



**BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”

**BIODISPONIBILIDAD DE FÓSFORO EDÁFICO A TRAVÉS DE
BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS EN EL
CULTIVO MIXTO MAÍZ (*Zea mays* L.)- HABA (*Vicia faba* L.)**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta:

BIOL. JUAN CARLOS GÓMEZ MARTÍNEZ

Director de tesis

Dra. Lucía López Reyes

Codirector de tesis

M. en C. Moisés G. Carcaño Montiel

Diciembre 2018



**BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”

**BIODISPONIBILIDAD DE FÓSFORO EDÁFICO A TRAVÉS
DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS EN EL
CULTIVO MIXTO MAÍZ (*Zea mays* L.)- HABA (*Vicia faba* L.)**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta:

BIOL. JUAN CARLOS GÓMEZ MARTÍNEZ

Comité tutorial

Dra. Lucía López Reyéz
M. en C. Moisés G. Carcaño Montiel
Dr. David Espinosa Victoria
Dra. Sonia Emilia Silva Gómez
Dr. Ricardo Darío Peña Moreno

Diciembre 2018

AGRADECIMIENTOS

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de posgrado y su fomento al desarrollo científico del país.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) por la oportunidad de desarrollar un trabajo de investigación en un ambiente de trabajo adecuado a las exigencias del mundo actual.

Al posgrado en Ciencias Ambientales por la aceptación en el programa de maestría, el tiempo invertido y los recursos humanos dedicados para la finalización del proyecto.

Al Laboratorio de Microbiología de Suelos por su apoyo en el financiamiento, equipo, instrucción técnica y metodológica para todas las etapas del proyecto.

BIOFERTIBUAP y BIOFOSFOBUAP por el financiamiento del proyecto, lo cual hizo posible obtener los resultados presentados en este trabajo.

A mi familia, por ser la principal motivación para mi crecimiento personal y profesional: a mi mamá por tenerme siempre presente en sus oraciones y en sus pensamientos, a mi papá, por ser un ejemplo de esfuerzo y dedicación, a mi hermano por ser un guía y un amigo en cada paso de mi vida.

A Tania, por ser mi compañera y cómplice en todos los momentos malos y buenos de nuestras vidas, por creer siempre en mí y ser mi fortaleza en los peores días. Te amo.

A mis amigos y compañeros, sin los cuales una comida casual puede convertirse en una mesa de debate y aprendizaje: Lety, Ely y todo el equipo de estudiantes de servicio social y prácticas profesionales. Sobre todo, muchas gracias Dra. Lucía, Maestro Moisés por ser maestros, guías y amigos durante mi estancia en el laboratorio. Su apoyo y todas sus enseñanzas hicieron posible todo este trabajo.

A todos los que estuvieron al pendiente de mi progreso y me hicieron ver mis errores más de una vez: Ivar, Belén, Diana 1 y 2, Cristina, Karen, Jessica, Gerardo, Rodrigo, Lulú, Nitza, Luis, Andrés, Bere, Celeste, David, Mildred, Rebeca y Pacheco. Gracias por los momentos alegres, y sus enseñanzas durante estos dos cortos años. Que todos los retos que se encuentran frente a nosotros sean superados y todas las expectativas rebasadas.

Índice general

I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Justificación	5
IV. Hipótesis	6
V. Objetivos	6
5.1 Objetivo general	6
5.2 Objetivos particulares	6
VI. Antecedentes	7
6.1 Seguridad y soberanía alimentaria	7
6.2 El recurso suelo	10
6.3 Los cultivos mixtos	12
6.4 El maíz y el haba	14
6.5 Biofertilizantes y nutrición vegetal	15
VII. Materiales y métodos	19
7.1 Localización	19
7.2 Fase de laboratorio	21
7.2.1 Análisis físico y químico del suelo	21
7.2.1.1 Textura del suelo	21
7.2.1.2 Determinación de pH del suelo	22
7.2.1.3 Conductividad eléctrica del suelo	22
7.2.1.4 Cuantificación del fósforo disponible en suelo	23
7.2.2 Análisis microbiológico del suelo	23
7.2.2.1 Cuantificación de poblaciones microbianas en el suelo	23
7.2.2.2 Actividad deshidrogenasa en suelo	24
7.2.3 Aislamiento y selección de bacterias solubilizadoras de fosfatos	24
7.2.4 Evaluación de la actividad solubilizadora de fosfatos por las cepas bacterianas	25

7.2.5	Identificación de las cepas aisladas	27
7.2.5.1	Identificación de bacterias por métodos bioquímicos	27
7.2.5.2	Identificación de bacterias por métodos moleculares	27
7.2.6	Ensayo de compatibilidad entre bacterias	28
7.2.7	Conservación de bacterias solubilizadoras de fosfatos	29
7.3	Fase de invernadero	29
7.3.1	Establecimiento del cultivo	29
7.4	Fase de campo	30
7.4.1	Preparación del terreno	30
7.4.2	Preparación de inóculos para el experimento de campo	32
VIII.	Resultados y discusión	34
8.1	Fase de laboratorio	34
8.1.1	Análisis físico y químico del suelo	34
8.1.1.1	Textura del suelo	34
8.1.1.2	Determinación de pH en suelo	34
8.1.1.3	Conductividad eléctrica en suelo	36
8.1.1.4	Cuantificación del fósforo disponible en suelo	38
8.1.2	Análisis microbiológico del suelo	40
8.1.2.1	Conteo de unidades formadoras de colonias del suelo	40
8.1.2.2	Aislamiento y selección de bacterias solubilizadoras de fosfatos	41
8.1.2.3	Evaluación de la actividad solubilizadora de fosfatos por las cepas bacterianas	41
8.1.2.4	Identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos	42
8.1.2.4.1	Identificación de bacterias por métodos bioquímicos	42

8.1.2.4.2 Identificación de bacterias por métodos moleculares	43
8.1.2.5 Ensayo de compatibilidad entre bacterias	44
8.1.2.6 Actividad de la enzima deshidrogenasa en suelo	44
8.2 Fase de invernadero	46
8.2.1 Monocultivo y cultivo mixto de maíz y haba	46
8.3 Fase de campo	57
8.3.1 Cultivo en campo	57
IX. Conclusiones	63
X. Bibliografía	65

Índice de figuras

Figura 1. Ubicación del municipio de San José Teacalco en el Estado de Tlaxcala.	19
Figura 2. Zona de estudio en el Municipio de San José Teacalco, Tlaxcala.	20
Figura 3. Ampliación del área de estudio en el Municipio de San José Teacalco, Tlaxcala.	21
Figura 4. Nódulos de haba.	25
Figura 5. Índice de solubilización.	26
Figura 6. Kit de identificación bioquímica API 20 NE.	27
Figura 7. Esquema del diseño de siembra para prueba de compatibilidad.	29
Figura 8. Plantas de maíz y haba en invernadero.	30
Figura 9. Esquema de la distribución de los tratamientos en el experimento de campo.	31
Figura 10. Área de cultivo en campo.	32
Figura 11. Preparación de biofertilizante e inoculación de semillas en campo.	33
Figura 12. Triángulo de textura del suelo.	34
Figura 13. Conteo de microorganismos del suelo.	40
Figura 14. Placas de agar Goldstein con bacterias solubilizadoras de fosfatos.	41
Figura 15. Placa de agar Goldstein adicionado de glucosa.	42
Figura 16. Ensayos de compatibilidad entre bacterias solubilizadoras de fosfatos.	44
Figura 17. Raíces de maíz en monocultivo.	48
Figura 18. Raíces de haba en monocultivo.	51

Índice de cuadros

Cuadro 1. Tratamientos del experimento realizado en condición de invernadero para monocultivo y cultivo mixto.	31
Cuadro 2. Valores de pH para el suelo de las plantas de invernadero.	36
Cuadro 3. Conductividad eléctrica en suelo de plantas de maíz y haba en monocultivo y cultivo mixto en condiciones de invernadero.	37
Cuadro 4. Cuantificación del fósforo disponible en suelo asociado a las plantas de maíz y haba en condiciones de monocultivo y cultivo mixto en invernadero.	39
Cuadro 5. Conteo de UFC de microorganismos por gramo de suelo.	40
Cuadro 6. Índice de solubilización de las cepas bacterianas aisladas de nódulos de haba.	42
Cuadro 7. Pruebas bioquímicas para la determinación mediante API 20 NE.	43
Cuadro 8. Actividad deshidrogenasa en suelo asociado a plantas de maíz y haba en monocultivo y cultivo mixto.	45
Cuadro 9. Altura y diámetro en las plantas de maíz en invernadero en monocultivo.	46
Cuadro 10. Masa seca de tallo y raíz en las plantas de maíz en invernadero, en monocultivo.	47
Cuadro 11. Altura y diámetro en las plantas de haba en invernadero en monocultivo.	49
Cuadro 12. Masa seca de tallo y raíz, y cuenta de nódulos en las plantas de haba en invernadero en monocultivo.	50
Cuadro 13. Altura, diámetro y masa seca de tallo en las plantas de maíz en invernadero en cultivo mixto.	52
Cuadro 14. Altura y diámetro en las plantas de haba en invernadero en cultivo mixto.	53
Cuadro 15. Masa seca de tallo y raíz, y cuenta de nódulos en las plantas de haba en invernadero en cultivo mixto.	54
Cuadro 16. Masa seca de la raíz combinada de las plantas de haba y maíz en cultivo mixto en invernadero.	55
Cuadro 17. Unidades formadoras de colonias de bacterias solubilizadoras de fosfatos en el suelo de las plantas de haba en condición de invernadero.	56

Cuadro 18. Unidades formadoras de colonias de bacterias solubilizadoras de fosfatos en el suelo de las plantas de haba en condición de campo.	57
Cuadro 19. Comparación de la altura de las plantas de haba en el experimento de campo.	58
Cuadro 20. Comparación del diámetro de las plantas de haba en el experimento de campo.	59
Cuadro 21. Número de vainas de haba por planta en el experimento de campo.	60
Cuadro 22. Comparación de la masa seca promedio de las vainas de haba en el experimento de campo.	62

I. Resumen

Las prácticas agrícolas pueden mejorarse con la siembra de cultivos mixtos y la aplicación de biofertilizantes. La siembra de leguminosas asociadas con gramíneas aumenta los rendimientos de las plantas con beneficios a los agricultores que cuentan con limitaciones tecnológicas y económicas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la cantidad de fósforo disponible en el suelo asociado a las plantas de maíz y haba inoculadas con bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF), evaluar su crecimiento y productividad. Se aislaron y seleccionaron BSF a partir de nódulos de haba con la mayor actividad solubilizadora de fosfatos para la elaboración de un biofertilizante. Se inocularon poblaciones de 52×10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de biofertilizante en semillas de maíz y haba en monocultivo y cultivo mixto en condiciones de invernadero y campo. Se evaluaron las características iniciales en el suelo de la zona de estudio: actividad de la enzima deshidrogenasa (0.41 unidades enzimáticas por día), bacterias mesofílicas aeróbicas (90×10^4 UFC g^{-1} de suelo), BSF (8×10^4 UFC g^{-1} suelo) y fósforo disponible en el suelo rizosférico (8.96 mg kg^{-1}). Se observó que las plantas de maíz y haba inoculadas con BSF más 60-30-00 unidades de fertilizante químico presentaron la mayor altura. El diámetro de las plantas de maíz se incrementó al agregar BSF y fertilizante químico. La masa seca de los tallos y raíces de las plantas de haba y maíz en monocultivo mejoró con el tratamiento de fertilización química 60-30-00 y BFN. El número de nódulos se vio favorecido por la inoculación con BFN y BSF. La actividad deshidrogenasa aumentó en los tratamientos con fertilización química. El número de vainas por planta de haba se benefició con el tratamiento de 120-60-00 unidades de fertilización química (5.77 vainas por planta). La masa seca de las vainas de haba alcanzó 770 g con el tratamiento de fertilización química 120-60-00. La aplicación de biofertilizantes y los cultivos mixtos (maíz-haba), mejoraron el crecimiento de las plantas. Lo anterior representa una alternativa para reducir el uso de fertilizantes químicos en condiciones de campo e invernadero.

Palabras clave: *solubilización de fosfatos; biofertilizantes; productividad agrícola.*

I. Abstract

The agricultural practices can be improved with the sowing of mixed crops and the application of biofertilizers. The sowing of legumes with grasses and the yields of the plants with the benefits of technological and economic limitations. The objective of this work was to evaluate the amount of phosphorus available in the soil associated with maize and bean plants inoculated with phosphate solubilizing bacteria (BSF), evaluation of growth and productivity. BSF were isolated and selected from bean nodules with the highest phosphate solubilizing activity for the preparation of a biofertilizer. Populations of 5.2×10^7 colony-forming units (CFU) per gram of biofertilizer were inoculated into maize and bean seeds in monoculture and mixed culture under greenhouse and field conditions. The initial characteristics in the soil of the study area were evaluated: activity of the enzyme dehydrogenase (0.41 enzymatic units per day), aerobic mesophilic bacteria (9.0×10^4 CFU g⁻¹ of soil), BSF (8×10^4 CFU g⁻¹ soil) and available phosphorus in the rhizospheric soil (8.96 mg kg⁻¹). It has been observed that the maize and bean plants inoculated with BSF plus 60-30-00 units of chemical fertilizer presented the highest height. The diameter of the corn plants was increased by adding BSF and chemical fertilizer. The dry mass of the stems and the roots of the maize and corn plants in monoculture improved with the chemical fertilization treatment 60-30-00 and BFN. The number of nodules was favored by inoculation with BFN and BSF. The dehydrogenase activity in the treatments with chemical fertilization. The number of pods per plant has benefited from the treatment of 120-60-00 units of chemical fertilization (5.77 pods per plant). The dry weight of vains of habit 770 g with treatment of chemical fertilization 120-60-00. The application of biofertilizers and mixed crops (corn-bean), improved the growth of the plants. This represents an alternative to reduce the use of chemical fertilizers in field and greenhouse conditions.

Keywords: *phosphate solubilization, biofertilizers, agricultural productivity.*

II. Introducción

Se estima que cerca de un tercio de la superficie arable del planeta se encuentra degradada de forma moderada a alta debido a la erosión, pérdida de carbono orgánico del suelo, desequilibrio de nutrientes, acidificación, contaminación, anegamiento, compactación, sellado, salinización y pérdida de biodiversidad. Por lo que se vuelve necesario encontrar medidas que mitiguen dichos efectos (FAO, 2015).

