



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

COLEGIO DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**INOCULACIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL
CRECIMIENTO VEGETAL EN PLANTAS DE INTERÉS
ALIMENTARIO**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

LICENCIATURA EN INGENIERA EN ALIMENTOS

Presenta:

ISABEL MUÑOZ GONZÁLEZ

Director de Tesis:

Dr. José Carlos Mendoza Hernández

Puebla, Pue. Noviembre 2016



ÍNDICE GENERAL

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
JUSTIFICACIÓN	2
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
HIPÓTESIS	4
CAPÍTULO I:	5
ANTECEDENTES	5
1.1. Importancia y descripción de la planta de chícharo.	5
1.2. Importancia y descripción de la planta de calabaza.	6
1.3. Importancia y descripción de la planta de girasol	8
1.4. Introducción a la agricultura sustentable y cultivos orgánicos	9
1.5. Rizósfera.	11
1.6. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)	13
CAPÍTULO II.	16
METODOLOGÍA	16
Diagrama de proceso general	16
2.1 Caracterización como bacterias promotoras del crecimiento	17
2.2 Preparación del inóculo	17
2.3 Preparación de las semillas	18
2.4 Preparación de maceteros.	18
2.5 Diseño Experimental.	19

2.6	Parámetros de crecimiento	20
2.8	Análisis estadístico.....	21
CAPÍTULO III.....		22
RESULTADOS		22
3.1	Evaluación de la planta de Chícharo (<i>Pisum Sativum</i>).....	22
3.1.1	Longitud promedio de raíz y tallo	22
3.1.2	Efecto en la concentración de micro y macronutrientes	24
3.1.2.1	Concentración de Manganeso (Mn).....	24
3.1.2.2	Concentración de Cobre (Cu)	25
3.1.2.3	Concentración de Níquel (Ni).....	26
3.1.2.4	Concentración de Zinc (Zn).....	27
3.1.2.5	Concentración de Hierro (Fe).....	28
3.1.2.6	Concentración de Sodio (Na).....	29
3.1.2.7	Concentración de Potasio (K).....	30
3.1.2.8	Concentración de Fósforo (P).....	31
3.2	Evaluación de la planta de Calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>).....	32
3.2.1	Longitud promedio de raíz y tallo	32
3.2.2	Efecto en la concentración de micro y macronutrientes	33
3.2.2.1	Concentración de Manganeso (Mn).....	33
3.2.2.2	Concentración de Cobre (Cu)	34
3.2.2.3	Concentración de Níquel (Ni).....	35
3.2.2.4	Concentración de Zinc (Zn).....	36
3.2.2.5	Concentración de Hierro (Fe).....	37
3.2.2.6	Concentración de Sodio (Na).....	38

3.2.2.7	Concentración de Potasio (K)	39
3.2.2.8	Concentración de Fósforo (P)	40
3.3	Evaluación de la planta de Girasol (<i>Helianthus annuus</i>)	41
3.3.1	Longitud promedio de raíz y tallo	41
3.3.2	Efecto en la concentración de micro y macronutrientes	42
3.3.2.1	Concentración de Manganeso (Mn)	42
3.3.2.2	Concentración de Cobre (Cu)	43
3.3.2.3	Concentración de Níquel (Ni)	44
3.3.2.4	Concentración de Zinc (Zn)	45
3.3.2.5	Concentración de Hierro (Fe)	46
3.3.2.6	Concentración de Sodio (Na)	47
3.3.2.7	Concentración de Potasio (K)	48
3.3.2.8	Concentración de Fósforo (P)	49
	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
	CONCLUSIONES	52
	BIBLIOGRAFÍA	54

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Propagación masiva de cepas bacterianas.</i>	17
<i>Figura 2. a) Bacterias centrifugadas, b) Preparación de inóculo.</i>	18
<i>Figura 3. Preparación de maceteros con sustrato e hidratados.</i>	18
<i>Figura 4. Diseño experimental por triplicado.</i>	20
<i>Figura 5. a) Plantas a los 20 días de crecimiento, b) raíz y tallo limpios.</i>	20
<i>Tabla 1. Diseño de experimentos aplicado en el proyecto de investigación.</i>	19
<i>Figura 6. a) Digestión ácida, b) Absorción atómica.</i>	21
<i>Figura 7. Longitud promedio de raíz y tallo de las plantas de chícharo por efecto de la inoculación de PGPR.</i>	23
<i>Figura 8. Concentración de Mn en raíz y tallo de las plantas de chícharo inoculadas con PGPR.</i>	24
<i>Figura 9. Concentración de Cu en raíz y tallo de las plantas de chícharo inoculadas con PGPR.</i>	25
<i>Figura 10. Concentración de Ni en raíz y tallo de las plantas de chícharo inoculadas con PGPR.</i>	26
<i>Figura 11. Concentración de Zn en raíz y tallo de las plantas de chícharo inoculadas con PGPR.</i>	27
<i>Figura 12. Concentración de Fe en raíz y tallo de las plantas de chícharo inoculadas con PGPR.</i>	28
<i>Figura 13. Concentración de Na en raíz y tallo de las plantas de chícharo inoculadas con PGPR.</i>	29
<i>Figura 14. Concentración de K en raíz y tallo de las plantas de chícharo inoculadas con PGPR.</i>	30
<i>Figura 15. Concentración de P en raíz y tallo de las plantas de chícharo inoculadas con PGPR.</i>	31
<i>Figura 16. Longitud promedio de raíz y tallo de las plantas de calabaza por efecto de la inoculación de PGPR.</i>	32
<i>Figura 17. Concentración de Mn en raíz y tallo de las plantas de calabaza inoculadas con PGPR.</i>	33
<i>Figura 18. Concentración de Cu en raíz y tallo de las plantas de calabaza inoculadas con PGPR.</i>	34

Figura 19. Concentración de Ni en raíz y tallo de las plantas de calabaza inoculadas con PGPR.	35
Figura 20. Concentración de Zn en raíz y tallo de las plantas de calabaza inoculadas con PGPR.	36
Figura 21. Concentración de Fe en raíz y tallo de las plantas de calabaza inoculadas con PGPR.	37
Figura 22. Concentración de Na en raíz y tallo de las plantas de calabaza inoculadas con PGPR.	38
Figura 23. Concentración de K en raíz y tallo de las plantas de calabaza inoculadas con PGPR.	39
Figura 24. Concentración de P en raíz y tallo de las plantas de calabaza inoculadas con PGPR.	40
Figura 25. Longitud promedio de raíz y tallo de las plantas de girasol por efecto de la inoculación de PGPR.	41
Figura 26. Concentración de Mn en raíz y tallo de las plantas de girasol inoculadas con PGPR.	42
Figura 27. Concentración de Cu en raíz y tallo de las plantas de girasol inoculadas con PGPR.	43
Figura 28. Concentración de Ni en raíz y tallo de las plantas de girasol inoculadas con PGPR.	44
Figura 29. Concentración de Zn en raíz y tallo de las plantas de girasol inoculadas con PGPR.	45
Figura 30. Concentración de Fe en raíz y tallo de las plantas de girasol inoculadas con PGPR.	46
Figura 31. Concentración de Na en raíz y tallo de las plantas de girasol inoculadas con PGPR.	47
Figura 32. Concentración de K en raíz y tallo de las plantas de girasol inoculadas con PGPR.	48
Figura 33. Concentración de P en raíz y tallo de las plantas de girasol inoculadas con PGPR.	49

INOCULACIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN PLANTAS DE INTERÉS ALIMENTARIO.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como consecuencia del incremento en daños al medio ambiente y el crecimiento de la población en todo el mundo, la producción mundial de alimentos pronto podría ser insuficiente para alimentar a la población. Según los expertos de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) dentro de 9 años, en 2025 en nuestro planeta la población mundial será de 6,800 a 9,100 millones (FAO, 2009). Por lo anterior para poder alimentar a todos estos individuos es esencial que la productividad agrícola se incremente significativamente en las próximas décadas, para así proporcionar los alimentos suficientes. La producción agrícola requiere de estrategias que aseguren un crecimiento sano de las plantas y un rendimiento rentable, aunque claramente muchas de las soluciones a este problema no son sustentables y no serán efectivas a corto plazo; para lograr este incremento se requerirá de diferentes tecnologías entre las que se incluyen las microbiológicas para tener una agricultura más sustentable.

JUSTIFICACIÓN

A fin de reducir la pobreza y hacer posible que todos tengan acceso a los alimentos, es esencial que haya un entorno propicio para que el crecimiento económico se reparta equitativamente. El sector agrícola representa uno de los mayores retos para la investigación, el mejoramiento y aumento de la producción, es una acción importante para reducir la pobreza, la desnutrición y proporcionar la economía necesaria. Uno de los mecanismos inmediatos para contrarrestar la baja fertilidad es el uso de fertilizantes químicos; sin embargo, la aplicación de dosis altas de fertilizante es poco recomendable, debido a las condiciones de escasa precipitación y a las restricciones de capital que enfrentan los productores (Sergio *et al.*, 1998).

Para asegurar el crecimiento sano de las plantas y un rendimiento rentable, es necesario aumentar de manera sostenible la productividad agrícola por lo que se propone el uso de soluciones biológicas sostenibles y amigables con el medio ambiente como lo son las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal también conocidas como PGPR (del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria).

En las últimas décadas, las investigaciones se han enfocado en conocer la función de las bacterias de la rizósfera o rizobacterias de diversas gramíneas como caña de azúcar, maíz, trigo, sorgo, cebada y pastos tropicales, los microorganismos más estudiados pertenecen a los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacter*, las cuales han demostrado ejercer una simbiosis asociativa con la capacidad de emplear mecanismos como: la fijación biológica de nitrógeno, producción de sustancias reguladoras de crecimiento, solubilización de algunos minerales, entre otros; mecanismos llevados a cabo según la funcionalidad biológica de cada bacteria. (Loredo *et al.*, 2004).

Otro trabajo desarrollado por Garrido & Rubiano (2007), referente al tema de la evaluación de poblaciones bacterianas asociadas a forrajes, resultó en 11 aislamientos seleccionados por su capacidad de reducción de Acetileno (ARA), determinándose que estos aislamientos pertenecen a los géneros *Azospirillum* y *Klebsiella*, los cuales podrían ser utilizados como posibles biofertilizantes.

Con el fin de mejorar el desarrollo de las plantas de chícharo (*Pisum sativum*), calabaza (*Cucurbita pepo*) y girasol (*Helianthus annuus L.*) en este trabajo se evaluó el efecto de inoculación con Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal de los géneros *E.coli*, *Lysinibacillus* y *Enterobacter*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto en el crecimiento vegetal en plantas de chícharo (*Pisum sativum*), calabaza (*Cucurbita pepo*) y girasol (*Helianthus annuus L.*) inoculadas con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Enterobacter*, *E.coli* y *Lysinibacillus*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el efecto de las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal en la longitud de la raíz y el tallo de las plantas de chícharo, calabaza y girasol.
- Cuantificar los micronutrientes y macronutrientes en las plantas de chícharo, calabaza y girasol inoculadas con Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal.

HIPÓTESIS

H₀: la inoculación de plantas con bacterias promotoras del crecimiento vegetal no aumentará su crecimiento por lo tanto no beneficiará en la nutrición de estas.

H₁: la inoculación de plantas con bacterias promotoras del crecimiento vegetal aumentará su crecimiento y beneficiará en la nutrición de estas

CAPÍTULO I:

ANTECEDENTES

1.1. Importancia y descripción de la planta de chícharo.

Nombre común: Chícharo

Nombre científico: *Pisum sativum L.*

Familia botánica: Fabáceas (leguminosas).

Origen: Oriente

Clima y suelo: La planta se cultiva en climas húmedos y templados con temperaturas de entre 16 y 20°C. Los suelos idóneos para el chícharo son los ligeros de textura silíceo-limosa. Este cultivo no tolera suelos muy ácidos y se ha de vigilar el pH para tratar de que no sea inferior a 6.5.

Características generales: La planta posee un sistema vegetativo poco desarrollado aunque con una raíz pivotante que tiende a profundizar bastante. Las hojas tienen pares de folíolos y terminan en zarcillos, que tienen la propiedad de asirse a los tutores que encuentran en su crecimiento; las vainas tienen de 5 a 10 cm de largo y suelen tener de 4 a 10 semillas generalmente verdes que pueden ser lisas o rugosas; son de forma y color variable, según las variedades.

Ciclo vegetativo: El ciclo de cultivo del chícharo va de 110 a 150 días. La recolección se hace cuando las vainas estén llenas de la semilla y tiernas, no se debe dejar que los granos se endurezcan; como síntomas se utilizan el que los tegumentos se desprendan fácilmente al presionar los granos y que tanto éstos como las vainas mantengan exteriormente su color verde característico.

Propiedades: Están constituidos mayormente por agua (78%), carbohidratos, proteínas, lípidos, sodio, potasio, calcio, fósforo, hierro, vitamina A, B1, B2 y B3 y vitamina C. Como todas las leguminosas, además de ser una buena fuente de proteínas, minerales y fibras es beneficiosa para la tierra, ya que fija el nitrógeno en el suelo debido a ciertas bacterias que proliferan en los nódulos de las raíces y producen nitratos. (INEGI, 2007).

Usos del cultivo: Los guisantes o chícharos tradicionalmente no fueron empleados para el consumo humano, sino que se utilizaban como alimento para el ganado, tanto en forma de planta tierna como por sus semillas secas. La versatilidad de usos va desde humano en fresco, hasta pasar por diversos procesos agroindustriales para su conservación (enlatado, deshidratados, congelado, harinas) como fuente de proteína en productos cárnicos, llegando a ser un valioso componente en la fabricación de suplementos alimenticios para la acuicultura. En México se presenta como una alternativa en la reconversión de cultivos.

En nuestro país, el chícharo se cultiva en 19 estados; el estado de Puebla ocupa el segundo lugar en producción con 18,037 toneladas anuales (Ordoñez N., 2010).

1.2. Importancia y descripción de la planta de calabaza.

Nombre común: Calabacita

Nombre científico: *Cucurbita pepo L.*

Familia botánica: Cucurbitáceas

Origen: Se le considera originaria de México y Sudamérica

Clima y suelo: La calabacita es una hortaliza de clima cálido que no tolera heladas, prospera en cualquier tipo de suelo, se desarrolla bien en suelos profundos y ricos en materia orgánica.

Variedades: Sus variedades botánicas son: condesa, ovifera, clarita, lolita y progreen, entre otras.

Características generales: Planta herbácea anual, erecta y también puede ser rastrera; los tallos son erectos en sus primeras etapas de desarrollo (hasta antes del tercer corte de frutos) y después se tornan rastreros; son angulares, cubiertos de vellos. Los pétalos de las flores son de color amarillo anaranjado. El fruto se consume en diversos estados de madurez fisiológica pero se les define como frutos inmaduros dentro de la amplia familia de las cucurbitáceas, los frutos jóvenes y pequeños son más tiernos y tienen por lo general un sabor ligeramente dulce. Las semillas son generalmente de color blanco, crema o ligeramente café.

Ciclo vegetativo: Para el corte del producto se considera el número de días que se aproxima a la cosecha o al primer corte, que va de 45 a 55 días, llegando a realizarse hasta 20 cortes. Otro aspecto que se toma como referencia es el tamaño del fruto, que puede variar de 12 a 15 cm, o hasta 20 cm en algunas variedades, otro indicador podría ser cuando la flor esté deshidratada o muestre un color café.

Propiedades: Los frutos maduros contienen cantidades altas de potasio, zinc y hierro. Las semillas contienen proteínas y aceites, de los cuales sólo 7% son considerados como saturados y 15 % son monoinsaturados; además contienen sustancias como, retinol, tiamina, riboflavina y niacina. Los frutos y flores tienen riboflavinas y betacarotenos. Esta especie posee propiedades antiespasmódicas y laxantes. La planta de calabacín, principalmente sus hojas, poseen propiedades diuréticas y vermífugas.

Usos del cultivo: El uso principal es para la alimentación humana, se consume en estado tierno, por lo que se le puede encontrar en una gran variedad de platillos culinarios. Las flores se emplean como alimento hervidas o fritas para diversas preparaciones, por su alto contenido de minerales, fósforo y calcio (INEGI, 2007).

El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) capto información de 55,454.24 toneladas de producción con ese cultivo en el estado de Puebla en la producción agrícola del año 2015 (SIAP, 2014).

1.3. Importancia y descripción de la planta de girasol

Nombre común: Girasol

Nombre científico: *Helianthus annuus L.*

Familia botánica: Asteráceas

Origen: Norte de México y oeste de EE UU

Clima y suelo: El girasol es una planta resistente, se adapta muy bien a un amplio margen de temperaturas, de 13° a 30°C, muy poco tolerante a la salinidad, se desarrolla principalmente en climas semicálido y semiseco; se produce tanto en la primavera como en el invierno y se caracteriza por aprovechar las posibilidades termohídricas que desarrolla el cultivo. Poco exigente en el tipo de suelo, aunque se desarrolla mejor en los arcillo-arenosos y ricos en materia orgánica, pero es esencial que el suelo tenga un buen drenaje y la capa freática se encuentre a poca profundidad.

Características generales: Planta herbácea anual, erecta, con tallos de consistencia semileñosa y maciza en su interior, hojas alternas, grandes, dentadas y de áspera velloso tanto en el haz como en el envés, el número de hojas varía según las condiciones de cultivo y la variedad. Las flores del exterior son estériles, están dispuestas radialmente. Las flores del interior están formadas por un ovario inferior, dos sépalos, una corola en forma de tubo compuesta por cinco pétalos y cinco anteras unidas a la base del tubo de la corola. Los frutos son aquenios, ovoides, comprimidos de color y tamaño variables con estrías blancas; las semillas

de girasol, también llamadas pipas, son gruesas pero más frágiles que las semillas del maíz, contienen un gran valor nutricional.

Propiedades: Las semillas son una fuente importante de vitamina E natural, minerales, fósforo, hierro lecitina y ácido caféico, lo que le confiere cierto valor nutricional necesario para la salud.

Usos del cultivo: El girasol se utiliza en la alimentación humana y animal, es cultivado como planta ornamental, para la producción de semilla oleaginosa y forraje. De la semilla se obtienen dos principales productos, harina y aceite: la primera se utiliza en la industria de alimentos balanceados por su alto contenido de proteína que requiere el ganado; el aceite es uno de los que tienen mejores beneficios a la salud, por su alto contenido de grasas polinsaturadas. Otros usos son la elaboración de jabones, cosméticos, detergentes, lubricantes, pinturas y biodiesel entre otros.

El girasol se encuentra entre las cuatro oleaginosos más importantes del mundo y representa alrededor del 8% de la producción mundial de este grupo, en contenido de aceite ocupa el 5° lugar, superado por el ajonjolí, cacahuate, olivo, y colza, siguiéndole el cártamo (INEGI, 2007). El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) capto información de 125,627.00 toneladas de producción con ese cultivo en el estado de México en la producción agrícola del año 2015 (SIAP, 2014).

1.4. Introducción a la agricultura sustentable y cultivos orgánicos

Dada la heterogeneidad de los ecosistemas naturales y de los sistemas agrícolas así como la naturaleza diferenciada de la pobreza rural, es claro de que no puede existir un tipo único de intervención tecnológica para el desarrollo. El problema con los enfoques agrícolas convencionales es que no han tomado en cuenta las

enormes variaciones en la ecología, las presiones de la población, las relaciones económicas y las organizaciones sociales que existen en la región, y por consiguiente el desarrollo agrícola no ha estado a la par con las necesidades y potencialidades actuales (Altieri, M. A., 2001).

