



**BENEMÉRITA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE SUELOS  
I.C.B.U.A.P

**BIOESTIMULANTES MICROBIANOS Y LA BIOFORTIFICACIÓN  
EN EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE FRIJOL (*Phaseolus  
vulgaris* L.)**

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

YURIDIA POSADAS HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M. C. MOISÉS GRACIANO CARCAÑO MONTIEL

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DRA. LUCIA LÓPEZ REYES

ASESOR INTERNO DE TESIS:

QFB. GUILLERMO RUEDA LUNA



PUEBLA, PUE.

NOVIEMBRE, 2015

El presente trabajo fue financiado por el Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del I.C.B.U.A.P.

## DEDICATORIA

A Dios y a la vida por permitirme llegar hasta este punto y haberme dado salud y paciencia para lograr mis objetivos.

A mis padres Macedonio Posadas Silverio y Antonieta Hernández Rodríguez por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por su apoyo y amor incondicional, por su motivación constante y por sus consejos que me han permitido ser una persona de bien. Gracias.

A mi hermano Edy Abraham Posadas y a mi cuñada Adelina Mora por estar conmigo y ayudarme siempre, y a mi princesita Evelyn que fue un motivo más para salir adelante.

A mis abuelitos, tíos (as), primos (as) y demás familiares por sus palabras de aliento y por motivarme a seguir adelante.

A mi tío Primo Hernández, a mi abuelita Florencia Silverio y a mi tía Margarita Posadas que aunque físicamente ya no están a mi lado, fueron parte importante en mi motivación en este camino.

A José Aguilar León por su apoyo incondicional, por sus constantes palabras de aliento y por estar conmigo siempre.

A mis amigas y amigos que me brindaron su amistad sincera apoyándome cuando más lo necesitaba y nunca me dejaron sola.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a la Escuela de Biología por permitirme desarrollar mi formación académica en esta institución.

Al M. en C. Moisés Graciano Carcaño Montiel y a la Dra. Lucía López Reyes por toda su paciencia, apoyo y enseñanza durante la realización de este trabajo.

Al personal del Laboratorio de Microbiología de Suelos por ayudarme en las actividades de laboratorio y de invernadero requeridas para desarrollar este trabajo, por su amistad, paciencia y su confianza.

A los revisores de tesis, la Dra. Rocío Pérez y Terrón y al QFB. Guillermo Rueda Luna por sus aportaciones a este trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE CUADROS .....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
RESUMEN .....	vi
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1. Origen del frijol .....	3
2.2. El frijol y su importancia. ....	3
2.3. Fertilizantes químicos. ....	5
2.3.1. Daños ambientales que ocasionan los fertilizantes químicos. ....	6
2.3.2. Dosis de fertilización para el cultivo de frijol en Puebla. ....	7
<b>2.4. Biofortificación. ....</b>	<b>8</b>
2.4.1. Macroelementos y microelementos. ....	9
2.4.2. Fertilización foliar. ....	10
2.5. El Suelo.....	11
2.5.1. El fósforo en el suelo. ....	11
2.5.2. Diversidad microbiana en los suelos.....	12
2.5.2.1. Microorganismos benéficos. ....	13
2.6. Interacción planta-microorganismo. ....	14
2.7. Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	16
2.7.1. <i>Rhizobium</i> . ....	17
2.7.2. <i>Azospirillum</i> . ....	18
2.7.3. <i>Klebsiella</i> . ....	19
2.8. Microorganismos solubilizadores de fosfatos.....	20
2.8.1 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> . ....	21
2.8.2. <i>Chromobacterium violaceum</i> . ....	22
2.9. Control biológico. ....	22
2.9.1. <i>Trichoderma</i> .....	23
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>25</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>27</b>
<b>6. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
6.1. OBJETIVO GENERAL. ....	28
6. 2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	28

<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
7.1. Material biológico: Selección de semillas.....	29
7.2. Pruebas de sanidad de semillas. ....	29
7.3. Selección de bacterias y hongo. ....	29
7.4. Propagación de bacterias. ....	29
7.5. Preparación de biofertilizantes.....	30
7.6. Preparación de semillas.....	30
7.7. Inoculación de los microorganismos a las semillas.....	30
7.8. Preparación del suelo. ....	31
7.9. Siembra de semillas de frijol. ....	31
7.10. Diseño experimental. ....	31
7.11. Evaluación de parámetros fenológicos de las plantas de frijol.....	32
7.12. Análisis estadísticos.....	32
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
8.1. Sanidad de semillas.....	33
8.2. Preparación de inóculos.....	33
8.3. Porcentaje de germinación. ....	33
8.4. Medición de altura.....	34
8.5. Conteo del número de ramas formadas por efectos de la inoculación... 37	
8.6. Evaluación del número de hojas de plantas de frijol por efectos de la inoculación.....	39
8.7. Evaluación de la floración de plantas de frijol .....	41
8.8. Cuantificación del número de vainas en plantas de frijol inoculadas. ...	42
8.9. Cuantificación de la masa seca de las vainas, raíz y tallo de plantas de frijol. ....	44
8.10. Cuantificación de nódulos.....	47
<b>9. DISCUSIÓN. ....</b>	<b>49</b>
<b>10. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>56</b>
<b>11. SUGERENCIA .....</b>	<b>57</b>
<b>12. ANEXO .....</b>	<b>58</b>
<b>13. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Cepas bacterianas y fúngicas utilizados en el experimento de inoculación de frijol.....	29
<b>Cuadro 2.</b> Diseño experimental para la inoculación de biofertilizantes con bacterias, hongos a dos dosis de fertilización química en el cultivo de frijol, complementado con una biofortificación a base de una solución nutritiva. ....	31
<b>Cuadro 3.</b> Recuento microbiano de las poblaciones inoculadas por cada tratamiento. ....	33
<b>Cuadro 4.</b> Porcentaje de germinación de las semillas de frijol por cada tratamiento inoculado. ....	34
<b>Cuadro 5.</b> Efectos de la inoculación de bacterias un hongo y dos dosis de fertilización química en la medición de la altura en plantas de frijol. ....	35
<b>Cuadro 6.</b> Efectos de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química junto con la fertilización foliar en la mediación de la altura en plantas de frijol. ....	35
<b>Cuadro 7.</b> Efectos de la inoculación de bacterias, un hongo y dos dosis de fertilización química en el número de ramas en plantas de frijol. ....	37
<b>Cuadro 8.</b> Efectos de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química junto con la fertilización foliar en el número de ramas en plantas de frijol. ....	38
<b>Cuadro 9.</b> Efectos de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química en el número de hojas en plantas de frijol.....	40
<b>Cuadro 10.</b> Efectos de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química junto con la fertilización foliar en el número de hojas en plantas de frijol. ....	40
<b>Cuadro 11.</b> Efectos de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química con y sin fertilización foliar en la floración de plantas de frijol.....	41
<b>Cuadro 12.</b> Efectos de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química con y sin fertilización foliar en el número de vainas de plantas de frijol. ....	44
<b>Cuadro 13.</b> Efectos de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química con y sin fertilización foliar en la cuantificación de masa seca de vainas de plantas de frijol. ....	45

<b>Cuadro 14.</b> Cuantificación de masa seca de raíz de plantas de frijol derivado de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química con y sin fertilización foliar.....	46
<b>Cuadro 15.</b> Cuantificación de masa seca de tallo de plantas de frijol derivado de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química con y sin fertilización foliar.....	47
<b>Cuadro 16.</b> Cuantificación del número de nódulos por planta por efecto de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química con y sin fertilización foliar.....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Comparación de altura entre 3 tratamientos distintos y el control. ...	36
<b>Figura 2.</b> Comparación de altura y parte foliar de los tratamientos M4 y la mezcla de <i>T. asperellum</i> más <i>A. brasilense</i> 7A+10B respecto al control. ....	36
<b>Figura 3.</b> Comparación del número de ramas entre la mezcla de <i>A. brasilense</i> con <i>T. asperellum</i> respecto al control.....	38
<b>Figura 4.</b> Comparación en la etapa de floración entre el tratamiento 7A+10B y el control.....	42
<b>Figura 5.</b> Comparación del número de vainas entre la mezcla de <i>A. brasilense</i> y el control. ....	43
<b>Figura 6.</b> Comparación del número de vainas de <i>K. pneumoniae</i> y la mezcla de <i>T. asperellum</i> más <i>A. brasilense</i> ambas con fertilización foliar ante el control.	43
<b>Cuadro 13.</b> Efectos de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química con y sin fertilización foliar en la cuantificación de masa seca de vainas de plantas de frijol. ....	45
<b>Figura 7.</b> Comparación de raíz entre el control y la mezcla de <i>Rhizobium</i> y <i>Azospirillum</i> . ....	45
<b>Figura 8.</b> Pruebas de sanidad en semillas de frijol. ....	50

## RESUMEN

El aprovechamiento de los recursos naturales ha incrementado como alternativa para mejorar los cultivos de gran importancia para el hombre.

En México el frijol es la leguminosa más importante por: la superficie que se siembra, la actividad económica que genera y porque constituye la principal fuente de proteína en el sector de la población de bajos ingresos.

Existen microorganismos que pueden utilizarse en sustitución de los fertilizantes minerales solubles, ya que tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal debido a la solubilización de fosfato y la fijación biológica del nitrógeno entre otros mecanismos.

El grupo de bacterias al que se conoce como *Rhizobium*, induce en las raíces de las leguminosas, la formación de estructuras especializadas llamadas nódulos dentro de los cuales, el nitrógeno gaseoso es reducido a amonio por las bacterias a través de las enzimas llamadas nitrogenasa. Se estima que este proceso contribuye entre el 60-80 % de la fijación biológica de nitrógeno.

En este trabajo se utilizó frijol criollo negro nativo del municipio de Hueytlalpan Puebla, el frijol se inoculó con microorganismos fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos para obtener una mejor producción y al mismo tiempo disminuir el uso de fertilizantes químicos. Los microorganismos utilizados fueron: *Klebsiella pneumoniae*, *Rhizobium* sp. *Rhizobium tropici*, *Trichoderma asperellum*, *Azospirillum brasilense*, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Chromobacterium violaceum*. Se determinó el efecto de la aplicación de microorganismos benéficos y la biofortificación en el desarrollo de plantas del cultivo de frijol criollo negro en un ensayo de invernadero hasta la etapa de formación de vainas. Esta investigación se realizó en invernadero a una temperatura promedio de 28 °C, se utilizaron 12 tratamientos con 10 repeticiones en un diseño de bloques al azar. Cinco repeticiones de cada tratamiento se trataron con fertilización foliar y los parámetros evaluados fueron: el porcentaje de germinación, número de hojas, número de ramas, altura, el número de vainas, masa seca de raíz, y vainas, posteriormente se realizó el análisis estadístico.

De los microorganismos benéficos aplicados en plantas de frijol, los que presentaron un mayor porcentaje en los parámetros evaluados fueron la cepa KMT10-2 de *K. pneumoniae* con y sin fertilización foliar, la cepa de *Rhizobium*

*tropici* (CIAT 899) y la mezcla de *Trichoderma asperellum* con las cepas de *A. brasilense* junto con la fertilización foliar respecto a los demás tratamientos. La altura de las plantas se vio favorecida en el tratamiento inoculado con la cepa M4 de *Rhizobium* sp. y la mezcla de las cepas *C. violaceum* BUAP 35 más *A. calcoaceticus* BUAP 40 adicionando la fertilización foliar también presentó un incremento en comparación al control. La mezcla de *Trichoderma asperellum* con *Azospirillum brasilense* presentó incremento significativo con respecto al control en el número de ramas, sin embargo, a las plantas que se les aplicó la fertilización foliar la respuesta más óptima se observó en el tratamiento con *K. pneumoniae*. Las cepas que presentaron mejor respuesta en cuanto al número de hojas en plantas sin fertilización foliar fueron las cepas solubilizadoras de fosfatos, mientras tanto la fertilización foliar con *K. pneumoniae* resultó ser la más representativa.

Palabras clave: Cultivo de frijol, suelo, microorganismos, biofertilización, biofortificación.

## 1. INTRODUCCIÓN

El frijol en México se considera como estrategia en el desarrollo rural y social del país, ya que representa toda una tradición productiva y de consumo, cumpliendo diversas funciones tanto de carácter alimentario como para el desarrollo socioeconómico.

La planta de frijol es anual, herbácea, aunque es una especie termófila, es decir que no soporta heladas; se cultiva esencialmente para obtener la semilla, las cuales tienen un alto grado de proteínas de aproximadamente un 22%.

La creciente necesidad de producir alimentos a nivel mundial, nos impulsa a ser eficientes y efectivos en la generación de nuevas y mejores alternativas tecnológicas de producción de frijol, para ponerlas a disposición de los grandes, medianos y pequeños productores a nivel nacional. El frijol es vital en la dieta diaria de la población, superado en consumo solamente por el maíz (Danilo, 2011).

Los microorganismos benéficos del suelo han generado interés en su estudio, ya que pueden promover el crecimiento de las plantas y en algunos casos también pueden evitar la infección del tejido vegetal por patógenos. Los microorganismos de vida libre se asocian a partículas del suelo por lo que interactúan con las raíces de las plantas al encontrarse en los gránulos de suelo adheridos a las mismas en la rizósfera donde son capaces de ejercer un conjunto de interacciones producto de la competencia por nutrientes. Por medio de esta interacción se liberan compuestos orgánicos solubles por exudación de la raíz de la planta. (Bacilio-Jiménez *et al.*, 2003; Ahemad y Kribet, 2014).

Las bacterias benéficas del suelo juegan un papel importante para las plantas, ya que al asociarse con ellas pueden promover el crecimiento y desarrollo así como evitar la infección del tejido vegetal por otros organismos patógenos del suelo (Peña y Reyes, 2007).

El nitrógeno es un elemento necesario en la composición química de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares, siendo así una molécula esencial para el crecimiento de todos los organismos. En la atmósfera el nitrógeno ocupa aproximadamente el 80% en la forma diatómica  $N_2$ ; sin embargo, debido al triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, hace a la molécula inerte por lo que no puede ser aprovechado por la mayoría de las

formas vivientes, sino sólo por un pequeño grupo de microorganismos altamente especializados, que incluyen algas, bacterias y actinomicetos (Mayz, 2004). Para ser utilizado en el crecimiento, este debe ser primero reducido y luego “fijado” (combinado) en la forma de iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). El proceso a través del cual esos microorganismos reducen el nitrógeno hasta una forma utilizable es conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno. El proceso puede ser llevado a cabo por los microorganismos en vida libre o en simbiosis con plantas, y el mismo no solo permite usar el nitrógeno atmosférico sino también revertir o reducir la degradación del suelo (Parsons y Sunley, 2001).

Los altos costos de producción y los precios relativamente bajos del frijol que han prevalecido en los últimos años han originado que el cultivo del frijol haya sido desplazado, por otros más remunerativos. Los retos en el cultivo del frijol consisten en resolver los problemas del productor minifundista así como del productor de escala comercial, y en este último caso, generar tecnología que permita abatir los costos de producción del grano para que sean competitivos (Oliver-Rodríguez, 2004).

En este trabajo se proponen alternativas con las que se puede aprovechar los recursos naturales a través del uso de microorganismos benéficos mediante la implementación de biotecnologías que tengan bajos costos de producción y que no afecten el medio ambiente.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. Origen del frijol**

A partir del siglo XX los científicos empezaron a aceptar al Nuevo Mundo como centro de origen del frijol común basándose en las observaciones en restos arqueológicos, primero del Perú y tiempo después del Suroeste de los EE. UU. Y se concluyó que el frijol común se había originado en las Américas, lo que llevó a contradecir la creencia de un origen asiático que se había sostenido por muchos siglos, por ejemplo, como lo había sugerido Linneus que su origen había sido en la India. Más tarde fueron adicionando evidencias que afirmaban que *P. vulgaris* era de origen americano, basándose principalmente en datos arqueológicos, botánicos, históricos y lingüísticos (Rosas, 2003).

Los frijoles del género *Phaseolus* se domesticaron hace más de 7000 años. Durante este proceso el frijol se convirtió en uno de los tres cultivos principales de la milpa porque además de ofrecer vainas tiernas para su consumo inmediato, o semillas secas para su almacenamiento y posteriormente consumirlas, ayuda a fijar en el suelo el nitrógeno que el maíz requiere para crecer (Muñoz, 2010).

### **2.2. El frijol y su importancia.**

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa que ha formado parte de la dieta de muchos pueblos debido a su valor alimenticio. El consumo de frijol en el mundo no se ha generalizado como sucede con otros granos como el trigo o el maíz, sin embargo, es un grano cuyo consumo se encuentra localizado en algunos países de América y África. El grano de frijol contiene un 20-25% de proteínas, 1.6% de lípidos, aproximadamente un 60% de carbohidratos, además de calcio, fósforo y hierro, entre otros. Se considera que la rotación de cultivos (gramínea-leguminosa) es una alternativa de producción de la leguminosa, ya que reporta utilidades económicas y aporta nitrógeno al suelo (Salinas-García *et al.*, 2005).

Desde el punto de vista alimenticio, el género *Phaseolus* es muy importante, se siembra en todas las regiones agrícolas de México. Por lo que el frijol representa gran importancia desde enfoques diferentes como económico, biológico, alimentario y cultural. El frijol, es el segundo cultivo en importancia en cuanto a superficie sembrada y tiene un notable aporte proteico a la dieta

humana sobre todo en poblaciones rurales y sector urbano de escasos recursos (Basurto, 2000 citado por Reyes-Matamoros *et al.*, 2014).

En México se siembra más de un millón de hectáreas de frijol, localizadas principalmente en la región del altiplano semiárido entre 1800 y 2200 msnm, con una precipitación media anual de 200 a 400 mm (Kristin *et al.*, 1997 citado por Reyes-Matamoros *et al.*, 2014). El 85% de la superficie sembrada con cultivos de frijol se establece en el ciclo de primavera-verano principalmente bajo condiciones de temporal, con un rendimiento promedio de 554 kg ha<sup>-1</sup> (Acosta *et al.*, 1996 citado por Reyes-Matamoros *et al.*, 2014). El 45% de frijol que se consume en México es importado, esto debido a que el 60% de frijol se siembra en zonas sin potencial productivo y de bajos rendimientos, el 87.3% de la producción de frijol se produce en la temporada de lluvias, SAGARPA, 2008 citado por (Reyes-Matamoros *et al.*, 2014).

El frijol se cultiva principalmente en condiciones de temporal, cuyas siembras se establecen desde finales de mayo hasta principios de julio y es afectado por las plagas y enfermedades. Así mismo, como factores edáficos que varían entre localidades como: topografía, profundidad del suelo, para formar un ambiente de producción complejo del cultivo de esta leguminosa durante el año (INIFAP, 2004).

La producción de frijol tiene enorme tradición en México nuestro país, ya que por muchos años ha sido la principal fuente de alimentación. A pesar de su importancia, la leguminosa sigue siendo un producto muy sensible tanto a los aspectos climáticos, como a los económicos y comerciales. El frijol es quizá el ejemplo más típico del gran número de encadenamientos que origina una diversidad de agentes y un mercado con alto grado de intermediación (Barreiro, 1997).

El frijol constituye una de las leguminosas comestibles más importantes por ser un complemento nutricional indispensable en la dieta de los pobladores de México. El cultivo está concentrado en agricultores de pequeñas extensiones, la mayoría de los cuales no dispone de recursos técnicos ni financieros para su producción y comercialización (Acuña y Uribe, 1996).