El impacto en el suelo por la agricultura puede ser reducido por el uso de diferentes estrategias, entre ellas: a) La utilización de cultivos mixtos y b) el uso de formulaciones biológicas bacterianas conocidas como biofertilizantes o inoculantes. El término cultivo mixto se refiere a una práctica agrícola donde se siembran dos o más especies de plantas simultáneamente en la misma área para mejorar su crecimiento y productividad (Hauggaard-Nielsen y Jensen, 2005). Se ha observado que el uso excesivo de agroquímicos en el suelo puede provocar la contaminación de cuerpos de agua subterráneos o superficiales (Hermosín *et al.*, 2009; Masís *et al.*, 2008). Un ejemplo lo constituye el maíz, donde el fertilizante químico no es aprovechado completamente por el cultivo. Lo antes mencionado conlleva al suministro de altas dosis nutrimentales para alcanzar los rendimientos deseados. Sin embargo, el maíz es una planta susceptible a cultivarse asociado con otras especies vegetales como las leguminosas (Álvarez-Solís *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se demostró que los sistemas productivos mixtos pueden ser optimizados, sin la necesidad de degradar los recursos naturales. Se usaron como estrategias de estudio los cultivos mixtos (Agegnehu *et al.* 2008; Dahmardeh *et al.* 2010; Mucheru-Muna *et al.*, 2010) y la aplicación de inoculantes bacterianos (Armenta *et al.*, 2010; Holguin *et al.*, 2003; Restrepo-Franco *et al.*, 2015), las cuales han tenido resultados satisfactorios en comparación a la utilización del sistema tradicional de monocultivos y fertilización química.

Se llevó a cabo una investigación de tipo experimental, con un diseño de bloques completamente al azar. Se utilizaron tratamientos con cepas bacterianas solubilizadoras de fosfatos obtenidas a partir de nódulos de haba. Dichas bacterias se agregaron en forma

de inoculante a las semillas de plantas de maíz y haba. Se sembraron en condiciones de monocultivo y cultivo mixto y se evaluó el desarrollo de las plantas. Se midió la altura, el diámetro, la masa seca del tallo y raíz, y se contaron los nódulos de las plantas. Los resultados se compararon estadísticamente mediante un análisis de varianza y se realizó una comparación de medias para identificar diferencias estadísticas significativas entre tratamientos y determinar el más eficaz.

III. Justificación

La dinámica del crecimiento poblacional humano, conlleva a la necesidad de producir más alimentos. Sin embargo, el recurso suelo es un recurso finito a corto plazo y no es posible restaurar las condiciones naturales al ritmo en que se está degradando. Por lo que se vuelve necesario realizar investigación dirigida a mitigar los impactos adversos en los recursos naturales y en la seguridad y soberanía alimentaria.

El suelo es un sumidero de CO₂ que está perdiendo la capacidad de retener este gas, el cual, al ser liberado a la atmósfera, contribuye al efecto invernadero. La pérdida del suelo por la erosión y las malas prácticas agrícolas, constituyen la segunda causa antropogénica de las emisiones de CO₂ a la atmósfera, después de las emisiones por fuentes fijas y móviles del mundo.

El presente trabajo de investigación contribuyó al estudio de prácticas agrícolas que ayudan a reducir la degradación del suelo. Se determinó que la aplicación de biofertilizantes y los cultivos mixtos son alternativas viables y que han probado tener resultados favorables en distintas condiciones ambientales en el mundo. Se aportó conocimiento en materia de insumos agrícolas para mejorar la productividad del campo mexicano. Existen trabajos que indican los beneficios de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, y los beneficios de los cultivos mixtos, haciéndose especial énfasis en la dinámica del nitrógeno. Sin embargo, la participación del fósforo como macronutriente y su papel en el desarrollo de las plantas han sido estudiados con menor detenimiento. Es necesario ampliar el conocimiento en materia de alternativas agroecológicas para reducir la dependencia de fertilizantes e insumos químicos para la agricultura.

A nivel global se ha buscado intensificar el rendimiento de los cultivos a través de la aplicación de compuestos químicos. Sin embargo, han impactado negativamente a la fertilidad del suelo y ha provocado la degradación de áreas cada vez mayores, lo que repercute en la suficiencia alimentaria y en la captura de carbono en el suelo.

IV. Hipótesis

La inoculación de bacterias solubilizadoras de fosfatos y el establecimiento de cultivos mixtos mejoran la biodisponibilidad de fósforo para las plantas de maíz y haba en comparación al monocultivo.

V. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar la cantidad de fósforo disponible en el suelo asociado a las plantas de maíz y haba inoculadas con bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) y su crecimiento.

5.2 Objetivos particulares

Realizar un análisis microbiológico del suelo, con énfasis en el aislamiento e identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos.

Evaluar parámetros físicos, químicos y biológicos del suelo antes y después del establecimiento del cultivo.

Determinar el efecto de la aplicación de bacterias solubilizadoras de fosfatos en campo, en el crecimiento y productividad de plantas de maíz y haba en condiciones de monocultivo y cultivo mixto.

Seleccionar el tratamiento con mejores resultados en el desarrollo de las plantas.

VI. Antecedentes

6.1 Seguridad y soberanía alimentaria

La seguridad alimentaria se consigue cuando las personas tienen acceso a suficiente alimento en todo momento, de manera segura y nutritiva para satisfacer sus necesidades alimenticias y llevar una vida activa y sana (FAO, 2013). La soberanía en la producción de alimentos surge después de la seguridad alimentaria, una vez que las políticas de los países se centran en las necesidades particulares de la gente. Para lograrlo, se requiere del apoyo a los productores de alimentos, la identificación de los sistemas de producción de alimentos más eficientes, poner el control en las manos de los productores locales, y promover el conocimiento y las habilidades necesarias para un trabajo en conjunto con la naturaleza (FAO, 2013).

La problemática del modelo de seguridad alimentaria, radica en la dependencia del comercio para satisfacer las necesidades de la población de países en vías de desarrollo. Sin embargo, no se considera la situación de desempleo que millones de pequeños productores padecen en la actualidad y que tiende a incrementarse. Además, uno de los temas recientes, respecto a la seguridad alimentaria, es el de incrementar la producción agrícola en un 50% para 2030, así como duplicarla para 2050, debido a la creciente demanda de alimentos, siguiendo el modelo de agricultura tecnificada (Pachón-Arisa, 2013).

La soberanía alimentaria, engloba factores políticos, sociales, ecológicos, económicos, temas de inclusión y cultura, que buscan abrir un camino y anexarse en el discurso de la FAO. Se pretende cambiar el enfoque de subsidios y dependencia, y reemplazarlo por fomento a pequeña producción, autoconsumo, autosuficiencia, independencia, e importaciones (Patel, 2009).

Se estima que en el planeta se producen, al día de hoy, suficientes alimentos para todas las personas; sin embargo, el problema yace en la adquisición de éstos debido a la inflación en el precio de los alimentos e insumos para su producción. Además de la emergencia de los biocombustibles, que compiten por los recursos suelo y agua (Friedrich, 2014; Holt-Giménez y Altieri, 2013). Existe una competencia por el espacio

físico cultivable entre la agricultura tradicional y la agricultura tecnificada. La primera busca establecer las bases agroecológicas para una optimización de los sistemas de producción al usar menor cantidad de insumos externos. Lo anterior se contrapone con el sistema tecnificado de la revolución verde, donde el suministro de insumos es considerado un “mal necesario” y cuyas repercusiones en el suelo son inevitables (Holt-Giménez y Altieri, 2013).

La población mundial en el año de 1950 se estimó en 2 billones de seres humanos, en 2018 la cifra aumentó a 7.6 billones. En México, en el año 2015, se había alcanzado la cifra de 119 millones (ONU, 2017; INEGI, 2018). Se prevé que este incremento sea sostenido hasta cerca del año 2100, donde se predice alcanzar una población mundial de casi 11 billones (ONU, 2017).

El incremento en la población mundial ha impactado en los sistemas naturales al demandar cantidades cada vez mayores de recursos naturales para satisfacer sus necesidades, con la consecuente degradación del suelo, el agua y el aire, dando origen a múltiples problemas ambientales de escala global (ONU, 2017).

La degradación ambiental es el resultado de los procesos a través de los cuales se ha concebido el mundo desde la perspectiva científica de particularizar, especializar y fragmentar el conocimiento científico de la realidad (Leff, 2007). La inseguridad alimentaria es una problemática compleja a nivel mundial, que ha presentado mejoría en todos los países. Sin embargo, se estima que aún existen cerca de 815 millones de personas que sufren de hambre crónica (FAO, 2017).

El problema de la inseguridad alimentaria se volvió más complejo, alrededor de 1940, cuando la revolución verde surge como una acción para hacer frente a la crisis alimentaria. Durante este periodo se hizo un extenso uso de fertilizantes y agentes químicos para combatir plagas y malezas en los cultivos con la finalidad de incrementar la producción agrícola (Brown, 1970). La utilización de esta tecnología agrícola afectó la calidad de los suelos y la economía de los campesinos, ya que el poder adquisitivo de los trabajadores del campo era insuficiente para adquirir los insumos que el sistema requería para su optimización (González, 2006). La producción de alimentos que

propone el paradigma de la revolución verde está entrando en desuso. Friedreich (2014) menciona la posibilidad de una “intensificación sostenible” en los sistemas productivos, donde se dé más relevancia a los efectos de la intensificación de la producción agrícola. Abordar la problemática de la inseguridad alimentaria, requiere de una perspectiva donde se desarrollen propuestas integrales con enfoques multidisciplinarios, para aproximarse a una alternativa viable para atender el problema, buscando reducir los impactos negativos en los recursos naturales, sin comprometer la producción de alimentos (Paloviita *et al.*, 2016).

En México se han hecho esfuerzos para garantizar la soberanía alimentaria en hogares en situación de pobreza extrema y en zonas indígenas. Uno de estos esfuerzos fue el Sistema Alimentario Mexicano de 1980, el cual logró conjuntar el sector productivo con un sistema de acopio, transformación, abasto y consumo de alimentos en beneficio de la población en situación de carencia alimentaria. El programa se vio afectado por un recorte presupuestal, el cual fue reemplazado en años posteriores por programas de asistencia social, dejando de lado el sistema de autosuficiencia alimentaria (López y Gallardo, 2015).

Se estima que uno de cada tres hogares en México se encuentra, o ha pasado por inseguridad alimentaria moderada o severa, mientras que un estimado de 41.6% de los hogares mexicanos se encuentran en inseguridad alimentaria leve. De esta situación derivan múltiples problemas de salud relacionados con el desarrollo físico de niños y deterioro gradual en adolescentes y adultos. Por lo que, es urgente integrar estrategias y consolidar esfuerzos entre el Estado, las instituciones educativas, de salud y la sociedad misma para atender esta problemática (Mundo-Rosas *et al.*, 2013). Para lograr erradicar la inseguridad alimentaria en México, es necesario rediseñar las políticas actuales en materia de seguridad alimentaria en un entorno de participación, donde no se vea como un problema aislado, sino que se analice desde la complejidad para ofrecer alternativas reales, viables y cuyos efectos no repercutan negativamente en el ambiente (Urquía-Fernández, 2014).

Escalona-Aguilar *et al.* (2015), proponen que el papel de las instituciones universitarias es el de formar profesionistas con un estricto acervo de conocimientos disciplinarios, y capaces de desarrollar un pensamiento complejo e integral para la construcción de entornos sustentables. Los huertos familiares deben ser considerados para alcanzar la soberanía alimentaria, al incorporar todos los aspectos de un agroecosistema sustentable y de autoconsumo, cuyos beneficios deben ser difundidos y aplicados en todos los sectores de la sociedad (Sánchez, 2014; Cano, 2015).

El presente trabajo consideró la implementación de un sistema de cultivos mixtos, cuyos beneficios han sido ampliamente estudiados en el mundo (Agegnehu *et al.*, 2008; Tadesse *et al.* 2012; Song *et al.* 2006; Yilmaz *et al.*, 2007; Mei *et al.* 2012) y la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal, que mejoran la asimilación de los nutrientes del suelo y promueven beneficios tanto al suelo como a las plantas (Pérez-Montaña *et al.*, 2014; de-Bashan *et al.* 2012; Zarabi *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2000; Najjar *et al.*, 2012), como un aporte al estudio de agroecosistemas sustentables y productivos que conduzca hacia la soberanía alimentaria.

6.2 El recurso suelo

Los suelos son la base de los ecosistemas naturales y desempeñan un papel fundamental para las sociedades y su economía. La NOM-021-SEMARNAT-2000 (NOM-021) define al suelo como la “colección de cuerpos naturales formados por sólidos (minerales y orgánicos), líquidos y gases, sobre la superficie de los terrenos. Esta, presenta, horizontes o capas, que se diferencian del material de origen como resultado de adiciones, pérdidas, migraciones, y transformaciones de energía y materia; o por la habilidad de soportar raíces de plantas en un ambiente natural” (DOF, 2002). El suelo es la capa más expuesta de la corteza terrestre la cual está en un proceso constante de cambio, donde diversos organismos y los productos de sus actividades metabólicas modifican sus condiciones (Gliessman, 2000). Es la parte integral de los ecosistemas terrestres del planeta, presenta variaciones graduales en el espacio geográfico y en el tiempo y funciona como un sitio de interacción e interrelación de factores bióticos y

abióticos (Segura-Castruita, 2014). Por su parte, la FAO (2018) considera que el suelo es un cuerpo natural formado de capas compuestas de minerales intemperizados, materia orgánica, agua y aire, que son el producto final de las condiciones climáticas, topográficas, la acción de los organismos y el material parental de un lugar en una escala de tiempo, lo que le confiere determinadas propiedades físicas, químicas y biológicas. Es considerado un cuerpo natural, donde la materia orgánica y los minerales, en conjunto con líquidos y gases, interactúan y le confieren propiedades específicas para el desarrollo de la vida terrestre. Sufre procesos de transformación mediante intercambios de energía y materia, y puede diferenciarse en horizontes, lo que le confiere propiedades particulares. El suelo está en constante cambio debido a la interacción entre sus componentes físicos, los factores bióticos y abióticos, por lo que es necesario considerar que la escala temporal y ambiental tiene una gran influencia al momento de estudiar una zona en particular (USDA, 2014).

Las propiedades físicas del suelo se refieren a su estructura, profundidad, humedad, textura, color, consistencia, porosidad, densidad, etc. En sus propiedades biológicas se engloban los ciclos de los nutrientes como: nitrógeno, fósforo, carbono, etc. y los subprocesos que engloban estos ciclos (FAO, 2018). Para clasificar los suelos, se consideran dos principales categorías: los suelos orgánicos y los suelos minerales. Esta diferenciación se basa en el componente que predomina, aunque considera la presencia de ambos pero en diferente proporción. Para un suelo mineral, el contenido en carbón orgánico debe ser menor al 20%. Cuando se rebasa el 20% de carbón orgánico presente, se considera un suelo orgánico (USDA, 2014). A nivel mundial, el suelo presenta niveles de deterioro derivados de diferentes factores. Se estima que el 33% de la tierra se encuentra de moderada a altamente degradada debido a un gran número de factores no solamente naturales, sino también antropogénicos (FAO, 2015). Las actividades humanas han modificado la productividad del suelo, para bien y para mal. La percepción común sobre este recurso, es la de ganancias inmediatas en vez de un programa de conservación a largo plazo (Santos *et al.*, 2011).