Con el crecimiento de la población y el incremento de la demanda económica y social que se proyecta para la próxima década, se perfilan dos desafíos cruciales que deberán ser enfrentados por el mundo académico y el mundo del desarrollo:

- Incrementar la producción agrícola a nivel regional en casi un 30-40%, sin agravar aún más la degradación ambiental, y
- Proveer un acceso más igualitario a la población, no sólo a alimentos, sino a los recursos necesarios para producirlos.

La preocupación central hoy es la sustentabilidad de la agricultura. El concepto de sustentabilidad es útil porque recoge un conjunto de preocupaciones sobre la agricultura, concebida como un sistema tanto económico, social y ecológico. Por lo que a nivel mundial, está emergiendo un consenso en cuanto a la necesidad de nuevas estrategias de desarrollo agrícola para asegurar una producción estable de alimentos y que sea acorde con la calidad ambiental. Entre otros, los objetivos que se persiguen son: la seguridad alimentaria, erradicar la pobreza, conservar y proteger el ambiente así como los recursos naturales.

A pesar de que la conciencia respecto al impacto de las tecnologías modernas sobre el medio ambiente ha crecido, existen aquellos que al enfrentarse a los retos ambientales argumentan en favor de la intensificación tecnológica de la producción agrícola. Es en este contexto, que los simpatizantes de la agricultura convencional celebran el surgimiento de la biotecnología como la última “bala mágica” que revolucionará la agricultura con productos basados “en los métodos de la naturaleza”, como es el caso de la agricultura orgánica (Altieri, M. & Nicholls, C., 2000).

La agricultura orgánica es un sistema de producción que trata de utilizar al máximo los recursos naturales, dándole énfasis a la fertilidad del suelo y la actividad biológica y al mismo tiempo a minimizar el uso de recursos no renovables reduciendo o eliminando el uso de fertilizantes y plaguicidas sintéticos para proteger el medio ambiente y la salud humana (SAGARPA, 2009). La agricultura orgánica es diferente a la agricultura química, en el sentido de que en la orgánica se ocupan aquellos métodos de producción de alimentos pura y exclusivamente naturales que buscan no sólo prescindir del uso de plaguicidas, productos de síntesis química, pesticidas, antibióticos y transgénicos sino trabajar en armonía con el ambiente, así como mejorar las condiciones económicas y sociales de productores y consumidores. Estas producciones no sólo son beneficiosas para el alimento que logra un estado completamente natural, sino que además beneficia al medioambiente; además, los cultivos orgánicos en muchas oportunidades mantienen los nutrientes esenciales de su naturaleza, elementos que en muchos casos se pierden con la manipulación genética o utilización de agroquímicos (Secretaría de Fomento Agropecuario, 2009).

1.5. Rizósfera.

El término rizósfera fue definido en 1904 por Hiltner, como el volumen de suelo influenciado por la presencia de raíces de una planta viva, cuya extensión puede variar de acuerdo al tipo de suelo, la especie de planta, su edad y otros factores.

Esta zona se caracteriza por tener un alto nivel de actividad microbiana a causa de los nutrientes secretados por las raíces de las plantas en forma de exudados solubles como aminoácidos, ácidos orgánicos y otros. La rizósfera es relativamente rica en nutrientes pues el 40% de las sustancias producidas en la raíz se pierden en el suelo en forma de exudados solubles. La vasta actividad bacteriana presente en esta zona, determina entonces las propiedades fisicoquímicas del suelo de la rizósfera así como el de la superficie de la raíz.

Las comunidades bacterianas de la rizósfera tienen un eficiente sistema de absorción y catabolismo de compuestos orgánicos que se encuentran en los exudados de la raíces. A su vez existen bacterias que tienen la habilidad de adherirse a la superficie de las raíces obteniendo así el máximo beneficio de los exudados radicales (rizoplano). Por ultimo existen otras que penetran el tejido radical (endófitas) y tienen acceso directo a los compuestos orgánicos ahí presentes, evitando de esta forma todo tipo de competencia existente en la rizósfera o en el suelo (Gallegos & Angélica, 2009).

La rizósfera es la zona del suelo que se encuentra rodeando a la raíz de la planta y mide alrededor de 1 mm. Es aquí donde las bacterias encuentran diferentes sustancias como aminoácidos, proteínas, enzimas, azúcares, ácidos orgánicos y vitaminas, las cuales utilizan como fuente de energía o carbono (Ortiz R., 2015). En este pequeño lugar suceden intensos procesos biológicos en los que intervienen compuestos químicos del suelo, y provenientes de las secreciones de microorganismos y plantas, los cuales promueven o bloquean su interacción, siendo así una zona de interacción única y dinámica entre raíces de plantas y microorganismos del suelo. Esta región especializada, está caracterizada por el aumento de la biomasa microbiana y de su actividad. En la rizósfera se generan una serie de interacciones complejas, debido a una actividad biológica intensa y a una transferencia de agua y nutrientes desde el suelo hacia la planta que puede estar medida o no por la microbiota circundante a la raíz. Estas interacciones pueden resultar benéficas o dañinas a las plantas. En la rizósfera existe una amplia gama de compuestos orgánicos, tales como exudados de raíces de bajo peso molecular, secreciones y lisados celulares; por lo tanto, las raíces actúan como una fuente de carbono orgánico para los microorganismos que crecen en la rizósfera. Por ello, la densidad de las poblaciones de microorganismos es considerablemente más alta en la rizósfera que en el suelo lejano a la raíz.

Los microorganismos que colonizan la rizósfera se pueden clasificar de acuerdo a los efectos que tienen sobre las plantas y a la manera en que interactúan con las raíces; algunos microorganismos son patógenos de plantas mientras que otros tienen efectos benéficos sobre estas. En la rizósfera, las rizobacterias comúnmente se agrupan en microcolonias.

Estos microorganismos se benefician al tomar las sustancias secretadas por las plantas y en algunos casos pueden ocasionar una estimulación en el crecimiento de las mismas. En el grupo de rizobacterias promotoras de crecimiento se incluyen algunos géneros como: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *AZospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter* y *Azotobacter* entre otros (Cota Ochoa, 2014).

1.6. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)

El término “Rizobacteria” fue introducido por Kloepper y Schroth en el año 1978 para hacer referencia a aquellas comunidades bacterianas que se encontraban presentes en el suelo y que eran capaces de colonizar las raíces de las plantas. Los mismos autores en 1981, ampliaron este concepto y dieron el nombre de Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) a todos aquellos microorganismos capaces de estimular el crecimiento de las plantas posterior a la colonización de sus raíces. Actualmente, los microorganismos promotores de crecimiento vegetal no se restringen únicamente a las rizobacterias, además se incluyen hongos y bacterias de vida libre (Villarraga, 2014).

Los mecanismos de acción de estos microorganismos se basan en la interacción con la planta “huésped”, que puede ocurrir en tres niveles: la filósfera, la endósfera y la rizósfera. Las PGPR pueden inducir el crecimiento vegetal directamente o indirectamente. La influencia directa incluye la producción de fitohormonas, como por ejemplo, de ácido indolacético (AIA), del grupo de las auxinas; también de

ácido giberélico (GA), citoquininas y ácido abscísico (ABA); o bien la capacidad de producir la enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato (ACC) desaminasa, que reduce el nivel de etileno en las raíces. Además, los mecanismos directos incluyen la liberación de fosfatos, incremento de la disponibilidad de nutrientes y la fijación biológica de nitrógeno y la producción de compuestos reguladores de crecimiento vegetal (fitohormonas y compuestos para minimizar el estrés). Los efectos indirectos se deben a la modificación del ambiente rizosférico y su ecología, englobando mecanismo de protección de la planta contra patógenos actuando como agentes de biocontrol mediante la liberación de sustancias como sideróforos, β -1, 3-glucanasas, quitinasas, antibióticos, pigmentos fluorescentes y cianidas (Angulo *et al.*, 2014).

Es pertinente aclarar que en la mayoría de los casos las PGPR no se restringen a un único mecanismo de acción, por lo que, el efecto sobre una planta huésped puede no estar asociado a una única característica sino a una combinación de ellas (Villarraga, 2014).

Las PGPR favorecen a las plantas a través de diferentes mecanismos que se pueden resumir en: la fijación biológica del nitrógeno, síntesis de fitohormonas como las auxinas, fundamentalmente el ácido indolacético (AIA), promoción del crecimiento de la raíz y proliferación de pelos radicales, mejora de la absorción de agua y nutrientes, solubilizan los fosfatos di y tricálcicos y otros minerales, inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos y producen sideróforos, que son los iniciadores de la resistencia sistémica inducida (ISR).

Los mecanismos por los que las PGPR controlan los microorganismos patógenos son: la competencia por el nicho ecológico o sustrato, síntesis de compuestos químicos inhibitorios como los sideróforos, los antibióticos y las enzimas líticas detoxificadoras e inducción de resistencia en la planta (Torriente D., 2010).

Si bien algunas bacterias pueden vivir de manera independiente de otros organismos, existen otras, tanto patógenas como benéficas, que están asociadas a un huésped. Una bacteria es patógena cuando tiene capacidad de implantarse en el huésped y crear trastornos en él. En cambio, las bacterias benéficas, particularmente asociadas a plantas, encuentran en la rizósfera un nicho favorable para su crecimiento (Ortiz R., 2015). Estas bacterias promueven no sólo directamente crecimiento de las plantas, sino que también protegen a las plantas contra las inundaciones, la sequía, la sal, el marchitamiento de la flor, metales, contaminantes orgánicos, y ambas bacterias y hongos patógenos (Glick, B. R., 2014).

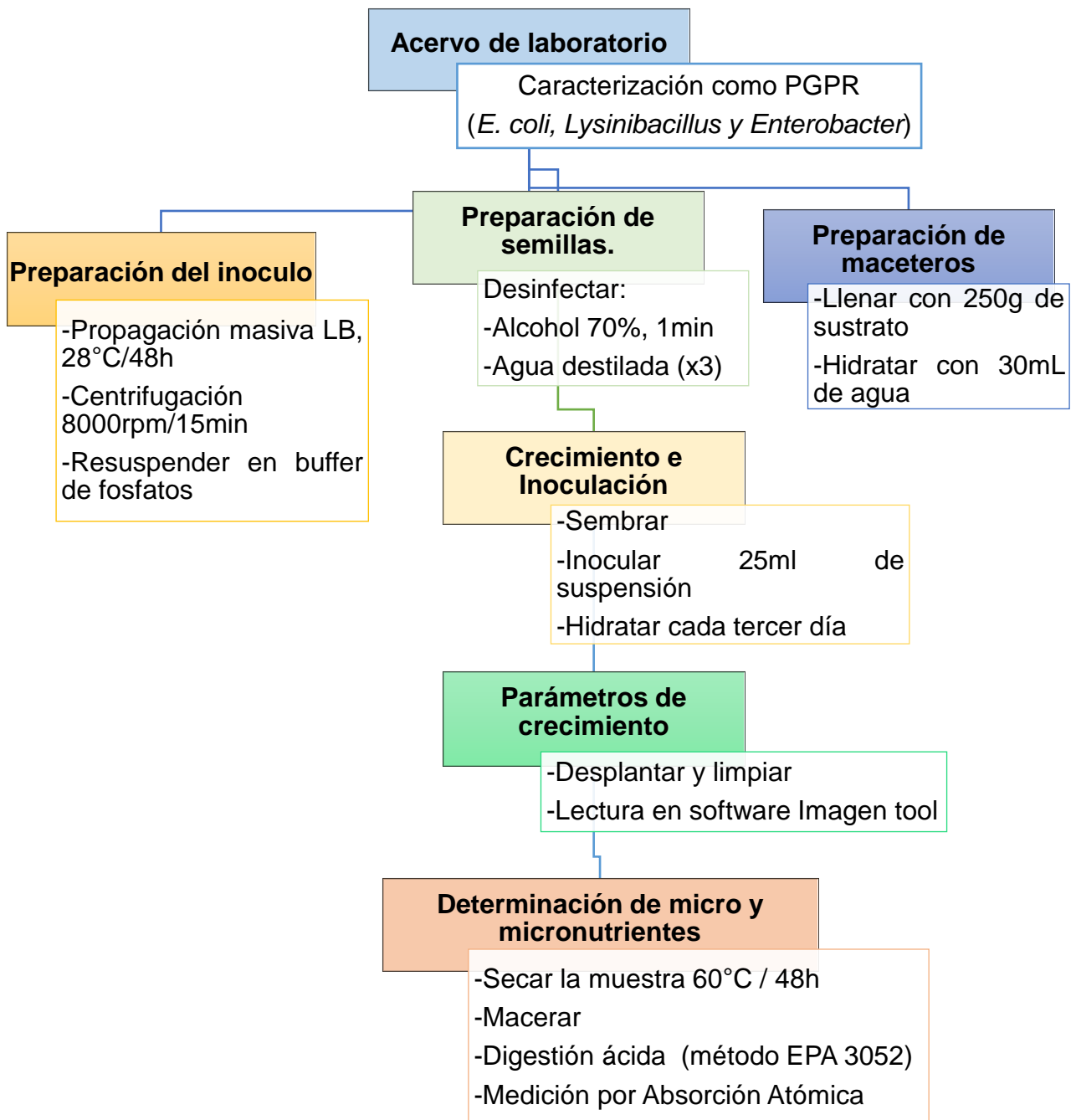
Las bacterias que facilitan el crecimiento de la planta pueden hacerlo ya sea mediante la unión a la superficie exterior de la planta tales como las raíces (la rizósfera) o las hojas (la filosfera), o pueden habitar en las superficies interiores de la planta que forman una relación endofítica. Un endófito bacteriano puede ser localizado en sólo ciertos tejidos de la planta tales como raíces y tallos, que puede ser distribuido a través de los tejidos de la planta, o puede formar estructuras específicas tales como nódulos, dependiendo de la bacteria y la planta.

Las PGPR pueden clasificarse en dos grupos: (i) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas, donde la bacteria afecta a las plantas suprimiendo otros microorganismos. Los mecanismos que estas bacterias utilizan pueden ser a través de su propio metabolismo (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas o fijando nitrógeno), afectando directamente el metabolismo de la planta (incrementando la toma de agua y minerales), mejorando el desarrollo radicular, incrementando la actividad enzimática de la planta o “ayudando” a otros microorganismos benéficos para que actúen de mejor manera sobre las plantas; (ii) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas con capacidad de control biológico, las cuales promueven el crecimiento de la planta al suprimir los fitopatógenos (Ferrera R., 2007).

CAPÍTULO II.

METODOLOGÍA

Diagrama de proceso general



2.1 Caracterización como bacterias promotoras del crecimiento

Las cepas *Enterobacter* K131, *Enterobacter* MC156, *Enterobacter* K125, *E.coli* N16 y *Lysinibacillus* MC188 fueron caracterizadas previamente como promotoras del crecimiento (Mendoza J. *et al.*, 2016).

2.2 Preparación del inóculo

Las cepas bacterianas se crecieron en caldo Luria Bertani (LB) a 28°C durante 48h; posteriormente se realizó una propagación masiva en matraces Erlenmeyer conteniendo 500 mL de caldo LB a 28°C durante 48h a 60 rpm (Fig. 1).



Figura 1. Propagación masiva de cepas bacterianas.

Las bacterias posteriormente se separaron mediante centrifugación a 8000 rpm durante 15 minutos; el sobrenadante se desechó y el pellet se re suspendió en buffer de fosfatos 0.1 M pH de 7.4 ajustando a 0.5 A a 600nm, que corresponde aproximadamente a 1×10^9 UFC/mL (Mendoza J. *et al.*, 2016) (Fig. 2).

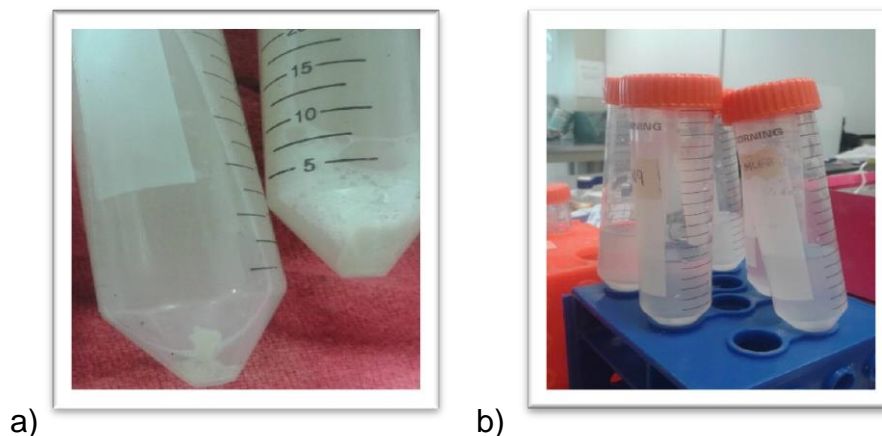


Figura 2. a) Bacterias centrifugadas, b) Preparación de inoculo.

2.3 Preparación de las semillas

Las semillas se lavaron superficialmente con alcohol al 70% durante 1 min y posteriormente, se realizaron 3 lavados con agua destilada para garantizar la desinfección de estas (Malajovich M., 2015).

2.4 Preparación de maceteros.

Como maceteros se usaron bolsas de vivero las cuales se llenaron con 250g de sustrato Miracle Gro® y se hidrataron con 30 mL de agua (Fig. 3).



Figura 3. Preparación de maceteros con sustrato e hidratados.

2.5 Diseño Experimental

El diseño experimental fue por bloques completamente al azar con cinco tratamientos correspondientes a cada cepa bacteriana y un tratamiento como testigo al cual solo se le colocó buffer de fosfatos (0.1M, pH 7.4), se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento. Teniendo como variables independientes las cepas bacterianas y el tiempo y como variable dependiente el tallo, la raíz, los micronutrientes y los macronutrientes (Tabla 1).

Tabla 1. Diseño de experimentos aplicado en el proyecto de investigación.

	R1	R2	R3
Tratamiento 1 Testigo	1	2	3
Tratamiento 2 <i>E. coli</i> N16	4	5	6
Tratamiento 3 <i>Lysinibacillus</i> MC188	7	8	9
Tratamiento 4 <i>Enterobacter</i> K125	10	11	12
Tratamiento 5 <i>Enterobacter</i> K131	13	14	15
Tratamiento 6 <i>Enterobacter</i> MC156	16	17	18

Para cada maceta se sembraron semillas de chícharo, calabaza y girasol colocando cinco semillas respectivamente por cada lote. Cada maceta se inoculó con 25 ml de la suspensión bacteriana, regándolas cada tercer día (Fig. 4).