De acuerdo a la bibliografía citada por (Reyes-Rivas *et al.*, 2008) diversos autores (Ortega, 1991; Kohashi, 1996; Castellanos *et al.*, 1997; Jacinto *et al.*, 2002; Pérez *et al.* 2002; Serrano y Goñi, 2004; Salinas *et al.*,

2005; Iniesta *et al.*, 2005; Herrera *et al.*, 2005), han destacado las propiedades nutritivas que posee el frijol, de manera fundamental por su alto contenido en proteínas y en menor medida en carbohidratos. Los resultados de dichos estudios demuestran las razones por las cuales las culturas mesoamericanas, desde tiempos inmemoriales basaron su alimentación en el frijol y el maíz, al igual de la razón por la que en la actualidad continúa siendo complemento básico entre la población de Mesoamérica.

México ocupa el quinto lugar en producción de frijol a nivel mundial (Reyes-Rivas *et al.*, 2008). Como el frijol y el maíz son la base de la alimentación en México, su cultivo es de suma importancia socioeconómica, tanto por la extensión de tierra que se ocupa para su producción así como por el consumo *per cápita* (Lara-Flores, 2015). Si se considera la preparación del terreno, la siembra, la fertilización, la labor del cultivo, el riego, el control de plagas y enfermedades y la cosecha; la producción de frijol tiene un costo directo aproximado a \$15,000.00 pesos por hectárea (SAGARPA, 2011-2012).

### **2.3. Fertilizantes químicos.**

Los nutrientes que las plantas requieren las toman del aire y del suelo. Si el suministro de nutrientes en el suelo es amplio, los cultivos tendrán mejor desarrollo y rendimiento. El crecimiento de las plantas es limitado y su rendimiento se reducirá si alguno de los nutrimentos es escaso. Por lo tanto, el uso de fertilizantes son necesarios para proveer a los cultivos con los nutrientes que no pueden adquirir del suelo para que de esta manera se obtengan mayor rendimiento el cual puede duplicarse o hasta triplicarse (FAO, 2002).

Los fertilizantes son los elementos nutritivos que se suministran a las plantas para complementar las necesidades nutricionales de su crecimiento y desarrollo, los cambios químicos generados en el suelo por el uso de los fertilizantes varían de acuerdo a la dinámica propia de cada elemento, la dosis y fuentes empleadas, los sistemas de aplicación y las características particulares del suelo, clima, entre otros. El incremento en el nivel del nutrimento aplicado, así como su persistencia y residualidad a través del tiempo, son aspectos importantes a tener en cuenta, junto con el efecto del

fertilizante sobre la reacción del suelo y la disponibilidad de otros elementos (Sadeghian, 2003).

La fórmula de fertilización recomendada para el cultivo de frijol en condiciones de riego es 60-40-00 (unidades de nitrógeno, fósforo y potasio), se aplica al momento de la siembra en el fondo del surco a una profundidad de 10 centímetros; lo que equivale a 130 kilogramos de urea y 87 kilogramos de superfosfato de calcio triple por hectárea ó 293 kilogramos de sulfato de amonio mezclados con 205 kilogramos de superfosfato de calcio simple. Bajo condiciones de temporal, se sugiere utilizar la fórmula 40-40-00, aplicando al momento de la siembra 87 kilogramos de urea más 87 kilogramos de superfosfato de calcio triple, ó 195 kilogramos de sulfato de amonio con 205 kilogramos de superfosfato de calcio simple por hectárea. El fertilizante debe cubrirse con una capa de tierra de seis centímetros de espesor para evitar que “queme” la semilla en germinación (INIFAP, 1997).

### **2.3.1. Daños ambientales que ocasionan los fertilizantes químicos.**

Los fertilizantes químicos, los abonos orgánicos y los mejoradores del suelo impactan en mayor o menor grado en el ambiente cuando son mal utilizados en la salud animal y humana (Cueto-Wong y Figueroa-Viramontes, 2012). La contaminación de aguas freáticas, eutrofización, aumento de gases de invernadero y acumulación de sustancias tóxicas en la cadena trófica, son algunos de los graves problemas que se presentan por el uso indiscriminado de agroquímicos.

Los daños al medio ambiente también incluyen: ensalitramiento de los suelos, pérdida de la fertilidad natural, lixiviación de nutrientes más allá de la zona radical de los cultivos, emisión de gases efecto invernadero y, contaminación de cuerpos de agua superficiales y subterráneos. Los daños en animales y humanos están fundamentalmente relacionados con el consumo de agua o alimentos contaminados con nutrientes que fueron aplicados en exceso (Cueto-Wong y Figueroa-Viramontes, 2012).

Los fertilizantes causan problemas ambientales debido al uso inadecuado que ha estos se les da, como por ejemplo, aplicarlos en exceso, cuando no se requieren, en la ubicación incorrecta, en la forma química inadecuada, sin conocer las propiedades físicas del suelo, entre muchas otras,

por ello, es recomendable informarse de todos estos factores antes de aplicar cualquier fertilizante químico (Stewart, 2007).

El nitrógeno es uno de los principales contaminantes de las aguas subterráneas, las plantas solo aprovechan aproximadamente un 50% del nitrógeno aportado en el abono, lo que significa que el resto se pierde ya que generalmente es lavado del suelo por el agua que se filtra hacia el subsuelo y que luego es arrastrado hacia los mantos acuíferos, ríos, embalses, etcétera, contaminando así el agua que es para el consumo humano (Stewart, 2007).

El exceso de la fertilización nitrogenada y su incorrecta aplicación son las causas que contribuyen a la contaminación por nitratos de las aguas subterráneas.

Los nitratos pueden ser reducidos a nitritos en el interior del organismo humano, especialmente en los niños menores de tres meses de edad y en adultos con ciertos problemas de salud. Los nitritos producen la transformación de la hemoglobina a metahemoglobina. La hemoglobina se encarga del transporte del oxígeno a través de los vasos sanguíneos y capilares, pero la metahemoglobina no es capaz de captar y ceder oxígeno de forma funcional. Una vez formados los nitritos pueden reaccionar con las aminas, sustancias ampliamente presentes en nuestro organismo, originando las nitrosaminas, un tipo de compuestos sobre cuya acción es cancerígena. Se ha comprobado que cuando las embarazadas ingieren cantidades altas de nitratos se eleva la mortalidad durante los primeros días de vida del hijo, principalmente debido a malformaciones que afectan al sistema nervioso central, al muscular o al óseo (Stewart, 2007).

### **2.3.2. Dosis de fertilización para el cultivo de frijol en Puebla.**

Se siembra en Puebla 60,000 hectáreas promedio con una producción de 24,000 toneladas y un rendimiento medio de 400 kilogramos por hectárea. En el estado de Puebla se recomienda usar la fórmula 50-40.5-00 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O) y al momento de la siembra se aplican 108 kg de urea y 89.5 kg de superfosfato de calcio triple por hectárea. El fertilizante debe cubrirse con una capa de tierra de ocho cm de espesor para evitar que “queme” la semilla en germinación (INIFAP, 1997).

Debido a que no existe una fórmula de fertilización para las siembras de frijol bajo temporal en el Distrito de Desarrollo Rural 02 de Zacatlán, se tomó como referencia las dosis para los distritos 04 Libres, 05 Cholula y 07 Tecamachalco de los cuales se tomó una media y la dosis que se utilizó fue 50-50-00 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O) (INIFAP, 1997).

#### **2.4. Biofortificación.**

La biofortificación, es la adición de elementos nutritivos a las plantas, mejorando en micronutrientes a las variedades de cultivos básicos, aumenta el valor nutricional de los alimentos que provienen de los vegetales. Es el desarrollo y la difusión de variedades de cultivos básicos mejorados en micronutrientes, es una intervención basada en la alimentación complementaria. El objetivo de la biofortificación es mejorar el contenido de micronutrientes en los cultivos de alimentos básicos que predominan en las dietas humanas a través de técnicas de cultivo de plantas, lo que resulta una mayor ingesta de micronutrientes. A diferencia de la fortificación comercial o alimentos fortificados, la biofortificación se dirige especialmente a las zonas rurales donde la producción y el consumo de cultivos de alimentos básicos son importantes (Meenakshi *et al.*, 2010).

Actualmente, la sociedad no solo demanda una gran producción, sino que necesita productos con una alta calidad nutricional, capaces de satisfacer las necesidades de alimento humanas tras su consumo. Los humanos requieren más de 22 elementos minerales para cubrir sus necesidades fisiológicas alimentarias. Algunos elementos requeridos en mayores cantidades son el Calcio (Ca) y el Fósforo (P), sin embargo, otros como las vitaminas, hierro (Fe), Zinc (Zn), Cobre (Cu) y Selenio (Se) sólo son necesarios en pequeñas cantidades (Welch y Graham, 2004; White y Broadley, 2005).

Las estrategias para aumentar la diversificación de la dieta, la suplementación mineral y el enriquecimiento de los alimentos no siempre han tenido éxito. Por esta razón, la biofortificación de cultivos a través de la aplicación de fertilizantes minerales complejos, en combinación con las variedades de reproducción con una mayor capacidad para adquirir elementos minerales, se defiende como una estrategia inmediata no sólo para aumentar

las concentraciones de minerales en cultivos comestibles, sino también para mejorar los rendimientos de los suelos infértiles (White y Broadley 2009).

Para aumentar las concentraciones minerales en los tejidos comestibles, sin pérdida de rendimiento, debe haber aumento de la captación por las raíces (de minerales presentes en la solución del suelo) o de las hojas (por foliar minerales aplicados), una redistribución efectiva dentro de la planta a la parte comestible y la acumulación en los tejidos comestibles no debe ser tóxica (Welch y Graham, 2005).

Estudios en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) mostraron que ciertas variedades de frijol común tenían entre el 60 y 80% más de zinc que los de las variedades cultivadas comercialmente. Los esfuerzos de mejoramiento se pueden emplear para incorporar niveles más altos de zinc en variedades de frijol mejoradas (Khush *et al.*, 2012).

#### **2.4.1. Macroelementos y microelementos.**

La nutrición vegetal es el proceso mediante el cual la planta absorbe del medio que le rodea las sustancias necesarias para llevar a cabo su metabolismo y en consecuencia, crecer y desarrollarse. Una característica particular de las plantas verdes es que las sustancias requeridas para su alimentación son exclusivamente de tipo mineral o inorgánico.

Recientemente se han descrito elementos los cuales son esenciales en las funciones específicas en la vida de las plantas y de los que se pensaba les serían tóxicos, como por ejemplo el níquel (Ni), considerado un elemento tóxico para las plantas superiores, sin embargo, estimula la germinación y el crecimiento de varios cultivos, además de ser esencial para un gran número de bacterias, como componente metálico de las enzimas ureasa y de muchas hidrogenasas (Malavolta y Moraes, 2005). Cuando hay deficiencia de este elemento en leguminosas, disminuye la actividad de la enzima ureasa, por lo que presentan como una necrosis en la punta de las hojas provocada por la acumulación de niveles tóxicos de urea, por lo tanto, se requiere un suministro adecuado de Ni para maximizar el crecimiento de las plantas y la absorción de urea en la raíz. Se ha demostrado que la adición de Ni en solución de nutrientes no sólo alivia los síntomas de toxicidad asociados con la

acumulación de urea, sino también mejora el crecimiento de las plantas alimentadas con urea como fuente única de nitrógeno (Kutman, *et al.*, 2014).

El cobalto (Co) es benéfico y aplicado en la agricultura en varios cultivos junto con el molibdeno (Mo), además es esencial para fijadores libres y simbióticos en el proceso de fijación biológica de N atmosférico e interviene en el metabolismo de los carbohidratos y de las proteínas en la vida de las plantas superiores (Ortega y Malavolta, 2012).

El magnesio (Mg) participa en el crecimiento de las plantas principalmente en la formación de raíces, clorofila y fotosíntesis. Por consiguiente si el Mg es deficiente entonces los procesos fisiológicos y bioquímicos que realiza en la planta serán afectados y provocara poco crecimiento y por tanto un rendimiento menor por lo que ya es considerado un elemento mineral necesario en grandes cantidades (White y Brown, 2010).

#### **2.4.2. Fertilización foliar.**

La fertilización foliar se define como el paso de sustancias a través de las hojas. Es una herramienta importante para el manejo sostenible y productivo de los cultivos. La fertilización foliar consiste de la aplicación de los fertilizantes para que sean absorbidos por las hojas ya que de esta forma es más rápido, se suelen aplicar para resolver alguna deficiencia nutricional. Las principales razones para el uso de la fertilización foliar son:

1. Limitación de la disponibilidad de los nutrimentos aplicados al suelo.
2. En condiciones en que se pueden producir altas tasas de pérdida de nutrientes aplicados al suelo.
3. Cuando la etapa de crecimiento de las plantas, la demanda interna de la planta y las condiciones ambientales interactúan para limitar el suministro de nutrientes a los órganos vitales de la planta.

En los últimos años se ha incrementado el uso de los fertilizantes foliares en la agricultura comercial, ya que es una técnica que provee los nutrimentos que requiere el cultivo como suplemento a la fertilización al suelo. (Romheld y El-Fouly, 2002; Trejo-Téllez *et al.*, 2007).

Las aplicaciones foliares con sales de Ni son muy efectivas para combatir la roya de los cereales por su toxicidad para el patógeno y por la resistencia que otorga en el hospedero (Malavolta y Moraes, 2005).

En los cultivos de leguminosas que forman nódulos con bacterias del género *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*, el cobalto (Co) se aplica principalmente en aspersiones foliares (White y Brown, 2010).

## **2.5. El Suelo.**

El suelo se define como el material mineral no consolidado en la superficie terrestre, también es considerado un cuerpo natural involucrado en interacciones dinámicas con la atmósfera y con los estratos que están debajo de él, que influye en clima y en el ciclo hidrológico del planeta, y que sirve como hábitat de diversos organismos. Además se puede considerar como un reactor bio físico-químico donde se lleva a cabo la descomposición de material de desecho que se recicla dentro de él (SEMARNAT, 2004).

Suelo, es el término colectivo de cuerpos naturales, formados a partir de materiales minerales y orgánicos, que cubren mucha de la superficie terrestre, que contienen materia viva y que pueden soportar vegetación en forma natural, y en algunos lugares han sido transformados por la actividad humana (Soil Survey Staff, 1995).

### **2.5.1. El fósforo en el suelo.**

La disponibilidad del fósforo en el suelo es esencial para el crecimiento vegetal ya que constituye más de un 0.2% del peso seco de la planta. Después del nitrógeno, el fósforo es el elemento más crítico para la producción agropecuaria, pero debido a la insuficiencia de sus fuentes naturales, a su relativa escases edáfica, a la elevada retención de la matriz del suelo, la falta de reposición natural y por su baja movilidad en comparación con otros nutrientes, su disponibilidad ha ido disminuyendo (Beltrán, 2014).

El fósforo es un nutriente importante en las plantas para que lleven a cabo diversos procesos metabólicos tales como la división celular, el transporte de energía, transducción de señales, la biosíntesis macromolecular, la fotosíntesis y la respiración. La presencia de fósforo en el suelo es en forma orgánica e inorgánica, lo que representa el 0.05% de la composición del suelo aproximadamente, sin embargo, sólo el 0.1% del fósforo total está disponible para las plantas (Khan *et al.*, 2009; Ahemad *et al.*, 2009; Shenoy y Kalagudi 2005).

Los microorganismos asociados con las raíces pueden incrementar el crecimiento de las plantas y su productividad y son reconocidos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV o PGPM por sus siglas en Inglés Plant growth promoting microorganisms) (Rosas *et al.*, 2006). Dentro de los PGPM se encuentran los microorganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) ya que están involucrados en un amplio rango de procesos que afectan la transformación del fósforo, debido a que son componentes integrales del ciclo edáfico de este nutriente (Fankem *et al.*, 2006). Los MSF movilizan fosfato inorgánico insoluble desde la matriz mineral hasta el suelo donde puede ser absorbido por las raíces, y las plantas les suministran compuestos carbonados que son metabolizados para el crecimiento microbiano (Pérez *et al.*, 2007).

### **2.5.2. Diversidad microbiana en los suelos.**

El suelo es el lugar con una mega diversidad de microorganismos y es la zona de la rizósfera dónde existe la mayor diversidad microbiana. Se puede considerar que el suelo es como “un ser vivo” ya que cumple con las descripciones clásicas para ello: “nace, crece, se reproduce y muere”. Es decir, el suelo presenta una dinámica como un ecosistema estable y sustentable para el grupo microbiano, los aportes de materia orgánica e inorgánica mantienen una inmensa cantidad de microbios los cuales se encuentran en proceso de descubrimiento. Los desechos humanos y animales, sus cuerpos y los tejidos de vegetales llegan al suelo y allí se transforman, por la presencia de los microorganismos. Por otro lado, los microorganismos liberan sustancias útiles para las plantas de tal manera que sin la actividad microbiana del suelo la vida se extinguiría gradualmente (Toro y Daniel, 2004).

Los microorganismos se encuentran prácticamente en todas las regiones del planeta, desde ambientes bajo el punto de congelación y muy secos, hasta con temperaturas altas y con elevada precipitación pluvial. Su presencia y actividad es esencial para la salud y funcionamiento adecuado de todos los ecosistemas, degradan la materia orgánica haciéndola nuevamente disponible para las plantas, otros han jugado un papel significativo en relación con el hombre y su productividad, participan en la agricultura y en la elaboración de alimentos y medicinas (Lozada, 2004).

En el sistema suelo ocurren diversas relaciones entre grupos microbianos que estimulan o inhiben la proliferación de alguno de esos grupos. La diversidad microbiana favorece la búsqueda de microorganismos con actividad fisiológica específica. En el suelo existen bacterias y hongos benéficos que mediante su uso es factible la obtención de incrementos significativos en el crecimiento vegetal (Alarcón y Ferrera, 2012).

#### **2.5.2.1. Microorganismos benéficos.**

Entre los microorganismos benéficos están aquellos que fijan nitrógeno atmosférico, descomponen desechos y residuos orgánicos, desintoxican el suelo de pesticidas, suprimen enfermedades de plantas y patógenos del suelo, incrementan el reciclaje de nutrientes y producen componentes bioactivos como vitaminas, hormonas y enzimas que estimulan el crecimiento de las plantas. La aplicación de microorganismos benéficos como proveedores de nutrientes presenta una estrategia económica y ambientalmente prometedora que puede ayudar en la reposición y el mantenimiento de la fertilidad del suelo a largo plazo, proporcionando buena actividad biológica del mismo mediante la supresión de los microorganismos patógenos que existen en el suelo a través de la actividad microbiana en la rizósfera; y para mejorar la salud de las plantas (Zaidi *et al.*, 2010).

Los PGPM pueden afectar el crecimiento vegetal por un amplio rango de mecanismos como solubilización de fosfato inorgánico, disminución de los niveles de etileno en plantas, fijación de nitrógeno atmosférico, biocontrol de enfermedades de plantas y producción de fitohormonas, sideróforos y ácidos orgánicos (Ahemad y Kibret, 2014).

Una clasificación más específica de los microorganismos benéficos ha sido sugerida por Higa (Bhattacharyya y Jha, 2012), quien hace referencia a los “microorganismos efectivos” o ME, cuyo rol y aplicación de microorganismos benéficos incluyendo a los ME es factible, como inoculantes microbianos para lograr un equilibrio microbiológico del suelo de manera que puedan mejorar su calidad, incrementando la producción y protección de los cultivos, conservando los recursos naturales y creando una agricultura y medio ambiente más sostenibles (Bhattacharyya y Jha, 2012).

## **2.6. Interacción planta-microorganismo.**

Existe una amplia gama de interrelaciones entre especies de microorganismos en los ecosistemas, tales como sinérgicas, antagónicas, de competencia física y química, moduladas por múltiples y complejos factores bióticos y abióticos. En la rizósfera, uno de los principales sitios donde se presentan microorganismos, especialmente funcionales, como fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos, promotores del crecimiento vegetal, biocontroladores y especies patogénicas, normalmente compiten por espacio y por nutrientes. Estas interrelaciones entre microorganismos inciden en interacción suelo-planta-microorganismos-ambiente y repercuten en forma directa, en el crecimiento y en el desarrollo de las especies vegetales (Cano, 2011).