Se estima que la cobertura vegetal juega un papel importante para prevenir la erosión hídrica del suelo y la consecuente pérdida de nutrientes. Debido a esto, se deben implementar estrategias de conservación del suelo, basadas en la recuperación de la cobertura vegetal y mejora del manejo del suelo agrícola (Bispo *et al.*, 2017). En México el 76% de la superficie presenta algún grado de afectación por la erosión hídrica. Se debe considerar que el carbono almacenado en los suelos está siendo liberado a la atmósfera a un ritmo diez veces mayor que las emisiones por el uso de combustibles fósiles. El impacto en los suelos no solamente se limita a la producción agrícola, sino que sus consecuencias participan también en el efecto invernadero (Bolaños *et al.*, 2016). La pérdida del suelo ocasionada por malas prácticas agrícolas representa la segunda causa antropogénica de las emisiones de CO₂ a la atmósfera. La comunidad científica ha buscado posibles soluciones para mejorar el secuestro de carbón y frenar la participación antropogénica en el calentamiento global (Scharlemann *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). Un agroecosistema que incorpora la resiliencia, estabilidad, productividad y balance, está próximo a asegurar el mantenimiento del equilibrio para establecer las bases de la sostenibilidad del sistema, mantener la diversidad de especies y diversidad genética (Gliessman, 2000). Se ha demostrado que los ciclos continuos de cultivos mixtos favorecen la concentración de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo total. De igual forma, mantienen la materia orgánica del suelo y el pH, aumentando la productividad en comparación a los monocultivos y a la rotación de cultivos (Wang *et al.* 2014; Wang *et al.* 2015; Matusso *et al.* 2014).

6.3 Los cultivos mixtos

El impacto en el suelo debido a la agricultura puede ser reducido por el uso de múltiples estrategias, dos de ellas pueden ser el uso de cultivos mixtos y la aplicación de formulaciones biológicas bacterianas conocidas como biofertilizantes o inoculantes. El término cultivo mixto se refiere a una práctica agrícola donde se siembran dos o más especies de plantas simultáneamente en la misma área para mejorar su crecimiento y productividad (Hauggaard-Nielsen y Jensen, 2005).

El crecimiento de dos o más cultivos que comparten el suelo y sus nutrientes se le conoce como cultivos múltiples o mixtos. Esta es una práctica muy común en países como África (FAO, 2001). El sistema de cultivo mixto más estudiado ha sido la siembra conjunta de una gramínea y una leguminosa. Entre las ventajas de este sistema de cultivo, es que favorece las interacciones a nivel de raíz entre las plantas, lo que permite la obtención de nutrientes. Lo anterior se refleja en un mayor rendimiento en las plantas en comparación al sistema de monocultivo (Song *et al.*, 2006). Además de ser un método de utilidad en la conservación del suelo, también controla malezas e infecciones a nivel de raíz (Yilmaz *et al.*, 2007). En México, el sistema milpa es un ejemplo de cultivo mixto que combina la presencia de maíz, frijol, chile, y calabaza para crear un sistema de plantas capaces de compartir nutrientes y proteger el suelo del crecimiento de maleza. Se estima que la milpa surgió como una estrategia de agricultura alrededor del 3500 a. C. y 1550 a. C., con la domesticación del maíz. Algunos campesinos conservan este sistema de cultivo por sus beneficios ecológicos, rendimiento de plantas y como parte de una tradición de la época prehispánica (Vásquez *et al.*, 2016). Se ha estudiado la efectividad de los cultivos mixtos para mejorar la producción agrícola con resultados superiores a los obtenidos por fertilizantes químicos (Agegnehu *et al.*, 2008; Mucheru-Muna *et al.*, 2010). El uso de cultivos mixtos aumenta el rendimiento y mejora la eficiencia en el aprovechamiento de los recursos minerales del suelo, específicamente nitrógeno y fósforo. Se ha observado que para el caso del maíz (*Zea mays*) la siembra conjunta con leguminosas resulta benéfica (Vance, 2001; Mucheru-Muna *et al.*, 2010). Los cultivos mixtos favorecen a la optimización de los recursos disponibles en el suelo, minimiza el traslape de nichos entre las especies asociadas y disminuye al mínimo la competencia por recursos. Esta complementación es de interés particular si se considera a la conservación como eje rector de las actividades productivas (Altieri *et al.*, 1994; Brooker *et al.*, 2014; Midega *et al.*, 2014).

6.4 El maíz y el haba

El maíz es un cultivo de importancia económica y nutricional en México. En 2010, según datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), se sembraron 7.86 millones de hectáreas de maíz, lo que representa el 36% de la superficie cultivable del país (Damian-Huato *et al.*, 2010). Según datos de la SAGARPA, se estima que el consumo de maíz en México se mantuvo en torno a los 35.6 millones de toneladas durante el año agrícola de 2015, así como una importación de 10.3 millones de toneladas (SAGARPA, 2010). El maíz blanco es el cultivo de mayor importancia en México, siendo este país uno de los 10 mayores productores en el mundo teniendo en 2017 una producción de alrededor de 24.1 millones de toneladas (SIAP, 2017). Con un consumo *per cápita* estimado en 196.4 kg al año, el consumo de este cultivo representa cerca del 20% del gasto total en alimentos para los mexicanos (SAGARPA, 2017). Esta planta es cultivada principalmente en condiciones de temporal en el centro y sur del país, y en condiciones de riego tecnificado en la parte norte de México. La región norte del país es la que tiene un mayor rendimiento total por hectárea, donde Sinaloa es el principal estado productor de maíz en el país con una participación del 21.8% (FIRA, 2016). El sistema de riego ofrece un mayor rendimiento por hectárea de maíz, con respecto al sistema de temporal, con una diferencia de casi 6 toneladas entre ambos sistemas. Por lo anterior es necesario mejorar las condiciones del cultivo de temporal, ya que cerca del 80% de la superficie total de maíz cultivada se mantiene en este sistema (FIRA, 2016). Entre los problemas que enfrenta el cultivo de maíz, se encuentran sus altas necesidades nutrimentales y de agua, Las malas prácticas agrícolas, el uso intensivo de herbicidas y el establecimiento de plagas en las áreas de cultivo ha perjudicado significativamente la productividad de los cultivos. La tendencia de las especies criollas de maíz están en vías de desaparecer debido a las condiciones de clima, las cuales limitan la producción, además de que ha habido una pérdida en zonas de cultivo y se ha abandonado el sistema tradicional de producción (Lara-Ponce *et al.*, 2017).

El haba es una leguminosa importante como fuente de proteína en algunos países del mundo. Su origen es incierto debido a que no se ha encontrado un ancestro silvestre, sin

embargo, se considera que su centro de origen fue en el este cercano, más precisamente Afganistán y la India. En México, se produce haba en la zona de los “valles altos”, lo que incluye a los estados de Puebla, México, Tlaxcala, Veracruz, Michoacán, Oaxaca y Chiapas (Flores *et al.*, 2016). Presenta estructuras a nivel de raíz conocidas como nódulos, las cuales contienen bacterias del género *Rhizobium* que interactúan con rizobacterias, las cuales han sido estudiadas ampliamente y se consideran como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Duc, 1997). Las leguminosas como el haba, tienen un papel fundamental en el mejoramiento de los sistemas de producción de bajos insumos, por su participación en las redes de interacción entre las plantas y los organismos polinizadores (Susó *et al.*, 2013).

Debido a sus capacidades de mejorar las condiciones del suelo. El uso de leguminosas como el haba es frecuente en sistemas de rotación de cultivos o en sistemas de cultivos mixtos, debido a sus capacidades de mejorar la biodisponibilidad de nutrientes en el suelo. Su presencia ayuda a aumentar la cantidad de nitrógeno en el suelo a través del proceso de fijación. Así mismo, facilita la disponibilidad de fósforo, al alterar el pH del suelo asociado a la raíz (rizósfera) y produciendo compuestos carboxilados, como el malato, que transforma el fósforo residual inmóvil en fósforo disponible. Ayuda a la estructura del suelo, mejora la utilización del agua y favorece la diversidad microbológica a nivel de raíz (Köpke y Nemecek 2010).

6.5 Fertilizantes, biofertilizantes y la nutrición vegetal

Los fertilizantes químicos son sustancias o mezcla de sustancias que contienen elementos útiles para la nutrición y desarrollo de los cultivos (Geisseler y Scow, 2014). Poseen también características tóxicas, irritantes o corrosivas, por poseer en su formulación compuestos tales como: amoníaco anhidro, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y materiales encalantes, entre otros componentes (Alcántar y Trejo-Tellez, 2007).

Los nutrimentos vegetales se clasifican en macronutrientes y micronutrientes. Los macronutrientes son considerados indispensables para el desarrollo de las plantas, estos incluyen al nitrógeno (N), el fósforo (P) y el potasio (K), y de estos depende en gran

parte el crecimiento de las plantas y el aporte energético que requieren para su crecimiento y productividad. Los micronutrientes son requeridos en menor proporción pero son importantes en el desarrollo y productividad de los cultivos, y para corregir deficiencias. Entre ellos se incluyen: el hierro, cobre, zinc, manganeso y boro, entre otros (FAO, 2002).

El nitrógeno y el fósforo son macronutrientes esenciales en la nutrición de las plantas y necesarios para la productividad de los cultivos. Se estima que los fertilizantes químicos son aprovechados entre el 10 y el 60% de la dosis administrada. El porcentaje restante interactúa en el suelo y forma complejos insolubles que no son aprovechados por las plantas. La inmovilización de los elementos como el fósforo forma complejos insolubles y el nitrógeno es lixiviado y desplazado a cuerpos de agua subterráneos o superficiales (Peña-Cabriales *et al.*, 2002; Hermosín *et al.*, 2009; Masís *et al.*, 2008; Álvarez-Solís *et al.*, 2010).

El fósforo es un elemento esencial para el crecimiento de las plantas debido a su importancia en los sistemas de almacenamiento y transferencia energética, es requerido en la síntesis de ácidos nucleicos, azúcares, fosfolípidos y ácidos ribonucleicos. Éste elemento se encuentra normalmente en formas no utilizables por las plantas, siendo necesaria su solubilización por bacterias de la rizósfera para facilitar su absorción por la raíz (Sharma *et al.*, 2013). La deficiencia de fósforo en la planta puede reflejarse en trastornos fisiológicos como la inhibición de la síntesis de ARN, se produce acumulación en las plantas de compuestos que contienen nitrógeno además de presentar un desequilibrio entre azúcares y almidón (Kalaji *et al.*, 2014).

El nitrógeno participa en la formación de aminoácidos y proteínas vegetales. Suele ser un elemento deficiente, sin embargo, las leguminosas lo pueden fijar del ambiente en cantidades que sobrepasan sus necesidades, por lo que pueden abastecer a cultivos que se alternen con ella (Fernández, 2007).

Estimaciones indican que en el ciclo agrícola de 2018, la demanda de fertilizantes nitrogenados es de 116 mil millones de toneladas y de fertilizantes fosfatados 44 mil millones de toneladas (FAO, 2016). Esta producción, además de ser extractiva de

recursos no renovables como la roca fosfórica, también crea subproductos que han sido estudiados y catalogados como ambientalmente peligrosos y radioactivos (Rutherford *et al.*, 1994; Martínez-Aguirre y García-León, 1997; Pérez-López *et al.*, 2007; Bituh *et al.*, 2009).

Los biofertilizantes son preparados de microorganismos aplicados al suelo y a la planta, con el fin de sustituir parcial o totalmente la fertilización química y la contaminación generada por los agroquímicos. Cumplen la función de fomentar el crecimiento de las plantas mediante mecanismos de fijación de nitrógeno, solubilización de hierro y fósforo inorgánico, así como mejorar la tolerancia al estrés por sequía, salinidad y algunos microorganismos, inclusive, pueden funcionar como agentes de control biológico, reguladores del crecimiento a través de hormonas o cumplir más de una función específica (Armenta *et al.*, 2010; Akram y Ashraf, 2013; López-Reyes *et al.*, 2018).

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) son microorganismos que tienen la capacidad de solubilizar los complejos que retienen las fracciones de fósforo disponible en el suelo, liberándolo para la absorción de las plantas a través del sistema radicular. Su importancia radica en la capacidad que tienen para utilizar los recursos del suelo y así reducir la fertilización química (Holguín *et al.*, 2003). Las BSF actúan a nivel de raíz liberando ácidos orgánicos como el ácido cítrico, glutámico, succínico, entre otros, que tienen la capacidad de liberar el fósforo contenido en complejos fosfatados de aluminio, calcio o hierro volviéndolo disponible para las plantas a las que están asociadas (Beltrán, 2014; Sundara *et al.*, 2002).

En países desarrollados, los géneros *Rhizobium* y *Azospirillum* han sido ampliamente utilizados, mientras que en países en vías de desarrollo, su uso se limita a inoculantes de menor calidad, lo que se traduce en un menor rendimiento de los cultivos (García-Olivares *et al.* 2012, Bashan *et al.*, 2013).

Para alcanzar altos rendimientos en cultivos, se necesita un gran aporte de nutrientes al suelo. La práctica común es agregar dosis altas de fertilizantes químicos al suelo para lograr este objetivo. Sin embargo, múltiples estudios demuestran que los fertilizantes químicos, aunque tienen ventajas en la productividad, tienen efectos negativos en las

propiedades del suelo. Bajo algunas condiciones, la inoculación de organismos reduce la cantidad de fertilizante químico suministrado (Zarabi *et al.*, 2011; Castañeda *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2015; Cardona *et al.*, 2016; Montejo-Martínez *et al.*, 2018; Alvarado *et al.*, 2018).

La aplicación de biofertilizantes mejora la masa seca total, aumentan el crecimiento de las plantas y se obtienen, bajo algunas condiciones, mayores rendimientos en grano (Tadeo *et al.*, 2017; Aguilar *et al.*, 2015; Aguilar-Carpio *et al.*, 2017; Rangel *et al.*, 2014). Los biofertilizantes se aplican al maíz y otros cultivos, ya que poseen efectividad como promotores del crecimiento vegetal. Los resultados de su aplicación generan plantas con un desarrollo mayor al de las plantas sin inocular. En muchos casos, se inoculan combinaciones de cepas de bacterias y/o grupos biológicos como hongos micorrizógenos y actinomicetos (Terry *et al.*, 2002).