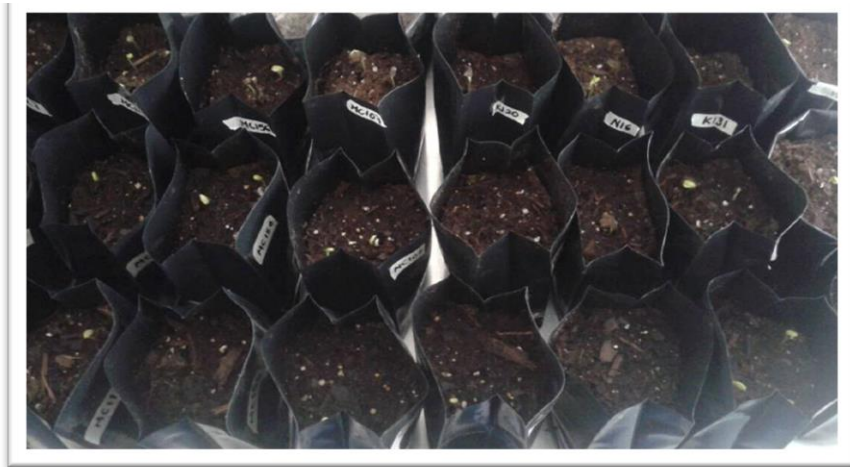


Figura 4. Diseño experimental por triplicado.

2.6 Parámetros de crecimiento

Después de 20 días correspondientes a la germinación las plantas se sacaron de los maceteros y se limpiaron para realizar la medición de longitud de la raíz y del tallo de cada vegetal, mediante el software imagen tool (Fig. 5).



a)



b)

Figura 5. a) Plantas a los 20 días de crecimiento, b) raíz y tallo limpios.

2.7 Determinación de micro y macronutrientes

Para la determinación de micro y macronutrientes en raíz y tallo, se secaron las muestras en estufa a a 60°C durante 48 horas y posteriormente se macero hasta obtener un polvo fino para homogenizar la muestra.

Se realizó una digestión ácida mediante el método EPA 3052 y se midió mediante Absorción Atómica los micronutrientes (Mn, Cu, Ni, Zn y Fe) y los macronutrientes (Na, K y P) (EPA, 1996) (Fig. 6).

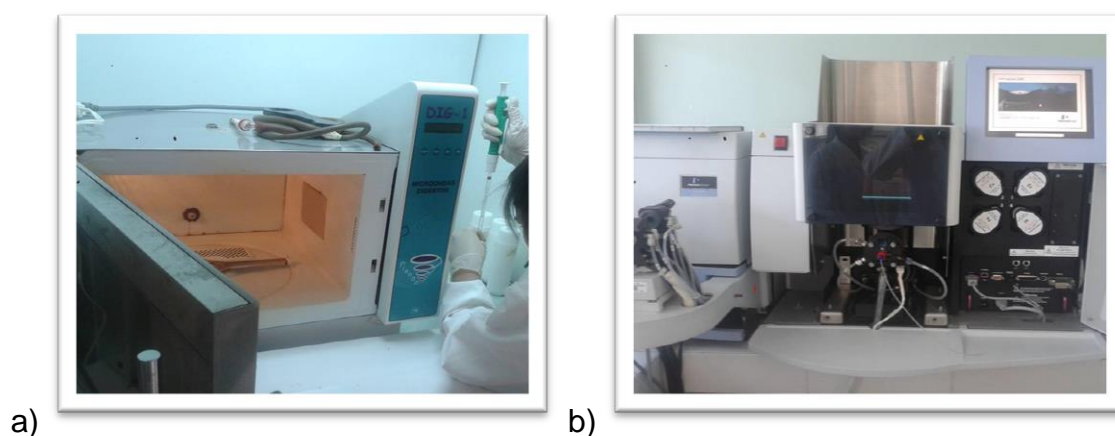


Figura 6. a) Digestión ácida, b) Absorción atómica

2.8 Análisis estadístico

Con la finalidad de distinguir diferencias significativas entre los tratamientos los resultados fueron analizados usando el programa Paquete Estadístico para las ciencias Sociales (SPSS, por sus siglas en inglés Statistical Package for the Social Sciences) con una comparación de medias mediante ANOVA con la prueba de Tukey, con una diferencia significativa de $p < 0.05$ (Herrerias, 2005)

CAPÍTULO III.

RESULTADOS

El uso de las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal y el impacto que estas tienen en las plantas de chícharo, calabaza y girasol se ha ido estudiando a lo largo de este trabajo.

El análisis de los resultados de las mediciones correspondientes de longitud así como determinación de micro y macronutrientes de los vegetales de chícharo, calabaza y girasol se presenta a continuación.

3.1 Evaluación de la planta de Chícharo (*Pisum Sativum*)

3.1.1 Longitud promedio de raíz y tallo

El análisis de la longitud de la raíz en las plantas de chícharo muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas *Enterobacter* K125, *Enterobacter* K131 y *Enterobacter* MC156 en comparación con el testigo, para las plantas inoculadas con las cepas restantes se muestra un efecto negativo. Por otro lado, las longitudes de los tallos no presentaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las cepas utilizadas con respecto al testigo (Fig. 7).

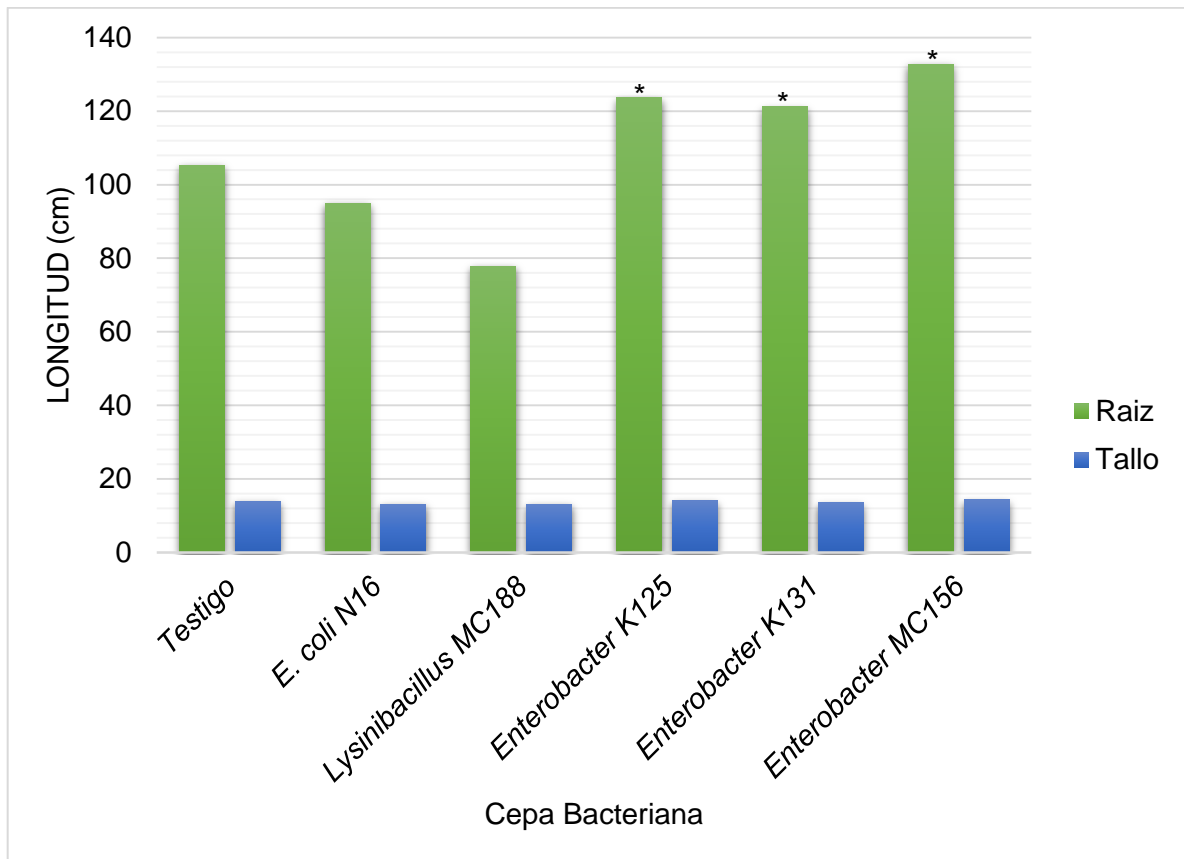


Figura 7. Longitud promedio de raíz y tallo de las plantas de chícharo por efecto de la inoculación de PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p(<0.05)$

3.1.2 Efecto en la concentración de micro y macronutrientes

3.1.2.1 Concentración de Manganeso (Mn)

El análisis de concentración de Mn para las plantas de chícharo en raíz y tallo muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo a excepción de la cepa *Enterobacter* MC156 la cual muestra un efecto similar en la raíz y negativo en el tallo. (Fig. 8).

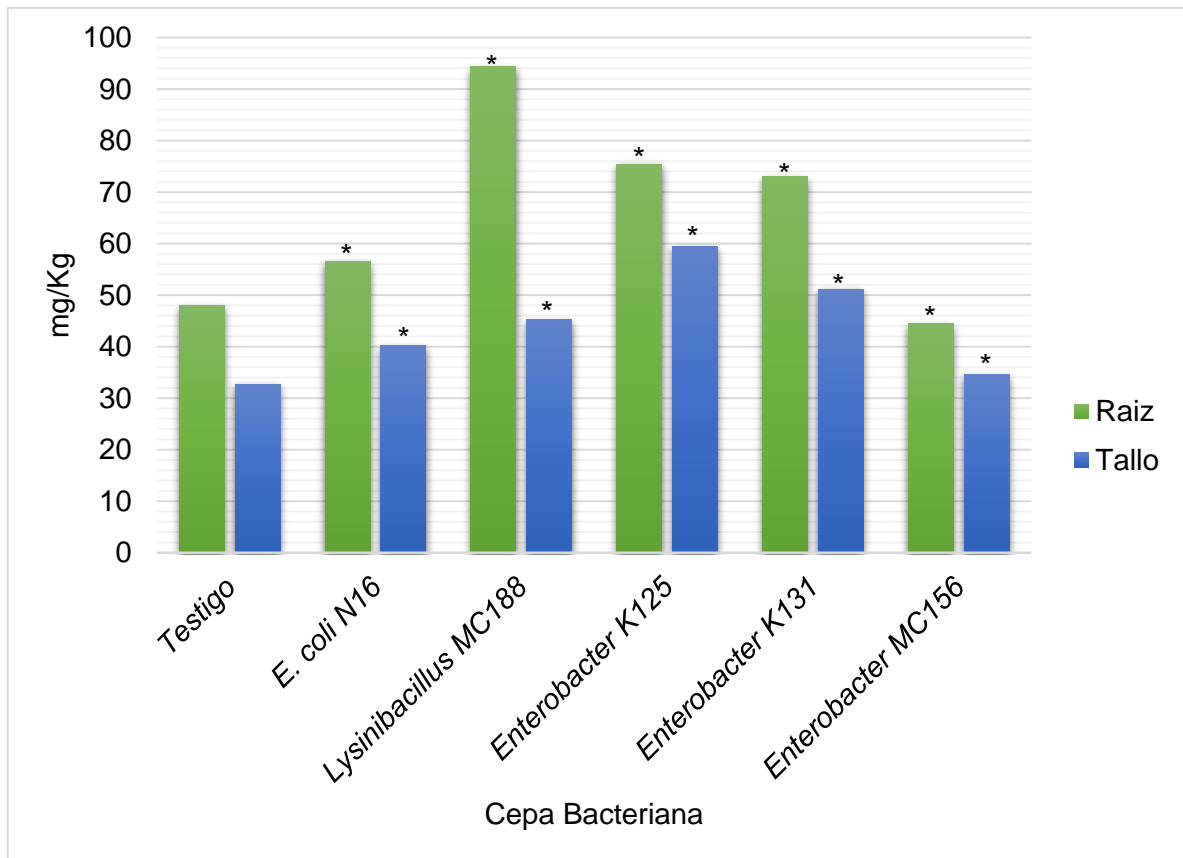


Figura 8. Concentración de Mn en raíz y tallo de las plantas de chícharo inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo ($p < 0.05$)

3.1.2.2 Concentración de Cobre (Cu)

El análisis de concentración de Cu para las plantas de chícharo en raíz y tallo muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo (Fig. 9).

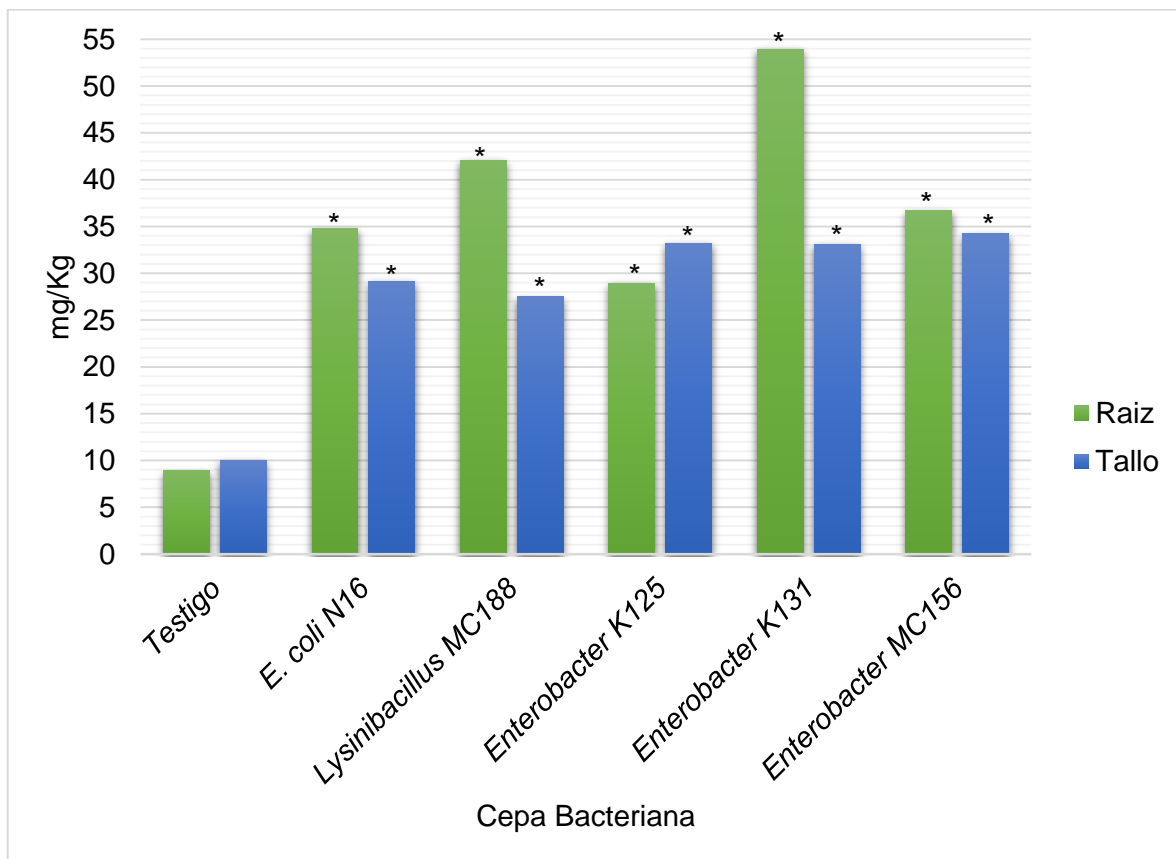


Figura 9. Concentración de Cu en raíz y tallo de las plantas de chícharo inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0.05$

3.1.2.3 Concentración de Níquel (Ni)

El análisis de concentración de Ni para las plantas de chícharo en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo excepto la cepa *Enterobacter* K125 que muestra un efecto negativo. Mientras que en el tallo todas las cepas bacterianas utilizadas muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en las plantas inoculadas en comparación con el testigo (Fig. 10).

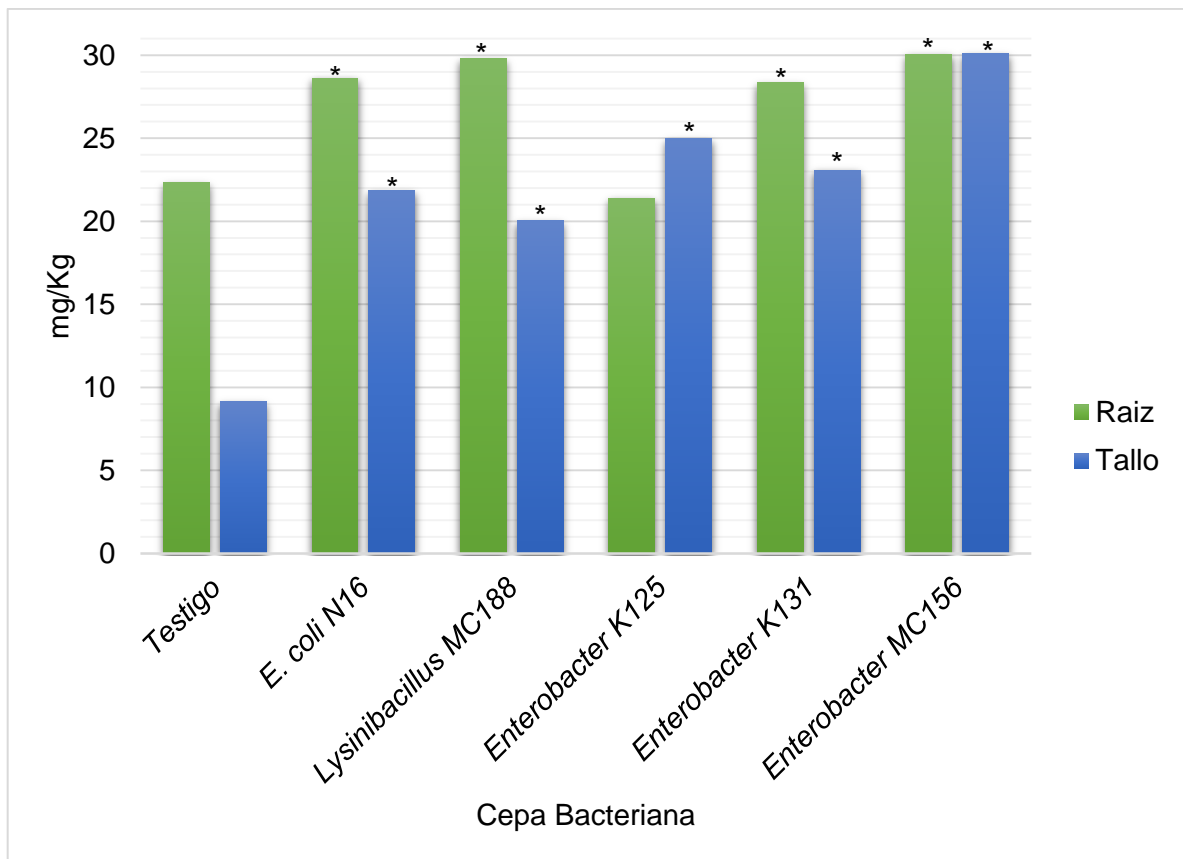


Figura 10. Concentración de Ni en raíz y tallo de las plantas de chícharo inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0.05$

3.1.2.4 Concentración de Zinc (Zn)

El análisis de concentración de Zn para las plantas de chícharo en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas *Enterobacter* K131 y *Enterobacter* MC156 en comparación con el testigo, para las plantas inoculadas con las cepas restantes se muestra un efecto similar o negativo. En tallo todas las cepas bacterianas utilizadas muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en las plantas inoculadas en comparación con el testigo (Fig. 11).