Actualmente es de interés restaurar la microbiota del suelo mediante estrategias que permitan mejorarlo en relación a la productividad agrícola y de manera no contaminante. El uso indiscriminado de insumos inorgánicos ha alterado significativamente los constituyentes orgánicos y vivos del suelo, y con ello su equilibrio, modificando principalmente las actividades metabólicas de las diferentes poblaciones microbianas del agroecosistema. Barea *et al.* (2005), señalan que la disponibilidad de nutrimentos en el suelo a través de las interacciones biológicas benéficas (sinérgicas) entre los diversos componentes que promuevan los procesos ecológicos, debe ser comprendida y manejada en la explotación sostenible de los suelos. En general, los microorganismos desarrollan actividades relacionadas con los procesos de descomposición y mineralización de complejos orgánicos y la translocación de bioproductos y elementos minerales que conllevan la movilización de los nutrimentos en el ecosistema suelo-planta. Se plantea que el uso constante de agroquímicos en la agricultura ha motivado a mejorar la comprensión de las actividades cooperativas que se establecen en el suelo entre la microbiota y las plantas y que si bien la microbiota también afecta el crecimiento de las plantas y las cadenas tróficas del suelo, los microorganismos deben entenderse como asociaciones microbianas que interactúan entre sí (Barea *et al.*, 2005). El suelo es un sistema complejo donde un gran número de poblaciones microbianas interactúan con los diversos sustratos, estando muchas de estas poblaciones asociadas a las raíces de las plantas en la zona rizosférica. En la rizósfera hay

expresión de relaciones simbióticas mutualistas entre microorganismos y plantas, debido a la exudación de nutrimentos orgánicos útiles para el metabolismo microbiano ya que la raíz proporciona un nicho ecológico. Los microorganismos, a la vez, participan en numerosos beneficios, como: influencia en el crecimiento radical, regulación de la actividad metabólica de la raíz e influencia en las propiedades físicas y químicas del suelo, así como de los contaminantes (González-Chávez, 2005).

La síntesis de fitohormonas como las auxinas, particularmente el ácido indol-3-acético (AIA), promueven el crecimiento de las raíces y la proliferación de pelos radicales, lo que mejora la absorción de agua y minerales del suelo y con ello el desarrollo de las plantas (Caballero-Mellado, 2006).

Se ha encontrado además que las PGPR pueden suprimir enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos a través de la producción de sideróforos, síntesis de antibióticos, enzimas y/o compuestos fungicidas (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

La información sobre la actividad de las bacterias en la naturaleza, se puede obtener del trabajo con plantas cultivadas a partir de tejidos, donde las dificultades observadas con frecuencia durante la producción de plantas libres de microbios, indica la sólida asociación que las bacterias han desarrollado con sus plantas huésped. Con frecuencia se ha dicho que todas las plantas en la naturaleza albergan bacterias, lo cual ha sido verificado en gran variedad de plantas, donde algunas de ellas ofrecen a las bacterias mejores o peores condiciones debido a las grandes cantidades de alcaloides con propiedades antimicrobianas dentro de su apoplasto. Cuando se observa una ausencia de bacterias, generalmente se atribuye a métodos de aislamiento inadecuados, densidades poblacionales inferiores a los niveles de detección, o incapacidad de las bacterias para ser cultivadas. Estos factores subrayan la importancia de mejorar los métodos de detección y de desarrollar marcadores altamente sensibles y específicos para las bacterias. Los métodos moleculares son prometedoras herramientas para la exploración de este grupo de bacterias no cultivables (Hallmann *et al.*, 1997).

## **2.7. Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.**

Las RPCV son bacterias capaces de estimular el desarrollo de las plantas de manera directa e indirecta y poseen una serie de mecanismos complejos que interactúan entre sí para establecer relaciones benéficas, especialmente con las raíces de las plantas objetivo.

Las bacterias solubilizadores de fósforo pueden ser de vida libre en el suelo o establecer relaciones simbióticas con algunas plantas, son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de la planta y favorecer su crecimiento o desarrollo por medio de la solubilización de fósforo inorgánico de diferentes compuestos como son el fósforo dicálcico, fósforo tricálcico y rocas fosfóricas (Patiño, 2010).

La actividad de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal en general se inicia con mecanismos de quimiotaxis que están relacionados con la presencia de flagelos, quimiorreceptores y sistemas de regulación codificados genéticamente. Estos factores tienen gran importancia sobre la habilidad de colonizar la rizósfera y mantener la comunicación entre las células de la raíz con los microorganismos presentes en el suelo (Camelo, 2011). Las bacterias capaces de interactuar con las raíces de las plantas, son atraídas por sustancias excretadas por la raíz, que ocasionan el movimiento de la bacteria hacia el rizoplasma de la planta y de esta forma dan inicio a una relación de beneficio mutuo. Las metodologías usadas para determinar la respuesta quimiotáctica de los microorganismos han evolucionado y actualmente hay algunas herramientas claves que dan claridad sobre este fenómeno (Ahmad, 2006).

La atmósfera contiene un 79% de nitrógeno, el nutriente más limitante para el crecimiento de los organismos, el nitrógeno es uno de los elementos principales en el crecimiento vegetal. Las bacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico se conocen como diazotrofos, los cuales se encuentran integrados por algunos géneros como: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Azospirillum*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Klebsiella* entre otros (Roper y Ladha, 1995).

### **2.7.1. *Rhizobium*.**

De los grupos microbianos que establecen relaciones con las plantas, los fijadores de N son unos de los más importantes. Sin embargo, sólo con el género *Rhizobium* simbiote de las leguminosas, se ha podido establecer un sistema de inoculación que se utiliza en muchas regiones del mundo.

La relación simbiótica que hay entre el género *Rhizobium* y las leguminosas como el frijol, ha tomado gran interés tanto en la producción como en la comercialización, debido a que los fertilizantes químicos conllevan a más contaminación, por lo que los microorganismos han tomado un lugar importante en biofertilizantes como alternativa ante los fertilizantes químicos (Hernández *et al.*, 2001).

La fijación de nitrógeno es un proceso tan importante para el desarrollo de las plantas y la industria ha creado numerosos fertilizantes químicos, como el nitrato de potasio (un compuesto asimilable por las plantas). En la atmosfera existe una gran cantidad de nitrógeno no asimilable ( $N_2$ ). Para poder descomponer los enlaces en una molécula de  $N_2$  son necesarias dos atmósferas de presión y una temperatura de 550 °C. Además, al ser mal utilizados, se infiltran en los mantos freáticos, contaminándolos y robando el oxígeno a la fauna acuática, especialmente a los peces. Por lo tanto, es muy importante el estudio de la fijación de nitrógeno hecha por los microorganismos, como *Rhizobium*; para que de tal manera el uso de fertilizantes químicos pueda reducirse, ayudando así al ambiente (Gartland *et al.*, 2011).

Para que se lleve a cabo la infección de *Rhizobium* a la planta de frijol primeramente es atraída por un compuesto químico liberado por la planta cuando a ésta le falta nitrógeno. La bacteria se introduce a la planta por el pelo de la raíz formando lo que se denomina como hilo infeccioso. A través de éste, *Rhizobium* se introduce a la planta e infecta las células corticales por medio de un proceso endocítico, en el cual están involucradas una serie de proteínas que inhiben la maduración del endosoma evitando que éste sea degradado en la vacuola. Estando la bacteria en la raíz de la planta formará nódulos en éstas; y ahí, se llevará a cabo la fijación de nitrógeno. Algunos ejemplos de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal son: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* de la familia *Rhizobiaceae* (Ahemad y Kibret, 2014).

### **2.7.2. *Azospirillum*.**

*Azospirillum* es la bacteria asociativa más estudiada. Afecta positivamente a una gran diversidad de plantas agrónomicamente importantes. Ha sido aislada de diferentes regiones geográficas a partir de una gran variedad de cultivos pertenecientes a diferentes familias botánicas. La primera especie de *Azospirillum* fue aislada en Holanda por Beijerinck (1925) a partir de suelos arenosos, pobres en nitrógeno y fue originalmente llamada *Spirillum lipoferum*. de-Bashan (2007), menciona que en 1978, después de sucesivos aislamientos se propuso a *Azospirillum* como género con base en diferencias morfológicas y fisiológicas entre varias cepas aisladas y en experimentos sobre homología del ADN (Falk *et al.*, 1986), distinguiendo dos especies: *A. brasilense* y *A. lipoferum*. Siendo que la mayoría de las cepas aisladas pertenecen a las especies *A. brasilense* o *A. lipoferum* (Krieg y Döbereiner, 1986). Posteriormente se han descrito tres especies más: *A. amazonense* (Falk *et al.*, 1985; aislada de pastos en el área del Amazonas en Brasil; la especie halo-tolerante *A. halopraefereans*, asociada exclusivamente a raíces del pasto Kallar (Reinhold *et al.*, 1987) y la especie que degrada pectina aislada a partir de raíces de arroz, *A. irakense* (Khammas *et al.*, 1989; Khammas y Kaiser, 1991). *A. largimobile* (Sly y Stackebrandt, 1999) y *A. doebereineriae* (Eckert *et al.*, 2001), *A. oryzae* (Xie y Yokota, 2005), *A. melenis* (Peng *et al.*, 2006), *A. canadense* y *A. zae* (Mehnaz *et al.*, 2007), *A. rugosum* (Young *et al.*, 2008), *A. picis* (Lin *et al.*, 2009), *A. palatum* (Zhou *et al.*, 2009) y *A. thiophilum* (Lavrinenko *et al.*, 2010),(de-Bashan, 2007). Las especies de *Azospirillum* están ampliamente distribuidas, especialmente en los suelos tropicales, subtropicales y regiones templadas de todo el mundo, donde están frecuentemente asociadas a gramíneas, cereales, y otros cultivos de importancia agroeconómica; así como de suelos contaminados con hidrocarburos (de-Bashan, 2007).

Carcaño-Montiel, 2003; Osorio-Tepeyahuitl, 1998 comentan que la bacteria fijadora de nitrógeno del género *Azospirillum* ha tenido mucha atención por encontrarse asociada con gran cantidad de plantas importantes agrónomicamente. Además, ha sido asociada con la raíz, el tallo y las semillas de diversas plantas como el maíz (CONABIO, 2011).

El nombre *Azospirillum* proviene del francés Azote, que significa nitrógeno y del grupo *Spirillum*, pequeña espiral. Las bacterias pertenecientes a este género son organismos fijadores de N<sub>2</sub> que poseen una amplia distribución ecológica, ya que ha sido posible detectar su presencia en zonas templadas, tropicales y subtropicales (Pazos, 2000; Velazco, 2001.)

La inoculación de plantas con *Azospirillum* puede provocar cambios significativos en varios parámetros de su crecimiento, los cuales pueden afectar o no el rendimiento del cultivo. Esta bacteria beneficiosa, general y no específica es notoria por sus efectos sobre plantas comerciales pastos y plantas de cereales cultivadas como trigo, además de producir asociaciones con varias plantas suculentas desérticas (Dosreis, 2000).

### **2.7.3. Klebsiella.**

*Klebsiella* es una bacteria fijadora de nitrógeno de vida libre y contribuye a que los agricultores economicen en fertilizantes nitrogenados conservando el ambiente (Mantilla *et al*, 2007).

Holt, 1994 menciona que el género *Klebsiella* cuenta con 5 especies tales como: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxitoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella terrigena* y *Klebsiella mobilis*, son bacilos Gram negativos, aeróbicos y anaerobios facultativos, sin movilidad, entre otras características (Mantilla *et al*, 2007).

Los microorganismos del género *Klebsiella* son bacilos Gram negativos inmóviles que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. El género *Klebsiella* está formado por varias especies, entre las que se encuentran *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, La capa más externa de *Klebsiella* spp. está formada por una gran cápsula de polisacáridos que diferencia a estos microorganismos de otros géneros de las Enterobacterias. Aproximadamente del 60 al 80% de los microorganismos del género *Klebsiella* fueron aislados de muestras de heces y pertenecen a *K. pneumoniae*, además de que dan positivo en la prueba de coliformes termotolerantes. *Klebsiella oxytoca* también se ha identificado como microorganismo patógeno (Rosenblueth *et al*. 2004).

Recientemente, tres especies ambientales (*Raoultella ornithinolytica*, *Raoultella planticola* y *Raoultella terrigena*) previamente consideradas como género *Klebsiella* han sido reclasificadas en el género *Raoultella* (Arenas *et al.*,

2009). Sobre la base de gen *rpoB* surgió la propuesta de transferir algunas de las especies de *Klebsiella*, como *K. planticola*, *K. terrigena* y *K. ornithinolytica*, al nuevo género *Raoultella* (Drancourt *et al.* 2001). La mayoría pertenecen a *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *K. granulomatis* (Carter *et al.* 1999), pero una proporción menor corresponde a *Raoultella planticola* y *R. terrigena*. Los análisis filogenéticos basados en genes evolutivamente conservados han permitido establecer relaciones evolutivas entre estas especies, en los cuales se evidencia una alta heterogeneidad genotípica y el carácter polifilético de algunas especies en el género *Klebsiella* (Arenas *et al.*, 2009). Recientemente en base a las secuencias genéticas y usando el sistema de árboles filogenéticos del complejo *Klebsiella/Raoultella* muestran que las especies del género *Raoultella* son: *R. ornithinolytica*, *R. planticola*, *R. terrigena* y *R. eléctrica* (Kimura *et al.*, 2014).

## **2.8. Microorganismos solubilizadores de fosfatos.**

El fósforo (P) es abundante en el suelo, su disponibilidad es limitada en las plantas debido a la fijación por otros elementos del suelo, tales como fosfatos insolubles de hierro, aluminio y calcio. La fracción de fósforo disponible y la concentración en la solución del suelo pueden ser insuficientes para satisfacer requerimientos de la planta (Beltrán, 2014).

La deficiencia de fósforo puede limitar severamente el crecimiento de la planta y la productividad particularmente en las legumbres, en donde las plantas y las bacterias simbióticas se ven afectados, y esto puede tener un efecto perjudicial sobre la formación de nódulos, el desarrollo, y la función (Divito y Sadras, 2014).

La habilidad de la planta para sobrevivir en suelos con baja disponibilidad de fósforo está asociada con la presencia de ácidos orgánicos que forman complejos con el hierro o aluminio dando como resultado la liberación del fósforo (Noriharu, *et al.*, 1990).

Los mecanismos microbianos para llevar a cabo la solubilización de fosfatos parecen estar basados en el hecho de que estos microorganismos producen ácidos orgánicos como: cítrico, málico, oxálico, glucónico, glutárico, que hacen disponible el fósforo para las plantas (Storcksdieck y Hurrell, 2008). Sin embargo, Illmer y Schinner (1995), han demostrado que algunos de estos

microorganismos son muy efectivos en la solubilización de fosfatos insolubles de calcio sin que produzcan ácidos orgánicos. Muchas raíces de las plantas y microorganismos del suelo pueden incrementar la disolución de compuestos fosforados por la liberación de CO<sub>2</sub> y ácidos orgánicos en la solución del suelo, el HCO<sub>3</sub> promueve la disolución ácida de fosfatos de calcio y magnesio. Similarmente la acidez producida por bacterias nitrificantes y oxidantes del azufre promueve la solubilización de sales de fósforo soluble. Un amplio rango de ácidos orgánicos son producidos por microorganismos y plantas y muchos actúan como agentes quelantes para solubilizar fosfatos de aluminio, hierro, calcio y magnesio resultando en la liberación de fosfatos a la solución del suelo (Illmer y Schinner, 1995).

Otro de los mecanismos que pudieran estar involucrados en la solubilización de fósforo es la actividad de enzimas fosfatasas que liberan al fósforo de los sustratos orgánicos y que actúan en muchos sustratos, debido a que su acción es específicamente sobre los enlaces tipo éster que unen la fracción orgánica con la mineral, La actividad de esta enzima en la rizósfera puede originarse de la raíz, de hongos (ectomicorrizas) y/o de bacterias (Chabot *et al.*, 1996).

Las bacterias solubilizadoras de fósforo movilizan este elemento a formas solubles a través de acción enzimática. Así la interrelación de los procesos antes mencionados da como resultado una mayor disponibilidad del fósforo para los cultivos; por otro lado el efecto de la fosfolubilización parece ser el mecanismo más importante en la promoción del crecimiento de las plantas, cuando la disponibilidad de fósforo se ve incrementada por la acción de los microorganismos fosfolubilizadores (Chabot *et al.*, 1996).

### **2.8.1 *Acinetobacter calcoaceticus*.**

El género *Acinetobacter* está formado por cocobacilos (con forma de bastón corto y grueso) Gram negativos, oxidasa negativa, no móvil y no fermentativa. Aerobios estrictos y patógenos oportunistas en humanos (Singleton, 1997). Algunas cepas pueden utilizar un límite restringido de azúcares además de ser resistentes a la penicilina (Brock y Madigan, 1993). Las especies de este género están ampliamente distribuidas en la naturaleza y en los ámbitos hospitalarios son los segundos más comunes (Murray *et al.*,

1999). Ha sido aislado de superficie de hojas, rizósfera del suelo, agua dulce y ambientes estuarinos (Austin y Priest, 1992). Se encontraron dos especies diferentes *A. calcoaceticus* y *A. baumannii*, ambas resistentes a antibióticos (Murray *et al.*, 1999) y que de acuerdo a las pruebas complementarias del sistema API la diferenciación se hace por el crecimiento de *A. calcoaceticus* a 42°C. La cepa BUAP 39 se identificó como *A. baumannii*, considerada como una especie clínica no hemolítica que oxida la glucosa (Murray *et al.*, 1999; Salas, 2000).

### **2.8.2. *Chromobacterium violaceum*.**

El género *Chromobacterium* se caracteriza por ser bacilo Gram negativo, aerobio facultativo de afiliación taxonómica incierta (Brock y Madigan, 1993). Aislado de superficies de hojas, rizósfera del suelo, agua dulce y ambientes estuarinos (Austin y Priest, 1992). Es un microorganismo pigmentado que se encuentra en el suelo y ocasionalmente en infecciones piogénicas del hombre o algunos animales (Brock y Madigan, 1993). Fue aislado del rizoplaneo de cultivos de maíz y se identificó mediante el sistema API 20 E. como *C. violaceum*. Su capacidad como microorganismo solubilizador de fosfatos insolubles es desconocido, sin embargo, la cepa BUAP 35 solubilizó  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , el  $\text{AlPO}_4$ , el  $\text{FePO}_4$  y el fosfato orgánico en la fosfolubilización *in vitro*, a pesar de que no se detectó actividad fosfatasa por lo que la fosfolubilización probablemente se debe a otro mecanismo (Salas, 2000).

### **2.9. Control biológico.**

El control biológico es un método en el que se emplean organismos vivos para reducir la densidad de la población de otros organismos plaga. Una plaga es cualquier organismo que produce daño o reduce la disponibilidad y la calidad de un recurso humano. Los recursos abarcan desde la salud humana hasta plantas o animales destinados a fines alimenticios o de producción (Fischbein, 2012).

El concepto de control biológico involucra la acción de organismos benéficos sobre organismos plaga. Van Driesche *et al.*, (2007) definen el control biológico como el uso de enemigos naturales, para disminuir la población de uno o más organismos plaga a densidades menores ya sea de forma temporal o permanente. Smith fue el primero en utilizar el término control

biológico, enfatizando en el uso de enemigos naturales para el control de insectos plaga (Rodríguez y Arredondo, 2007).