La biofertilización consiste en la reincorporación de organismos, en cantidades mayores a las encontradas naturalmente, para una optimización de los recursos propios del lugar donde se desea establecer un cultivo. Así, se reduce la extracción de recursos no renovables, como la roca fosfórica, y también la contaminación por agentes tóxicos derivados del proceso de refinamiento y elaboración de fertilizantes químicos. Todo esto a un precio menor, beneficiando el balance costo-beneficio de la producción de alimentos (Grageda-Cabrera *et al.*, 2012; Montero *et al.*, 2009).

VII. Materiales y métodos

7.1 Localización

El experimento de campo se realizó en una parcela perteneciente al Municipio de San José Teacalco, en el Estado de Tlaxcala, ubicada en el polígono que corresponde a las coordenadas punto 1: 19°21'7.26"N, 98° 2'13.38"O; punto 2: 19°21'6.93"N, 98° 2'12.02"O; punto 3: 19°21'6.34"N, 98° 2'12.11"O; punto 4: 19°21'6.69"N, 98° 2'13.40"O (Figuras 1, 2 y 3). Este Municipio está ubicado en el Altiplano central mexicano a 2,600 metros sobre el nivel del mar: Se sitúa en el eje de coordenadas geográficas entre los 19° 20' 09" latitud norte y 98° 03' 52" longitud oeste. Sus colindancias municipales son al norte con Cuaxomulco, Tzompantepec y Huamantla; al este con Huamantla; al sur con Huamantla, San Francisco Tetlanohcan y Chiautempan; al oeste con Chiautempan, Contla de Juan Cuamatzi y Cuaxomulco.

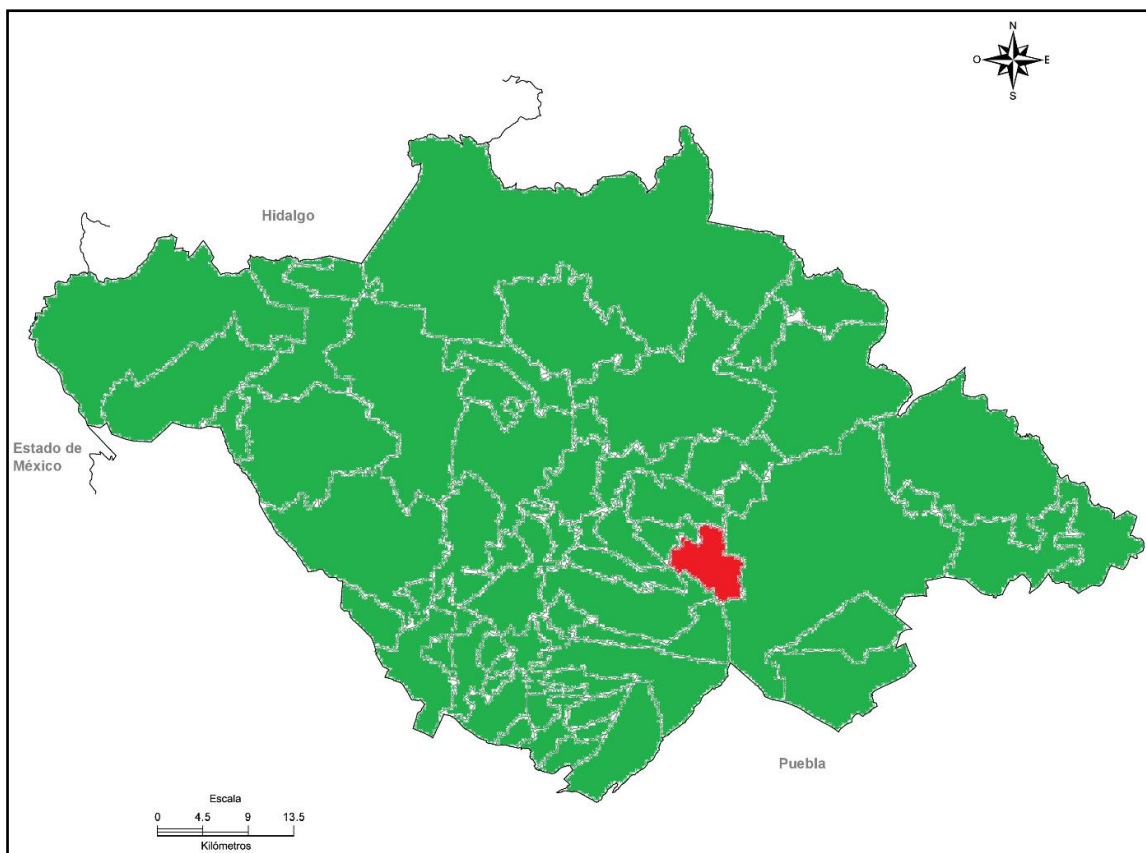


Figura 1. Ubicación del municipio de San José Teacalco (rojo) en el Estado de Tlaxcala. (Fuente: INEGI, 2015).

De acuerdo con la información del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, el municipio de San José Teacalco comprende una superficie de 36.23 km². En el municipio, el clima se considera templado subhúmedo, con régimen de lluvias en los meses de abril a septiembre, los meses más calurosos son marzo, abril y mayo. La dirección de los vientos en general es de noreste a suroeste con una temperatura media anual máxima registrada es de 23.2 grados centígrados. El rango de precipitación va de 800 a 1000 mm (INEGI, 2014).

El experimento de invernadero, se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de Suelos del CICM, ICUAP de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla localizado en el edificio IC-11A en Ciudad Universitaria, Puebla.



Figura 2. Zona de estudio (marcador en la esquina superior derecha) en el Municipio de San José Teacalco, Tlaxcala. (Fuente: Google Earth).



Figura 3: Ampliación del área de estudio en el Municipio de San José Teacalco, Tlaxcala, indicada en el recuadro verde (Fuente: Google Earth).

7.2 Fase de laboratorio

7.2.1 Análisis físico y químico del suelo

7.2.1.1 Textura del suelo

Para determinar la textura del suelo se utilizó el método de Bouyoucos (DOF, 2002). Previo a realizar la prueba, se preparó un defloculante con 54.8 g de hexametáfosfato de sodio y 12.2 g de carbonato de sodio. Se disolvió la mezcla de ambos reactivos y se aforó a 1 litro con agua destilada. Se realizó un secado de la muestra a 70 °C por 24 h y un cernido con malla de 2 mm. Se pesaron 50 g de la muestra de suelo preparada y se agregaron 35 mL de la mezcla defloculante en un vaso de licuadora. Se utilizó una batidora diseñada para no moler el suelo y se agitó durante 15 min.

Se vertió la suspensión de suelo en una probeta graduada de 1 L. Se introdujo un hidrómetro y se aforó a 1 L. Se retiró el hidrómetro y se agitó durante un minuto. Se volvió a introducir el hidrómetro y se tomó la lectura en el menisco superior después de transcurridos 40 seg. Se agregaron gotas de alcohol etílico para eliminar la espuma y se

tomó la temperatura de la suspensión. Se mantuvo la probeta en reposo durante dos horas y se volvió a tomar la lectura.

7.2.1.2 Determinación de pH del suelo

Se pesaron 10 g de suelo en un vaso de precipitado, se agregaron 20 mL de agua desionizada y se agitó con una varilla de vidrio durante 1 min, con intervalos de reposo de 10 min. Se repitió el procedimiento tres veces. Posteriormente, se calibró el pH-metro (conductronic PC18) con solución de pH 4 y 7, tomando la lectura del suelo en este rango. Se repitió el procedimiento para cada muestra de suelo de cada tratamiento y sus repeticiones, promediando los resultados.

7.2.1.3 Conductividad eléctrica del suelo

Se utilizó la muestra con la que se obtuvo el pH del suelo, agregando 30 mL de agua desionizada, se agitó y se dejó reposar por 24 h. Se colocó el sobrenadante de las muestras en la celda de lectura del equipo conductronic PC18. Previo a las lecturas, se calibró el instrumento de medición con una solución de KCl 0.01 N a 25 °C. Se realizaron tres lecturas de cada muestra y se promediaron, se utilizó el cuadro de ajuste de temperatura y se realizaron las correcciones a la lectura según la fórmula 1.

$$CE = \frac{C_{prob} \times k \times Ft}{1000} \quad \text{Fórmula 1}$$

Donde:

CE: conductividad eléctrica dS m⁻¹, a temperatura ambiente.

C_{prob}: conductividad de la muestra problema en mmho.

F_t: factor de corrección de temperatura tabulada

1000: factor para convertir de μmho a mmho.

7.2.1.4 Cuantificación del fósforo disponible en suelo

Se empleó la metodología de Bray y Kurtz 1 (DOF, 2002) para determinar el fósforo disponible del suelo. Se prepararon los reactivos en el Laboratorio de Microbiología del Suelo con agua tridestilada y todo el material de cristalería se lavó con ácido clorhídrico y se enjuagó en agua tridestilada. Se elaboró una curva de calibración con concentraciones de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 ppm de fósforo. Después de que se elaboró la curva de calibración, se trabajó con las muestras de suelo provenientes de las unidades experimentales de invernadero. Se tomaron 2.5 g de cada muestra de suelo en un matraz de 50 mL. Se agregaron 25 mL de la solución extractante. Se agitaron los matraces durante 5 min a 180 opm. Se filtró el extracto con papel Whatman No. 42. Se tomaron alícuotas de 2 mL de filtrado y se depositaron en matraces aforados de 10 mL por triplicado, con uno de los matraces como blanco. A cada matraz se agregaron 2 mL de molibdato de amonio y 1 mL de solución de cloruro estano diluido y se aforó con agua tridestilada. Se agitaron las muestras después de agregar cada reactivo, y se tomó la lectura al espectrofotómetro a 660 nm en el intervalo después de los 10 min y antes de los 20 min. Se realizaron los cálculos para la cuantificación de fósforo con la fórmula 2,

$$P \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = \text{ppm en CC} \times D_m \times D_v \quad \text{Fórmula 2}$$

Dónde:

Ppm CC: partes por millón de fósforo en la curva de calibración.

Dm: Dilución de masa (volumen de extractante/g de muestra).

Dv: Dilución de volumen (aforo/alícuota).

7.2.2 Análisis microbiológico del suelo

7.2.2.1 Cuantificación de poblaciones microbianas en el suelo.

El análisis microbiológico del suelo se realizó con el método de diluciones seriadas. Se suspendió suelo de cada muestra en agua destilada estéril para realizar diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-6} . De cada dilución se tomaron 100 μL en placas del medio de cultivo a) Rojo Congo para determinar bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN), y b) para las

bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) se utilizó medio Goldstein. Se inocularon las diluciones para determinar hongos en el medio papa dextrosa agar (PDA), tripticaseína soya agar (TSA) para conteos totales de bacterias, MacConkey para bacilos Gram negativos y enterobacterias, y Czapek Dox para actinomicetos. Se extendió la muestra líquida por las placas con un asa de vidrio en un sembrado masivo, se dejaron incubar a 32° C y se contabilizaron las colonias a las 24, 48 y 72 h. Las siembras se hicieron por duplicado y se promedió el número de colonias para registrar los resultados.

7.2.2.2 Actividad deshidrogenasa en suelo

Se determinó la actividad de la enzima deshidrogenasa utilizando la metodología de Trevors *et al.* (1984). Se utilizó para cada muestra 1 g de suelo, cada uno por triplicado. Se agregaron 10 mg de CaCO₃ en polvo y se mezcló por agitación. Se agregó 1 mL de agua destilada estéril y 1 mL del cloruro de trifenil tetrazolio (Sigma-Aldrich). Se colocaron tapones de hule a los viales y se extrajo el aire con una jeringa estándar para generar condiciones de anerobiosis. Se incubaron las muestras por 22 h a 32° C. Transcurrido el tiempo se detuvo la reacción adicionando 25 mL de etanol, se dejó reposar las muestras por 2 h en ausencia de luz, y transcurrido el tiempo, se filtraron las muestras con papel filtro Whatman No. 42. El filtrado se colocó en celdas de cuarzo y se leyó en un espectrofotómetro Jenway 6305 a una longitud de onda de 550 nm. Se registraron los datos de absorbancia de cada muestra con respecto a su blanco y se realizaron los cálculos para obtener un estimado de la actividad microbiológica en el suelo (Ortíz-Maya *et al.*, 2017).

7.2.3 Aislamiento y selección de bacterias solubilizadoras de fosfatos

Se utilizaron plantas de haba procedentes del municipio de San José Teacalco, Tlaxcala. Se separaron las raíces de la planta mediante un corte a nivel de corona y se lavaron con agua destilada estéril para eliminar el suelo adherido. Posteriormente, se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril. Los nódulos presentes en la raíz se cortaron en condiciones de esterilidad con ayuda de un bisturí y fueron depositados en viales vidrio

donde se agregó 1 mL de agua destilada para su maceración con un asa de vidrio (Figura 4). Se sembraron 100 μ L del líquido obtenido del nódulo en placas de medio Goldstein y fueron incubadas por cinco días a 32 °C. Las colonias desarrolladas se lavaron en solución Tween 80 y se resembraron en medio Goldstein para obtener colonias puras con actividad solubilizadora de fosfatos.

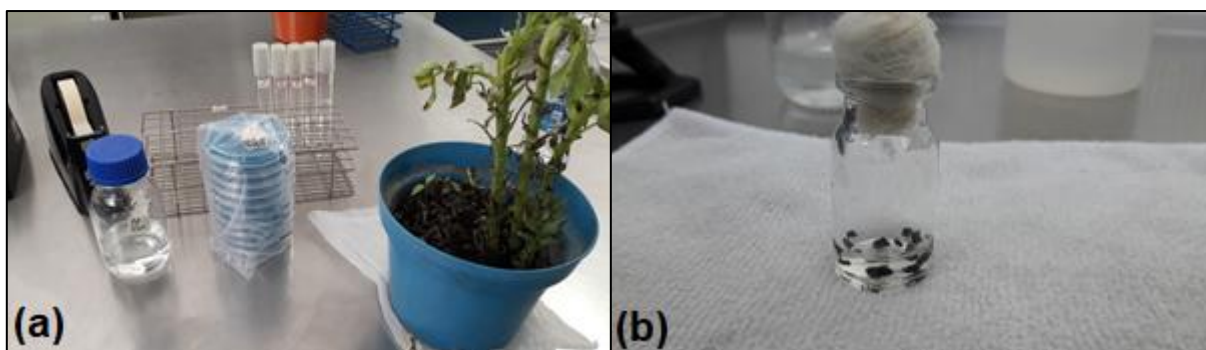


Figura 4. Nódulos de haba. (a) Material requerido para el procesamiento de plantas de haba, (b) Extracción de nódulos de haba para el aislamiento de bacterias.