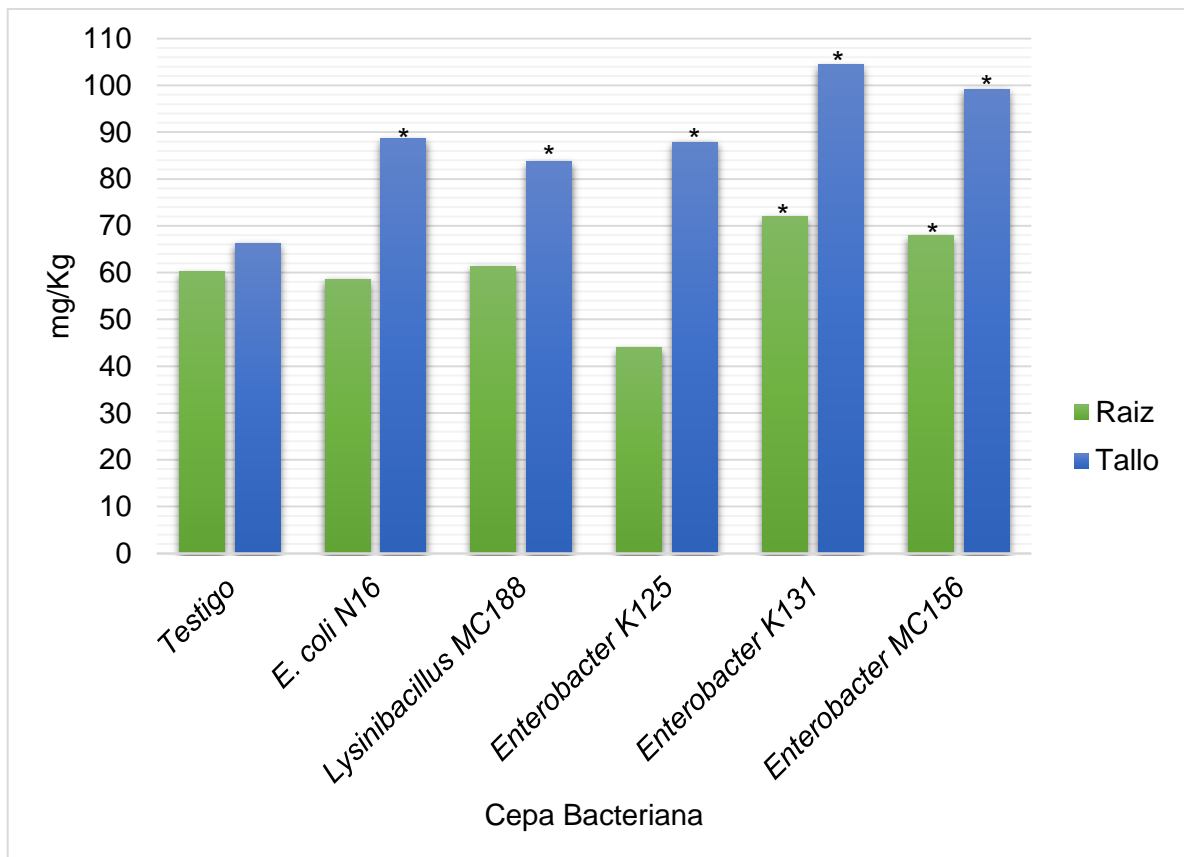


Figura 11. Concentración de Zn en raíz y tallo de las plantas de chícharo inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0.05$

3.1.2.5 Concentración de Hierro (Fe)

El análisis de concentración de Fe para las plantas de chícharo en raíz y tallo muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo (Fig. 12).

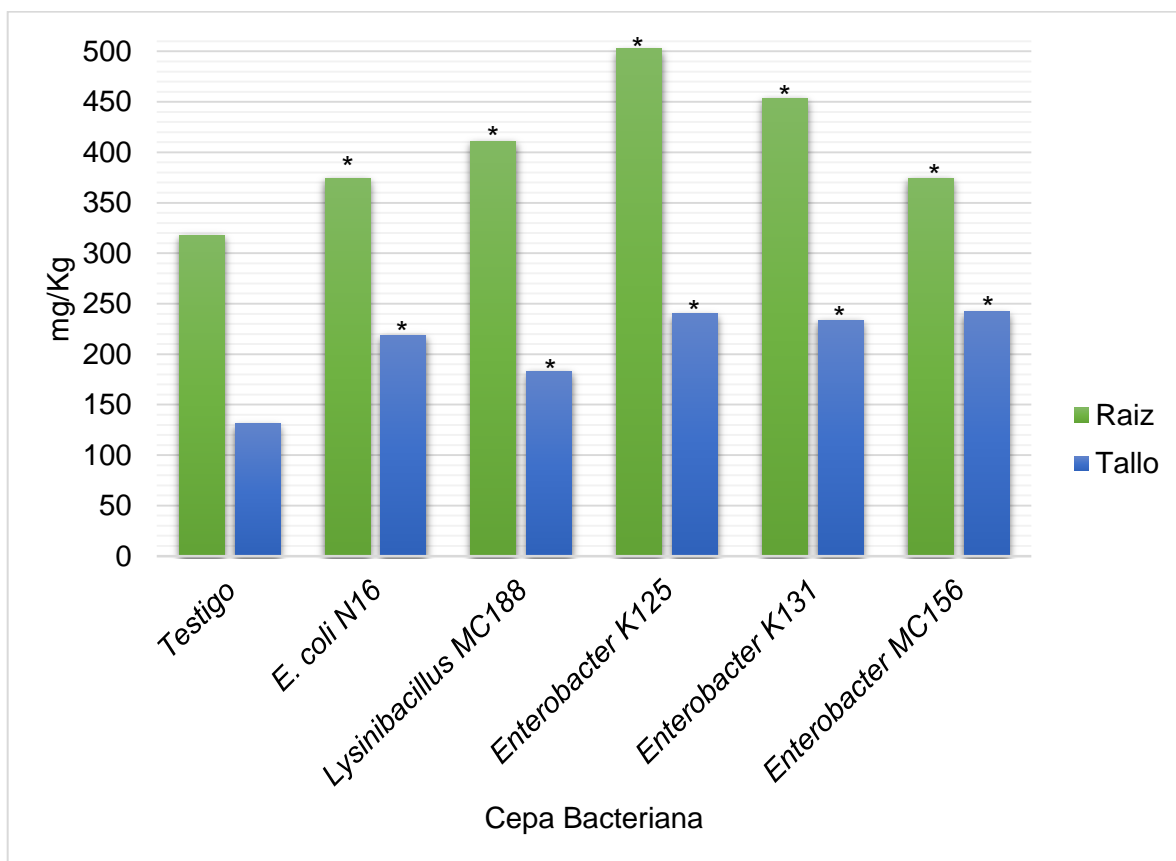


Figura 12. Concentración de Fe en raíz y tallo de las plantas de chícharo inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0.05$

3.1.2.6 Concentración de Sodio (Na)

El análisis de concentración de Na para las plantas de chícharo en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo a excepción de la cepa *Enterobacter* K125 que muestra un efecto negativo. Mientras que en el tallo todas las cepas bacterianas utilizadas muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en las plantas inoculadas en comparación con el testigo (Fig. 13).

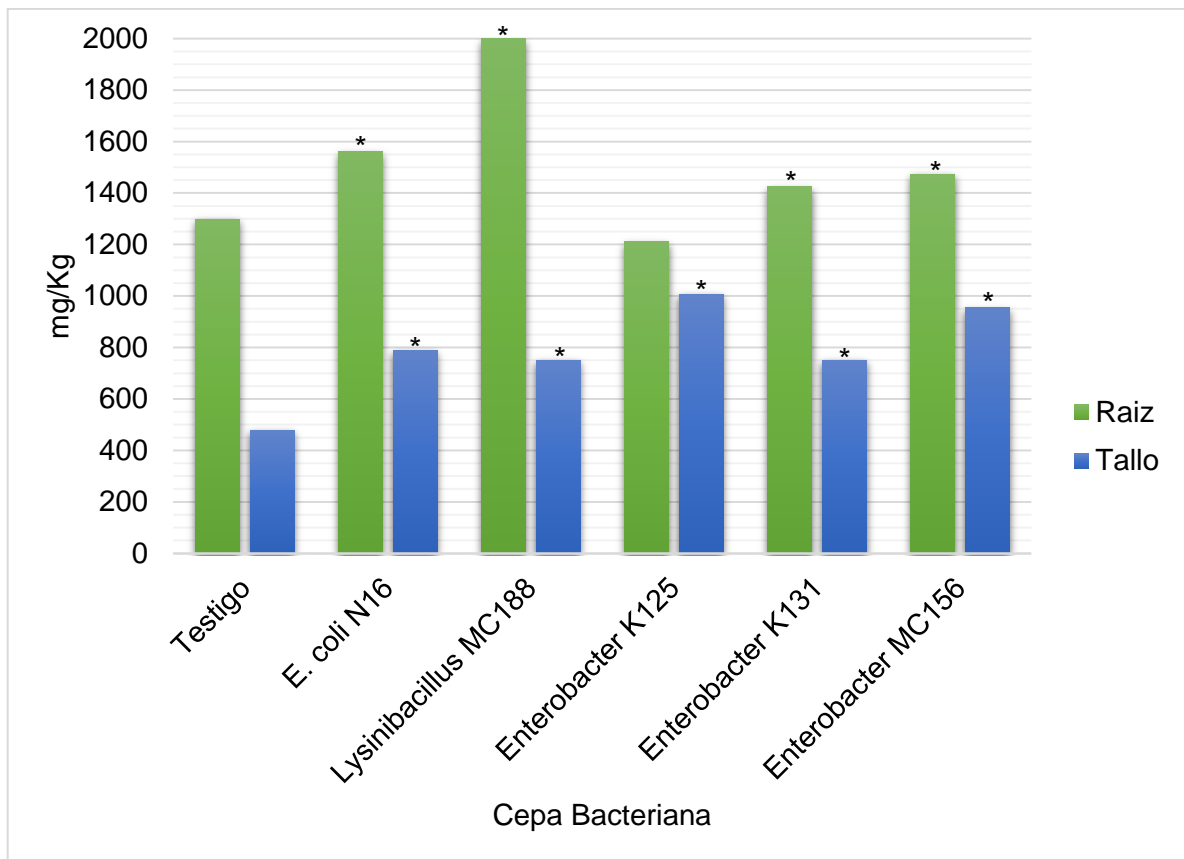


Figura 13. Concentración de Na en raíz y tallo de las plantas de chícharo inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0.05$

3.1.2.7 Concentración de Potasio (K)

El análisis de concentración de K para las plantas de chícharo en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas *E. coli* N16, *Lysinibacillus* MC188 y *Enterobacter* MC156 en comparación con el testigo, para las plantas inoculadas con las cepas restantes se muestran valores ligeramente bajos. Simultáneamente el tallo se muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas *Lysinibacillus* MC188, *Enterobacter* K131 y *Enterobacter* MC156 en comparación con el testigo, las plantas inoculadas con las cepas bacterianas restantes mostraron un efecto negativo en comparación con el testigo (Fig.14).

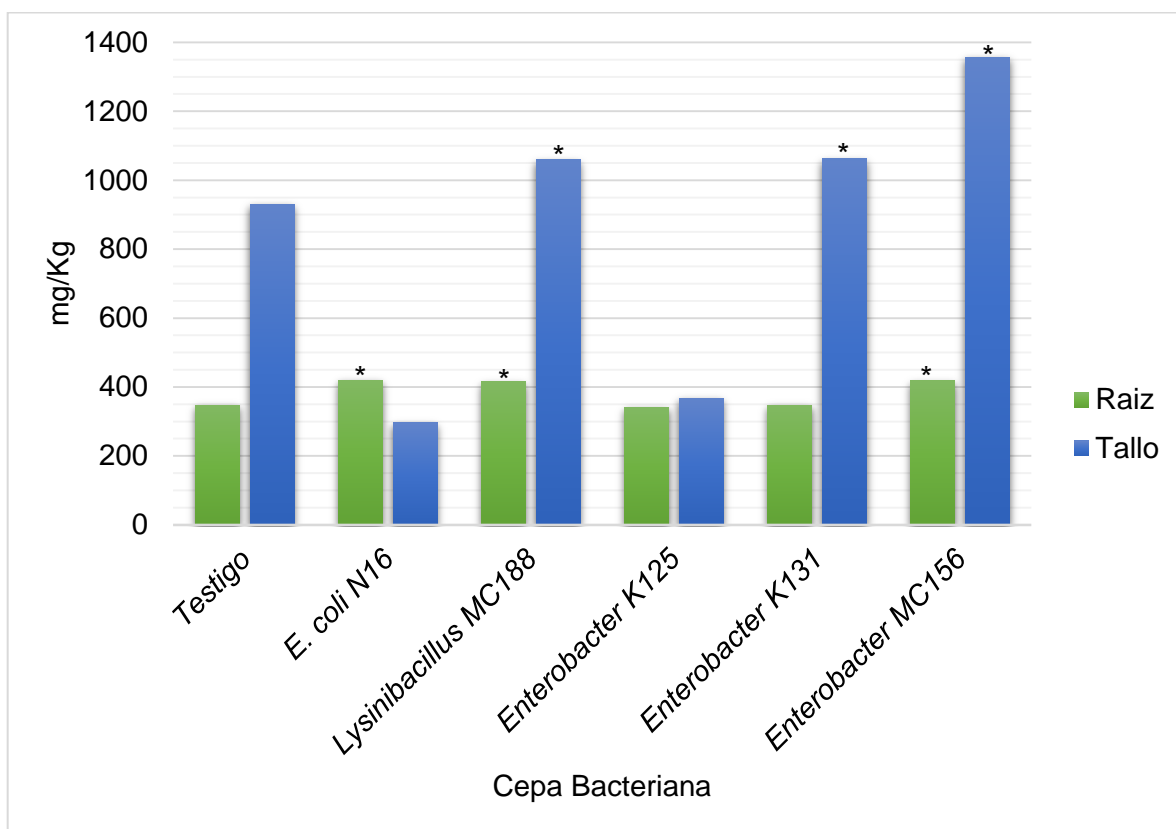


Figura 14. Concentración de K en raíz y tallo de las plantas de chícharo inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0,05$

3.1.2.8 Concentración de Fósforo (P)

El análisis de concentración de P para las plantas de chícharo en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo, a excepción de la cepa *Enterobacter* K125 que muestra en efecto negativo. En el tallo todas las cepas bacterianas utilizadas muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en las plantas inoculadas en comparación con el testigo (Fig. 15).

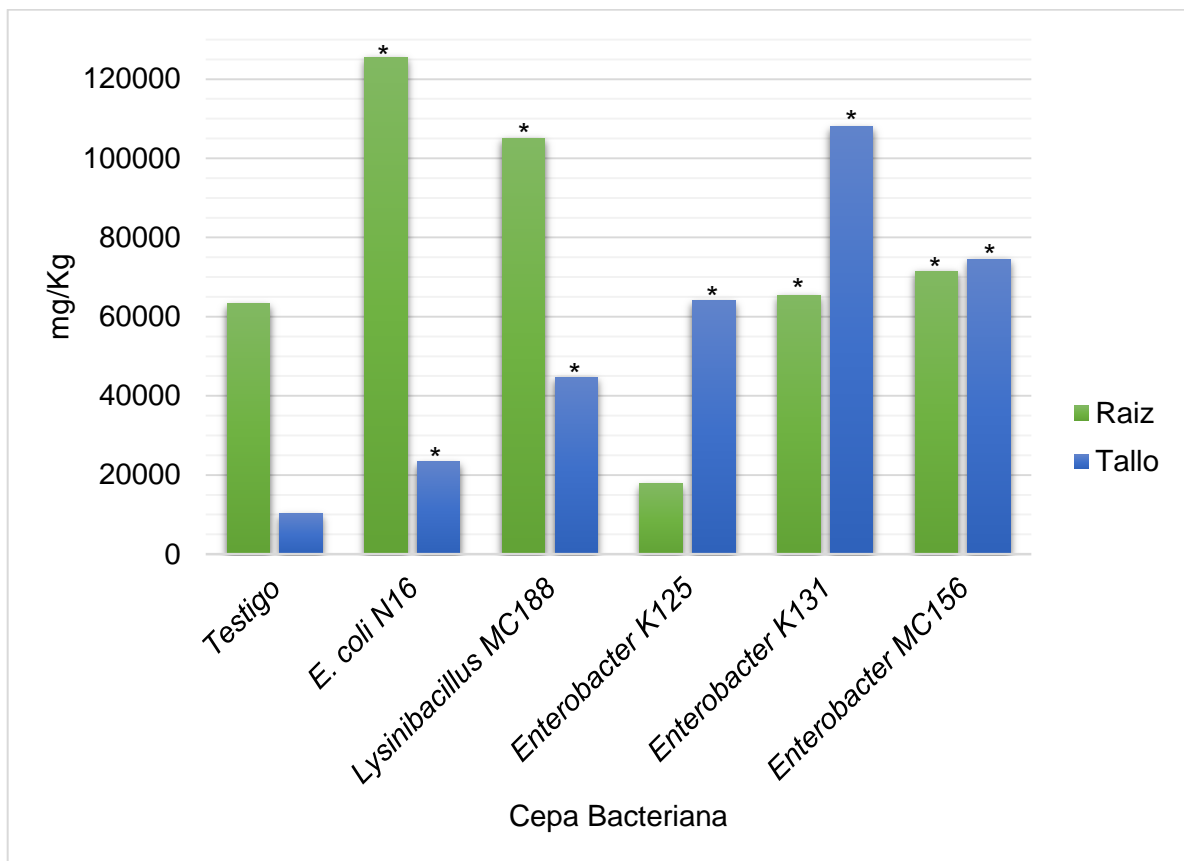


Figura 15. Concentración de P en raíz y tallo de las plantas de chícharo inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0,05$

3.2 Evaluación de la planta de Calabaza (*Cucurbita pepo*)

3.2.1 Longitud promedio de raíz y tallo

El análisis de la longitud de raíz y tallo en las plantas de calabaza muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo (Fig. 16).