### **2.9.1. *Trichoderma*.**

*Trichoderma* es un género de hongos que se encuentra en los suelos de todas las zonas climáticas del mundo y son importantes descomponedores de materiales leñosos y herbáceos. *Trichoderma* es un hongo invasor oportunista, que se caracteriza por su rápido crecimiento, por la capacidad de asimilar una amplia gama de sustratos y por la producción de una variedad de compuestos antimicrobianos. Algunas cepas han sido explotadas como agentes de control biológico de patógenos, incluyendo hongos y nemátodos, todo mediado por la producción de enzimas de degradación de la pared celular, como: celulasas, quitinasas, glucanasas, entre otras, y la producción de antibióticos. También han sido usadas en biorremediación, por su capacidad de degradar hidrocarburos, compuestos clorofenólicos, polisacáridos y los plaguicidas xenobióticos, utilizados en la agricultura (Verma *et al.*, 2007; Vinale *et al.*, 2008; Hoyos *et al.*, 2009).

Igualmente, debido a la existencia de transposones ABC en sus moléculas (Hoyos *et al.* 2009), se considera estimulador del crecimiento vegetal (Leandro *et al.* 2007) e inductor de resistencia sistémica, debido a que modula o estimula algunas respuestas en la planta (Howell y Puckhaber, 2005; Howell, 2006).

*Trichoderma* es un hongo aeróbico, con capacidad para resistir un amplio intervalo de temperaturas, así por ejemplo, Adelman aislaron una cepa en suelo de Alaska, con crecimiento a 4 °C y que toleró hasta 33 °C (Adelman, 1992).

Se han implementado estrategias de control biológico a partir de aislamientos nativos del hongo *Trichoderma* gracias a sus propiedades como biofertilizante y bioestimulante ya que ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y de esa manera aprovechar una fuente nutricional adicional. Los efectos que ejerce la inoculación de plantas con *Trichoderma* son: control biológico de enfermedades causadas por patógenos en la raíz y en algunos foliares; inducción de resistencia sistémica en las plantas; cambios en la composición de la microbiota de las raíces; mejora la absorción de

nutrientes, incluyendo, al nitrógeno; mejora de la solubilidad de los nutrientes del suelo; mayor desarrollo de las raíces; aumento de la formación de pelos radiculares; más profundo enraizamiento (Stewart, 2007).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La producción en el cultivo de frijol ha disminuido al paso de los años por factores como: enfermedades, plagas, insumos nutricionales de alto costo, mal manejo de pesticidas, entre otros, aunado a la nula aplicación de biotecnologías, conlleva a una baja rentabilidad del cultivo ya que la mayoría de las veces no se cuentan con los insumos suficientes para aplicarlos, principalmente en los lugares con bajos recursos. Además de que al usar y dar un mal manejo de los fertilizantes químicos pueden ocasionar algunos problemas de contaminación ambiental. Se busca implementar nuevos recursos biotecnológicos con el objetivo de obtener mejor producción, por ello se pretende buscar microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos, entre otros, que tengan especificidad y efectividad en las plantas del cultivo de frijol, y de esta manera mejorar la producción, reducir costos con menor impacto ambiental.

#### **4. JUSTIFICACIÓN.**

Desde hace muchos años se ha buscado obtener mejor producción en el cultivo de frijol mediante el uso de fertilizantes químicos y pesticidas. Al paso del tiempo, la producción se ha mantenido y en algunos lugares la ha disminuido, debido en parte a problemas de contaminación, erosión de suelos y problemas en la salud humana y animal. Por lo tanto, en este trabajo se usa como forma alternativa a la producción de frijol, a los microorganismos benéficos como los fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos por su función estimulante del crecimiento vegetal y junto a ellos complementar con una nutrición foliar y así obtener una mejor producción con la disminución de fertilizantes químicos y protegiendo al ambiente.

## **5. HIPÓTESIS.**

La inoculación de microorganismos benéficos y la adición de elementos nutricionales a las plantas de frijol mejorarán el crecimiento de las plantas.

## **6. OBJETIVOS.**

### **6.1. OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar el efecto de la aplicación de microorganismos benéficos y la biofortificación sobre el desarrollo de plantas del cultivo de frijol.

### **6. 2. OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Seleccionar bacterias solubilizadoras de fosfatos, fijadoras de nitrógeno y hongos benéficos para inoculación de plantas de frijol.
2. Realizar la inoculación de semillas de frijol con diferentes microorganismos benéficos, agregando solución nutritiva.
3. Evaluar las etapas fenológicas de plantas de frijol tomando en cuenta el porcentaje de germinación, altura, número de ramas, número de hojas, masa seca de raíz, vainas, tallo, y número de nódulos.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 7.1. Material biológico: Selección de semillas.

Las semillas de frijol criollo negro se seleccionaron tomando en consideración el tamaño uniforme y ausencia de daño aparente.

### 7.2. Pruebas de sanidad de semillas.

Se seleccionaron 30 semillas de frijol que se colocaron en una superficie de papel absorbente protegida con una membrana plástica “kleen pack”. Se humedecieron las semillas con 1 mL de agua destilada estéril y se enrollaron sellando de lado y lado para evitar que se contaminara y mantener las condiciones de humedad.

### 7.3. Selección de bacterias y hongo.

Se trabajó con cinco bacterias fijadoras de nitrógeno y dos bacterias solubilizadoras de fosfatos así como una cepa de *Trichoderma asperellum*. Todos los microorganismos usados forman parte del cepario del Laboratorio de Microbiología de Suelos “Dr. Jesús Caballero Mellado” del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las semillas de frijol criollo negro procedieron del municipio de Hueytlalpan, Puebla, cosecha 2014.

Cuadro 1. Cepas bacterianas y fúngicas utilizados en el experimento de inoculación de frijol.

Cepas	Clave
<i>Rhizobium tropici</i>	CIAT 899
<i>Rhizobium</i> sp.	M7
<i>Rhizobium</i> sp.	M4
<i>Azospirillum brasilense</i>	10B
<i>Azospirillum brasilense</i>	7A
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KMT10-2
<i>Chromobacterium violaceum</i>	BUAP 35
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	BUAP 40
<i>Trichoderma asperellum</i>	Tas-10

### 7.4. Propagación de bacterias.

Las dos bacterias del género *Azospirillum brasilense* fueron seleccionadas por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y de procedencia

geográfica diferente y dos bacterias con actividad solubilizadora de fosfato tricálcico. Las cepas de *Azospirillum brasilense* se propagaron en medio NFb líquido adicionado de extracto de levadura y cloruro de amonio, y las bacterias solubilizadoras de fosfatos en caldo nutritivo. Se incubaron a 32 °C durante 24 h, 48 h., a 220 rpm. Posteriormente, se procedió a realizar diluciones decimales y se sembró en caja Petri con medio de cultivo Rojo Congo para *Azospirillum brasilense*, medio de cultivo Goldstein para bacterias solubilizadoras de fosfatos, para *Klebsiella pneumoniae* medio de agar MacConkey así como medio Extracto de Levadura Manitol Rojo Congo (ELMARC) para *Rhizobium* sp. para que de esta manera se pudiera propagar la población bacteriana.

*Trichoderma asperellum* se propago en caldo papa y dextrosa mediante incubación en agitación a 180 rpm a 30°C por 24 h. Posteriormente se dejó el cultivo en crecimiento estático 15 días hasta la esporulación, confirmando la pureza del cultivo sembrando en medio de agar de papa y dextrosa.

#### **7.5. Preparación de biofertilizantes.**

Se mezclaron los caldos de cultivo con el sustrato “Peat moss” previamente estéril. Para tener un porcentaje de absorción del 80%. Se tomaron 50 mL de cada caldo para 60 g de sustrato, esto se colocó en bolsitas de plástico, una vez terminadas las mezclas se llevaron a incubación y se dejaron en maduración durante tres días (Oliver-Rodríguez 2004).

#### **7.6. Preparación de semillas.**

Se seleccionaron las semillas de frijol criollo negro, posteriormente se verificó que no tuvieran algún daño mecánico o aparente daño por hongos.

#### **7.7. Inoculación de los microorganismos a las semillas.**

Se prepararon 12 bolsitas de plástico y en cada una de ellas se colocaron 15.0 g de semillas del frijol criollo negro. Posteriormente se pesaron 30.0 g de cada biofertilizante los cuales se agregaron en cada bolsita de semillas correspondiente a cada tratamiento; y por último, se colocó 1 mL de *T. asperellum* a las bolsitas correspondientes, y de esta manera se inocularon las semillas.

### 7.8. Preparación del suelo.

Se utilizó suelo procedente de San José Teacalco Tlaxcala, el cual se tamizó y posteriormente se llenaron 120 macetas conteniendo 2.0 kg de suelo aproximadamente el cual se humedeció previamente a la siembra, se utilizaron 12 tratamientos con 10 repeticiones cada uno, como se describe en el Cuadro 2.

### 7.9. Siembra de semillas de frijol.

Se sembraron cuatro semillas en cada una de las macetas a una profundidad de 3 cm aproximadamente, se cubrieron con el suelo y se mantuvieron en humedad con riegos de agua destilada y a una temperatura promedio de 26 °C.

### 7.10. Diseño experimental.

Se trabajó con 12 tratamientos diferentes (Cuadro 2), con 10 repeticiones cada uno, a 5 repeticiones solo se les agregaron bacterias u hongo según correspondió, a las 5 repeticiones restantes se les aplicó una solución nutritiva a base de N, P, K, Ca, Mg, Mn, Zn, Fe, Mo, B, Co vía foliar con atomización.

Cuadro 2. Diseño experimental para la inoculación de biofertilizantes con bacterias, hongos a dos dosis de fertilización química en el cultivo de frijol, complementado con una biofortificación a base de una solución nutritiva.

Tratamientos
<i>Rhizobium</i> sp. M7
<i>R. tropici</i> CIAT 899 (tipo)
<i>A. brasilense</i> 7A + <i>A. brasilense</i> 10B
<i>K. pneumoniae</i> KMT10-2
<i>T. asperellum</i> Tas-10
<i>Rhizobium</i> sp. M4
<i>C. violaceum</i> BUAP 35 + <i>A. calcoaceticus</i> BUAP 40
<i>Rhisobium</i> sp. M7 + <i>R. tropici</i> CIAT + <i>A. brasilense</i> 7A + 10B
Fertilización Química 100%
Fertilización Química 50%
<i>T. asperellum</i> + <i>A. brasilense</i> 7A + 10B
Control

Tratamientos con 10 repeticiones, en 5 repeticiones se adicionó fertilización foliar.

### **7.11. Evaluación de parámetros fenológicos de las plantas de frijol.**

Se sacaron las plantas de las macetas cuidando que no sufrieran algún daño, se eliminó el suelo y posteriormente se lavó la raíz con agua de la llave hasta dejarla totalmente limpia. La masa seca se cuantificó después de la cosecha, separando la raíz, tallo y vainas de las plantas de frijol, se colocaron en bolsas de papel y se secaron en un horno a 75 °C durante 72 horas, luego de este tiempo se procedió a pesarlas. Una vez que las raíces se secaron se llevó a cabo la separación de los nódulos para su posterior conteo.

### **7.12. Análisis estadísticos.**

Una vez obtenidos los datos se les realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey a  $P \leq 0.05$  para ver la diferencia de tratamientos (Olivares-Sáenz, 1994).

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Sanidad de semillas.

En las pruebas de sanidad realizada a las semillas de frijol, se aislaron dos hongos, uno del género *Penicillium* y el segundo del género *Fusarium*.

### 8.2. Preparación de inóculos.

Se llevó a cabo el conteo microbiano de cada biofertilizante, expresando los valores en unidades formadoras de colonias UFC g<sup>-1</sup> y en el caso de *T. asperellum*, en UFC mL<sup>-1</sup> como se observa en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Recuento microbiano de las poblaciones inoculadas por cada tratamiento.

CONTEO MICROBIANO	
Biofertilizantes	UFC
<i>Rhizobium</i> sp. M7	110.0 x 10 <sup>6</sup> UFC g <sup>-1</sup>
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 (tipo)	20.0 x 10 <sup>6</sup> UFC g <sup>-1</sup>
<i>Azospirillum brasilense</i> 7A	3.6 x 10 <sup>6</sup> UFC g <sup>-1</sup>
<i>Azospirillum brasilense</i> 10B	2 x 10 <sup>6</sup> UFC g <sup>-1</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KMT10-2	13.0 x 10 <sup>6</sup> UFC g <sup>-1</sup>
<i>Trichoderma asperellum</i>	16.3 x 10 <sup>6</sup> UFC mL <sup>-1</sup>
<i>Rhizobium</i> sp. M4	50.0 x 10 <sup>6</sup> UFC g <sup>-1</sup>
<i>Chromobacterium violaceum</i> BUAP 35	60.0 x 10 <sup>6</sup> UFC g <sup>-1</sup>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BUAP 40	2.3 x 10 <sup>6</sup> UFC g <sup>-1</sup>

### 8.3. Porcentaje de germinación.

El porcentaje de germinación se determinó a los días 5 y 7 después de la siembra. Se observó que el tratamiento con la cepa KMT10-2 y el tratamiento con las cepas de *A. brasilense* 7A+10B en combinación con *T. asperellum* Tas-10 fueron los primeros en germinar. También se notó que de los 12 tratamientos utilizados, en 8 de ellos el porcentaje de germinación fue mayor o igual a 80%, mientras que en los 4 tratamientos restantes el porcentaje de germinación fue baja con valores de 50 a 70% como se describe en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Porcentaje de germinación de las semillas de frijol por cada tratamiento inoculado.

Tratamientos	Porcentaje
<i>T. asperellum</i> + <i>A. brasilense</i> 7A + <i>A. brasilense</i> 10B	100%
<i>A. brasilense</i> 7A + <i>A. brasilense</i> 10B	90%
<i>K. pneumoniae</i> KMT10-2	90%
<i>Rhizobium</i> sp. M4	90%
Fertilizante químico 100%	90%
<i>R. tropici</i> CIAT + <i>Rhizobium</i> sp. M7+	80%
<i>A. brasilense</i> 7A + <i>A. brasilense</i> 10B	
Fertilizante químico 50%	80%
<i>C. violaceum</i> B35+ <i>A. calcoaceticus</i> B40	80%
<i>T. asperellum</i> Tas-10	70%
Control	70%
<i>R. tropici</i> CIAT 899 (tipo)	60%
<i>Rhizobium</i> sp. M7	50%

#### 8.4. Medición de altura.

Al evaluar la altura de las plantas de frijol en suelo sin adición de ningún nutrimento (Cuadro 5), observamos a los 15 días después de la germinación, que con la inoculación de diferentes rizobacterias en las plantas encontramos que en altura no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos, sin embargo, si existen diferencias numéricas utilizando la cepa KMT10-2 con un incremento de 28.65% (Figura 1) y con la mezcla de bacterias M7+CIAT 899+7A+10B se presenta un incremento de 31.46% respecto al control. Sin embargo, a los 45 días el mayor porcentaje se obtuvo utilizando la mezcla de las cepas BUAP 35+BUAP 40 que se incrementa en un 14.84% respecto al control y el tratamiento con la respuesta más baja fue utilizando el fertilizante químico al 50%. Y al llevar a cabo la medición a los 65 días, se observó mayor porcentaje al utilizar la cepa M4 de *Rhizobium* sp. (Figura 2) que se incrementa en un 5.8% respecto al control mientras que los tratamientos con menor respuesta fueron los tratamientos con fertilizante químico al 100%, *Trichoderma asperellum* Tas-10 y el fertilizante químico al 50%.

Al evaluar la inoculación junto con la fertilización foliar (Cuadro 6) con diferentes Rizobacterias en plantas de frijol encontramos que en altura a los 15 días después de la germinación, la respuesta óptima se obtuvo utilizando la cepa KMT10-2 que se incrementa en un 24.46% respecto al control pero también se puede observar la baja respuesta de algunos tratamientos como lo

son la cepa M7 de *Rhizobium sp.*, el fertilizante químico al 50% y *Trichoderma asperellum* Tas-10.

Cuadro 5. Efectos de la inoculación de bacterias un hongo y dos dosis de fertilización química en la medición de la altura en plantas de frijol.

Tratamiento	Suelo		
	15	45	65
<i>Rhizobium sp.</i> M7	9.35±2.02 a	20.20±1.20 ab	26.65±2.97 abcd
<i>R. tropici</i> CIAT 899 (tipo)	10.30±1.51 a	21.70±1.85 ab	28.00±3.22 abc
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	10.30±1.04 a	21.05±1.41 ab	28.75±2.22 ab
<i>K. pneumoniae</i> KMT10-2	11.45±1.89 a	22.00±1.22 ab	27.75±3.03 abc
<i>Trichoderma asperellum</i> Tas-10	8.65±2.10 a	19.60±1.46 ab	25.50±1.57 cd
<i>Rhizobium sp.</i> M4	10.90±0.74 a	21.10±1.40 ab	29.10±1.44 a
<i>C. violaceum</i> B35+			
<i>A. calcoaceticus</i> B40	9.20±0.93 a	26.30±10.10 a	26.50±1.65 abcd
M7+CIAT+7A+10B	11.70±1.82 a	23.10±1.91 ab	26.40±1.55 abcd
F. Q. 100%	9.70±1.04 a	22.05±2.22 ab	25.80±0.86 bcd
F. Q. 50%	10.20±1.19 a	18.60±0.82 b	23.60±3.99 d
<i>T. asperellum</i> Tas-10+			
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	10.70±1.24 a	21.00±1.88 ab	26.55±2.94 abcd
Control	8.90±0.89 a	22.90±2.00 ab	27.50±3.05 abc

Valores promedio de 5 repeticiones por tratamiento seguido de su desviación estándar; letras iguales dentro de la misma columna no existen diferencias significativas a P=0.05 según la prueba de Tukey

Cuadro 6. Efectos de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química junto con la fertilización foliar en la mediación de la altura en plantas de frijol.

Tratamiento	Fertilización foliar		
	15	45	65
<i>Rhizobium sp.</i> M7	8.70±1.08 bc	20.10±2.21 bc	27.85±3.55 ab
<i>R. tropici</i> CIAT 899 (tipo)	9.70±0.76 abc	22.00±1.52 ab	28.35±2.42 ab
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	9.75±0.68 abc	21.30±2.22 abc	29.45±3.29 ab
<i>K. pneumoniae</i> KMT10-2	11.70±1.39 a	21.90±1.04 c	28.35±0.98 ab
<i>Trichoderma asperellum</i> Tas-10	8.45±0.65 c	21.17±1.40 c	26.25±3.34 b
<i>Rhizobium sp.</i> M4	11.25±1.16 ab	20.85±1.32 abc	26.50±1.15 b
<i>C. violaceum</i> B35+			
<i>A. calcoaceticus</i> B40	9.40±0.49 abc	24.10±9.39 bc	30.10±2.23 a
M7+CIAT+7A+10B	10.35±0.70 abc	20.78±1.17 ab	27.75±3.07 ab
F. Q. 100%	10.50±1.53 abc	22.50±0.68 a	27.95±1.29 ab
F. Q. 50%	8.65±1.74 c	20.00±1.39 abc	27.00±2.48 ab
<i>T. asperellum</i> Tas-10+			
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	10.25±2.11 abc	22.00±1.08 ab	26.15±3.06 b
Control	9.40±0.45 abc	20.80±1.54 c	27.25±2.86 ab

Valores promedio de 5 repeticiones por tratamiento seguido de su desviación estándar; letras iguales dentro de la misma columna no existen diferencias significativas a P=0.05 según la prueba de Tukey



Figura 1. Comparación de altura entre 3 tratamientos distintos y el control.