7.2.4 Evaluación de la actividad solubilizadora de fosfatos por las cepas bacterianas

Se utilizó medio de cultivo Goldstein, adicionado de dos fuentes de carbono: manitol y glucosa. Se utilizó el método de resiembra por estría cruzada con asa bacteriológica para separar las colonias de interés y verificar su crecimiento y actividad solubilizadora a los cinco días. Se determinó en forma comparativa la actividad solubilizadora de fosfatos por parte de las bacterias aisladas, se utilizó la técnica de siembra múltiple con ayuda de un replicador Steers. Se sembraron siete bacterias: seis procedentes de nódulos de haba previamente purificadas y una cepa control, cuya actividad solubilizadora de fosfatos es conocida. Se realizó el ensayo por triplicado en medio Goldstein por cada fuente de carbono (glucosa, manitol y la combinación de ambas). Se incubaron por 72 h y se midieron los halos de solubilización de las cepas bacterianas con ayuda de un vernier (Figura 5). Se determinó el índice de solubilización de acuerdo a la fórmula 3 (Ahmad *et al.*, 2008; Mamta *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2011; Rfaki *et al.*, 2015).

$$\text{índice de solubilización} = \frac{a}{b}$$

Fórmula 3

Dónde:

a= diámetro del halo de solubilización

b= diámetro de la colonia

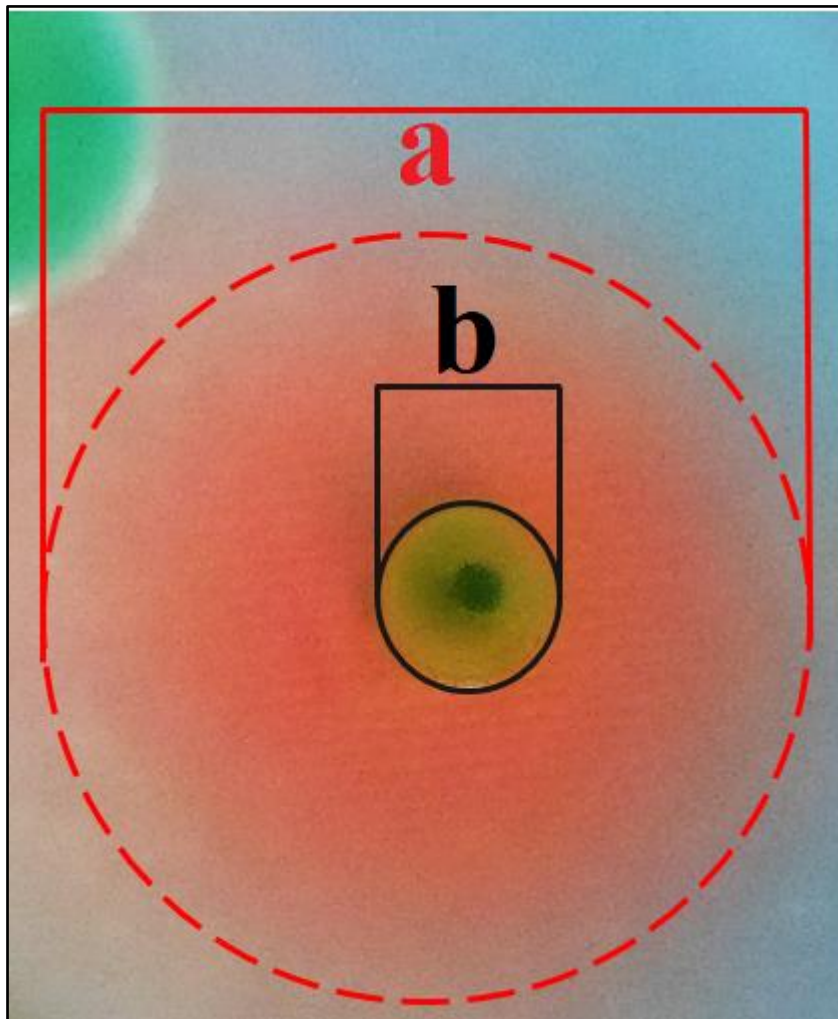


Figura 5. Índice de solubilización: (a) halo de solubilización de fosfato en el medio de cultivo, (b) circunferencia de la colonia.

7.2. Identificación de las cepas aisladas

7.2.5.1 Identificación de bacterias por métodos bioquímicos

Se utilizó el kit de identificación API 20NE (Biomérieux) para determinar el género y especie de las bacterias aisladas (Figura 6). Se prepararon cultivos frescos de las cepas en placas con medio de cultivo agar nutritivo (BD-BIOXON), y se dejaron crecer 24 h a 32 °C. Posteriormente, se trasladaron colonias bacterianas a tubos de ensayo con medio líquido de caldo nutritivo (BD-BIOXON) en agitación por otras 24 h a 32 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 100 µL del cultivo líquido de bacterias a tubos de medio API NaCl 0.85% hasta obtener una concentración semejante al tubo de 0.5 de la escala de McFarland para asegurar que las unidades formadoras de colonias fueran homogéneas.

Una vez preparado el medio de cultivo con la suspensión bacteriana, se llenaron las galerías del kit de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se realizaron las pruebas requeridas en el periodo de 24 y 48 h y se registraron los datos en una hoja de lectura por cada muestra. Se utilizó el sistema API Web para realizar la identificación con base en un banco de datos. Las cepas bacterianas se preservaron en 1.5 mL de caldo nutritivo en crioprotectores a -80 °C en el Laboratorio de Microbiología de Suelos.



Figura 6. Kit de identificación bioquímica API 20 NE.

7.2.5.2 Identificación de bacterias por métodos moleculares

Las dos bacterias de interés por su actividad solubilizadora de fosfatos fueron caracterizadas genéticamente a partir de la extracción de ADN, realizada con el procedimiento del Kit de purificación de ADN genómico Wizard de Promega y la técnica PCR para la amplificación del gen 16S ARNr. Se usaron como iniciadores fD1 y rD1 sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT) a través de UNIPARTS. La

reacción se llevó a cabo en un termociclador (Techne®TC-3000G), a un volumen final de 50 µL, los cuales contenían 23.5 µL de agua estéril, 5 µL de cada oligonucleótido (fD1 y rD1), 12.5 µL de enzima GoTaq de Promega® (PCR Colorless Master) y 4 µL de DNA genómico. El programa de PCR consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguido por 34 ciclos de 94 °C por 45 seg, 63.2 °C por 1 min y 72 °C por 2 min, y un paso final de 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se observaron por electroforesis en gel de agarosa al 3% a 80 V durante 120 min. El gel se tiñó con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain durante 45 minutos. Se observaron las bandas obtenidas en el gel con ayuda de un transiluminador (WiseUV® Wisd WUV-L50). Los productos de PCR se purificaron con DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit y fueron secuenciados por Servicios Genómicos Langebio del Centro de Investigación y Servicios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) en Irapuato, México. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Chromas Lite® y posteriormente fueron comparadas para su alineamiento con la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (The Basic Local Alignment Search Tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

7.2.6 Ensayo de compatibilidad entre bacterias

Se realizó un ensayo de compatibilidad entre cepas solubilizadoras. Se utilizaron placas con medio de cultivo tripticaseína soya gar (TSA). Se sembró cada bacteria a evaluar en forma vertical en la zona centro de la placa, donde se extendió el inóculo hasta 6.8 cm de largo. Además, se colocaron inóculos en tres líneas a la izquierda de la línea central con una longitud de 2 cm y se dejó 0.5 cm de separación con la línea central y los extremos (Figura 7). En las líneas de la derecha se sembró la bacteria antagonizada para observar compatibilidad entre ellas.

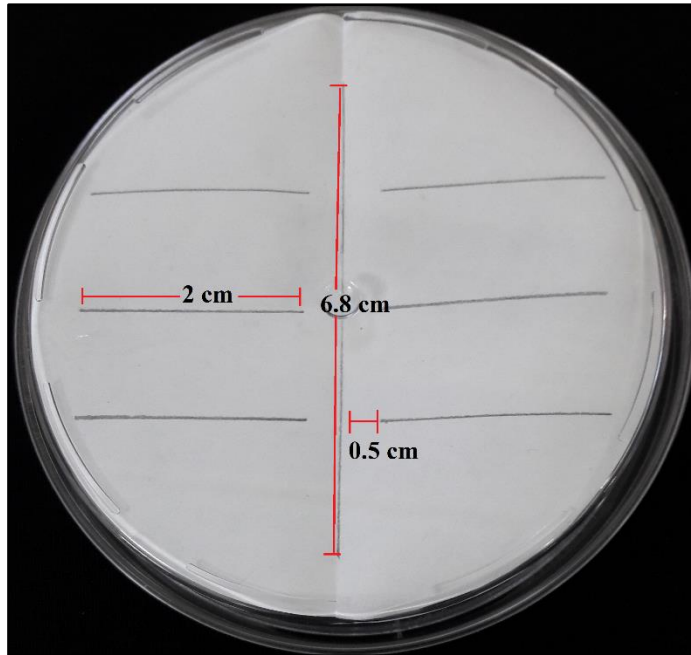


Figura 7. Esquema del diseño de siembra para prueba de compatibilidad.

7.2.7 Conservación de bacterias solubilizadoras de fosfatos

Se tomaron cultivos frescos de las cepas puras y se crecieron en medio líquido de caldo nutritivo (BD-BIOXON) durante 24 h a 32 °C. Se colocó 1 mL de cada muestra en tubos Eppendorf y fueron centrifugadas a 5000 rpm durante media hora, se retiró el sobrenadante y la pastilla se suspendió en caldo nutritivo estéril. Se etiquetaron las muestras y se colocaron en un crioconservador para ser almacenados a -80 °C en el Laboratorio de Microbiología de Suelos.

7.3 Fase de invernadero

7.3.1 Establecimiento del cultivo

Se probó la eficacia de las bacterias aisladas en un cultivo de maíz y haba en condiciones de mono cultivo y cultivo mixto. La unidad experimental consistió de una maceta con 4 kg de suelo de San José Teacalco, Tlaxcala cernido en una malla de 2 milímetros. Se sembró en cada unidad experimental tres semillas de maíz y haba según el tratamiento y se realizó un raleo a dos plantas después de 20 días. Se establecieron tres repeticiones de

cada tratamiento y se organizaron las unidades experimentales en bloques completamente al azar. Fueron regadas con 300 mL de agua destilada cada dos días, durante dos meses. Al finalizar el periodo de crecimiento, se “sacrificaron” las plantas para medir su altura, diámetro y peso seco de tallo y raíz. Para el caso de las plantas de haba, también se contaron los nódulos en la raíz. Se tomó una muestra de suelo de cada unidad experimental para análisis posteriores.



Figura 8. Plantas de maíz y haba en invernadero. Maceta negra, monocultivo de maíz; maceta azul, monocultivo de haba; macetas naranja, cultivo mixto.

7.4 Fase de campo

7.4.1 Preparación del terreno

El área de estudio se delimitó en cien parcelas de 2.5 x 2.0 m (Figuras 9 y 10). Cada parcela se dividió en tres surcos separados a 0.75 m. Se sembraron dos semillas de haba o de maíz de acuerdo a los tratamientos del Cuadro 1 con una separación de 0.45 m en cada punto. Se dejaron germinar por 10 días para que las plantas de maíz y haba crecieran

a un ritmo similar. Se sorteó cada parcela con un tratamiento (Cuadro 1) creando bloques al azar resultando en una distribución como se muestra la Figura 9.

Cuadro 1. Tratamientos del experimento realizado en condición de invernadero para monocultivo y cultivo mixto.

Bacterias	Dosis de fertilizante químico kg ha ⁻¹
BFN	-
BFN	60-30-00
BSF	-
BSF	120-60-00
BSF	60-30-00
BFN + BSF	-
BFN + BSF	60-30-00
Fertilización química 100%	120-60-00
Fertilización química 50%	60-30-00
Control	-

BFN = Bacteria fijadora de nitrógeno; BSF = Bacteria solubilizadora de fosfato. Dosis en kg ha⁻¹ de fertilizante N-P-K

	H7	MH6	H1	H8	M6	H8	M6	H3	H6	H9	M4	M2
	MH1	MH3	MH7	MH10	M6	H1	H4	M4	M10	H4	MH5	H6
	MH9	M2	H10	M10	H10	H2	MH9	MH1	MH5	M3	M8	MH8
	MH5	H6	M9	MH10	M3	H5	H2	M9	H10	MH8	MH4	MH2
MH3	MH7	MH7	M2	MH6	M1	M10	H3	MH7	M8	MH4	H7	H3
MH8	MH6	M1	H7	H8	MH5	MH3	M5	MH9	M7	M9	M1	MH6
MH1	MH10	MH1	M3	M7	MH9	M5	M7	MH4	MH2	H5	H9	H5
MH2	MH4	H1	H2	H9	H4	MH10	M4	M8	M5	MH2	MH3	MH8

Figura 9. Esquema de la distribución de los tratamientos en el experimento de campo. Los colores corresponden a un número de tratamiento indicado en el Cuadro 1, las letras se refieren a parcelas con haba (H), maíz (M) o maíz y haba juntos (MH).



Figura 10. Área de cultivo en campo. Las banderas corresponden a la distribución representada en la Figura 9.

7.4.2 Preparación de inóculos para el experimento de campo

Se utilizaron cultivos bacterianos frescos de 24 h con una población de 52×10^7 unidades formadoras de colonias (UFC). Las cepas bacterianas solubilizadoras de fosfatos utilizadas fueron *Paraburkholderia graminis* y *Chromobacterium violaceum*, y las cepas fijadoras de nitrógeno fueron *Azospirillum* sp. y *Rhizobium* sp. La cepa *P. graminis* fue obtenida a partir del aislamiento de bacterias en nódulos de plantas de haba y las cepas restantes forman parte de la colección de cepas del laboratorio de Microbiología del Suelo. Se mezclaron las semillas y el inoculante de forma manual en un recipiente plástico. Posteriormente, fueron sembradas las semillas de forma inmediata (Figura 11). Este procedimiento se realizó para los ensayos con BFN y las BSF por separado. Las semillas fueron sembradas en condición de monocultivo y cultivo mixto con tres repeticiones para el caso de maíz y haba individualmente y cuatro repeticiones para el caso del cultivo mixto maíz-haba. Se administró el inoculante de BFN y las BSF por separado, así mismo, se incluyó un tratamiento combinando BFN + BSF. Posteriormente se realizó la fertilización química para los tratamientos indicados, con las dosis de N-P-K: 120-60-00 y 60-30-00 según el tratamiento correspondiente.



Figura 11. Preparación del inoculante e inoculación de semillas en campo. El inoculante se preparó en el sitio antes de la siembra mezclando cultivo bacteriano líquido con suelo esterilizado. La mezcla se agregó directamente en las semillas.