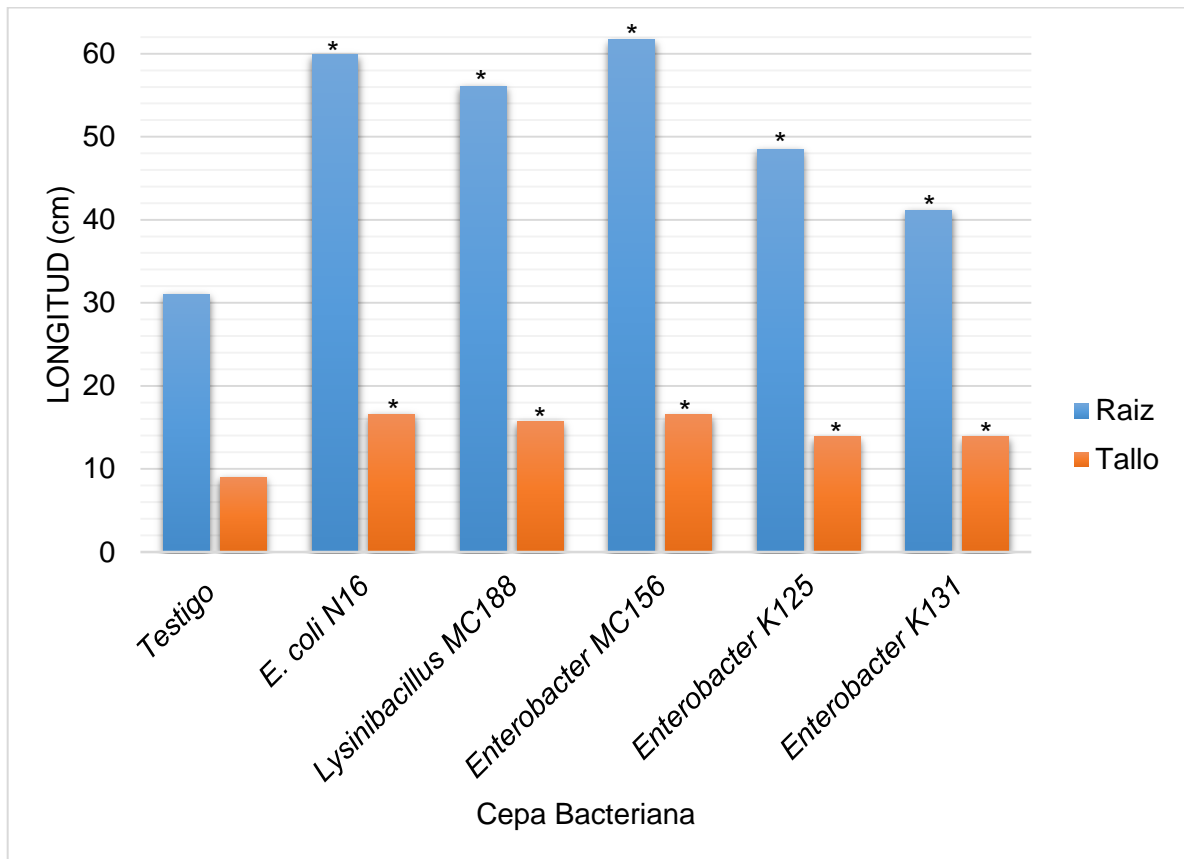


Figura 16. Longitud promedio de raíz y tallo de las plantas de calabaza por efecto de la inoculación de PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0.05$

3.2.2 Efecto en la concentración de micro y macronutrientes

3.2.2.1 Concentración de Manganeso (Mn)

El análisis de concentración de Mn para las plantas de calabaza en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo a excepción de la cepa *Enterobacter* K125 que muestra un efecto negativo. Para el tallo se muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas *E. coli* N16, *Enterobacter* MC156, *Enterobacter* K131 en comparación con el testigo, las plantas inoculadas con las cepas bacterianas restantes muestran un efecto negativo (Fig. 17).

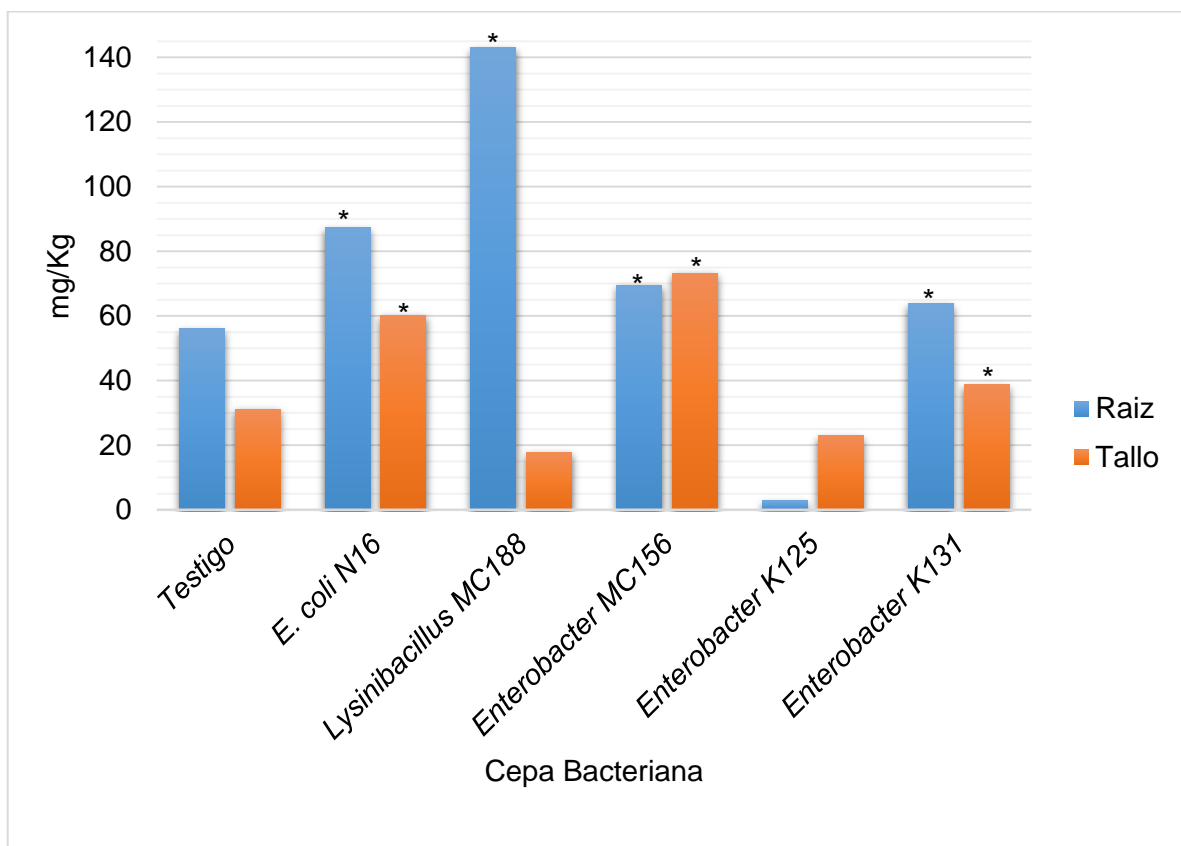


Figura 17. Concentración de Mn en raíz y tallo de las plantas de calabaza inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0.05$

3.2.2.2 Concentración de Cobre (Cu)

El análisis de concentración de Cu para las plantas de calabaza en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo a excepción de la cepa *Enterobacter* K131 que muestra valor similar. Mientras que en el tallo muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo (Fig. 18).

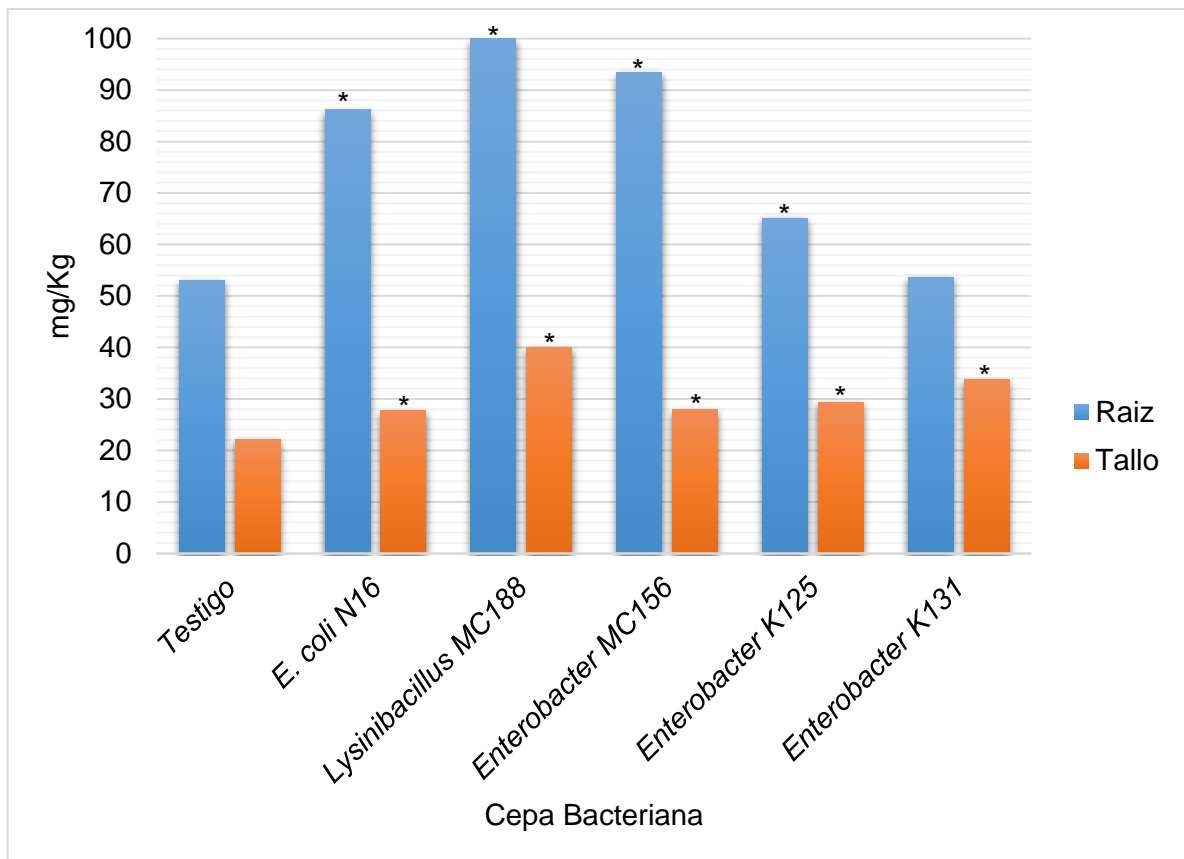


Figura 18. Concentración de Cu en raíz y tallo de las plantas de calabaza inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0,05$

3.2.2.3 Concentración de Níquel (Ni)

El análisis de concentración de Ni para las plantas de calabaza en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas *utilizadas en comparación con el testigo*, a excepción de la cepa *E. coli* N16 que muestra un efecto negativo. En el tallo se muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo (Fig. 19).

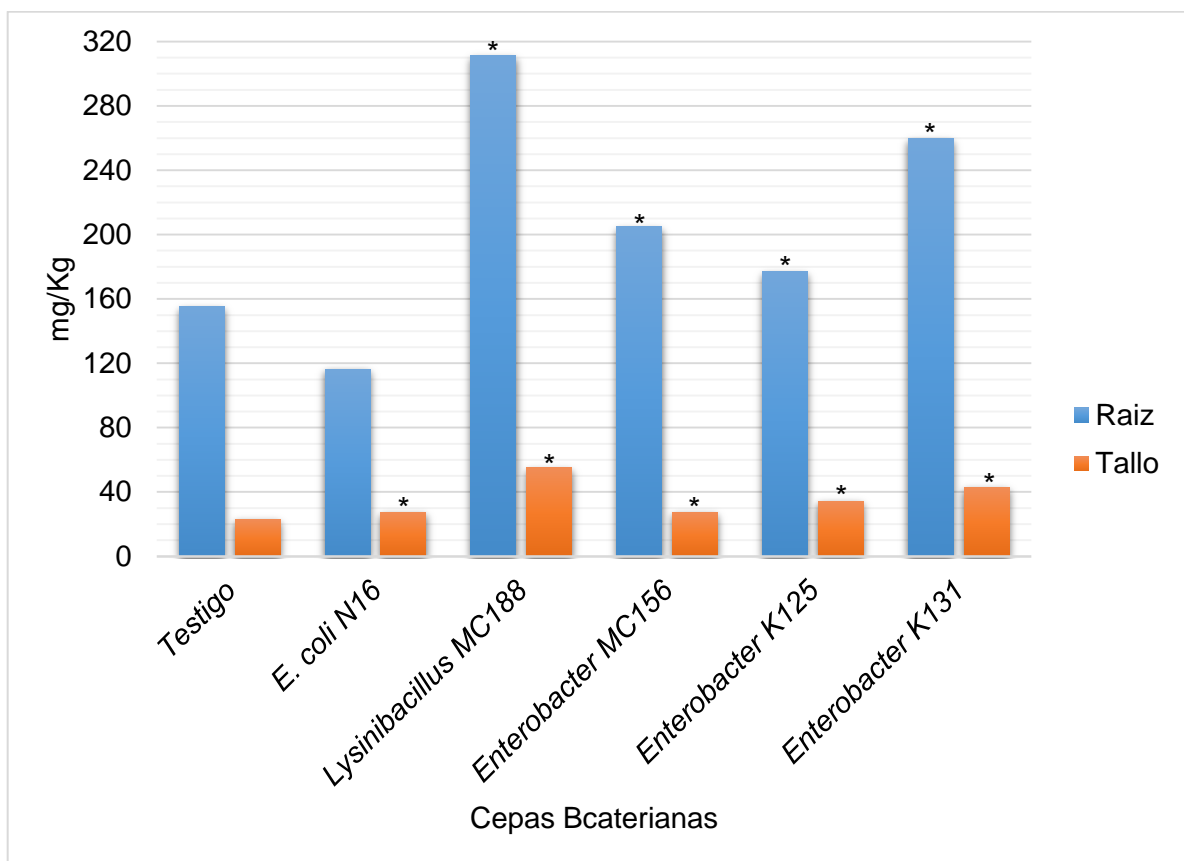


Figura 19. Concentración de Ni en raíz y tallo de las plantas de calabaza inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0,05$

3.2.2.4 Concentración de Zinc (Zn)

El análisis de concentración de Zn para las plantas de calabaza en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas *E. coli* N16 y *Enterobacter* K131 en comparación con el testigo, para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas restantes se muestran un efecto negativo. Entretanto en el tallo todas las cepas bacterianas utilizadas muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en las plantas inoculadas en comparación con el testigo (Fig. 20).

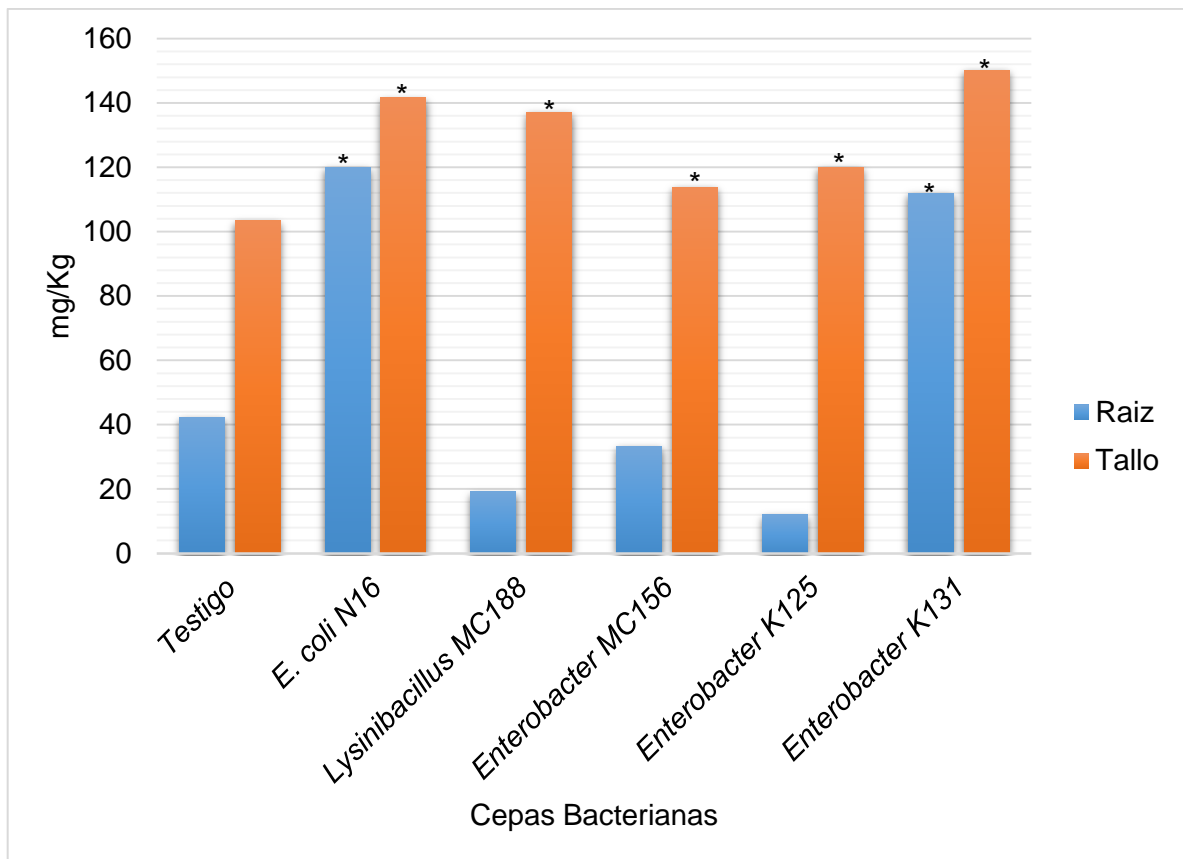


Figura 20. Concentración de Zn en raíz y tallo de las plantas de calabaza inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0,05$

3.2.2.5 Concentración de Hierro (Fe)

El análisis de concentración de Fe para las plantas de calabaza en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo a excepción de la cepa *E. coli* N16 la cual muestra un efecto negativo. Simultáneamente en el tallo todas las cepas bacterianas utilizadas muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en las plantas inoculadas en comparación con el testigo (Fig. 21).

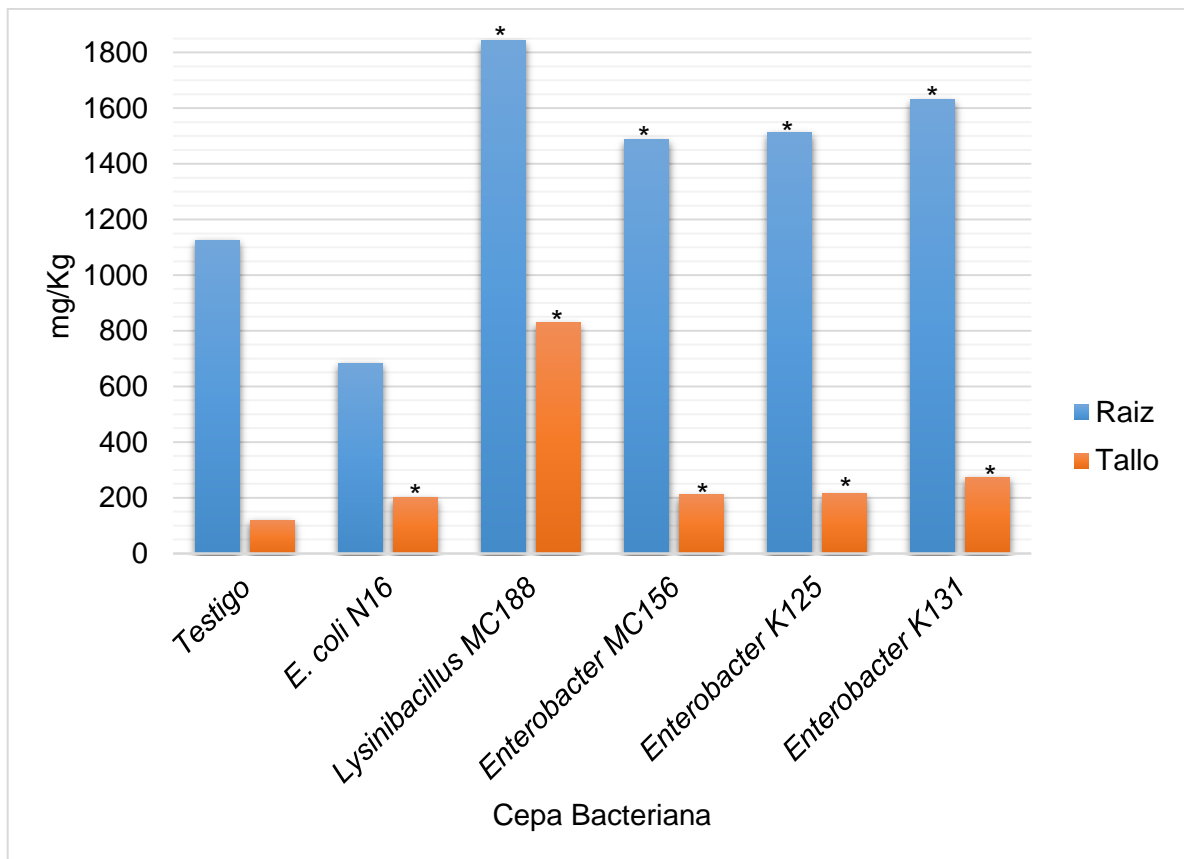


Figura 21. Concentración de Fe en raíz y tallo de las plantas de calabaza inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0,05$

3.2.2.6 Concentración de Sodio (Na)

El análisis de concentración de Na para las plantas de calabaza en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo, excepto la cepa *E. coli* N16 la cual muestra un efecto negativo. Para el tallo muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas *Lysinibacillus* MC188, *Enterobacter* K125 y *Enterobacter* K131 en comparación con el testigo, las plantas inoculadas con las cepas bacterianas restantes muestran un efecto negativo (Fig. 22).