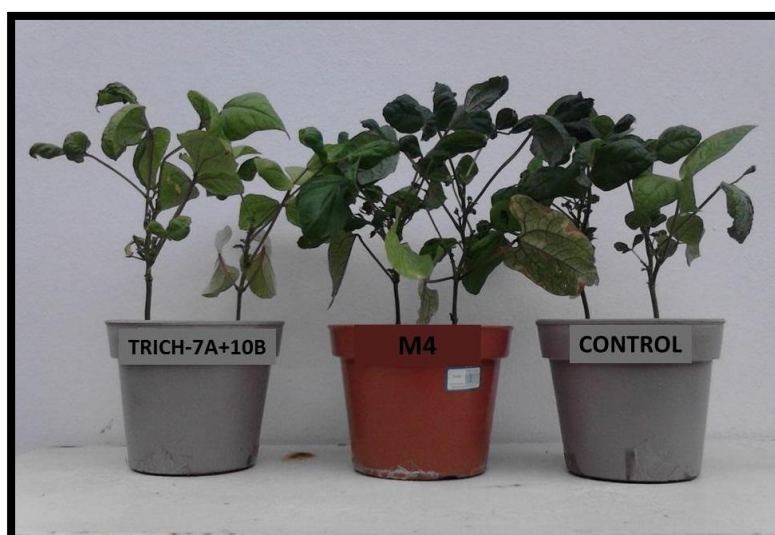


Figura 2. Comparación de altura y parte foliar de los tratamientos M4 y la mezcla de *T. asperellum* más *A. brasilense* 7A+10B respecto al control.

En la evaluación del día 45 encontramos que la mejor respuesta fue utilizando la fertilización química al 100% que se incrementa en un 8.17% respecto al control y los tratamientos con respuesta baja fueron las cepas B35+B40, M7, KMT10-2, Tas-10 y el control. Sin embargo al llegar al día 65 encontramos que en altura, la cepa B35+B40 correspondiente a los solubilizadores obtiene el mayor porcentaje incrementándose en un 10.45% respecto al control mientras que M4, Tas-10 y Tas-10 + 7A+10B fueron los tratamientos con menor respuesta.

### 8.5. Conteo del número de ramas formadas por efectos de la inoculación.

Al evaluar el número de ramas formadas por procesos de la inoculación con diferentes rizobacterias en plantas de frijol sin agregar ningún nutrimento (Cuadro 7), en los primeros 15 días, se observa que en el número de ramas el tratamiento con mayor porcentaje fue la mezcla de *T. asperellum* Tas-10 y las cepas de *A. brasilense* 7A+10B incrementándose en un 10.14% respecto al control. Sin embargo los tratamientos con las cepas de *Rhizobium* sp. M7, *A. brasilense* 7A+10B y el fertilizante químico al 100% fueron los que obtuvieron la respuesta más baja. En el día 45 encontramos que la mezcla *T. asperellum* Tas-10 y 7A+10B tuvo un incremento del 25% respecto al control representando el mayor porcentaje (Figura 3) y el tratamiento con la respuesta más baja fue la mezcla de las cepas M7+CIAT+7A+10B. Sin embargo, a los 65 días hallamos que los tratamientos 7A+10B, KMT10-2 y la mezcla de *T. asperellum* Tas-10 con *A. brasilense* 7A+10B fueron los que incrementaron en porcentaje respecto al control y la mezcla M7+CIAT+7A+10B continuo con la respuesta más baja.

Cuadro 7. Efectos de la inoculación de bacterias, un hongo y dos dosis de fertilización química en el número de ramas en plantas de frijol.

Tratamiento	Suelo		
	15	45	65
<i>Rhizobium</i> sp. M7	12.00±1.87 bcd	19.60±3.78 ab	32.00±3.94 ab
<i>R. tropici</i> CIAT 899 (tipo)	13.60±1.95 abcd	19.80±5.22 ab	30.20±8.53 ab
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	11.20±3.56 cd	20.80±5.93 ab	34.20±8.44 a
<i>K. pneumoniae</i> KMT10-2	14.00±3.87 abc	22.40±4.56 ab	33.80±6.76 a
<i>Trichoderma asperellum</i> Tas-10	14.20±2.49 abc	20.40±2.41 ab	31.20±3.11 ab
<i>Rhizobium</i> sp. M4	13.60±3.85 abcd	22.80±6.57 ab	31.40±6.50 ab
<i>C. violaceum</i> B35+			
<i>A. calcoaceticus</i> B40	12.60±0.55 abcd	22.40±2.07 ab	33.20±2.39 ab
M7+CIAT+7A+10B	12.20±1.30 abcd	15.60±2.07 b	21.60±5.18 b
F. Q. 100%	10.80±2.39 d	16.60±6.27 ab	27.20±5.59 ab
F. Q. 50%	14.60±1.67 ab	18.80±2.49ab	31.20±2.77 ab
<i>T. asperellum</i> TTas-10+			
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	15.20±3.27 a	25.00±3.24 a	33.60±3.13 a
Control	13.80±0.84 abcd	20.00±2.92 ab	33.00±4.18 ab

Valores promedio de 5 repeticiones por tratamiento seguido de su desviación estándar; letras iguales dentro de la misma columna no existen diferencias significativas a P=0.05 según la prueba de Tukey

En el mismo parámetro al evaluar la inoculación junto con la fertilización foliar con diferentes rizobacterias en plantas de frijol (Cuadro 8), encontramos que en el número de ramas en el día 15 el tratamiento con mayor porcentaje

fue utilizando la mezcla de las cepas de *A. brasilense* 7A+10B que presenta un incremento de un 11.76% respecto al control mientras que la cepa de *Rhizobium* sp. M4 fue la que presento menor respuesta. En el día 45, se observó que la cepa KMT10-2 incremento en un 19.46% sobre el control y las cepas CIAT 899, M4 y *Tas-10+7A+10B* presentaron la respuesta más baja, mientras que a los 65 días, el tratamiento que presentó un porcentaje mayor fue nuevamente la cepa KMT10-2 incrementando en un 32.25% respecto al control pero la mayoría de los tratamientos presentaron respuestas muy bajas.

Cuadro 8. Efectos de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química junto con la fertilización foliar en el número de ramas en plantas de frijol.

Tratamiento	Fertilización foliar		
	15	45	65
<i>Rhizobium</i> sp. M7	11.20±5.50 ab	20.20±7.82 abc	31.40±7.40 bc
<i>R. tropici</i> CIAT 899 (tipo)	14.40±1.52 ab	19.00±3.24 bc	35.60±5.55 abc
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	15.20±3.63 a	24.60±4.16 ab	36.60±5.81 ab
<i>K. pneumoniae</i> KMT10-2	14.00±2.45 ab	27.00±6.63 a	41.00±9.03 a
<i>Trichoderma asperellum</i> Tas-10	14.40±0.55 ab	19.80±3.70 abc	32.40±7.89 bc
<i>Rhizobium</i> sp. M4	10.80±2.59 b	18.00±8.37 bc	27.40±6.19 c
<i>C. violaceum</i> B35+			
<i>A. calcoaceticus</i> B40	14.80±1.10 ab	21.60±2.97 abc	32.40±6.39 bc
M7+CIAT+7A+10B	13.60±4.72 ab	20.60±9.89 abc	30.40±9.07 bc
F. Q. 100%	14.80±3.70 ab	19.80± 5.45 abc	29.40±3.36 bc
F. Q. 50%	12.80±3.11 ab	19.80± 4.87 abc	36.00±5.92 ab
<i>T. asperellum</i> Tas-10+			
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	13.80±2.17 ab	16.80±4.49 c	28.80±7.40 bc
Control	13.60±2.51 ab	22.60±4.88 abc	31.00±3.00 bc

Valores promedio de 5 repeticiones por tratamiento seguido de su desviación estándar; letras iguales dentro de la misma columna no existen diferencias significativas a P=0.05 según la prueba de Tukey



Figura 3. Comparación del número de ramas entre la mezcla de *A. brasilense* con *T. asperellum* respecto al control.

## 8.6. Evaluación del número de hojas de plantas de frijol por efectos de la inoculación.

En los primeros 15 días al evaluar la inoculación con diferentes Rizobacterias en plantas de frijol y sin adicionar algún nutriente (Cuadro 9), se observa que en el número de hojas, los tratamientos que presentaron mayor porcentaje fueron las cepas CIAT 899, M4, la mezcla M7+CIAT+7A+10B y también el fertilizante químico al 50% y el tratamiento con *T. asperellum* Tas-10 obtuvo la respuesta más baja. En el día 45, los tratamientos no presentaron diferencias estadísticas pero si ligeras diferencias numéricas donde las bacterias solubilizadoras de fosfatos B35+B40 incrementan en un 17.69% respecto al control, a los 65 días nuevamente la mezcla de B35+B40 son las que presentan mayor incremento respecto al control con un incremento del 15.82%, mientras que el tratamiento de la mezcla de las cepas M7+CIAT+7A+10B y el fertilizante químico al 100% presentaron una baja respuesta.

Al evaluar la inoculación junto con la fertilización foliar con diferentes rizobacterias en el número de hojas en las plantas de frijol (Cuadro 10), encontramos que en el día 15 el tratamiento con porcentaje mayor fue utilizando la cepa KMT10-2 presentando un incremento de un 77.77% respecto al control notando de esta manera que los tratamientos con baja respuesta fueron utilizando el fertilizante químico al 50%, M7, B35+B40, Tas-10 +7A+10B, *T. asperellum* y el control. Mientras tanto en el día 45 no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos pero si diferencias numéricas, a los 65 días la cepa KMT10-2 obtuvo el mayor porcentaje presentando un incremento de un 13.47% sobre el control y la cepa con menor respuesta fue utilizando el hongo *T. asperellum* Tas-10 más las cepas de *A. brasilense* 7A+10B.

Cuadro 9. Efectos de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química en el número de hojas en plantas de frijol.

Tratamiento	Suelo		
	15	45	65
<i>Rhizobium</i> sp. M7	8.00±2.55 ab	38.00±6.52 a	54.00±7.25 bc
<i>R. tropici</i> CIAT 899 (tipo)	10.20±1.79 a	48.20±5.50 a	55.60±13.28 abc
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	7.60±2.51 ab	42.40±12.64 a	57.20±12.60 abc
<i>K. pneumoniae</i> KMT10-2	8.20±2.68 ab	48.80±10.11 a	59.60±13.13 abc
<i>Trichoderma asperellum</i> Tas-10	4.00±0.00 b	46.50±7.40 a	57.00±8.51 abc
<i>Rhizobium</i> sp. M4	8.80±1.64 a	47.40±12.84 a	62.00±14.02 ab
<i>C. violaceum</i> B35+			
<i>A. calcoaceticus</i> B40	5.80±2.68 ab	57.20±5.76 a	68.80±10.01 a
M7+CIAT+7A+10B	8.80±1.64 a	44.80±5.45 a	52.30±7.33 c
F. Q. 100%	8.20±1.64 ab	38.60±11.52 a	48.00±18.29 c
F. Q. 50%	8.80±1.64 a	49.60±9.10 a	55.00±8.28 bc
<i>T. asperellum</i> Tas-10+			
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	8.20±1.64 ab	56.40±4.67 a	67.40±9.96 ab
Control	5.80±2.68 ab	48.60±8.79 a	59.40±7.37 abc

Valores promedio de 5 repeticiones por tratamiento seguido de su desviación estándar; letras iguales dentro de la misma columna no existen diferencias significativas a P=0.05 según la prueba de Tukey

Cuadro 10. Efectos de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química junto con la fertilización foliar en el número de hojas en plantas de frijol.

Tratamiento	Fertilización foliar		
	15	45	65
<i>Rhizobium</i> sp. M7	6.40±3.91 cd	41.40±12.30 a	69.90±24.15 ab
<i>R. tropici</i> CIAT 899 (tipo)	9.40±1.34 ab	47.60±3.71 a	54.00±5.10 ab
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	7.20±2.17 abcd	50.80±8.81 a	66.00±5.79 ab
<i>K. pneumoniae</i> KMT10-2	9.60±2.88 a	48.80±7.26 a	72.40±18.15 a
<i>Trichoderma asperellum</i> Tas-10	4.80±1.79 d	50.00±5.96 a	56.60±3.44 ab
<i>Rhizobium</i> sp. M4	7.60±1.34 abcd	45.80±5.89 a	53.80±18.16 ab
<i>C. violaceum</i> B35+			
<i>A. calcoaceticus</i> B40	6.40±1.34 cd	52.80±4.16 a	62.80±5.89 ab
M7+CIAT+7A+10B	8.20±1.64 abc	44.80±12.66 a	70.90±23.02 ab
F. Q. 100%	7.20±3.03 abcd	51.20±11.07 a	58.00±15.49 ab
F. Q. 50%	6.60±2.61 bcd	45.40±7.80 a	53.60±8.91 b
<i>T. asperellum</i> Tas-10+			
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	6.20±2.17 cd	48.00±3.97 a	49.80±10.83 b
Control	5.40±1.34 cd	49.00±6.44 a	63.80±15.96 ab

Valores promedio de 5 repeticiones por tratamiento seguido de su desviación estándar; letras iguales dentro de la misma columna no existen diferencias significativas a P=0.05 según la prueba de Tukey

### 8.7. Evaluación de la floración de plantas de frijol

Al evaluar la floración en los tratamientos sin fertilización foliar (Cuadro 11) encontramos que el mayor porcentaje se presentó utilizando la cepa *R. tropici* CIAT 899 que se incrementa en un 35.71% respecto al control, seguida de los tratamientos inoculados con *A. brasilense* 7A+10B (Figura 4) y *K. pneumoniae* KMT10-2 con 21.42% y 17.85 % respectivamente, en este parámetro, la mezcla de las cepas M7+CIAT+7A+10B, B35+B40 y el fertilizante químico al 100% presentaron las respuestas más bajas.

Cuadro 11. Efectos de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química con y sin fertilización foliar en la floración de plantas de frijol.

Tratamiento	Floración			
	Suelo	Porcentaje		F. foliar
<i>Rhizobium</i> sp. M7	6.75±0.96 abcd	-3.57	20.68	8.75±0.96 ab
<i>R. tropici</i> CIAT 899 (tipo)	9.50±0.58 a	35.71	68.96	12.25±4.50 a
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	8.50±1.00 ab	21.42	24.13	9.00±0.82 ab
<i>K. pneumoniae</i> KMT10-2	8.25±1.71 abc	17.85	37.93	10.00±0.00 ab
<i>Trichoderma asperellum</i> Tas-10	5.75±2.87 abc	-17.85	27.58	9.25±1.50 ab
<i>Rhizobium</i> sp. M4	8.00±1.41 abcd	14.28	37.93	10.00±0.00 ab
<i>C. violaceum</i> B35+	5.00±1.83 cd	-28.57	10.34	8.00±1.83 ab
<i>A. calcoaceticus</i> B40				
M7+CIAT+7A+10B	5.50±2.08 bcd	-21.42	0	7.25±2.06 b
F. Q. 100%	4.75±0.96 d	-32.14	-3.44	7.00±1.83 b
F. Q. 50%	8.75±0.96 ab	25.00	31.03	9.50±1.00 ab
<i>T. asperellum</i> Tas-10+	6.25±2.63 abcd	-10.71	6.89	7.75±1.50 ab
<i>A. brasilense</i> 7A+10B				
Control	7.00±2.16 abcd	--	--	7.25±2.75 b

Valores promedio de 5 repeticiones por tratamiento seguido de su desviación estándar; letras iguales dentro de la misma columna no existen diferencias significativas a P=0.05 según la prueba de Tukey

Cuando se realizó la inoculación junto con la fertilización foliar (Cuadro 11) observamos que el mejor porcentaje fue utilizando la cepa CIAT 899 logrando incrementos de 68.96% respecto al control, junto con los demás tratamientos, mientras que las cepas con baja respuesta fueron la mezcla de las cepas M7+CIAT+7A+10B y el fertilizante químico al 100%.



Figura 4. Comparación en la etapa de floración entre el tratamiento 7A+10B y el control.

#### **8.8. Cuantificación del número de vainas en plantas de frijol inoculadas.**

Al cuantificar el número de vainas sin adición de ningún nutrimento (Cuadro 12) solo por efecto de la adición de inóculos, encontramos que el porcentaje mayor fue utilizando las cepas de *A. brasilense* 7A+10B que incrementó en un 150% respecto al control (Figura 5), mientras que la mayoría de los tratamientos restantes presentó una respuesta variable con tendencias positivas. Y en algunos tratamientos mostraron valores inferiores respecto al control.

En la evaluación del número de vainas con inoculación y fertilización foliar (Cuadro 12) se observó que el porcentaje mayor fue utilizando las cepas 7A+10B y la cepa KMT10-2 ambas en un incremento del 96.66% respecto al control (Figura 6), con la misma tendencia cuando solo se inoculan. También se observó una respuesta menor en los tratamientos B35+B40, la mezcla de las cepas M7, CIAT, 7A+10B, el fertilizante químico al 100% y el tratamiento de Tas-10+7A+10B.



Figura 5. Comparación del número de vainas entre la mezcla de *A. brasilense* y el control.



Figura 6. Comparación del número de vainas de *K. pneumoniae* y la mezcla de *T. asperellum* más *A. brasilense* ambas con fertilización foliar ante el control.

Cuadro 12. Efectos de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química con y sin fertilización foliar en el número de vainas de plantas de frijol.

Tratamiento	Número de vainas			
	Suelo	Porcentaje		F. foliar
<i>Rhizobium</i> sp. M7	3.50±2.38 cde	16.66	50.00	11.25±4.92 abc
<i>R. tropici</i> CIAT 899 (tipo)	5.00±3.74 bc	66.66	60.00	12.00±7.75 ab
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	7.50±2.38 a	150.00	96.66	14.75±4.03 a
<i>K. pneumoniae</i> KMT10-2	6.50±3.11 ab	116.66	96.66	14.75±5.91 a
<i>Trichoderma asperellum</i> Tas-10	3.50±1.73 cde	16.66	16.66	8.75±4.03 bcd
<i>Rhizobium</i> sp. M4	4.50±3.11 bcd	50.00	50.00	11.25±7.04 abc
<i>C. violaceum</i> B35+				
<i>A. calcoaceticus</i> B40	1.50±1.29 e	-50.00	-13.33	6.50±3.87 d
M7+CIAT+7A+10B	2.25±0.96 de	-25.00	-30.00	5.25±3.30 d
F. Q. 100%	2.25±1.71 de	-25.00	-23.33	5.75±4.19 d
F. Q. 50%	5.25±3.30 abc	75.00	60.00	12.00±6.98 ab
<i>T. asperellum</i> Tas-10+				
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	2.50±2.08 de	-16.66	-23.33	5.75±3.69 d
Control	3.00±2.16 cde	--	--	7.50±5.45 cd

Valores promedio de 5 repeticiones por tratamiento seguido de su desviación estándar; letras iguales dentro de la misma columna no existen diferencias significativas a P=0.05 según la prueba de Tukey

### 8.9. Cuantificación de la masa seca de las vainas, raíz y tallo de plantas de frijol.

En la masa seca de vainas de las plantas de frijol inoculadas con diferentes rizobacterias sin agregar fertilización foliar (Cuadro 13) encontramos que la cepa que obtuvo el mayor porcentaje fue la KMT10-2 presentando un incremento de 355.68% sobre el control, seguidas de la mezcla de cepas de *A. brasilense* (7A+10B) y las diferentes cepas de *Rhizobium* con diferentes porcentajes de incremento en el número de vainas y los tratamientos que presentaron bajas respuestas fueron B35+B40, las dos dosis de fertilizante químico al 50% y 100%, y la mezcla de las cepas M7, CIAT, 7A+10B.

Al evaluar la masa seca de vainas de frijol cuando se aplicó fertilizante foliar (Cuadro 13) no se hallaron diferencias estadísticas entre todos los tratamientos, pero si diferencias numéricas respecto al control, donde el mayor porcentaje se obtuvo en el tratamiento con las cepas KMT10-2, 7A+10B, CIAT 899 entre otras.