VIII. Resultados y discusión

8.1 Fase de laboratorio

8.1.1 Análisis físico y químico del suelo

8.1.1.1 Textura del suelo

Como parte del análisis físico del suelo, se obtuvo que la textura del suelo corresponde a 37% arcilla, 4% limo y 59% arena obteniendo un suelo Franco-Arcillo-Arenoso (Figura 12). Las propiedades físicas del suelo, como la textura, son importantes en el desarrollo del sistema radicular de las plantas, los poros permiten la infiltración de agua, aire y favorecen la presencia de microorganismos, lo cual se traduce en un mejor desarrollo y un mayor rendimiento de los cultivos (Barbosa *et al.*, 2018).

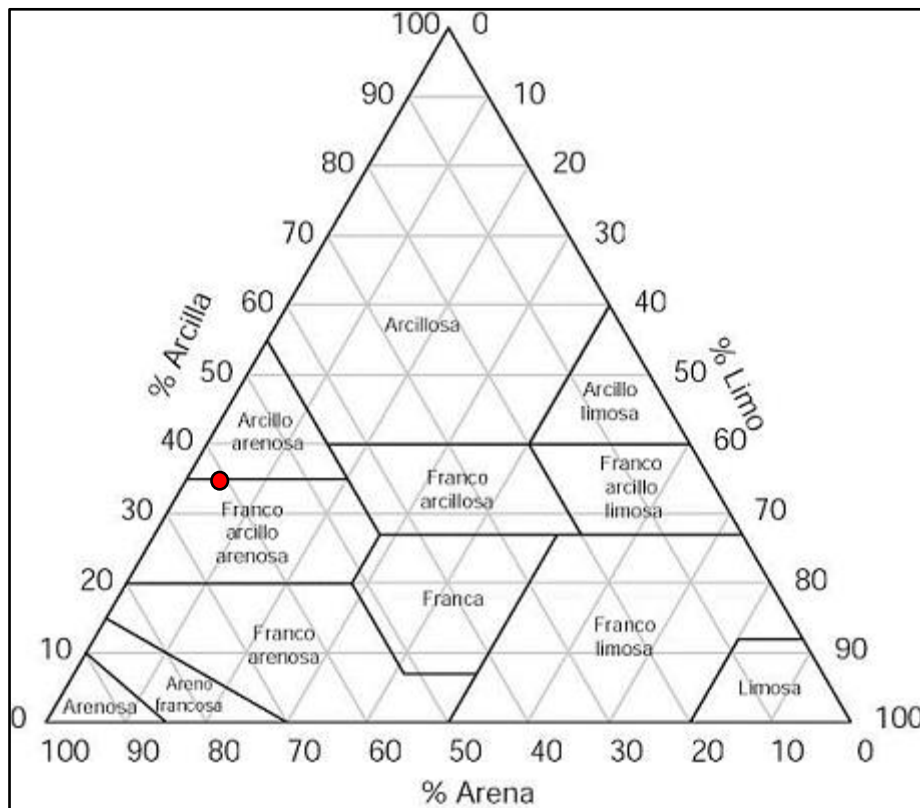


Figura 12. Triángulo de textura del suelo. El punto rojo indica la intersección de los tres valores obtenidos.

8.1.1.2 Determinación de pH en suelo

En el Cuadro 2 se observan los resultados de pH del suelo con base en la NOM-021 (DOF, 2002). Las condiciones previas al cultivo de maíz y haba presentaron un valor de

pH de 5.64, considerado como moderadamente ácido. Durante el establecimiento del monocultivo de maíz, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, el pH del suelo presentó un valor fuertemente ácido de 4.58, en presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN). El tratamiento con bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) más fertilizante químico (60-30-00) mostró un valor de pH de 5.77, que corresponde a la misma clasificación del pH inicial. El monocultivo de haba presentó diferencias significativas de pH entre los tratamientos. Se detectó un suelo fuertemente ácido con valor de pH de 4.85, que corresponde al tratamiento con fertilizante químico (120-60-00). En condiciones de cultivo mixto (maíz-haba) se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento con bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) resultó en un suelo fuertemente ácido, con un valor de pH de 4.58. La disminución del pH en el suelo que se observó en gran parte de los tratamientos se da de manera natural por la producción de ácidos orgánicos en la raíz, estos cambios se intensifican con la participación de microorganismos, y con el tipo de cultivo específico (Anderson *et al.*, 2013). La relación que existía entre el pH del suelo, la disponibilidad de nutrientes y la diversidad microbiana. En ese estudio encontraron que el factor que más afectaba la diversidad de microorganismos era el pH del suelo, al mismo tiempo, encontraron una correlación positiva entre la diversidad microbiana y la diversidad de plantas en su zona de estudio (Zhalnina *et al.*, 2015).

La adición de fertilizantes químicos resulta en un cambio en la acidez del suelo a corto y largo plazo, además de afectar a las poblaciones de microorganismos (Ren-Yong *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2015). Lo anterior se observó en los tratamientos de fertilización química 120-60-00 y 60-30-00 para el caso de las plantas en condiciones de cultivo mixto y monocultivo. Suelos con un pH inferior a 5 son considerados fuertemente ácidos (DOF, 2002). En el caso de las condiciones iniciales del suelo, el pH indica ser un suelo moderadamente ácido, volviéndolo más ácido al agregar fertilizantes químicos Sin embargo, en algunos casos, la adición de bacterias como biofertilizante incrementó el pH del suelo con respecto a su condición inicial.

Cuadro 2. Valores de pH para el suelo de las plantas de invernadero. Se reportan los valores de pH para las plantas en condiciones de cultivo mixto y monocultivo.

Tratamiento	Maíz	Incremento %	Haba	Incremento %	Maíz-Haba	Incremento %
BFN	4.58 ± 0.42 a	-15.96	5.15 ± 0.20 ab	-01.53	4.48 ± 0.51 b	-13.85
BFN	5.27 ± 0.94 a	-03.30	5.52 ± 0.10 ab	05.54	5.20 ± 0.11 ab	00.00
60-30-00	5.07 ± 0.85 a	-06.97	5.58 ± 0.32 ab	06.69	5.15 ± 0.35 ab	-00.96
BSF	5.48 ± 0.23 a	0.55	5.71 ± 0.02 a	09.18	5.22 ± 0.13 ab	00.38
120-60-00	5.77 ± 0.39 a	05.87	5.41 ± 0.14 ab	03.44	5.07 ± 0.55 ab	-02.50
BSF	5.19 ± 0.05 a	-04.77	5.35 ± 0.01 ab	02.29	5.28 ± 0.09 ab	01.54
60-30-00	5.40 ± 0.50 a	-00.92	5.71 ± 0.47 a	09.18	5.53 ± 0.34 a	06.35
120-60-00	4.85 ± 0.59 a	-11.01	4.92 ± 0.33 b	-05.93	4.73 ± 0.45 ab	-09.04
60-30-00	5.09 ± 0.29 a	-06.61	5.49 ± 0.08 ab	04.97	5.10 ± 0.30 ab	-01.92
Control	5.45 ± 0.21 a	00.00	5.23 ± 0.06 ab	00.00	5.20 ± 0.07 ab	00.00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

8.1.1.3 Conductividad eléctrica en suelo

La conductividad eléctrica (CE) del suelo sin tratamientos presentó un valor de 0.62 dS m⁻¹. En el Cuadro 3, se presentan los valores obtenidos en cada uno de los tratamientos. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, para el monocultivo de maíz. En el tratamiento donde se aplicaron bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) con fertilizante químico (120-60-00) se presentó el valor más alto de conductividad, 0.43 dS m⁻¹. Le siguió el tratamiento donde se aplicaron BFN más fertilizante químico (60-30-00) con un valor de 0.38 dS m⁻¹. Para el caso del monocultivo de haba, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, el mayor valor, 0.81 dS m⁻¹, lo tuvo el tratamiento en el que se aplicaron BSF con fertilizante químico (120-60-00), seguido del tratamiento BFN más BSF más fertilizante químico (60-30-00) con un valor de 0.79 dS m⁻¹. En el caso de la CE en el cultivo mixto, existieron diferencias significativas, siendo nuevamente el tratamiento de BSF con fertilizante químico (120-

60-00) el que tuvo el mayor valor, con 0.76 dS m^{-1} , seguido del tratamiento de BFN más BSF más fertilizante químico (60-30-00) con un valor de 0.69 dS m^{-1} . Se considera que la salinidad de un suelo es un parámetro de productividad. En la escala de salinidad del suelo (DOF, 2002), todos los tratamientos presentaron suelos pocos salinos, sin embargo, la presencia o ausencia de organismos modificó las condiciones de salinidad con respecto al tratamiento control, lo que indica que casi todos los tratamientos disminuyeron los valores de salinidad para el suelo previo al experimento. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Cubillos-Hinojosa *et al.* (2017), quienes reportan una disminución en la conductividad eléctrica de suelos al ser inoculados con cepas bacterianas.

Cuadro 3. Conductividad eléctrica en suelo de plantas de maíz y haba en monocultivo y cultivo mixto en condiciones de invernadero.

Tratamiento	Maíz dS m^{-1}	Incremento %	Haba dS m^{-1}	Incremento %	Maíz-haba dS m^{-1}	Incremento %
BFN	0.36 ± 0.01 ab	28.57	0.49 ± 0.06 a	-18.33	0.53 ± 0.04 bc	32.50
BFN						
60-30-00	0.38 ± 0.07 ab	35.71	0.59 ± 0.05 a	-01.67	0.53 ± 0.04 bc	32.50
BSF	0.34 ± 0.01 ab	21.43	0.51 ± 0.07 a	-15.00	0.52 ± 0.03 bc	30.00
BSF						
120-60-00	0.43 ± 0.10 a	53.57	0.81 ± 0.10 a	35.00	0.76 ± 0.15 a	90.00
BSF						
60-30-00	0.30 ± 0.01 ab	07.14	0.52 ± 0.14 a	-13.33	0.59 ± 0.14 abc	47.50
BFN + BSF	0.32 ± 0.06 ab	14.29	0.60 ± 0.12 a	00.00	0.60 ± 0.05 abc	50.00
BFN + BSF						
60-30-00	0.30 ± 0.03 ab	07.14	0.79 ± 0.30 a	31.67	0.69 ± 0.07 ab	72.50
120-60-00	0.31 ± 0.03 ab	10.71	0.49 ± 0.18 a	-18.33	0.48 ± 0.02 bc	20.00
60-30-00	0.31 ± 0.02 ab	10.71	0.42 ± 0.01 a	-30.00	0.40 ± 0.02 c	00.00
Control	0.28 ± 0.02 b	00.00	0.60 ± 0.18 a	00.00	0.40 ± 0.05 c	00.00

.BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

En el presente trabajo, se observó que el tratamiento de BSF adicionado de fertilizante químico resultó en un incremento en la CE del suelo rizosférico, en una escala mayor con respecto a todos los demás tratamientos, incluido el control, por lo que se vuelve necesario realizar más estudios para evaluar este efecto en particular, el cual contradice

lo reportado por Shrivastava y Kumar (2015), quienes reportaron que la presencia de bacterias representa una herramienta para disminuir la salinidad del suelo.

8.1.1.4 Cuantificación del fósforo disponible en suelo

En el Cuadro 4, se muestran los resultados de la disponibilidad de fósforo en el suelo asociado a las plantas de maíz y haba en condiciones de monocultivo y cultivo mixto en invernadero. El valor inicial del fósforo disponible en el suelo antes del establecimiento del experimento, fue de 10.48 mg kg⁻¹. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en las condiciones de monocultivo de maíz y haba y cultivo mixto. En el suelo asociado a maíz en condiciones de monocultivo, el tratamiento de BSF más fertilizante químico (120-60-00) presentó la mayor cantidad de fósforo disponible con un valor de 10 mg kg⁻¹. Se observó que el tratamiento más demandante de fósforo fue el tratamiento con fertilizante químico (120-60-00) y el tratamiento BFN más BSF más fertilizante químico (60-30-00), con un valor de 3.90 mg kg⁻¹. Para el caso del suelo de las plantas de haba en condición de monocultivo, cuando se inocularon BSF, la biodisponibilidad del fósforo aumentó de 10.48 a 14.63 mg kg⁻¹, con respecto al valor inicial del suelo. Éste tratamiento resultó en el valor más alto para esa condición de cultivo. El valor más bajo para el suelo con monocultivo de haba, fue el tratamiento donde se aplicaron BFN más BSF más fertilizante químico (60-30-00), alcanzando 6.10 mg kg⁻¹. El suelo con cultivo mixto maíz-haba tuvo el valor más alto de fósforo disponible con la inoculación de BFN. Los tratamientos con haba en monocultivo o en cultivo mixto superaron el valor registrado en el suelo previo al establecimiento de los experimentos. Estos resultados concuerdan con los reportados por Köpke *et al.* (2009), quienes mencionan que la presencia de plantas de haba favorece la disponibilidad de fósforo en suelos con bajos niveles de este macronutriente. Esto se contrastó con el cultivo de plantas de maíz, las cuales tuvieron los valores más bajos de fósforo disponible en suelo, sin embargo las plantas de haba incrementaron su disponibilidad en condición de monocultivo y de cultivo mixto con respecto al valor del suelo sin tratamientos. El haba incorpora fracciones de fósforo disponible en el suelo, las cuales resultan en

mejores rendimientos para los cultivos posteriores, o los que están en asociación directa en la misma superficie tanto en suelos ácidos como en suelos alcalinos (Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2015). Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal son relevantes para disminuir la dependencia de fertilizantes químicos y aumentar el rendimiento de los cultivos (Chu *et al.*, 2018; Youseif, 2018; Marag y Suman, 2018). Es preciso destacar que la condición de cultivo mixto reportó los valores más altos de fósforo disponible al combinar BFN, BSF y fertilizante químico.

Cuadro 4. Cuantificación del fósforo disponible en suelo asociado a las plantas de maíz y haba en condiciones de monocultivo y cultivo mixto en invernadero.

Tratamiento	Maíz mg kg ⁻¹	Incremento %	Haba mg kg ⁻¹	Incremento %	Maíz-Haba mg kg ⁻¹	Incremento %
BFN	06.89 ± 0.30 cd	-10.98	10.06 ± 0.30 cd	03.71	15.12 ± 0.49 a	68.75
BFN 60-30-00	09.63 ± 0.37 ab	24.42	11.46 ± 0.49 bc	18.14	09.94 ± 0.43 cde	10.94
BSF	09.02 ± 0.73 abc	16.54	14.63 ± 0.61 a	50.82	09.39 ± 0.49 de	04.80
BSF 120-60-00	10.00 ± 0.37 a	29.20	11.95 ± 0.61 b	23.20	12.62 ± 2.26 bc	40.85
BSF 60-30-00	07.07 ± 0.37 cd	-08.66	10.18 ± 0.43 cd	04.95	10.24 ± 0.00 bcde	14.29
BFN + BSF	07.26 ± 1.77 cd	-06.20	07.20 ± 0.49 fg	-25.77	09.76 ± 0.00 de	08.93
BFN + BSF 60-30-00	03.90 ± 0.73 e	-49.61	06.10 ± 0.98 g	-37.11	12.87 ± 1.16 b	43.64
120-60-00	03.90 ± 0.12 cd	-49.61	12.13 ± 0.18 b	25.05	11.76 ± 0.06 bcd	31.25
60-30-00	06.52 ± 0.43 d	-15.76	08.29 ± 0.00 ef	-14.54	10.91 ± 0.30 bcde	21.76
Control	07.74 ± 0.06 bcd	00.00	09.70 ± 0.06 de	00.00	08.96 ± 1.04 e	00.00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

Las interacciones a nivel de raíz entre una gramínea y una leguminosa benefician la biodisponibilidad de fósforo en el suelo, adicionar microorganismos mejora este efecto y se mejora la eficiencia en el uso de los recursos del suelo en comparación al monocultivo (Xia *et al.*, 2013; Latati *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2016).