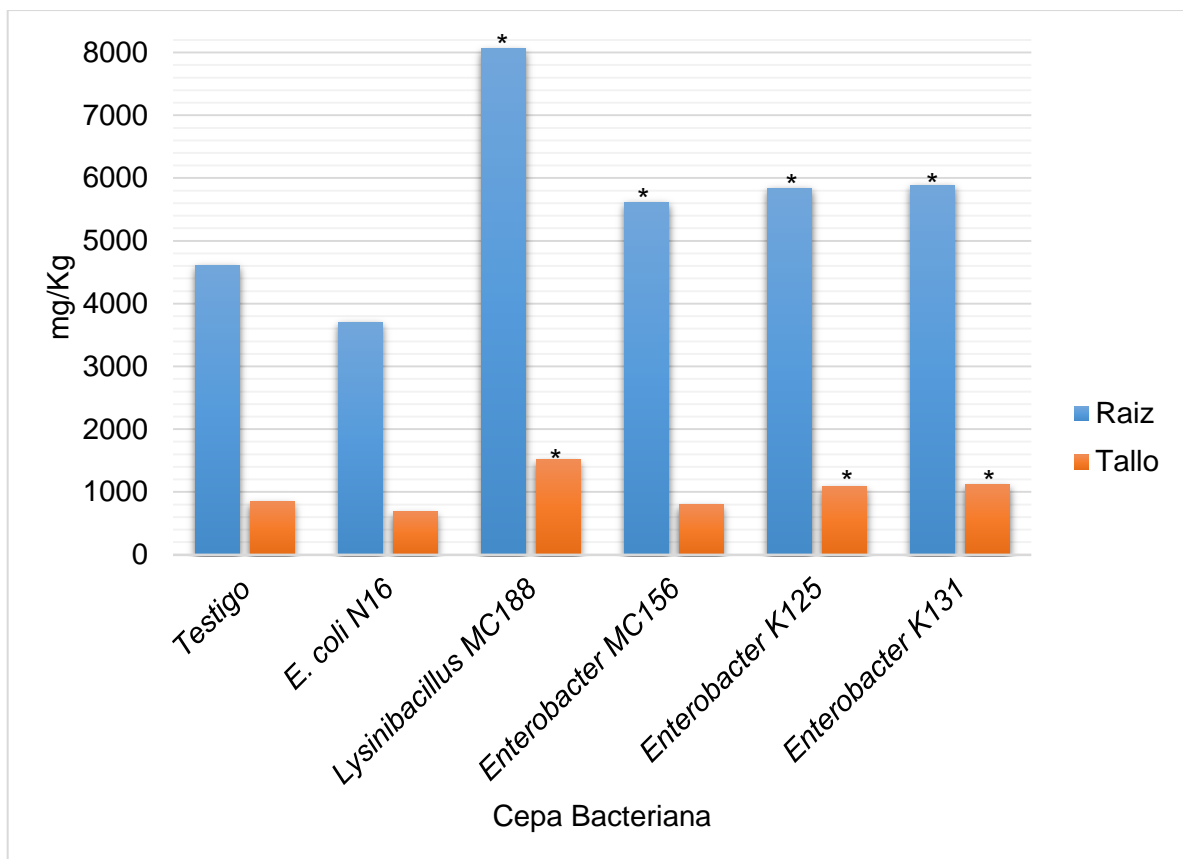


Figura 22. Concentración de Na en raíz y tallo de las plantas de calabaza inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0,05$

3.2.2.7 Concentración de Potasio (K)

El análisis de concentración de K para las plantas de calabaza en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con la cepa bacteriana *Lysinibacillus* MC188 en comparación con el testigo, para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas restantes muestran un efecto negativo. En el tallo muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas *Enterobacter* MC156, *Enterobacter* K125 y *Enterobacter* K131 en comparación con el testigo, las plantas inoculadas con la cepas bacterianas restantes muestran un efecto negativo (Fig. 23).

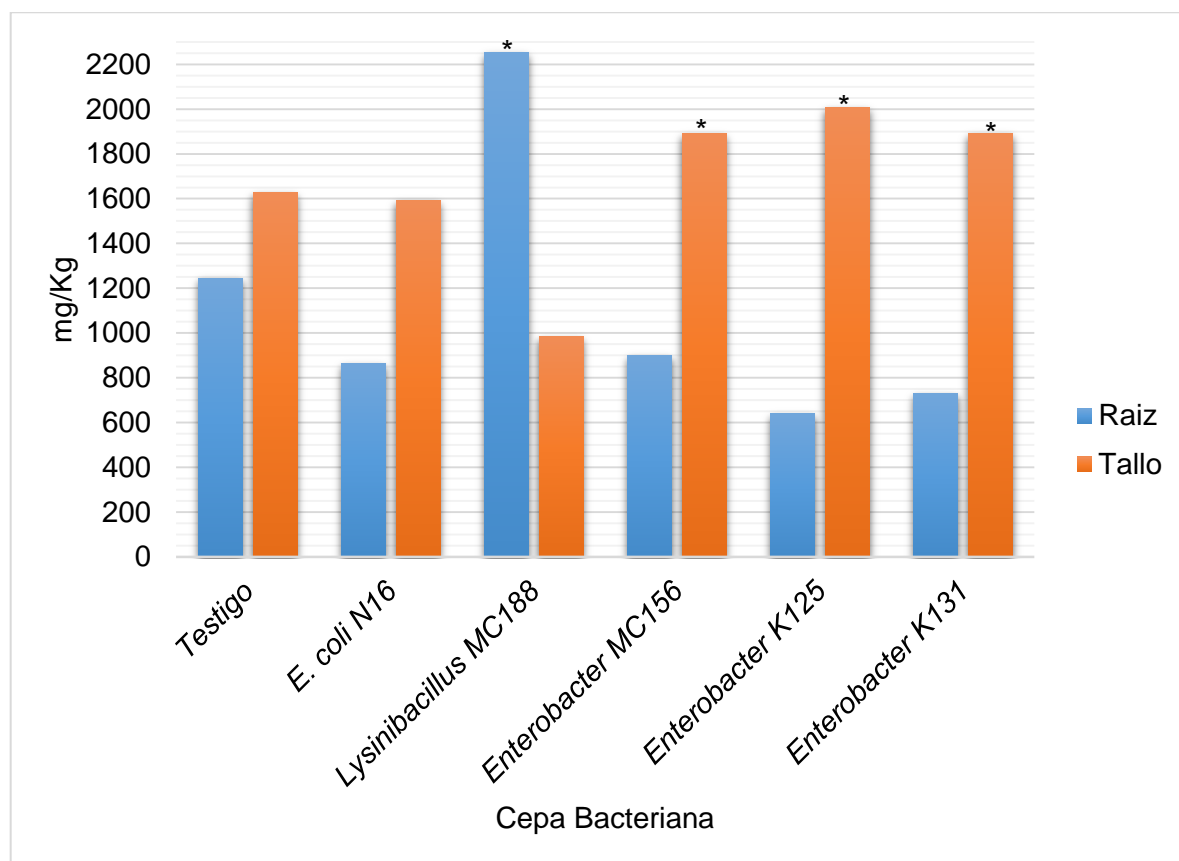


Figura 23. Concentración de K en raíz y tallo de las plantas de calabaza inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0,05$

3.2.2.8 Concentración de Fósforo (P)

El análisis de concentración de P para las plantas de calabaza en raíz y tallo todas las cepas bacterianas utilizadas muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para las plantas inoculadas en comparación con el testigo. (Fig. 24).

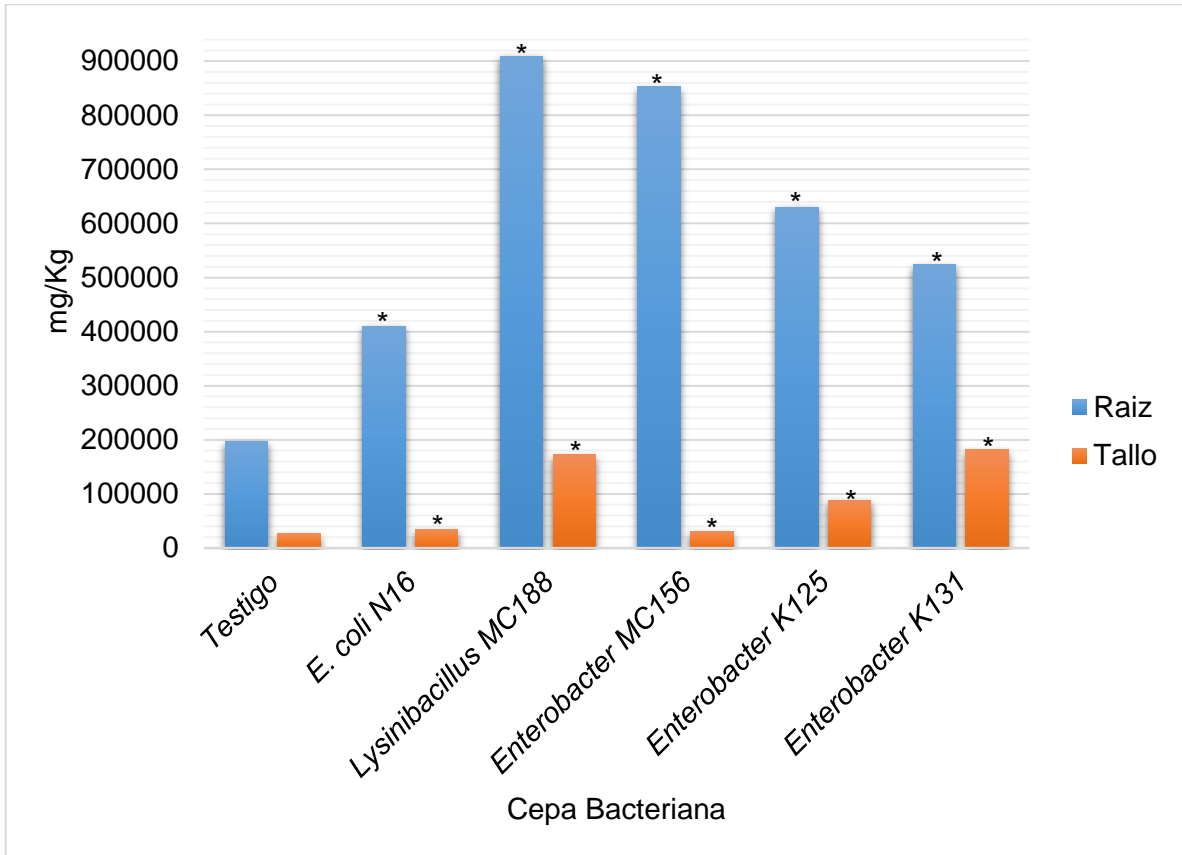


Figura 24. Concentración de P en raíz y tallo de las plantas de calabaza inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0.05$

3.3 Evaluación de la planta de Girasol (*Helianthus annuus*)

3.3.1 Longitud promedio de raíz y tallo

El análisis de la longitud de la raíz en las plantas de girasol muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo, a excepción de la cepa *Enterobacter* K131 que muestra un valor ligeramente bajo. Por otro lado, en la longitud del tallo solo presento diferencias estadísticamente significativas la cepa bacteriana *Enterobacter* K125, mientras que las cepas restantes mostraron valores ligeramente elevados en comparación con el testigo, pero sin diferencias significativas (Fig. 25).

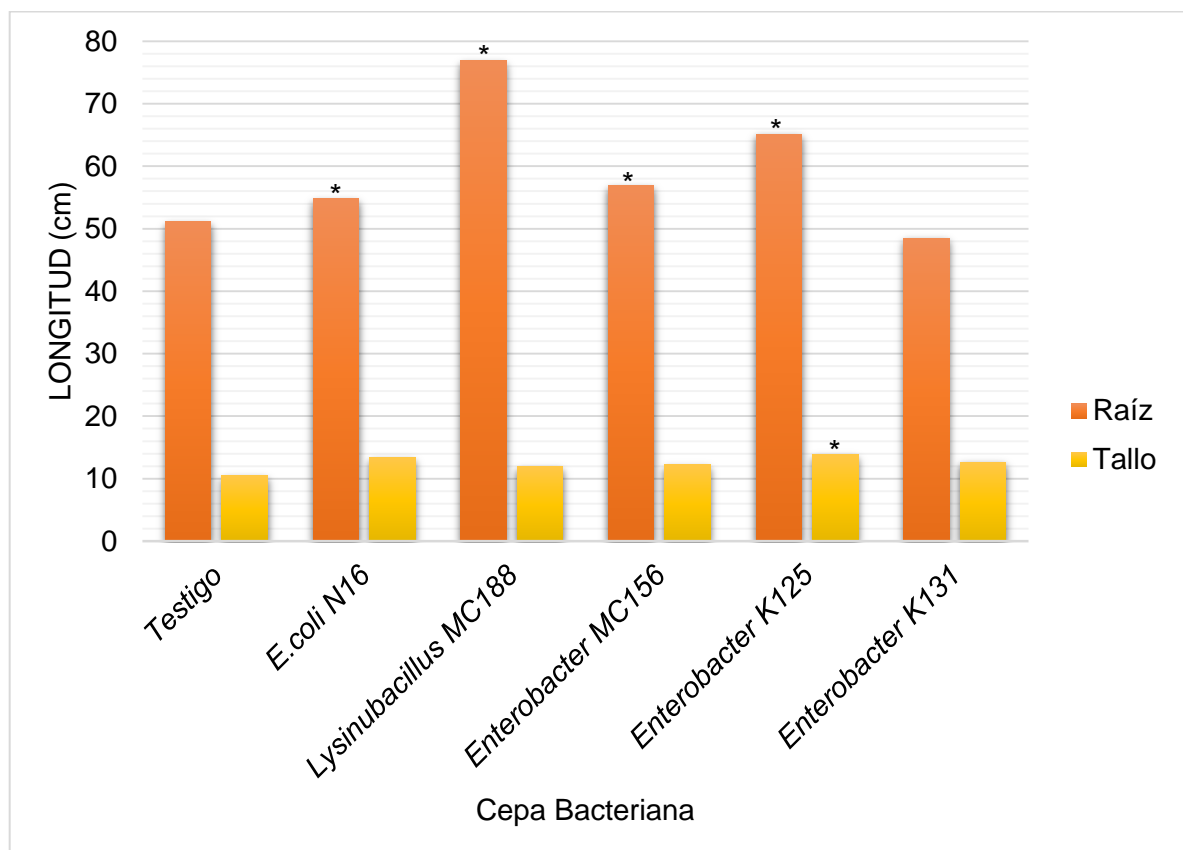


Figura 25. Longitud promedio de raíz y tallo de las plantas de girasol por efecto de la inoculación de PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0.05$

3.3.2 Efecto en la concentración de micro y macronutrientes

3.3.2.1 Concentración de Manganeso (Mn)

El análisis de concentración de Zn para las plantas de girasol en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo a excepción de la cepa *Enterobacter* K131 la cual muestra un valor ligeramente alto pero sin diferencias significativas. Mientras que en el tallo muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas *E. coli* N16 y *Lysinibacillus* MC188 en comparación con el testigo, las plantas inoculadas con las cepas bacterianas restantes mostraron un efecto negativo (Fig. 26).

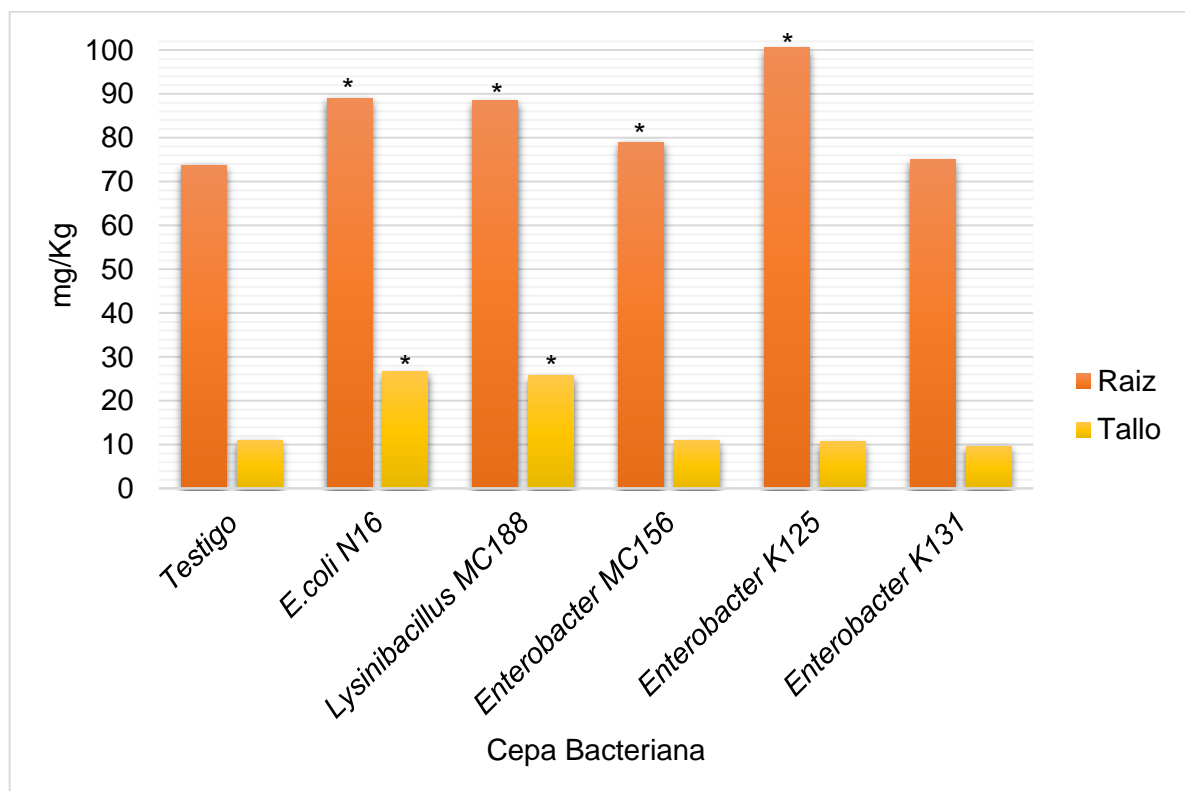


Figura 26. Concentración de Mn en raíz y tallo de las plantas de girasol inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo ($p < 0.05$)

3.3.2.2 Concentración de Cobre (Cu)

El análisis de concentración de Cu para las plantas de girasol en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con la cepa bacteriana *Enterobacter* K131 en comparación con el testigo, para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas restantes se muestra un efecto similar o negativo. En el tallo las cepas bacterianas muestran un efecto similar o ligeramente bajo en comparación con el testigo (Fig. 27).