Cuadro 13. Efectos de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química con y sin fertilización foliar en la cuantificación de masa seca de vainas de plantas de frijol.

Tratamiento	Masa seca vainas			
	Suelo	Porcentaje		F. foliar
<i>Rhizobium</i> sp. M7	2.30±1.42 abc	161.36	36.22	1.73±0.68 a
<i>R. tropici</i> CIAT 899 (tipo)	1.90±0.65 abc	115.90	107.87	2.64±1.38 a
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	3.03±1.19 ab	244.31	104.72	2.60±1.88 a
<i>K. pneumoniae</i> KMT10-2	4.01±1.79 a	355.68	129.13	2.91±0.75 a
<i>Trichoderma asperellum</i> Tas-10	2.13±1.09 abc	142.04	81.88	2.31±1.04 a
<i>Rhizobium</i> sp. M4	2.33±0.63 abc	164.77	67.71	2.13±1.23 a
<i>C. violaceum</i> B35+				
<i>A. calcoaceticus</i> B40	1.31±0.59 bc	48.86	64.56	2.09±0.78 a
M7+CIAT+7A+10B	0.56±0.61 c	-36.36	-44.09	0.71±0.60 a
F. Q. 100%	1.34±0.77 bc	52.27	-50.39	0.63±0.52 a
F. Q. 50%	1.46±0.89 bc	65.90	16.53	1.48±0.90 a
<i>T. asperellum</i> Tas-10+				
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	1.92±0.61 abc	118.18	-6.23	1.19±0.93 a
Control	0.88±0.84 bc	--	--	1.27±0.97 a

Valores promedio de 5 repeticiones por tratamiento seguido de su desviación estándar; letras iguales dentro de la misma columna no existen diferencias significativas a P=0.05 según la prueba de Tukey

En la masa seca de raíz sin ningún nutrimento adicional (Cuadro 14) el mayor porcentaje se observó al utilizar la mezcla de bacterias M7+CIAT 899+7A+10B que incrementó en 51.45% sobre el control tomando en cuenta la diferencia numérica ya que no hay diferencias estadísticas (Figura 7), también las cepas que mejor respuesta presentaron fueron *Rhizobium* sp. M4, la combinación de *T. asperellum* Tas-10 + *A. brasilense* 7A+10B y la fertilización química al 100%.



Figura 7. Comparación de raíz entre el control y la mezcla de *Rhizobium* y *Azospirillum*.

En el mismo parámetro al evaluar la masa seca de raíz por efecto de inoculación de diferentes rizobacterias junto con la fertilización foliar (Cuadro 14) en plantas de frijol, se observa que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos, pero si las hay numéricas, encontramos que el tratamiento con mejor porcentaje fue utilizando el fertilizante químico al 50% presentando un incremento de un 46.04% respecto al control, además de los tratamientos con *T. asperellum* + *A. brasilense*, fertilización química al 100%, *Rhizobium* sp. M4 y la mezcla de B35+B40, entre otras.

Cuadro 14. Cuantificación de masa seca de raíz de plantas de frijol derivado de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química con y sin fertilización foliar.

Tratamiento	Masa seca raíz			
	Suelo	Porcentaje		F. foliar
<i>Rhizobium</i> sp. M7	4.78±0.40 a	-0.82	10.20	5.29±0.34 a
<i>R. tropici</i> CIAT 899 (tipo)	4.78±0.44 a	-0.82	3.95	4.99±0.74 a
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	4.66±0.85 a	-3.31	-1.87	4.71±0.37 a
<i>K. pneumoniae</i> KMT10-2	5.16±0.94 a	7.05	14.79	5.51±0.18 a
<i>Trichoderma asperellum</i> Tas-10	4.97±1.01 a	3.11	11.04	5.33±0.93 a
<i>Rhizobium</i> sp. M4	6.13±4.32 a	27.17	23.95	5.95±4.28 a
<i>C. violaceum</i> B35+				
<i>A. calcoaceticus</i> B40	4.78±0.96 a	-0.82	21.25	5.82±2.44 a
M7+CIAT+7A+10B	7.30±2.18 a	51.45	11.66	5.36±0.46 a
F. Q. 100%	6.11±4.14 a	26.76	35.41	6.50±3.84 a
F. Q. 50%	4.55±0.56 a	-5.60	46.04	7.01±3.21 a
<i>T. asperellum</i> Tas-10+				
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	6.10±3.86 a	26.55	37.08	6.58±4.03 a
Control	4.82±0.50 a	--	--	4.80±0.65 a

Valores promedio de 5 repeticiones por tratamiento seguido de su desviación estándar; letras iguales dentro de la misma columna no existen diferencias significativas a P=0.05 según la prueba de Tukey

En el caso de la evaluación de la masa seca de tallo por efecto de inoculación de diferentes rizobacterias sin agregar nutrimentos en el Cuadro 15 se observa que las cepas de *Rhizobium tropici* CIAT 899 y *A. brasilense* 7A+10B fueron las que presentaron mayor porcentaje incrementando en 9.06% y 7.27% respecto al control, sin embargo los tratamientos M7, la mezcla M7+CIAT+7A+10B, Tas-10+7A+10B, M4, B35+B40 y las dosis de fertilizante químico al 50% y 100% presentaron las respuestas más bajas.

Respecto a la masa seca de tallo con la adición de fertilizante foliar (Cuadro 15) los tratamientos que presentaron mayor porcentaje fueron utilizando *Trichoderma asperellum*, Tas-10 fertilizante químico al 100%, *K. pneumoniae* KMT10-2 y *R. tropici* CIAT 899 sobre el control y la respuesta más baja se presentó en el tratamiento con la cepa *Rhizobium* sp. M4.

Cuadro 15. Cuantificación de masa seca de tallo de plantas de frijol derivado de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química con y sin fertilización foliar.

Tratamiento	Masa seca tallo			F. foliar
	Suelo	Porcentaje		
<i>Rhizobium</i> sp. M7	9.77±1.23 bc	-7.74	0.19	10.07±1.13 ab
<i>R. tropici</i> CIAT 899 (tipo)	11.55±1.07 a	9.06	7.96	10.85±1.14 ab
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	11.36±1.53 ab	7.27	0.09	10.06±1.29 ab
<i>K. pneumoniae</i> KMT10-2	10.35±2.73 abc	-2.26	8.05	10.86±0.85 ab
<i>Trichoderma asperellum</i> Tas-10	10.56±1.47 abc	-0.28	10.04	11.06±0.93 a
<i>Rhizobium</i> sp. M4	9.05±1.08 c	-14.54	-14.92	8.55±1.15 b
<i>C. violaceum</i> B35+				
<i>A. calcoaceticus</i> B40	9.61±0.95 c	-9.25	-3.38	9.71±1.37 ab
M7+CIAT+7A+10B	9.74±1.04 bc	-8.02	-1.19	9.93±0.98 ab
F. Q. 100%	9.54±0.87 c	-9.91	9.05	10.96±0.90 a
F. Q. 50%	9.12±1.23 c	-13.88	0	10.05±0.85 ab
<i>T. asperellum</i> Tas-10+				
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	9.79±1.04 bc	-7.55	-4.57	9.59±1.25 ab
Control	10.59±1.01 abc	--	--	10.05±0.87 ab

Valores promedio de 5 repeticiones por tratamiento seguido de su desviación estándar; letras iguales dentro de la misma columna no existen diferencias significativas a P=0.05 según la prueba de Tukey

### 8.10. Cuantificación de nódulos.

En la evaluación del número de nódulos sin fertilización foliar (Cuadro 16) el mayor porcentaje se observó con las cepas de *A. brasilense* 7A+10B mezclado con *T. asperellum* Tas-10 y *R. tropici* CIAT 899 donde el incremento fue de un 44.22% y 26% respectivamente ante el control, mientras que la mezcla de las cepas M7+CIAT 899+7A+10B fue el tratamiento que presentó una baja respuesta.

Respecto al número de nódulos con la adición de la fertilización foliar (Cuadro 16) encontramos que el porcentaje mayor fue utilizando la cepa de *Rhizobium* sp. M4 en un incremento del 99.29% respecto al control, además de los tratamientos con *R. tropici* CIAT 899, *A. brasilense* 7A+10B, entre otros y los tratamientos con menor respuesta fueron *K. pneumoniae* KMT10-2, *T.*

*asperellum* Tas-10, las solubilizadoras de fosfatos B35+B40 y las dosis de fertilizante químico al 50% y al 100%.

Cuadro 16. Cuantificación del número de nódulos por planta por efecto de la inoculación de bacterias, hongos y dos dosis de fertilización química con y sin fertilización foliar.

Tratamiento	Nódulos			
	Suelo	Porcentaje		F. foliar
<i>Rhizobium</i> sp. M7	145.40±34.72 ab	-11.66	23.06	175.00±63.99 ab
<i>R. tropici</i> CIAT 899 (tipo)	207.40±92.93 ab	26.00	62.02	230.40±29.27 ab
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	131.60±26.05 ab	-20.04	39.94	199.00±93.43 ab
<i>K. pneumoniae</i> KMT10-2	130.80±16.32 ab	-20.53	17.44	167.00±60.22 b
<i>Trichoderma asperellum</i> Tas-10	136.40±26.73 ab	-17.13	15.33	164.00±39.43 b
<i>Rhizobium</i> sp. M4	171.60±128.45 ab	4.25	99.29	283.40±47.54 a
<i>C. violaceum</i> B35+				
<i>A. calcoaceticus</i> B40	132.80±19.20 ab	-19.31	-6.61	132.80±40.65 b
M7+CIAT+7A+10B	113.80±10.73 b	-30.86	28.12	182.20±76.89 ab
F. Q. 100%	174.40±64.28 ab	5.95	17.29	166.80±14.79 b
F. Q. 50%	148.40±29.04ab	-9.84	-5.20	134.80±25.61 b
<i>T. asperellum</i> Tas-10+				
<i>A. brasilense</i> 7A+10B	237.40±41.33 a	44.22	30.94	186.20±56.59 ab
Control	164.60±22.45 ab	--	--	142.20±35.23 b

Valores promedio de 5 repeticiones por tratamiento seguido de su desviación estándar; letras iguales dentro de la misma columna no existen diferencias significativas a P=0.05 según la prueba de Tukey

## 9. DISCUSIÓN.

Existe una amplia gama de interacciones entre especies de microorganismos en los ecosistemas, tales como sinérgicas, antagónicas, de competencia física y bioquímica, moduladas por múltiples y complejos factores bióticos y abióticos. En la rizósfera, uno de los principales sitios donde se presentan microorganismos, específicamente funcionales como fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos, promotores de crecimiento vegetal, biocontroladores y especies patógenas, normalmente, compiten por espacio y por nutrimentos. Estas interrelaciones entre los microorganismos inciden en la interacción suelo-planta-microorganismo-ambiente y repercuten de forma directa en el crecimiento y en el desarrollo de las especies vegetales. Muchos microorganismos rizosféricos como *Rhizobium* sp., *Klebsiella* sp., *Azospirillum* sp. y *Trichoderma* sp. utilizados en el presente trabajo, catalogados como promotores del crecimiento vegetal y como agentes de control biológico dependen de los factores mencionados para expresar sus potenciales efectos benéficos. Sin embargo, en la interacción de estos microorganismos, se pueden presentar efectos sinérgicos que potencialicen los beneficios o, por el contrario, efectos antagónicos o simplemente que no ocurra ningún efecto benéfico en el crecimiento y en el desarrollo de las plantas (Cano, 2011).

Al llevar a cabo la prueba de sanidad de las semillas de frijol se pudo observar que la germinación de estas fue de un 80% en promedio (Figura 8), por lo tanto este resultado se le puede atribuir a los hongos que se hallaron en esta prueba porque como lo describe De La Parte *et al.*, (2014) el hongo *Penicillium* es considerado como agente de enfermedades de almacenamiento de productos vegetales y legumbres, el cual no tiene gran importancia durante el ciclo del cultivo pero afectan negativamente la calidad de la semilla y su germinación. Por otra parte, Navarrete-Maya, *et al.*, (2009) describe al hongo *Fusarium* como causante de enfermedades en las plantas de frijol como por ejemplo la pudrición de la raíz y tallo lo cual puede disminuir y retrasar el desarrollo de las plantas.



Figura 8. Pruebas de sanidad en semillas de frijol.

En relación al porcentaje germinación de semillas de frijol inoculadas con diferentes bacterias solas o en co-inoculación, se encontraron valores de 70 al 100%, aunque en dos de los tratamientos fueron de 50 y 60% menores al control con 70% y las primeras semillas germinadas se presentaron a los 5 días con la inoculación de la cepas KMT10-2 de *Klebsiella pneumoniae* y 7A+10B de *A. brasilense*, lo que sugiere que en esta primera etapa la germinación puede no depender directamente de las bacterias, sino más bien puede implicar algunos reguladores del crecimiento presentes en el medio de cultivo como productos de excreción al observar la diferencia con los tratamientos inoculados y el control, lo que puede influir en el potencial de los reguladores del crecimiento apoyando el papel potencial de la bacterias y los reguladores del crecimiento en la mejora de la tasa de germinación y principios de desarrollo de estructuras de la planta, sin dejar de mencionar factores como: la calidad de la semilla, la humedad y la temperatura que también pudieron repercutir en el porcentaje de germinación. Los datos mostrados coinciden con lo reportado por Cassan *et al.*, (2009) al inocular semillas de maíz y soya con cepas de *Azospirillum brasilense* y *Bradyrhizobium japonicum*, ya sea solas y en combinación, observando una mejora en la germinación hasta el día 7 para maíz y soya en el día 4 en comparación con el control que alcanzaron un bajo porcentaje de germinación.

En relación a la inoculación de semillas de frijol utilizadas procedentes de la región del municipio de Hueytlalpan, Puebla, se adicionaron  $110.0 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  de la cepa *Rhizobium sp.* M7,  $50.0 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  para *Rhizobium sp.*

M4,  $20.0 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  de la cepa *R. tropici* CIAT 899,  $3.6 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  de *A. brasilense* 7A,  $2 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  de la cepa *A. brasilense* 10B,  $13.0 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  de *K. pneumoniae*,  $60.0 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  para *C. violaceum* BUAP 35,  $2.3 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  para la cepa *A. calcoaceticus* BUAP 40, del hongo *T. asperellum* se le agregó en forma líquida a una concentración de  $16.3 \times 10^6$  UFC  $mL^{-1}$ . Hungría *et al.*, (2013) menciona que para una respuesta en las plantas por efectos de la inoculación con *Rhizobium tropici* se requieren poblaciones de  $1.2 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  y que para la inoculación con *A. brasilense* se requieren  $2.5 \times 10^5$  UFC  $g^{-1}$ . Los datos de poblaciones bacterianas en los inoculantes con *Rhizobium* sp, *Azospirillum brasilense* y otras bacterias benéficas también coinciden con lo descrito por Okon y Labandera-González (1994), quienes mencionan que las concentraciones óptimas pueden ser en promedio de  $10^7$  UFC por semilla o por planta, y que existen diferentes preparaciones biológicas con poblaciones de  $10^5$  UFC  $g^{-1}$  hasta  $10^{11}$  UFC  $g^{-1}$ .

Se ha demostrado que los microorganismos promotores de crecimiento vegetal, incluyendo las rizobacterias y bacterias promotoras del crecimiento vegetal, bacterias diazotróficas, fijadores de nitrógeno de vida libre y hongos formadores de micorrizas, tienen un efecto directo o primario en la nutrición vegetal y, por ende, en la estimulación del crecimiento de las plantas; no obstante, estudios recientes muestran la potencialidad del uso de estos inoculantes, como agentes de control biológico, considerándolo como un efecto secundario de esta interacción (Sturz y Christie, 2003).

En la evaluación de los parámetros fenológicos encontramos que en la medición de altura la cepa con mejor respuesta pertenece al grupo de *Rhizobium* sp. (M4), esto puede ser a causa de que diversas rizobacterias entre ellas las pertenecientes al género *Rhizobium* sp., tienen la capacidad de sintetizar y liberar auxinas como metabolitos secundarios (Patten y Glick, 1996). Generalmente, el AIA secretado por rizobacterias interfiere con los muchos procesos de desarrollo de la planta (Glick, 2012; Spaepen *et al.*, 2007). El 80% de las bacterias aisladas de la rizósfera de varias plantas producen auxinas. La producción de auxinas varía grandemente entre especies incluso entre cepas de la misma especie y también influye las condiciones de la colonia, etapa de crecimiento y disponibilidad de los sustratos. El ácido indol-3-acético es considerado fisiológicamente la auxina más activa en plantas, y

también es reconocido como un producto metabólico de varios microorganismos en presencia de peptona o triptófano y se conocen comúnmente como fitohormonas. *Rhizobium* es capaz de sintetizar AIA en ausencia de triptófano, pero la aplicación de este incrementa la producción de AIA siendo esta una de las sustancias causantes del encorvamiento del pelo radical (Frankenberger y Arshad, 1995). En consecuencia, la AIA juega un papel muy importante en las interacciones planta-rizobacterias (Spaepen *et al.*, 2011).

De la misma forma también podemos sugerir que la producción de AIA de las cepas de *A. brasilense* provocaron que la cantidad de ramas en las plantas inoculadas con estas cepas al final del experimento fueran las de mejor respuesta ya que de acuerdo con Ahemad y Kibret (2014) el AIA producido por rizobacterias, interfieren los procesos fisiológicos de las plantas superiores, modificando la división celular de la planta, la extensión, y la diferenciación, estimula la germinación de semillas que coincidentemente en nuestro experimento con *A. brasilense* presentó mayor porcentaje de germinación; aumenta la tasa de xilema y desarrollo de las raíces, controla los procesos de crecimiento vegetativo, inicia la formación de raíces laterales; media la respuesta a la luz, la gravedad y la florecencia; afecta a la fotosíntesis, la formación de pigmento, la biosíntesis de diversos metabolitos, y la resistencia a condiciones de estrés, por lo tanto también podemos decir que la síntesis y liberación de fitohormonas (auxinas) mediada por las cepas de *A. brasilense* juega un papel importante en cuanto a la formación de vainas ya que las plantas inoculadas con estas cepas obtuvieron el mayor número de vainas en comparación con el control.

El efecto de la inoculación de *Rhizobium tropici* CIAT 899 en cuanto a floración pudo notarse en ambas condiciones, es decir, con y sin fertilización foliar, sin embargo, la diferencia entre uno y otro es notable ya que al utilizar la fertilización foliar favoreció el incremento de la floración; y también al utilizar la cepa *Klebsiella pneumoniae* KMT10-2 junto a la fertilización foliar se notó el incremento en el número de ramas en comparación con el tratamiento inoculado solo con *Klebsiella pneumoniae* KMT10-2 sin agregar algún nutriente, lo que quiere decir que la fertilización foliar tiene un gran aporte en la nutrición vegetal como complemento a la biofertilización del suelo, como lo

menciona Franco y Morales (2006) en un experimento donde la inoculación de *A. brasilense* junto a la fertilización foliar incrementa el peso de la biomasa aérea seca, en este caso el efecto solo se observó en la cuantificación de vainas, también en un ensayo de fertilización edáfica y fertilización foliar sobre el desarrollo y rendimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Giskin *et al.* (1984) reportaron un incremento en el número de vainas al complementar la fertilización edáfica con la fertilización foliar.