8.1.2 Análisis microbiológico del suelo

8.1.2.1 Conteo de unidades formadoras de colonias del suelo

Se cuantificaron las poblaciones microbianas en unidades formadoras de colonias (UFC) en distintos medios de cultivo (Figura 13), donde se encontraron 289×10^4 UFC de hongos, 90×10^4 UFC de bacterias mesofílicas aeróbicas, 117×10^4 UFC de actinomicetos, 3×10^4 UFC bacterias Gram negativas, y 8×10^4 BSF (Cuadro 5). Romero *et al.* (2009) reportan que para suelos con distintos niveles de degradación, se obtuvieron de 10^2 hasta 10^5 UFC de conteos totales de bacterias y hongos. Henríquez *et al.* (2014) indicaron que las bacterias se encuentran en mayor proporción en el suelo de cultivos mixtos, con respecto a los monocultivos.

Cuadro 5. Conteo de UFC de microorganismos por gramo de suelo.

Medio de cultivo	Dilución
	UFC g ⁻¹ de suelo
	10 ⁻³
TSA	89.5 ± 12.02
PDA	288.5 ± 16.26
Czapeck-Dox	117.0 ± 08.48
Goldstein	08.0 ± 01.41
McConkey	02.5 ± 00.70

Promedio de tres repeticiones seguido de su desviación estándar.

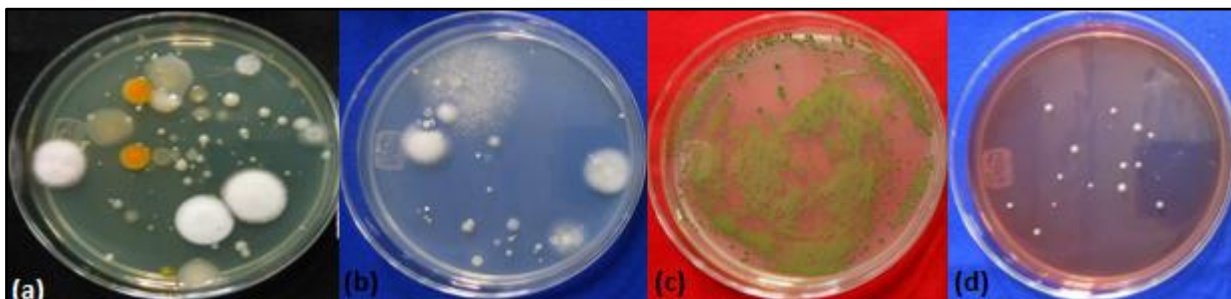


Figura 13. Conteo de microorganismos del suelo. (a) agar TSA, (b) agar Czapeck, (c) agar Goldstein, (d) agar McConkey.

8.1.2.2 Aislamiento y selección de bacterias solubilizadoras de fosfatos

Durante el proceso de aislamiento de bacterias se obtuvieron ocho cepas con actividad solubilizadora de fosfatos en medio de cultivo Goldstein. Se observó que en presencia de manitol no se manifestaba el halo de solubilización para las ocho cepas. En medio de cultivo con manitol y glucosa, como fuentes de carbono, se presentaron pequeños halos de solubilización. El medio de cultivo adicionado de glucosa, como fuente de carbono, mostró los halos de solubilización más evidentes, por lo que esta fuente de C fue utilizado para la purificación y estudios posteriores de las bacterias (Figura 14).

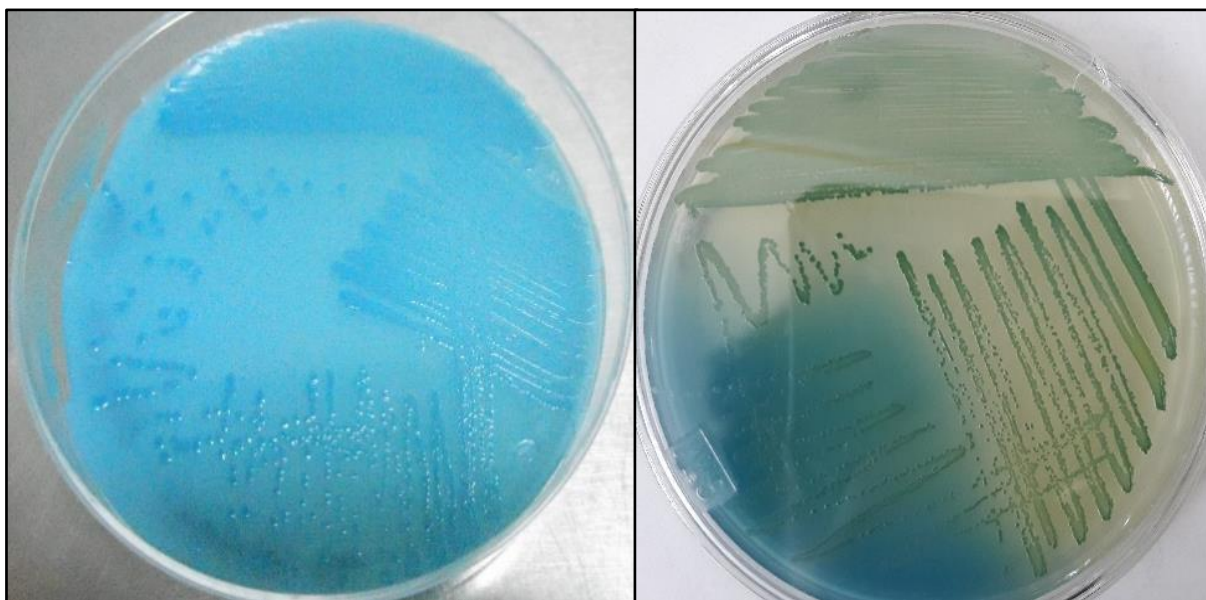


Figura 14. Placas de agar Goldstein con bacterias solubilizadoras de fosfatos. (a) Nula actividad solubilizadora en medio de cultivo con manitol y (b) actividad solubilizadora en medio de cultivo con glucosa.

8.1.2.3 Evaluación de la actividad solubilizadora de fosfatos por las cepas bacterianas

Durante la evaluación de la actividad solubilizadora de las bacterias, se observó que el mayor índice de solubilización de fosfatos correspondió a la cepa bacteriana C8, cuyo índice de solubilización fue de 1.65, seguido de la cepa B5₂ con un índice de solubilización de 1.47 (Figura 15). Ambas colonias fueron consideradas en el

experimento de invernadero y campo debido a la actividad que demostraron, y se analizó su compatibilidad (Cuadro 6).

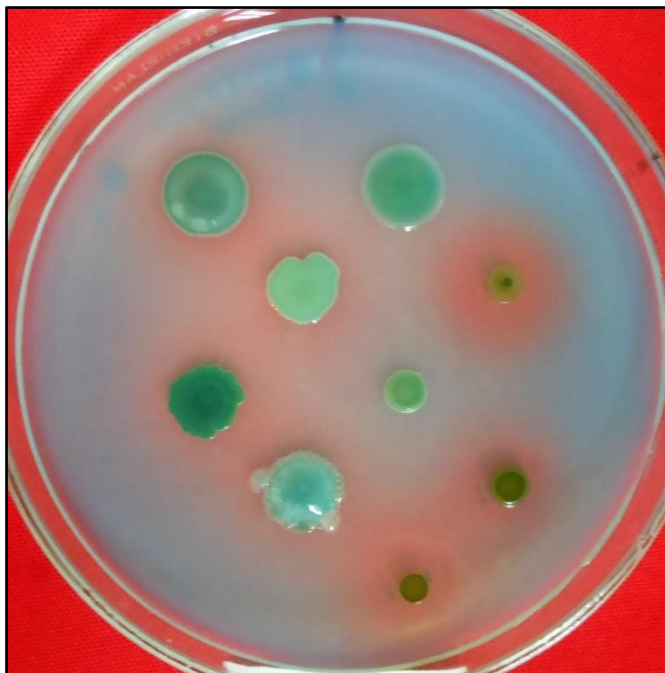


Figura 15. Placa de agar Goldstein adicionado de glucosa. Se observan halos de solubilización de las cepas bacterianas aisladas.

Cuadro 6. Índice de solubilización de las cepas bacterianas aisladas de nódulos de haba.

Colonia	Índice de solubilización
B1 ₂	1.15 ± 0.05 c
B5 ₁	1.35 ± 0.10 b
B5 ₂	1.43 ± 0.11 b
T2C5 ₃	1.12 ± 0.03 c
B6 ₁	0.00 ± 0.00 d
B6 ₂	1.13 ± 0.01 c
C8	1.67 ± 0.10 a

Los datos representan el promedio de tres repeticiones, seguido de su desviación estándar. Índice de solubilización (diámetro del halo/diámetro de la colonia).

8.1.2.4 Identificación de bacterias solubilizadoras de fosfatos

8.1.2.4.1 Identificación de bacterias por métodos bioquímicos

Se realizaron las pruebas bioquímicas para caracterizar a las cepas aisladas (Cuadro 7). Todas las cepas fueron identificadas con una clave, y posteriormente se realizó la identificación con el sistema API Web.

Cuadro 7. Pruebas bioquímicas para la determinación mediante API 20 NE.

Clave	Identificación	Oxidasa	Catalasa	Oxidativa / Fermentativa	Crecimiento en medio McConkey	Movilidad
B1 ₂	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	+	+	OF	+	+
B5 ₁	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	+	+	F	+	+
B5 ₂	<i>Ralstonia pickettii</i>	+	+	OF	-	-
T2C5 ₃	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	+	+	OF	+	+
B6 ₁	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	F	+	-
B6 ₂	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	+	+	OF	+	+
C8	<i>Burkholderia</i> sp.	+	-	OF	-	-

(+) Reacción positiva, (-) reacción negativa., (O) Oxidativo, (F) fermentativo. Todas las cepas fueron bacilos Gram negativos. Identificación corresponde al sistema API 20 NE de Biomérieux

8.1.2.4.2 Identificación de bacterias por métodos moleculares

Se identificaron molecularmente las cepas C8 y B5₂, las cuales mostraron el mayor índice de solubilización con respecto a las cepas aisladas. Se determinó que la C8 corresponde a la especie *Paraburkholderia graminis* (Sawana *et al.*, 2014), antes nombrada *Burkholderia graminis* (Viallard *et al.*, 1998) con un 100% de similitud con la base de datos del NCBI. La especie B5₂ corresponde a la bacteria *Variovorax soli* con un 98% de similitud, de acuerdo a la misma base de datos. La identificación molecular resultó en porcentajes de similitud más altos que los obtenidos por la identificación API, por lo que se consideraron estos resultados como los definitivos para las cepas analizadas. Las especies del género *Burkholderia* son bacterias promotoras del crecimiento vegetal, y aunque algunas especies son consideradas como patógenas, otras son benéficas en el desarrollo y asociación simbiótica con plantas (Beneduzi *et al.*, 2013). Se ha aislado *P. graminis* de nódulos de leguminosas y suelo, siendo más frecuente encontrarlas en nódulos (Steenkamp *et al.*, 2015). Cepas del género *Variovorax* han sido aisladas en suelo, agua y aire en distintos países. Algunas cepas, como *Variovorax soli*, se han utilizado como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Pereira *et al.*, 2016) y como agentes de biorremediación en suelos contaminados por pesticidas (Betancur-Corredor *et al.*, 2015).

8.1.2.5 Ensayo de compatibilidad entre bacterias

Se observó que las cepas *Variovorax soli* (B5₂) y *Paraburkholderia graminis* (C8) exhibieron el mayor índice de solubilización de fosfatos, por lo que fueron sometidas a un ensayo de compatibilidad para verificar que no exista antagonismo entre ellas. Se observó que *P. graminis* C8 inhibió el crecimiento de *V. soli* B5₂ (Figura 16). Por lo anterior, se utilizó *P. graminis* C8 en los ensayos de invernadero y campo.

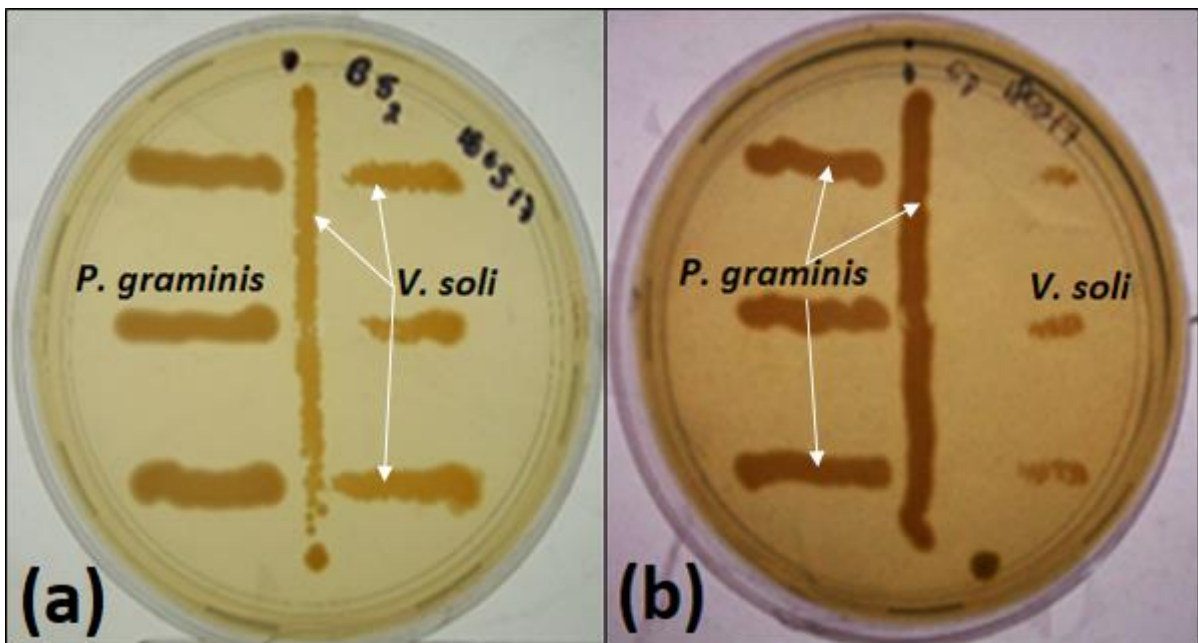


Figura 16. Ensayos de compatibilidad entre bacterias solubilizadoras de fosfatos. (a) La bacteria *Variovorax Soli* al centro y a la derecha de la placa y (b) la bacteria *Paraburkholderia graminis* se observa al centro y al lado izquierdo, del lado derecho está *V. soli*. ¿Y qué significa esto?