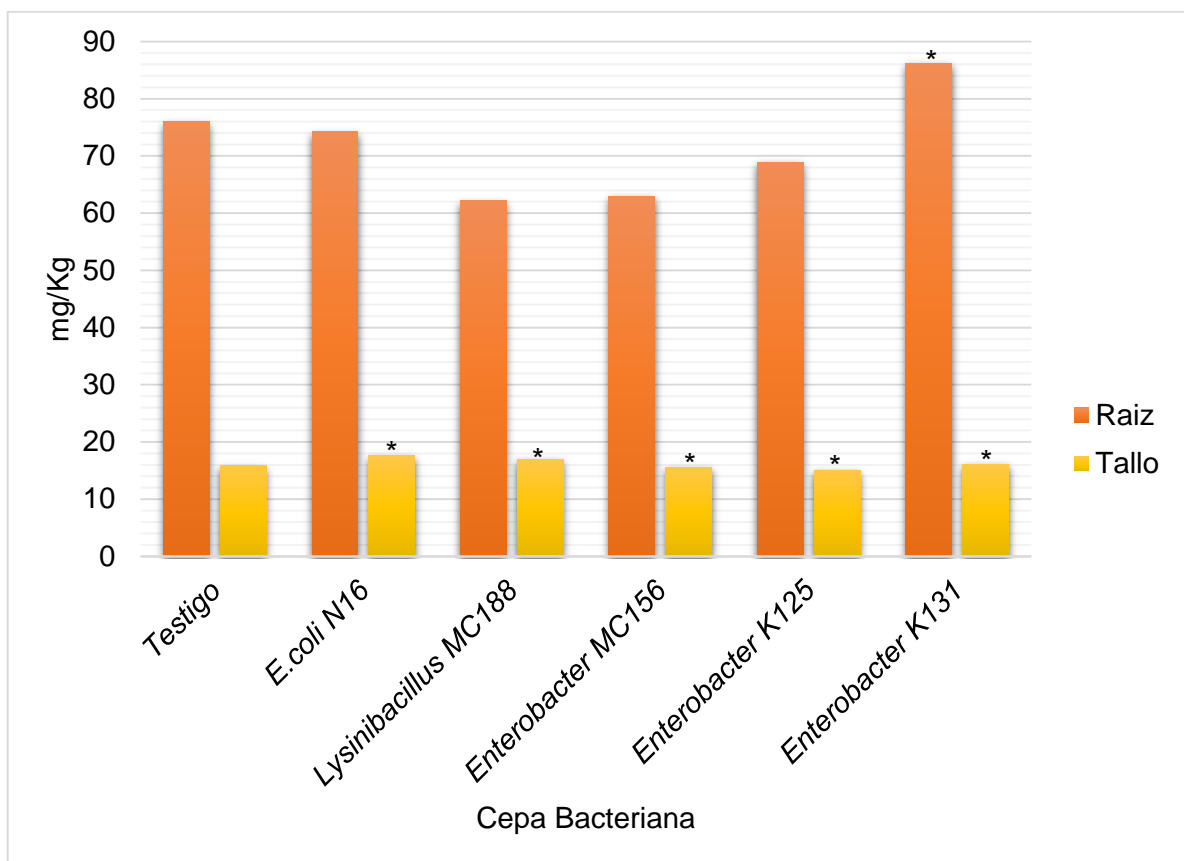


Figura 27. Concentración de Cu en raíz y tallo de las plantas de girasol inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0.05$

3.3.2.3 Concentración de Níquel (Ni)

El análisis de concentración de Ni para las plantas de girasol en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo, excepto la cepa *Enterobacter* K131 la cual muestra un efecto negativo. Entretanto en el tallo muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas *E. coli* N16 y *Enterobacter* MC156 en comparación con el testigo, las plantas inoculadas con las cepas bacterianas restantes mostraron un efecto similar o ligeramente elevado pero sin mostrar diferencias significativas (Fig. 28).

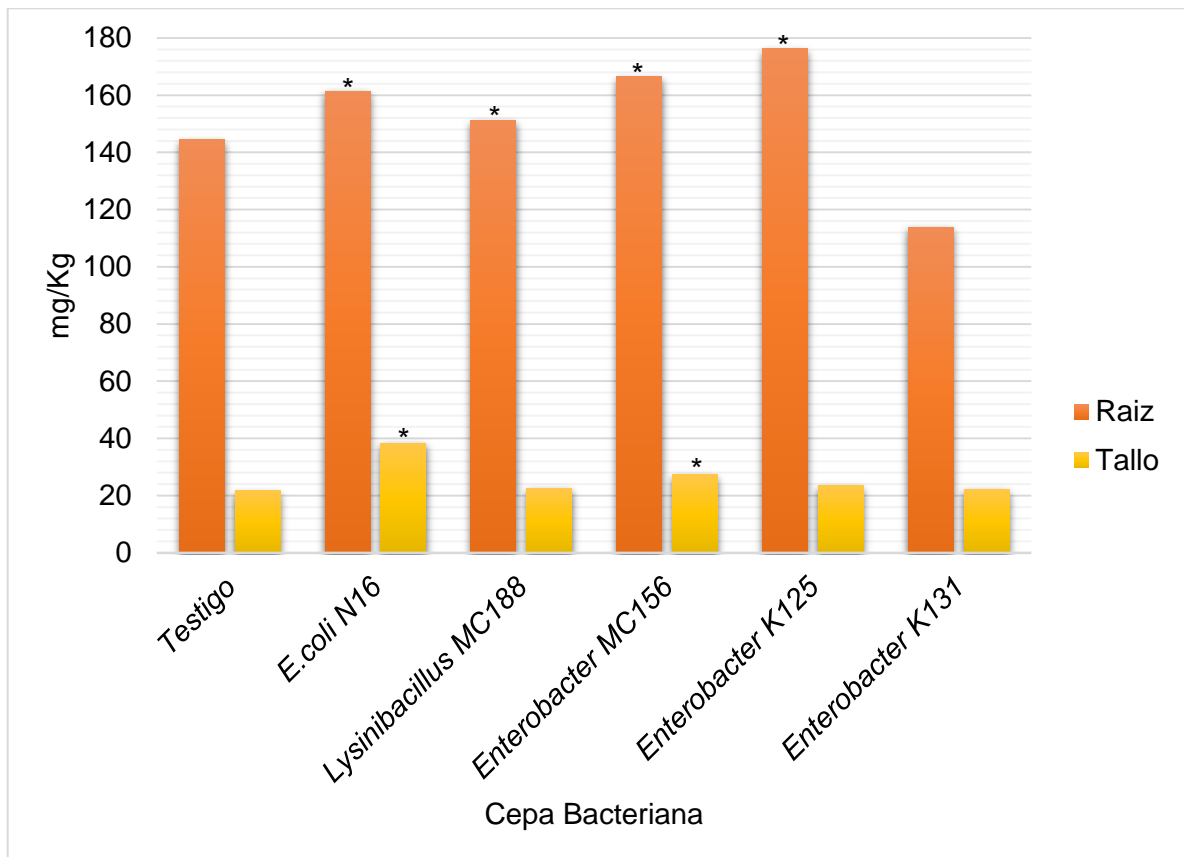


Figura 28. Concentración de Ni en raíz y tallo de las plantas de girasol inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0,05$

3.3.2.4 Concentración de Zinc (Zn)

El análisis de concentración de Zn para las plantas de girasol en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con la cepa bacteriana *Enterobacter* K131 en comparación con el testigo, para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas restantes se muestra un efecto negativo. Para el tallo muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo, excepto la cepa *E. coli* N16 la cual mostro un efecto negativo (Fig. 29).

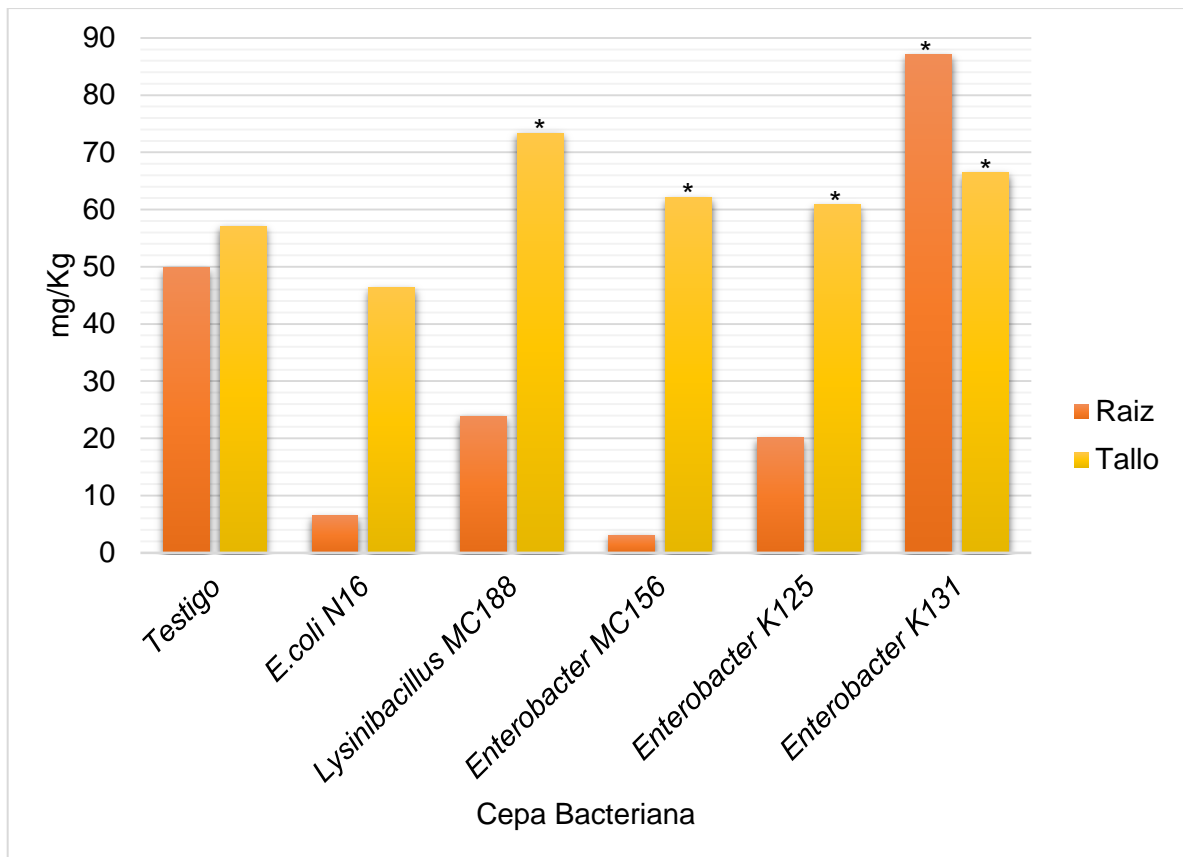


Figura 29. Concentración de Zn en raíz y tallo de las plantas de girasol inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0,05$

3.3.2.5 Concentración de Hierro (Fe)

El análisis de concentración de Fe para las plantas de girasol en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas *E. coli* N16, *Lysinibacillus* MC188 y *Enterobacter* K125 en comparación con el testigo, para las plantas inoculadas con las cepas restantes se muestra un efecto negativo. Simultáneamente el tallo muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas *Enterobacter* MC156 y *Enterobacter* K131 en comparación con el testigo, las plantas inoculadas con las cepas bacterianas restantes mostraron un efecto negativo (Fig. 30).

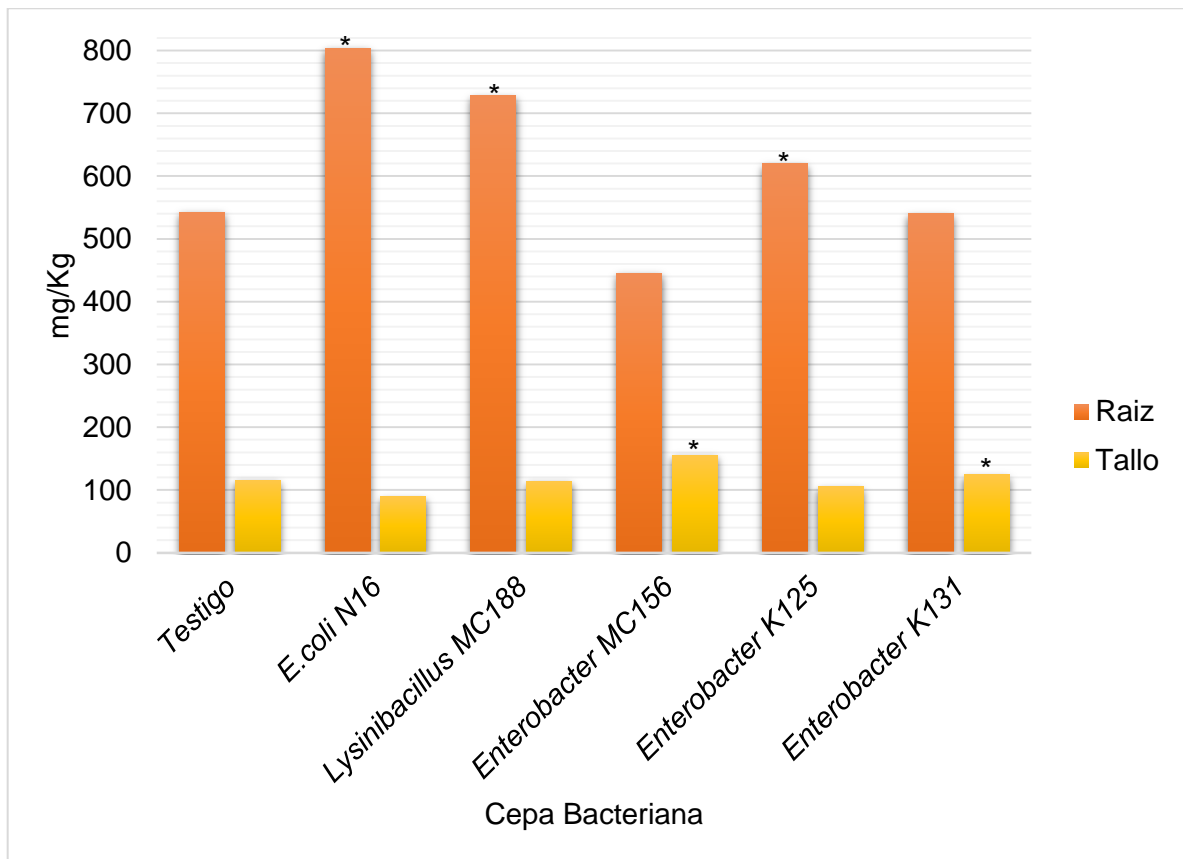


Figura 30. Concentración de Fe en raíz y tallo de las plantas de girasol inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0.05$

3.3.2.6 Concentración de Sodio (Na)

El análisis de concentración de Na para las plantas de girasol en raíz muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo, excepto la cepa *Enterobacter* K131 la cual muestra un efecto negativo. Mientras que en el tallo muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas *E. coli* N16, *Enterobacter* MC156 y *Enterobacter* K125 en comparación con el testigo, las plantas inoculadas con las cepas bacterianas restantes mostraron un efecto negativo (Fig. 31)

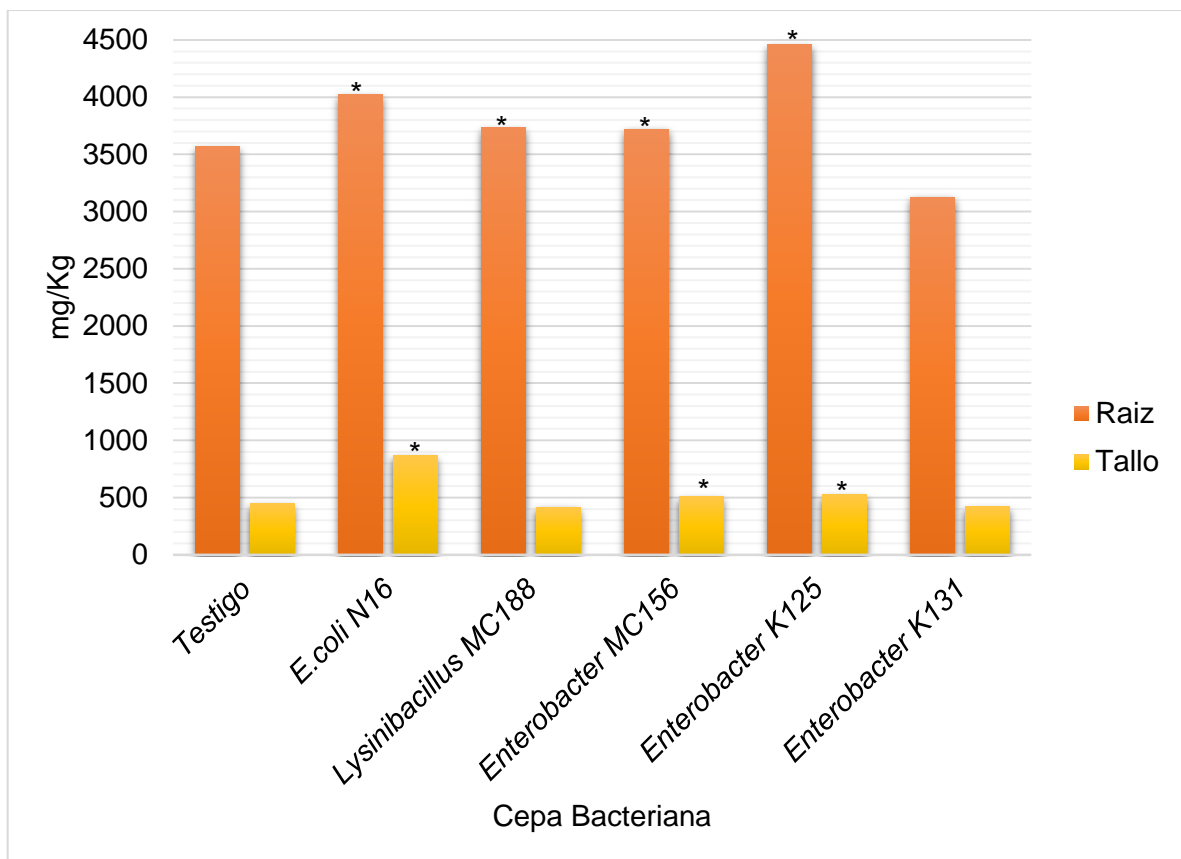


Figura 31. Concentración de Na en raíz y tallo de las plantas de girasol inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0,05$

3.3.2.7 Concentración de Potasio (K)

El análisis de concentración de K para las plantas de girasol en raíz muestra un efecto similar o negativo para todas las cepas bacterianas. Para el tallo muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo, excepto la cepa *Lysinibacillus* MC188 la cual mostro un valor similar y sin diferencia significativa (Fig. 32).