Cabe mencionar que al utilizar *A. brasilense* mezclado con el hongo *T. asperellum* tiene una respuesta positiva ante la formación de nódulos, ya que como hemos visto en algunos otros parámetros las cepas de *A. brasilense* por si solas tienen la mejor respuesta pero al ser mezclada con el hongo podríamos decir que sigue siendo favorable y que de alguna forma *T. asperellum* tiene efectos como control biológico y promoción del crecimiento, las especies del género *Trichoderma* se caracterizan como hongos filamentosos que se pueden aislar del suelo, son capaces de colonizar las raíces y los residuos vegetales, son genéticamente diversas con un gran número de capacidades, entre ellas el control biológico que puede atribuirse a la competencia por los nutrientes, la liberación de hidrolisis extracelular, enzimas y metabolitos secundarios tóxicos a los patógenos de plantas en concentraciones muy bajas, también inducen respuestas de defensa de las plantas hospedantes por ejemplo la resistencia sistémica adquirida, como ingrediente de control biológico actúa como elemento de disuasión y protección del sistema de la raíz contra agentes patógenos (Tataranni *et al.*, 2012). Por su parte Cano (2011) describe que los microorganismos promotores de crecimiento vegetal, incluyendo a las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, bacterias promotoras del crecimiento vegetal, bacterias diazotróficas, fijadores de nitrógeno de vida libre y hongos formadores de micorrizas, tienen un efecto directo o primario en la nutrición vegetal y por ende en la estimulación del crecimiento de las plantas, además de que estos inoculantes tienen gran potencialidad como agentes de control biológico y lo considera como efecto secundario de esta interacción, por lo tanto *Trichoderma* spp. puede controlar enfermedades en plantas siendo esto un efecto primario.

En este trabajo *Rhizobium* sp. tuvo un efecto significativo en el desarrollo de las plantas y en su productividad, que es muy coincidente con los trabajos

de Guo *et al.* 2004, Aliye *et al.* 2008 y Yasir *et al.* 2009 en los que afirman que *Rhizobium* spp y *Glomus* spp. pueden promover el crecimiento de las plantas y su productividad como efecto primario pero también pueden reducir enfermedades el cual sería un efecto secundario.

Al observar los datos de masa seca el tratamiento que mostró mayor cantidad de masa seca de raíz fue utilizando la combinación de las cepas de *A. brasilense* 7A+10B con *R. tropici* CIAT 899+M7, de esta manera se confirma lo descrito en el trabajo de Oliver-Rodríguez (2004) donde al combinar cepas de estos mismos géneros (CIAT 899 + 10B) obtiene la mejor respuesta ante los demás tratamientos en masa seca de raíz; la inoculación doble de plantas leguminosas con *Rhizobium* sp. y *Azospirillum* sp. pueden ser fundamentadas en distintas variables, como el incremento en el crecimiento de la planta cuando se compara con la inoculación única. *Azospirillum* es considerado como un ayudante de *Rhizobium* para la estimulación de la nodulación, la función del nódulo y posiblemente en el metabolismo de la planta. Las fitohormonas producidas por *Azospirillum* promueven diferenciación en las células epidermales de los pelos radiculares incrementando su número y sitios infectados por Rhizobia (Bashan y Holguin, 1997).

Además en el experimento de Oliver-Rodríguez (2004) también utilizó la mezcla de *Azospirillum brasilense* y *Klebsiella pneumoniae* mostrando diferencias significativas con el resto de los tratamientos en cuanto al número de nódulos y masa seca de nódulos, y en la masa seca de la parte aérea *Klebsiella pneumoniae* presentó diferencias significativas respecto al control, lo que coincide con los resultados del número de ramas y el número de vainas donde la cepa KMT10-2 presentó la mejor respuesta.

Ahora haciendo mención de los resultados de las cepas junto a la fertilización foliar pudimos observar que en la mayoría de los parámetros medidos las cepas con las mejores respuestas junto con la fertilización foliar fueron *K. pneumoniae* KMT10-2 y en un poco porcentaje la cepa *Rhizobium tropici* CIAT 899. La eficiencia de aprovechamiento de un nutriente se eleva al ser aplicado foliarmente. Así lo demostró Chonay (1981) al fertilizar el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) al suelo y follaje.

Como lo mencionan White y Broadley (2009) las plantas sólo pueden adquirir elementos minerales suministrados a ellos en formas químicas

específicas. Para obtener una estrategia de biofortificación exitosa, es necesario estar al tanto de los elementos minerales adquiridos por las raíces de las plantas, de sus limitaciones y de su fitodisponibilidad en la solución de la rizósfera ya que pueden ser limitados en los cultivos y entonces es necesario aplicar fertilizante foliar.

La mayoría de las especies de *Rhizobium* tienen la capacidad de producir AIA y muchos estudios indican que los cambios en la concentración de auxina endógena son un requisito para la organogénesis del nódulo (Lambrecht et al. 2000). En este trabajo la cepa CIAT 899 (*R. tropici*) fue el segundo tratamiento con mejor respuesta en la cuantificación de nódulos, lo que coincide con el trabajo de Oliver-Rodríguez (2004) donde los tratamientos inoculados con CIAT 899 presentan un mayor número de nódulos en comparación con los demás tratamientos. Mientras que *Rhizobium sp.* (M4) junto a la fertilización foliar seguido de la CEPA 899 (*R. tropici*) también con fertilización foliar obtuvieron un mayor número de nódulos lo que una vez más confirma lo antes mencionado, sin embargo, al revisar en otros parámetros medidos en este experimento, podemos ver que en floración, en cuantificación de masa seca de tallo y la cuantificación de masa seca de raíz (mencionando que en este último fue mezclado con otra cepa de *Rhizobium sp.*, y *A. brasilense*.) la cepa de *R. tropici* CIAT 899, obtuvo la mejor respuesta referente al control, por lo tanto podemos decir que estos resultados fueron a consecuencia de la fijación biológica de nitrógeno como estrategia viable que incrementa la producción y contribuye a la sostenibilidad de la productividad de los cultivos (Acuña y Uribe, 1996). También demostraron que al inocular distintas cepas de *Rhizobium sp.* como CR 477 y CIAT 613 en plantas de frijol mostraron una respuesta altamente significativa ante el tratamiento testigo en cuanto a valores de peso seco de la parte aérea y el peso seco de nódulos. Pero ellos mencionan que debe tomarse en cuenta que para que la fijación biológica de nitrógeno sea efectiva y se obtengan mejores resultados se tienen que considerar 3 factores, el primero es la interacción entre la cepa de *Rhizobium*, el genotipo de la planta y por último el medio ambiente, esto debido a que en muchos estudios realizados no han tenido resultados favorables porque no se consideró alguno de los factores que antes se mencionaron.

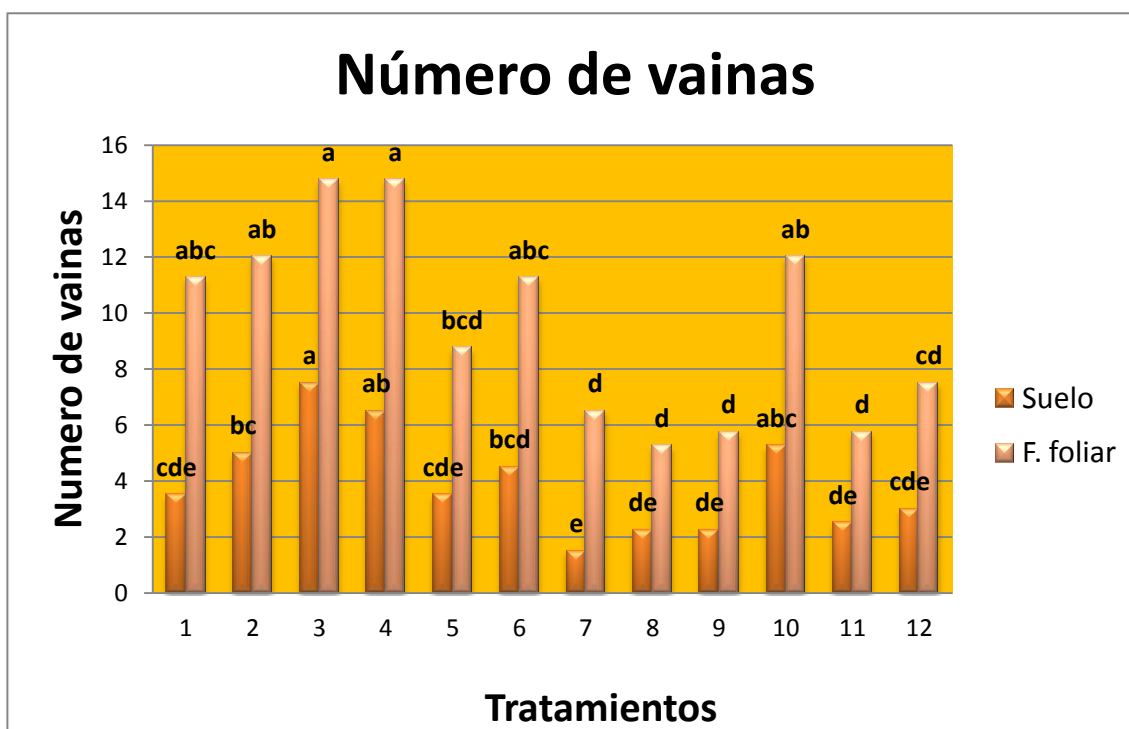
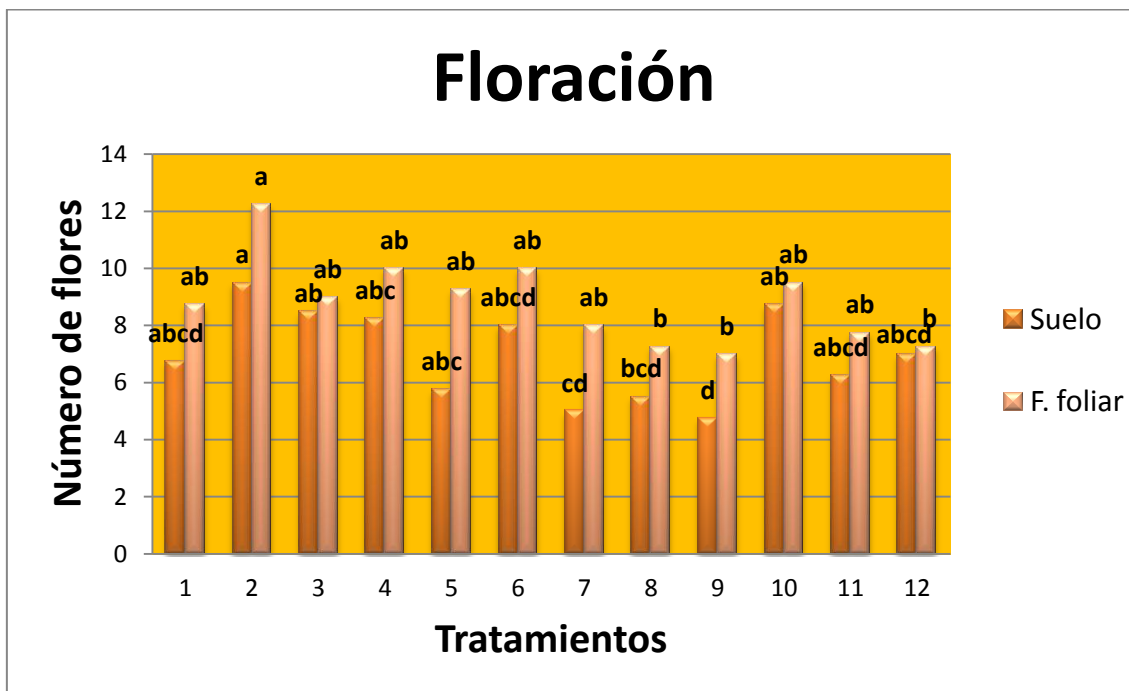
## 10. CONCLUSIONES.

1. La inoculación de microorganismos benéficos a las semillas de frijol, favorece la germinación de las semillas con poblaciones de  $10^6$  UFC g o mL.
2. En la evaluación de las etapas fenológicas de las plantas de frijol inoculadas, los tratamientos inoculados con *Klebsiella pneumoniae* KMT10-2, *Azospirillum brasilense* 7A+10B solas y en combinación de *Trichoderma asperellum* Tas-10 y la cepa de *Rhizobium tropici* CIAT 899 fueron las que mostraron mayor porcentaje en número de ramas, floración, número de vainas, masa seca de vainas, masa seca de tallo y en el número de nódulos, respecto al control de cada tratamiento.
3. Al utilizar *A. brasilense* 7A+10B combinadas con el hongo *T. asperellum* Tas-10 se pudo observar en el número de ramas y en el número de nódulos que la diferencia era significativa respecto al control, lo que sugiere que la inoculación tiene un fuerte efecto benéfico en plantas de frijol.
4. Al adicionar nutrientes vía foliar a las plantas a través del proceso de biofortificación, se obtuvo mayor efecto en el número de ramas y floración mostrando en algunos tratamientos diferencias significativas respecto al control, sugiriendo que la biofertilización del cultivo se puede mejorar complementando a través de la nutrición foliar.

## **11. SUGERENCIA**

Llevar a cabo este mismo experimento pero en condiciones de campo, específicamente en el municipio de Hueytlalpan de donde las semillas son nativas para que de esta manera se puedan comparar los efectos de estos microorganismos en condiciones de campo con los obtenidos en condiciones de invernadero.

## 12. ANEXO



1. M7

2. CIAT 899

3. 7A+10B

4. KMT10-2

5. Tas-10

6. M4

7. B35+B40

8. M7+CIAT899+7A+10B

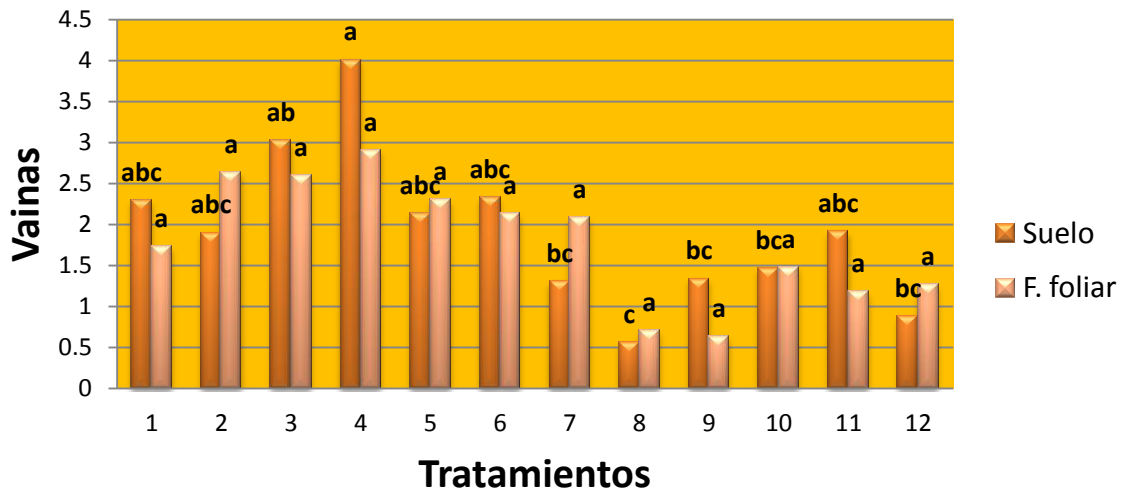
9. F. Q. 100%

10. F. Q. 50%

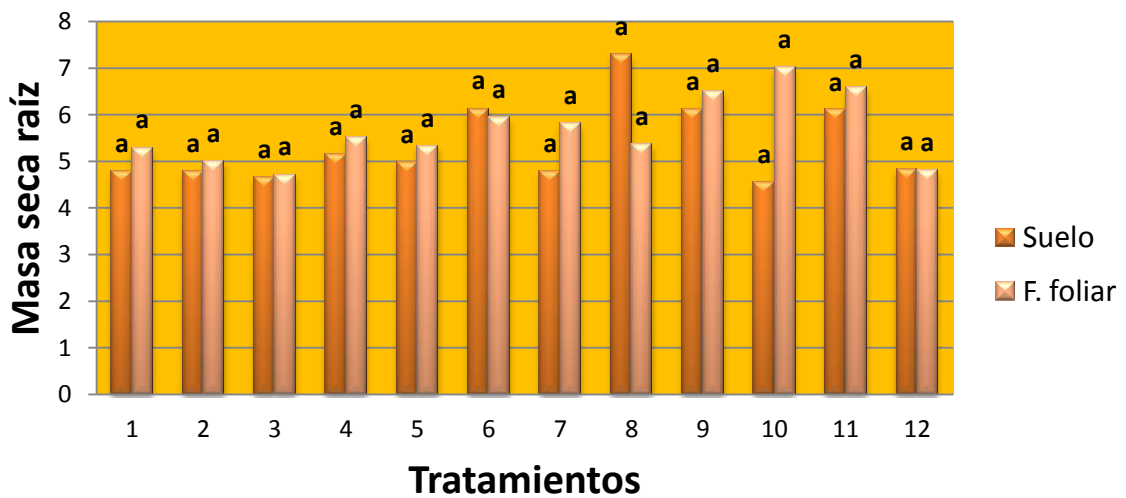
11. Tas-10+7A+10B

12. CONTROL

# Masa seca vainas

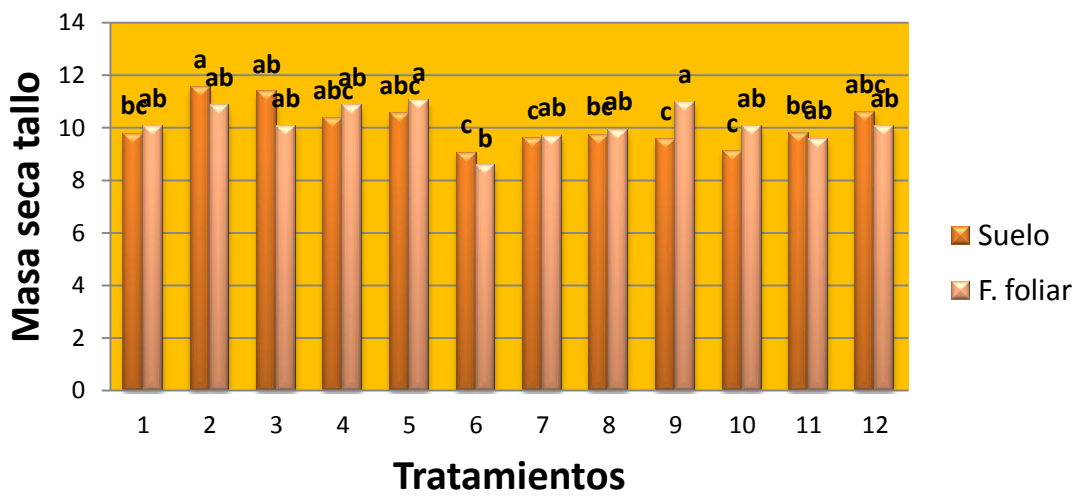


# Masa seca raíz

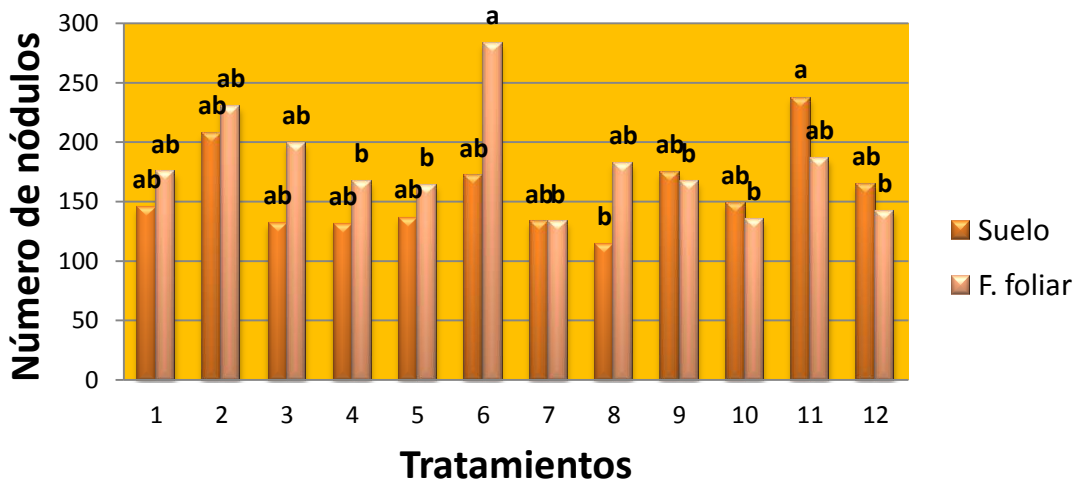


- |             |            |                      |                   |
|-------------|------------|----------------------|-------------------|
| 1. M7       | 4. KMT10-2 | 7. B35+B40           | 10. F. Q. 50%     |
| 2. CIAT 899 | 5. Tas-10  | 8. M7+CIAT899+7A+10B | 11. Tas-10+7A+10B |
| 3. 7A+10B   | 6. M4      | 9. F. Q. 100%        | 12. CONTROL       |

# Masa seca tallo



# Nódulos



1. M7

2. CIAT 899

3. 7A+10B

4. KMT10-2

5. Tas-10

6. M4

7. B35+B40

8. M7+CIAT899+7A+10B

9. F. Q. 100%

10. F. Q. 50%

11. Tas-10+7A+10B

12. CONTROL

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, O. y L. Uribe. 1996.** Inoculación del frijol común con tres cepas seleccionadas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Agronomía Mesoamericana*, 7(1): 35- 40.
- Ahmad, F. 2006.** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2):173-181.
- Ahemad, M. y M. Kibret. 2014.** Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26(1): 1-20.
- Alarcón, A. y R. Ferrera-Cerrato. 2012.** Biofertilizantes: importancia y utilización en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 26(2): 191-203.
- Aliye, N., C. Fininsa y Y. Hiskias. 2008.** Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Biol. Control*. 47(3):282-288.
- Allan, D. y P. Graham. 2002. Arenas, N. E., A. J. Gutiérrez, L. M. Salazar, J. C. Polanco y A. Gómez. 2010.** Construcción de una filogenia molecular para las especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* basada en los genes ARNr 16S y ARN polimerasa subunidad. *Revista Ciencias de la Salud*, 7(2): 22-29.
- Bacilio-Jiménez, M., S. Aguilar-Flores, E. Ventura-Zapata, E. Pérez-Campos, S. Bouquelet y E. Zenteno. 2003.** Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and Soil*, 249(2): 271-277.
- Barea, J. M., M. J. Pozo, R. Azcon y C. A. Aguilar. 2005.** Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56, 1761–1778.

- Barreiro, P. M. 1997.** La producción de frijol en México: diversidad y libre mercado. *Claridades Agropec.* 47:2-23.
- Bashan, Y. y G. Holguin. 1997.** *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology.* 4(2):103-121.
- Beltrán, M. E. 2014.** La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.* 15(1): 101-113.
- Bhattacharyya, P. N. y D.K. Jha. 2012.** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal Microbiology and Biotechnology.* 28(4):1327-1350.
- Brock, T. D. y M. T. Madigan. 1996.** Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Plant and Soil.* 184:311-321.
- Caballero-Mellado, J. 2006.** Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Revista Latinoamericana de Microbiología,* 48(2): 154-161.
- Camelo, M. 2011.** Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista CORPOICA. Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 12(2): 159-166.
- Cano, M. A. 2011.** Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica* 14(2):15-31.
- Carter, J. S., F. J. Bowden, I. Bastian, G. M. Myers, K. S. Sriprakash y D. J. Kemp. 1999.** Phylogenetic evidence for reclassification of *Calymatobacterium granulomatis* as *Klebsiella granulomatis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 49(4): 1695–1700.

- Cassán, F., D. Perrig, V. Sgroy, O. Masciarelli, C. Penna y V. Luna. 2009.** *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology* 45(1):28-35.
- Chabot R, Ch. Beauchamp, J. Kloepper H. Antoun. 1996.** Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1615-1618.
- Chonay P., J.J. 1981.** Efecto de la fertilización foliar sobre la compensación de la fijación biológica de nitrógeno por *Rhizobium phaseoli* en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Maestría. CEDAF-CP. Chapingo, Méx.
- Cueto-Wong, J. A. y U. Figueroa-Viramontes. 2012.** Impacto ambiental de la fertilización y recomendaciones para mejorar la eficiencia en el uso de nutrimentos. p. 2-36
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2011.** La Biodiversidad en Puebla: Estudio de Estado. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Gobierno del Estado de Puebla, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 440 páginas
- Danilo, N. 2011.** El cultivo del frijol. SAG DICTA. p. 1-35
- De-Bashan, L. E., G. Holguin, B. R. Glick y Y. Bashan. 2007.** Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *Microbiología Agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta micro-organismo.* p 170-224. *In:* Ferrera-Cerrato, R. y A. Alarcón (Eds.). *Microbiología Agrícola.* Editorial Trillas. México.
- De la Parte, E. M., T. C. Pérez. y D. García. 2014.** Hongos asociados a semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivadas en Cuba. *Bioteología vegetal.* 14(2):99-105.

- Divito, G. A. y V. O. Sadras. 2014.** ¿Cómo afectan el fósforo, el potasio y el azufre al crecimiento en las leguminosas y la fijación biológica de nitrógeno? Un meta-análisis. *Field Crops Research*, 156:161-171.
- Dosreis, F. 2000.** Occurrence of diazotrophic bacteria in different sugar cane genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 35(5): 985-994.
- Drancourt, M., C. Bollet, A. Carta, P. Rousselier. 2001.** Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51(3): 925–932.
- Falk, E.C., J.L. Johnson, V.L.D. Baldani, J. Döbereiner y N.R. Krieg. 1986.** Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 36(1): 80-85.
- Fankem, H., D. Nwaga, A. Deubel, L. Dieng, W. Merbach y F. X Etoa. 2006.** Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *African Journal of Biotechnology*. 5(24):2450-2460.
- FAO. 2002.** Los fertilizantes y su uso: una guía de bolsillo para los oficiales de extensión. p 4.
- Fischbein, D. 2012.** Introducción a la teoría del control biológico de plagas. Manejo integrado de plagas forestales. INTA EEA Bariloche. p. 4.
- Franco, A. D., y A. S. O. Morales. 2006.** Efecto de Inoculación con *Azospirillum brasilense* y fertilización química en el crecimiento y rendimiento de canola (*Brassica napus*). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(1): 63-67.
- Frankenberger, W. T. y M. Arshad. 1995.** Phytohormones in soils microbial production and function. Marcel Dekker, Inc. New York USA. p. 503.

- Gartland, A. P., A. P. Duran, A. Rangel, F. Tovar. 2011.** El uso de tres cepas diferentes de *Rhizobium* como fertilizante natural, comparado con un fertilizante químico. pp. 1-17.
- Giskin, M.L., A. Trinidad S. y J.D. Etchevers. 1984.** Can the foliar application of essential nutrients decrease fertilizer inputs? Act. VI. International Colloquium for the Optimization of Plant Nutrition. 1:239-242. Montpellier, France.
- Glick, B. R. 2012.** Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica. pp. 1-15.
- González-Chávez, M. 2005.** Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. TERRA Latinoamericana. 23: 29-37.
- Guo, J. H., H. Y. Qi, Y. H. Guo, H. L. Ge, L. Y. Gong, L. X. Zhang, P. H. Sun. 2004.** Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. Biological Control. 29(1):66-72.
- Gutiérrez-Ramírez A. 2013.** Control biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y su uso en el Estado de Nayarit, México. Revista Bio Ciencias. 2(3):102-112.
- Hallmann, J. A. Quandt-Hallmann, W.F. Mahaffee, J.W. Kloepper. 1997.** Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology, 43 (10): 895–914.
- Hernández, Y., O. A. García y M. Ramón. 2001.** Utilización de algunos microorganismos del suelo en cultivos de interés para la ganadería. 35(2): 85-97.
- Hoyos-Carvajal, L., S. Orduz y J. Bissett. 2009.** Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. Biological control, 51(3): 409-416.
- Howell, C. P., L. S. Puckhaber. 2005.** A study of the characteristics of “P” and “Q” strains of *Trichoderma virens* to account for differences in biological

control efficacy against cotton seedling diseases. *Biol. Control*. 33:217-222.

**Howell C. P. 2006.** Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopath.* 96(2):178-180.

**Hungria, M., M. A. Nogueira, R. Silva-Araujo. 2013.** Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biol Fertil Soils*. 49: 7791–801

**Illmer P. y F. Schinner. 1995.** Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil. Biol. Biochem.* 27(3): 257-263.

**INIFAP Produce. 1997.** Guía para la asistencia técnica agrícola en el área de influencia del campo experimental, Tecamachalco.

**Khan, M.S, A. Zaidi, P. A. Wani, M. Ahemad y M. Oves. 2009.** Functional diversity among plant growth-promoting rhizobacteria. In: Khan MS, Zaidi A, Musarrat J (eds.) *Microbial strategies for crop improvement*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 105–132.

**Khush, G. S., S. Lee, J. I. Cho y J. S. Jeon. 2012.** Biofortification of crops for reducing malnutrition. *Plant biotechnology reports*, 6(3):195-202.

**Kimura, Z., K. Chung, H. Itoh, A. Hiraishi y S. Okabe. 2014.** *Raoultella electrica* sp. nov., isolated from anodic biofilms of a glucose-fed microbial fuel cell. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64(4):1384-1388.

**Kutman, B. Y., U. B. Kutman y I. Cakmak, 2014.** Effects of seed nickel reserves or externally supplied nickel on the growth, nitrogen metabolites and nitrogen use efficiency of urea-or nitrate-fed soybean. *Plant and soil*, 376(1-2):261-276.

**Leandro, L. F. S., T. Guzmán, L. M. Ferguson, G. E. Fernández, F. J. Louws. 2007.** Population dynamics of *Trichoderma* in fumigated and

compostamended soil and on strawberry roots. *Applied Soil Ecology*. 35(1):237-246.

**Lambrecht, M., Y. Okon, B. A. Vande, J. Vanderleyden. 2000.** Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria plant interactions. *Trends in Microbiology*. 8(7):298–300.

**Lara-Flores M. 2015.** El cultivo del frijol en México. *Revista Digital Universitaria*. 16(2):2-11.

**Lozada, A. E., G. G. Lagarda, A. M. Jiménez y F. B. Zapata. 2004.** Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. 38(6): 583-592

**Lugtenberg, B. y F. Kamilova. 2009.** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63: 541-556.

**Malavolta, E., y M.F. Moraes. 2005.** Orelha de rato. Informe Laboratorio de Nutrición Mineral de Plantas, CENA –USP. Piracicaba, Brasil. 2 p.

**Mantilla, C. L., M. V. Anayay L. E. O. Zumaqué. 2007.** Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2): 6-14.

**Mayz, J. 2004.** Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola* 4(1):1-20.

**Meenakshi, J. V., N. L. Johnson, V. M. Manyong, H. Degroote, J. Javelosa, D. R. Yanggen, F. Naher, C. González, J. García y E. Meng. 2010.** How cost-effective is biofortification in combating micronutrient malnutrition? An ex ante assessment. *World Development*, 38(1), 64-75.

**Muñoz, S. R. 2010.** Rica fuente de proteínas. CONABIO. *Biodiversitas*. 89:7-11.

**Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover y R. H. Tenover. 1999.** *Manual of clinical microbiology*. 7a. Edición. Ed. ASM. 1773 p.

**Navarrete-Maya, R., E. Trejo-Albarrán, J. Navarrete-Maya, J. M. Prudencio-Sains y J. A. Acosta Gallegos, 2009.** Reacción de genotipos de frijol a

*Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* bajo condiciones de campo e invernadero. Agricultura técnica en México, 35(4): 459-470.

**Noriharu, A., J. Arihara, K. Okada, T. Yoshihara y C. Johansen. 1990.** Phosphorus Uptake by *Pigeon Pea* and Its Role in Cropping Systems of the Indian Subcontinent. Science, 248(4954): 477-480.

**Okon Y. y C. Labandera-Gonzalez. 1994.** Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem. 26(12): 1591-1601.

**Oliver-Rodríguez, T. J. 2004.** Inoculación de las Rizobacterias productoras de indoles sobre la nodulación de plantas de frijol variedad Jamapa por *Rhizobium etli* y *Rhizobium tropici*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ingeniería Química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. p. 1-59.

**Ortega, A. E., y E. Malavolta. 2012.** Los más recientes micronutrientes vegetales. IAH7. pp. 16-25.

**Parsons, R. y Sunley, R. J. 2001.** Nitrogen nutrition and the role of root-shot nitrogen signalling particularly in symbiotic systems. J. Exp. Bot. 52:435-443.

**Patiño, C. 2010.** Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del valle del cauca. Estudio de biodiversidad y eficiencia (tesis doctoral en Ciencias Agropecuarias - Manejo de Suelos y Aguas). Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

**Patten, C.L., B.R. Glick. 1996.** Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can. J. Microbiol. 42(3): 207-220.

**Pazos, M. 2000.** Aislamiento e identificación de cepas nativas, pertenecientes al género *Azospirillum* mediante técnicas moleculares. Tesis en opción al Grado Científico de Maestro en Ecología Microbiana. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. 50p.

- Peña, H. y I. Reyes. 2007.** Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfato en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia*. 32:560-565.
- Pérez, E., M. Sulbaran, M. M. Ball y L. A. Yarzabal. 2007.** Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(11):2905-2914.
- Ramírez, G. 1984.** Efecto de la fertilización con nitrógeno y fósforo del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en un suelo de Upala. *Agronomía Costarricense*. 8(1): 69-73.
- Ramírez-Pérez, A. R., R. Díaz-Ruiz, C. Jacinto-Hernández, J. A. Paredes-Sánchez, y R. Garza García. 2012.** Diversidad de frijoles nativos de diferentes regiones del estado de Puebla. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(3): 467-480.
- Reyes-Matamoros, J., D. Martínez-Moreno, R. Rueda-Luna y T. Rodríguez-Ramírez. 2014.** Efecto del estrés hídrico en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de invernadero. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 1 (2):191.
- Reyes-Rivas, E., L. E. Padilla-Bernal, O. Pérez-Veyna y P. López-Jáquez. 2008.** Historia, naturaleza y cualidades alimentarias del frijol. *Revista Investigación Científica*. 4(3):13.
- Rodríguez, L. A. y H. C. Arredondo. 2007.** Teoría y aplicación del control biológico. *Sociedad Mexicana de Control Biológico*. pp. 2-67.
- Romheld, V. y M. El-Fouly. 2002.** Aplicación foliar de nutrientes: retos y límites en la producción agrícola. *Informaciones Agronómicas*. 48:10-14.
- Roper, M. M., y J. K. Ladha. 1995.** Biological N<sub>2</sub> fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. In: *Management of Biological Nitrogen Fixation for the Development of More Productive and Sustainable Agricultural Systems*. 174: 211-224.

- Rosas, S. B., J. A. Andrés, M. Rovera y N. S. Correa. 2006.** Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(12): 3502-3505.
- Rosas, J. C. 2003.** El cultivo del frijol común en América tropical. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 2da edición. Imprenta Litocom, Tegucigalpa, Honduras, 57 p.
- Rosenblueth, M., L. Martínez, J. Silva y E. Martínez-Romero. 2004.** *Klebsiella varicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Systematic and Applied Microbiology*. 27(1): 27-35.
- Sadeghian, K.S. 2003.** Efecto de la fertilización con nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio sobre las propiedades químicas de los suelos cultivados en café. *Cenicafé* 54(3): 242-257.
- SAGARPA. "Ciclo agrícola otoño-invierno" 2011-2012.** Valle del Fuerte, Sinaloa.
- Salas-Moras, L. E. 2000.** Identificación de microorganismos solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo de maíz de tres áreas edafoclimáticas diferentes. Tesis de licenciatura. Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. pp. 77.
- Salinas-García, J., R. A. Díaz-Franco, E. Garza-Cano y I. Garza-Cano. 2005.** Efectos de la labranza y biofertilización en propiedades del suelo que afectan la sostenibilidad de la producción de frijol. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5(1): 30-34.
- SEMARNAT. 2004.** El suelo. *GEO México*. p 120.
- Singleton, P. 1997.** *Bacteria in Biology, biotechnology and medicine*. John Wiley and Sons. 4a. edición. 403 p.
- Soil Survey Staff. 1995.** Claves para la Taxonomía de Suelos, versión 1994. Traducción de: Carlos A. Ortiz, Ma. del Carmen Gutiérrez Castorena y Jorge Luis García Rodríguez. Primera Edición en Español. 1995. Publicación Especial 3. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo (SMCS). Chapingo, México. 306 págs.

- Spaepen, S., J. Vanderleyden y R. Remans. 2007.** Indole- 3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS. Microbiol. Rev.* 31: 425–448.
- Stewart, W. M. 2007.** Consideraciones en el uso eficiente de nutrientes. *Informaciones Agronomicas*, 67:1-6.
- Sturz A.V., B.R. Chistie. 2003.** Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil & Tillage Res.* 72:107-123.
- Storcksdieck, S. y R. F. Hunrrell. 2008.** The impact of trace elements from plants on human nutrition: A case for biofortification. 13: 1-17.
- Tataranni, G., B. Dichio y C. Xiloyannis. 2012.** Soil fungi-plant interaction. p161-188 In: *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*. G. Montanaro (Ed.). In Tech. [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com).
- Toro, C. y R. Daniel. 2004.** La biodiversidad microbiana del suelo, un mundo por descubrir. *Revista Luna Azul*, 19: 1-8.
- Trejo-Téllez, L.I., M.N. Rodríguez-Mendoza, G. Alcantar-González. 2007.** Fertilización foliar. pp. 326-371. En: Alcantar-González, G y L.I. Trejo-Téllez (Coordinadores). *Nutrición de Cultivos*. Mundi Prensa México.
- Van Driesche, R. G., M. S. Hoddle, T. D. Center, C. E. Ruíz, B. J. Coronada y A. J. Manuel. 2007.** Control de plagas y malezas por enemigos naturales. Washington. U. S. D. A. 3-46.
- Velazco, A. 2001.** Utilización de *Azospirillum brasilense* en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) sobre un suelo Hidromórfico Gley de la provincia de Pinar del Río. [Tesis de doctorado]. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Instituto de Ecología y Sistemática. Ciudad de La Habana., 101 h.
- Verma M., S. K. Brar, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli, J. R. Valéro. 2007.** Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoly of biological control. *Biochemical Engineering*. 37(1):1-20.

- Vinale F., K. Sivasithamparam, E. L. Ghisalberti, R. Marra, M. J. Barbetti, H. Li, S. L. Woo., M. Lorito. 2008.** A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 72(1):80-86.
- Welch, R. M. y R. D. Graham. 2004.** Breeding strategies for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany*. 55(396): 353-364.
- Welch R.M. y R. D. Graham. 2005.** Agriculture: the real nexus for enhancing bioavailable micronutrients in food crops. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18(4): 299–307.
- White, P. J. y Broadky M. R. 2005.** Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends of Plant Science*. 10(12): 586- 593.
- White, P. J. y P. H. Brown. 2010.** Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of botany*, 105(7):1073-1080.
- White, P. J. y M. R. Broadley. 2009.** Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets—iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182(1): 49-84.
- Yasir, M., Z. Aslam, S. W. Kim, C. O. Jeon, Y. R. Chung. 2009.** Bacterial community composition and chitinase gene diversity of vermicompost with antifungal activity. *Bioresource Technology*. 100(19):4396-4403.
- Zaidi, A., M. Ahemad, M. Oves, E. Ahmad y M. S. Khan. 2010.** Role of phosphate-solubilizing bacteria in legume improvement. pp. 273-292. En: Khan, M. S., A. Zaidi, J. Musarrat. (Coordinadores). *Microbes for Legume Improvement*. Springer Wien New York.