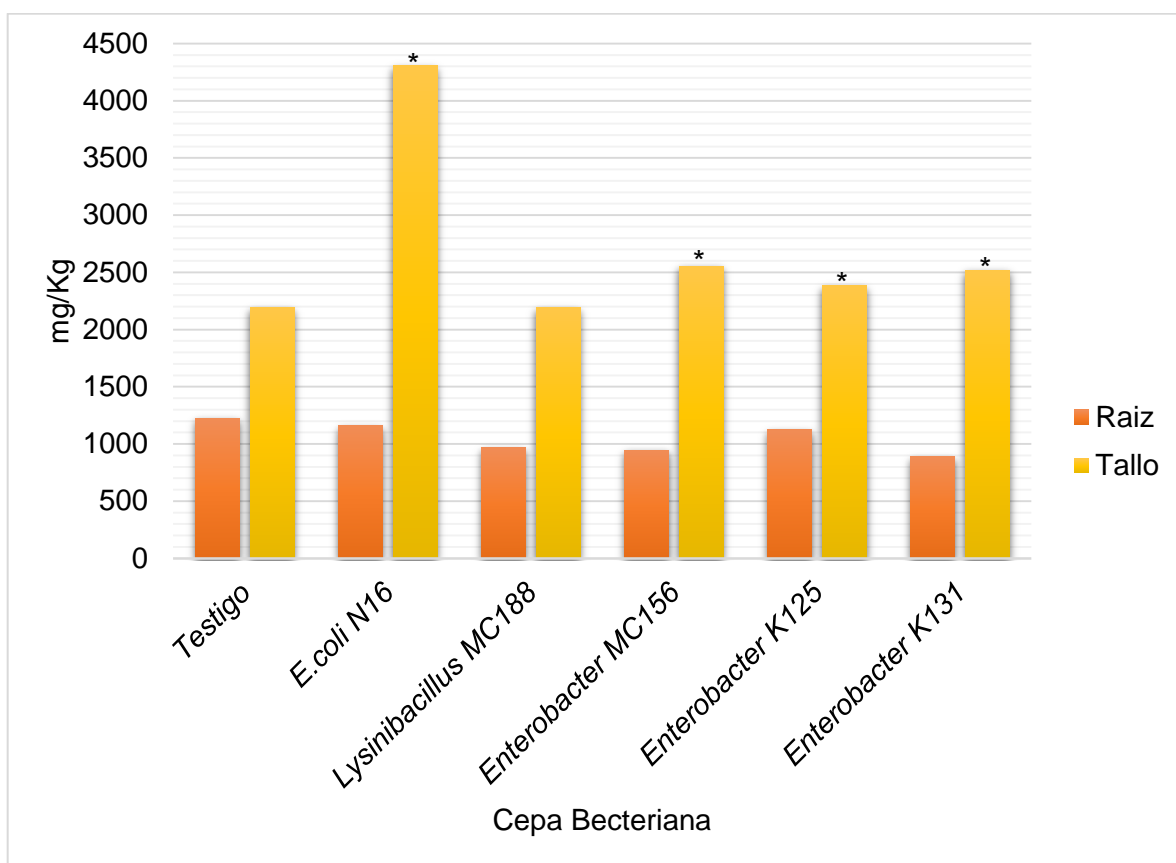


Figura 32. Concentración de K en raíz y tallo de las plantas de girasol inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo ($p < 0.05$)

3.3.2.8 Concentración de Fósforo (P)

El análisis de Concentración de P para las plantas de girasol en raíz y tallo muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas utilizadas en comparación con el testigo (Fig.33).

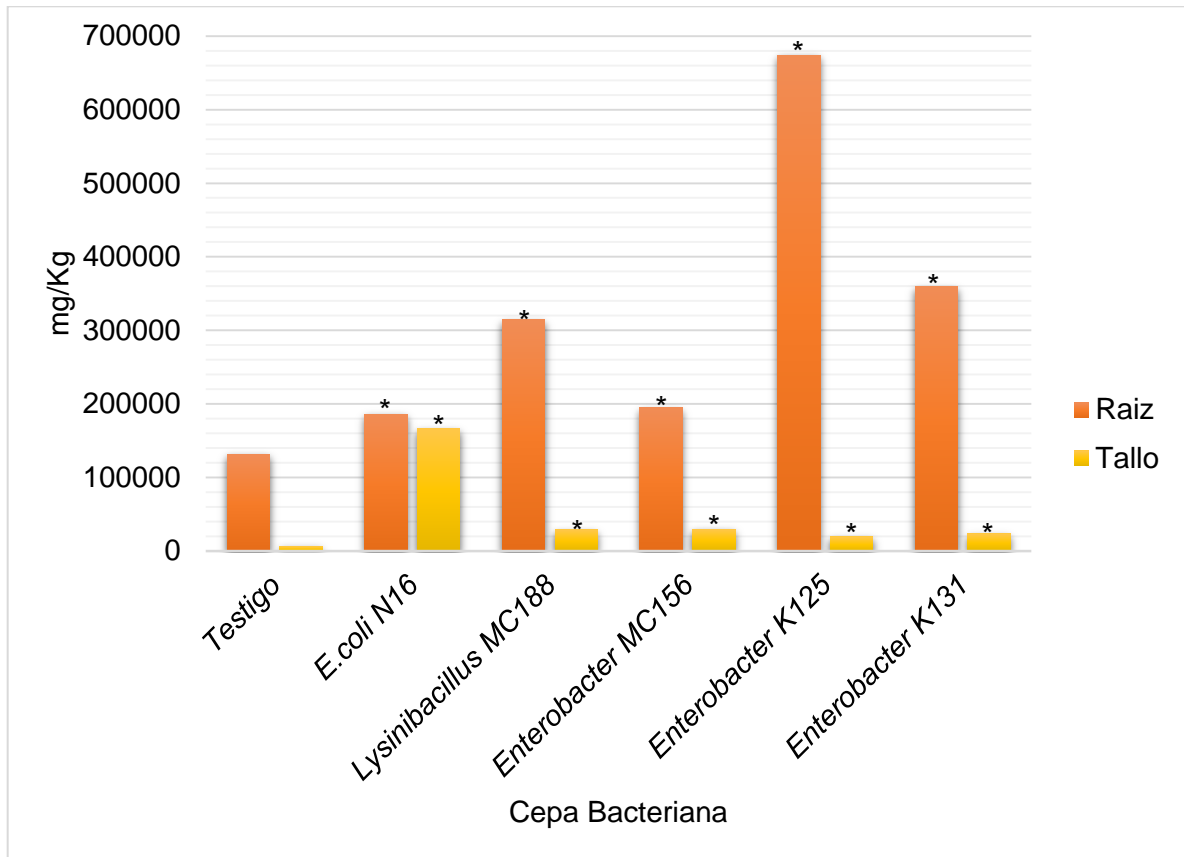


Figura 33. Concentración de P en raíz y tallo de las plantas de girasol inoculadas con PGPR.

* muestra diferencia significativa con respecto al testigo $p < 0.05$

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se estudiaron los efectos que tienen las bacterias promotoras del crecimiento de plantas de los géneros *E. coli* (N16), *Lysinibacillus* (MC188) y *Enterobacter* (MC156, K131 y K125) en plantas de chícharo (*Pisum sativum*), calabaza (*Cucurbita pepo*) y girasol (*Helianthus annuus*), lo que concuerda con lo reportado por Vargas et al., (2001) quienes reportaron los siguientes géneros bacterianos *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derrxia*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Metanobacterium*, *Clostridium* y *Desulfovibrio*; que se han aplicado a semillas, tubérculos o raíz, y son capaces de colonizar las raíces de las plantas y estimular el crecimiento y rendimiento de cultivos

De los resultados obtenidos se puede decir que se observó un aumento en la elongación y proliferación de raíces, así como de pelos radicales, lo que nos lleva a un aumento en el nivel de nutrientes y en el crecimiento de la planta, esto coincide con Angulo et al., (2014) quienes reportaron que en plantas de *Eucalyptus nitens* identificaron 12 cepas rizosféricas como PGPR pertenecientes a los géneros *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Rahnella* y *Bacillus*, donde los resultados obtenidos evidenciaron máximos incrementos en el peso seco aéreo (142 %) y de la raíz (135 %); la altura de las plantas (50 %) y el largo de raíces (45 %) de las mismas indicando así el potencial de las rizobacterias estudiadas como promotoras de emergencia y crecimiento de plántulas de *E. nitens* y su posible uso como inoculantes, ya que presentan más de un mecanismo de acción asociado a la promoción del crecimiento.

Los resultados mostraron efectos positivos significativos en el crecimiento de la longitud tanto de raíz como de tallo en las plantas de calabaza con las cinco cepas utilizadas, destacando la cepa *Enterobacter* MC156; para las plantas de chícharo destacan las cepas del genero *Enterobacter* (MC156, K131 y K125) y en girasol las cepas *E.coli* N16, *Lysinibacillus* MC188 y *Enterobacter* K125, lo que concuerda con lo estudiado por Sánchez, (2011) quien empleo las cepas del genero *Enterobacter sp* (TVL-1 y TVL-2), *Pseudomonas sp.* (PSO13, PSO14), y *Bacillus sp.* (BEOO2 y BEOO3) en cultivos de tomate, donde el experimento evidenció que las cepas *Enterobacter sp* TVL-2 y *Pseudomonas sp* PSO14 incrementaron de manera notoria la biomasa de la planta ($P>0.05$) (longitud, peso seco y área foliar) así como el rendimiento en la producción de frutos lo que se puede asociar a las capacidades bioquímicas asociadas a promoción de crecimiento.

Simultáneamente de los resultados obtenidos se evidencio que los mejores valores se encontraron en las cepas *Lysinibacillus* MC188 y *Enterobacter* K131 ya que incrementaron la absorción de micronutrientes (Mn, Cu, Ni, Z, Fe) y macronutrientes (Na, K, P) de las plantas de chícharo y calabaza, mientras que la cepa *Enterobacter* MC156 apporto diferencias significativas en la absorción de nutrientes de la planta de girasol. Lo anterior coincide con autores como Loredo *et al.*, (2004) quienes mencionan que los principales efectos de las bacterias promotoras del crecimiento sobre las gramíneas se han asociado en el desarrollo de la raíz y efectos en el rendimiento; y las inoculadas con *Azospirillum*, los cambios favorables en las plantas, en general, se han atribuido a cambios en la absorción de Nitratos (NO_3), Amonios (NH_4), Fosfatos (PO_4), Potasio (K) y Hierro (Fe), lo cual incrementa la acumulación de minerales en hojas y tallos, por lo que se ha sugerido que el incremento en la absorción de minerales se debe a un incremento general en el volumen de las raíces.

CONCLUSIONES

- Las cepas bacterianas que influyeron positivamente en las plantas de chícharo con diferencias significativas ($p < 0.05$) en una mayor cantidad de parámetros siendo estos incremento de altura, concentración de micronutrientes (Mn, Cu, Ni, Zn, Fe) y macronutrientes (Na, K, P) fueron: la cepa *Enterobacter* K131 con ocho de los nueve parámetros medidos siendo la excepción en raíz el macronutriente K y en el tallo la longitud, *Enterobacter* MC156 con ocho parámetros en raíz siendo la excepción el micronutriente Mn y siete parámetros en tallo con excepción del micronutriente Mn y longitud y *Lysinubacillus* MC188 con siete parámetros en raíz siendo la excepción del micronutriente Zn y la longitud y en tallo 8 parámetros a excepción de la longitud.
- En la inoculación de las plantas de calabaza las cepas bacterianas que influyeron positivamente con diferencias significativas ($p < 0.05$) en una mayor cantidad de parámetros siendo estos incremento de altura, concentración de micronutrientes (Mn, Cu, Ni, Zn, Fe) y macronutrientes (Na, K, P) fueron: la cepa *Enterobacter* K131 con 7 parámetros en raíz siendo la excepción el micronutriente Cu y el macronutriente K mientras que en el tallo obtuvo los nueve parámetros y *Lysinubacillus* MC188 con ocho parámetros en raíz a excepción el micronutriente Zn y seis parámetros en tallo siendo la excepción los micronutrientes Mn, Zn y el macronutriente K.
- La cepa bacteriana que influyó positivamente en las plantas de girasol con diferencias significativas ($p < 0.05$) en una mayor cantidad de parámetros siendo estos incremento de altura, concentración de micronutrientes (Mn, Cu, Ni, Zn, Fe) y macronutrientes (Na, K, P), fueron las cepas: *E. coli* N16 teniendo seis parámetros en raíz siendo la excepción los micronutrientes Cu y Zn y el macronutriente K y cinco parámetros en tallo con excepción de los micronutrientes Cu, Zn y Fe así como la longitud y *Enterobacter* MC156

teniendo cinco parámetros en raíz siendo la excepción los micronutrientes Cu, Zn, Fe y el macronutriente K y seis parámetros en tallo con excepción de los micronutrientes Mn y Cu así como la longitud y *Enterobacter* K125 teniendo 6 parámetros en raíz siendo la excepción los micronutrientes Cu, Zn y el macronutriente K y cinco parámetros en tallo con excepción de los micronutrientes Mn, Cu, Ni y Fe.

- De acuerdo a los resultados obtenidos en la inoculación de las plantas con las cepas bacterianas se mejoró el desarrollo radical de las plantas dando como resultado un aumento en la concentración de micronutrientes (Mn, Cu, Ni, Zn, Fe) y macronutrientes (Na, K, P), por lo que se acepta la hipótesis planteada que, la inoculación de plantas con Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal aumentara su crecimiento y beneficiara en la nutrición de estas. Estas bacterias poseen potencialidades para ser empleadas como inoculantes para una agricultura sustentable, usando los géneros *Enterobacter* K131 y *Lysinubacillus* MC188 para las plantas de chícharo y calabaza, mientras que para la planta de girasol la cepa *Enterobacter* MC156 es la mejor opción para mejorar su crecimiento y nutrición.

BIBLIOGRAFÍA

- Altieri, M., & Nicholls, C. I. (2000). Teoría y práctica para una agricultura sustentable. Serie Textos Básicos para la Formación Ambiental. PNUMA. Red de Formación Ambiental para América Latina y el Caribe. México, 235.
- Altieri, M. A. (2001). Agroecología: principios y estrategias para diseñar una agricultura que conserva recursos naturales y asegura la soberanía alimentaria. *Universidad de California, Berkeley*.
- Angulo, V. C., Sanfuentes, E. A., Rodríguez, F., & Sossa, K. E. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista argentina de microbiología*, 46(4), 338-347.
- Cota Ochoa, K. M. (2014). Selección de bacterias con capacidad promotora de crecimiento en frijol a partir del banco de microorganismos de la rizósfera CIIDIR 003.
- EPA (Environmental Protection Agency), 1996. METHOD 3052. Microwave Assisted Acid Digestion of Siliceous and Organically Based Matrices. EPA (Environmental Protection Agency).
- FAO. (2009). 2050: Un tercio más de bocas que alimentar. Página web: <http://www.fao.org/news/story/es/item/35675/icode/>
- Ferrera R., Alarcón A. (2007). Bacterias Promotoras del Crecimiento en Plantas para Propósitos Agrícolas y Ambientales. En *Microbiología Agrícola* (170-224). México City. México. Ed. Trillas.

- Gallegos, R., & Angélica, M. (2009). Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú.
- Garrido Rubiano, M. F., & Rubiano, M. F. G. (2007). *Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del valle y sabana del Cesar en dos épocas climáticas* (No. PDF 026) (Doc. 26140) CP-BAC, Bogotá).
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, vol.169 (1), pp. 30-39.
- Herreras, E. B. (2005). SPSS: Un instrumento de análisis de datos cuantitativos. *Revista de informática educativa y medios audiovisuales*, 2(4), 62-69
- Holguin, G., Bashan, Y., Puente, E., Carrillo, A., Bethlenfalvay, G., Rojas, A., & De Bashan, L. G. (2003). Promoción Del Crecimiento En Plantas Por Bacterias De La Rizosfera Plant Growth Promotion By Rhizosphere Bacteria. *Agricultura Técnica En México*, 29(2).
- INEGI. (2007). Cultivos Anuales de los Estados Unidos Mexicanos, VIII Censo Agrícola, Ganadero y Forestal, Censo Agropecuario.
- Loredó-Ostí, C; Espinosa-Victoria, D; López-Reyes, L; (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*. 22(2). Pág. 225-239.

- Malajovich M. (2015). Micropropagación. 2016, Biotecnología, Enseñanza y Divulgación. Página web: http://www.bteduc.bio.br/guias_es/90_Micropropagacion_desinfeccion_explant es.pdf
- Mendoza J., Perez Y., Arriola J., Martínez S., Pérez G. (Mayo 2016). Assessing the effects of heavy metals in ACC deaminase and IAA production on plant growth promoting bacteria. *Microbiological Research*, 188, 53-61.
- Ordoñez N. (2010). La versatilidad del Chicharo *Pisum sativum*. *Tecno Agro*, No.52. Página web: <http://www.tecnoagro.com.mx/revista/2009/no-52/la-versatilidad-del-chicharo-pisum-sativum/>
- Ortiz R. (2015). Comunicación entre plantas y bacterias para entender el crecimiento vegetal. *Revista Protocolo Foreign Affairs & Lifestyle*. Página web: <http://www.protocolo.com.mx/mexico/comunicacion-entre-plantas-y-bacterias-para-entender-el-crecimiento-vegetal/>
- SAGARPA. (2009). Tecnologías de Mitigación. Biofertilizantes. Página web: http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/cambioclimatico/Tecnologias_mitigacion.pdf
- Sánchez López, D. B. (2011). Efecto de la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre el cultivo de tomate (*Solanum Lycopersicum* var. Sofia) bajo invernadero. Página web: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/1566/SanchezLopezDianaBeatriz2011.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Secretaria de Fomento Agropecuario. (2009). Estudio Estadístico sobre Cultivos Orgánicos en Baja California. 2016, de Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable. Página web: <http://www.nacionmulticultural.unam.mx/empresasindigenas/docs/1859.pdf>
- Sergio, B. L., Catarina, L. O., & Luis, B. C. J. (1998). Reconversión de áreas agrícolas marginales a uso pecuario con módulos forrajeros.
- Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera (SIAP) (2014). Página web: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (2016)
- Torriente D. (2010). Aplicación De Bacterias Promotoras Del Crecimiento Vegetal En El Cultivo De La Caña De Azúcar. Perspectivas De Su Uso En Cuba. Cultivos Tropicales. Vol. 31(1)
- Vargas, P., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suárez, J. J., & Alcántar, G. (2001). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. Terra, 19(4), 327-335. Página web <https://chapingo.mx/terra/contenido/19/4/art327-335.pdf>
- Villarraga, V., & Marcela, D. (2014) Evaluación de tres aislamientos bacterianos como potenciales promotores de crecimiento vegetal en plantas de arroz (*Oryza sativa*) (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).