8.1.2.6 Actividad de la enzima deshidrogenasa en suelo

Los resultados de la actividad de la enzima deshidrogenasa en el suelo asociado a las plantas de maíz y haba en condiciones de monocultivo y cultivo mixto se muestra en el Cuadro 8. La actividad enzimática en el suelo previo al experimento fue de 0.41 unidades enzimáticas (UE).

Se observaron diferencias estadísticas significativas en todos los tratamientos. Para el caso del suelo de plantas de maíz en monocultivo se obtuvo que los tratamientos con fertilizante químico (120-60-00 y 60-30-00) presentaron la mayor concentración de unidades enzimáticas entre todos los tratamientos analizados, con concentraciones de

1.43 y 1.23 UE, respectivamente. En el suelo de haba en condiciones de monocultivo en los tratamientos con fertilizantes químicos 120-60-00 y 60-30-00, se registraron 1.09 y 0.87 UE, respectivamente. La inoculación con BSF más fertilizante químico presentó 0.62 UE. En condiciones de cultivo mixto, los tratamientos con fertilizante químico 120-60-00 y 60-30-00 mostraron la mayor actividad enzimática para esta condición de cultivo, con concentraciones de 1.29 y 0.91 UE, respectivamente. La inoculación con BSF resultó en 0.54 UE. Henríquez *et al.* (2014) reportaron 2.69 UE para la actividad deshidrogenasa en suelo cultivado con maíz.

Cuadro 8. Actividad deshidrogenasa en suelo asociado a plantas de maíz y haba en monocultivo y cultivo mixto.

Tratamiento	Actividad enzimática								
	Maíz		Haba		Maíz – Haba				
	UE	Incremento %	UE	Incremento %	UE	Incremento %			
BFN	0.29 ± 0.02	de	-28.69	0.20 ± 0.05	d	-61.20	0.30 ± 0.12	cd	-03.82
BFN 60-30-00	0.44 ± 0.03	cd	04.43	0.35 ± 0.01	cd	01.25	0.49 ± 0.16	cd	33.26
BSF	0.58 ± 0.01	c	14.76	0.57 ± 0.10	bc	14.10	0.54 ± 0.04	c	23.51
BSF 120-60-00	0.22 ± 0.00	e	-64.34	0.31 ± 0.11	cd	04.78	0.16 ± 0.04	d	-57.55
BSF 60-30-00	0.61 ± 0.04	c	14.34	0.62 ± 0.13	bc	21.15	0.41 ± 0.08	cd	-03.44
BFN + BSF	0.48 ± 0.09	cd	-15.61	0.43 ± 0.04	cd	-07.30	0.25 ± 0.06	cd	-33.07
BFN + BSF 60-30-00	0.36 ± 0.02	de	-33.33	0.36 ± 0.16	cd	48.86	0.51 ± 0.04	cd	-20.45
120-60-00	1.43 ± 0.03	a	183.75	1.09 ± 0.00	a	251.13	1.29 ± 0.02	a	183.17
60-30-00	1.23 ± 0.12	b	111.18	0.87 ± 0.05	ab	137.78	0.91 ± 0.11	b	122.37
Control	0.37 ± 0.05	de	00.00	0.53 ± 0.02	c	00.00	0.43 ± 0.03	cd	00.00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

En condiciones de monocultivo y cultivo mixto, se obtuvo la mayor actividad enzimática en el tratamiento con fertilizantes químicos, mostrando diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Lo anterior podría estar relacionado a las UFC encontradas en

el suelo, ya que la actividad de la enzima deshidrogenasa está relacionada con la cantidad de microorganismos presentes (Luo *et al.*, 2015). La actividad enzimática por microorganismos en el suelo es un indicador de fertilidad y se ha observado que el manejo, la cantidad de materia orgánica, la profundidad e incluso el tipo de fertilizante utilizado puede favorecer o perjudicar a las poblaciones microbianas y la calidad del suelo (Kumar *et al.*, 2013; Velmourougane *et al.*, 2013).

8.2 Fase de invernadero

8.2.1 Monocultivo y cultivo mixto de maíz y haba

Los resultados de altura, diámetro, masa seca de tallo y raíz se muestran en los Cuadros 9 y 10. En el caso de las plantas maíz en condición de monocultivo, el tratamiento con bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) más fertilizante químico (60-30-00) generó la mayor altura con 149.75 cm, seguido del tratamiento de BSF + fertilizante químico (120-60-00), con 147.25 cm.

Cuadro 9. Altura y diámetro en las plantas de maíz en invernadero en monocultivo.

Tratamiento	Altura cm	Incremento %	Diámetro cm	Incremento %
BFN	114.50 ± 06.80 c	-16.73	0.50 ± 0.00 de	00.00
BFN 60-30-00	135.00 ± 04.76 abc	-01.82	0.60 ± 0.11 bcde	20.00
BSF	115.75 ± 07.54 bc	-15.82	0.47 ± 0.09 e	-06.00
BSF 120-60-00	147.25 ± 05.85 a	07.09	0.65 ± 0.05 abc	30.00
BSF 60-30-00	149.75 ± 12.50 a	08.91	0.62 ± 0.05 abcd	24.00
BFN + BSF	140.25 ± 06.84 a	02.00	0.57 ± 0.09 bcde	14.00
BFN + BSF 60-30-00	132.75 ± 08.53 abc	-03.45	0.65 ± 0.12 abc	30.00
120-60-00	140.00 ± 05.29 a	01.82	0.75 ± 0.10 a	50.00
60-30-00	138.25 ± 10.30 ab	00.55	0.67 ± 0.12 ab	34.00
Control	137.50 ± 11.70 ab	00.00	0.50 ± 0.05 cde	00.00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

Lo anterior, representó un incremento del 8.9% y 7.09%, respectivamente. El mayor diámetro de las plantas de maíz en condición de monocultivo correspondió al tratamiento de fertilización química 120-60-00 con un valor de 0.75 cm; seguido del tratamiento de

fertilización química 60-30-00, con un valor de 0.67 cm. Los tratamientos que incluyeron BSF y/o BFN mostraron incrementos en diámetro desde un 14% hasta un 30%, con respecto al control. Existieron diferencias significativas entre todos los tratamientos.

La masa seca del tallo registró diferencias significativas entre tratamientos. Se observó la mayor masa seca con la inoculación de BSF + 120-60-00 de fertilizante, con un peso de 26.29 g, seguido del tratamiento con fertilización química 60-30-00 con un valor de 23.63 g.

Cuadro 10. Masa seca de tallo y raíz en las plantas de maíz en invernadero, en monocultivo.

Tratamiento	Masa seca tallo g	Incremento %	Masa seca raíz g	Incremento %
BFN	15.46 ± 0.54 c	-28.15	16.55 ± 0.81 a	03.82
BFN 60-30-00	18.95 ± 4.09 bc	-11.94	14.71 ± 3.42 a	-07.71
BSF	16.40 ± 4.74 bc	-23.79	14.85 ± 0.64 a	-06.83
BSF 120-60-00	33.50 ± 2.38 a	55.66	16.48 ± 0.85 a	03.38
BSF 60-30-00	21.45 ± 2.52 bc	-00.325	16.14 ± 0.52 a	01.25
BFN + BSF	14.92 ± 1.36 c	-30.66	15.14 ± 0.25 a	-05.01
BFN + BSF 60-30-00	20.4 ± 3.28 bc	-05.20	15.75 ± 0.28 a	-01.19
120-60-00	20.36 ± 0.39 bc	-05.39	16.54 ± 0.23 a	03.76
60-30-00	23.63 ± 7.59 b	09.80	16.65 ± 0.71 a	04.45
Control	21.52 ± 4.07 bc	00.00	15.94 ± 3.42 a	00.00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

La mayor masa seca de la raíz se obtuvo con el tratamiento con fertilización química 60-30-00 con un peso de 16.65 g, seguido del tratamiento donde se inoculó con BFN, con un valor de 16.55 g, sin diferencias significativas entre los tratamientos. Lo anterior es similar a los resultados obtenidos por autores como Pérez-Montaña *et al.* (2014), Pérez-

López *et al.* (2007) y Hauggaard-Nielsen y Jensen (2005), quienes aislaron cepas de bacterias del suelo y las inocularon en distintos cultivos obteniendo incrementos en altura, masa húmeda, masa seca y rendimientos totales en granos, entre muchos otros parámetros. En la Figura 17 se muestra la diferencia en el desarrollo de la raíz de las plantas de maíz en monocultivo con respecto al control.



Figura 17. Raíces de maíz en monocultivo. (a) Raíz inoculadas con BSF + 60-30-00 de fertilizante químico y (b) Raíz control.

En las plantas de haba sembradas en invernadero en condiciones de monocultivo, el valor más alto para la altura de las plantas se obtuvo con el tratamiento de BFN con un valor de 74.42 cm, seguido del tratamiento con fertilizante químico 60-30-00, con un valor de 68.66 cm. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento

con el dato más alto de diámetro fue cuando se inoculó BSF, con un valor de 0.52 cm, lo que representó un incremento del 30% con respecto al control. En segundo lugar, la inoculación con BFN y BSF más fertilizante químico 120-60-00 tuvieron un valor de 0.47 cm, sin diferencias significativas entre tratamientos.

Cuadro 11. Altura y diámetro en las plantas de haba en invernadero en monocultivo.

Tratamiento	Altura cm	Incremento %	Diámetro cm	Incremento %
BFN	74.42 ± 2.84 a	34.28	0.47 ± 0.05 a	17.50
BFN 60-30-00	65.52 ± 2.99 bc	18.22	0.45 ± 0.05 a	12.50
BSF	60.43 ± 2.04 cd	09.04	0.52 ± 0.05 a	30.00
BSF 120-60-00	57.92 ± 1.16 d	04.51	0.47 ± 0.09 a	17.50
BSF 60-30-00	67.80 ± 0.49 b	22.33	0.42 ± 0.05 a	05.00
BFN + BSF	66.96 ± 4.12 b	20.82	0.40 ± 0.08 a	00.00
BFN + BSF 60-30-00	55.76 ± 0.91 d	00.61	0.45 ± 0.05 a	12.50
120-60-00	65.00 ± 2.04 bc	17.28	0.40 ± 0.00 a	00.00
60-30-00	68.66 ± 3.39 ab	23.89	0.45 ± 0.05 a	12.50
Control	55.42 ± 2.76 d	00.00	0.40 ± 0.08 a	00.00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

El mayor dato registrado de masa seca del tallo de las plantas de haba en monocultivo correspondió a los tratamientos con fertilizante químico 120-60-00 y 60-30-00, con un peso de 20.33 y 19.33g, respectivamente (Cuadro 11). Los dos tratamientos mencionados anteriormente resultaron ser estadísticamente iguales, pero mostraron diferencias significativas con el resto de los tratamientos.

La masa seca de la raíz de las plantas de haba en monocultivo se mantuvo sin diferencias significativas entre tratamientos. Los tratamientos que alcanzaron la mayor masa fueron el tratamiento con fertilizante químico 120-60-00 con un valor de 18.14 g, seguido del

tratamiento donde se inoculó BFN + BSF adicionado con fertilizante químico 60-30-00 con un valor de 17.02 g (Figura 18).

El número de nódulos en la raíz de las plantas de haba en monocultivo presentó diferencias significativas entre tratamientos. En primer lugar, cuando se inoculó BFN se contaron 26.75 nódulos en promedio en las raíces de las plantas. En segundo lugar, las plantas inoculadas con BSF presentaron 19 nódulos. Algunos de estos resultados corresponden con lo expuesto por Abd-Alla *et al.* (2014), quienes reportan que la asociación con cepas específicas de hongos y bacterias promueven la formación de nódulos en plantas de haba y por otro lado, cambios en el pH del suelo afectan significativamente las poblaciones de microorganismos, lo que puede explicar la disminución en la cantidad de nódulos observadas en algunos tratamientos que incluyeron fertilización química.

Cuadro 12. Masa seca de tallo y raíz, y cuenta de nódulos en las plantas de haba en invernadero en monocultivo.

Tratamiento	Masa seca tallo g	Incremento %	Masa seca raíz g	Incremento %	Nódulos	Incremento %
BFN	13.71 ± 0.48 b	-05.90	16.10 ± 2.05 a	-03.59	26.75 ± 3.40 a	105.76
BFN						
60-30-00	13.37 ± 0.46 b	-08.23	14.31 ± 1.68 a	-14.31	04.00 ± 0.81 fgh	-69.23
BSF	13.63 ± 0.78 b	-06.45	14.70 ± 0.67 a	-11.97	19.00 ± 2.16 b	46.15
BSF						
120-60-00	13.53 ± 0.35 b	-07.13	14.41 ± 1.66 a	-13.71	09.25 ± 2.87 cde	-28.84
BSF	13.89 ± 0.78 b	-04.66	14.30 ± 1.83 a	-14.37	06.25 ± 1.25 efg	-51.92
60-30-00						
BFN + BSF	13.73 ± 0.42 b	-05.76	15.34 ± 2.35 a	-08.14	11.00 ± 1.63 cd	-15.38
BFN + BSF						
60-30-00	14.25 ± 0.95 b	-02.19	17.02 ± 1.16 a	01.91	03.25 ± 1.25 gh	-75.00
120-60-00	20.33 ± 0.94 a	39.53	18.14 ± 2.03 a	08.62	01.00 ± 0.00 h	-92.30
60-30-00	19.33 ± 1.24 a	32.66	15.97 ± 1.97 a	-04.37	07.75 ± 1.70 def	-40.38
Control	14.57 ± 1.34 b	00.00	16.70 ± 2.47 a	00.00	13.00 ± 1.41 c	00.00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

Andrade *et al.* (2013) indicaron en su estudio que los biofertilizantes incrementaron la biomasa de los nódulos en raíces de caupí, mejorando también la disponibilidad de fósforo en el suelo. En la Figura 18, se muestran diferencias en el desarrollo de las raíces inoculadas con biofertilizantes con respecto al control. Se observó un mayor número de raíces secundarias cuando se inoculó la BFN; en contraste, se observaron raíces más delgadas y con menos ramificaciones en el control.

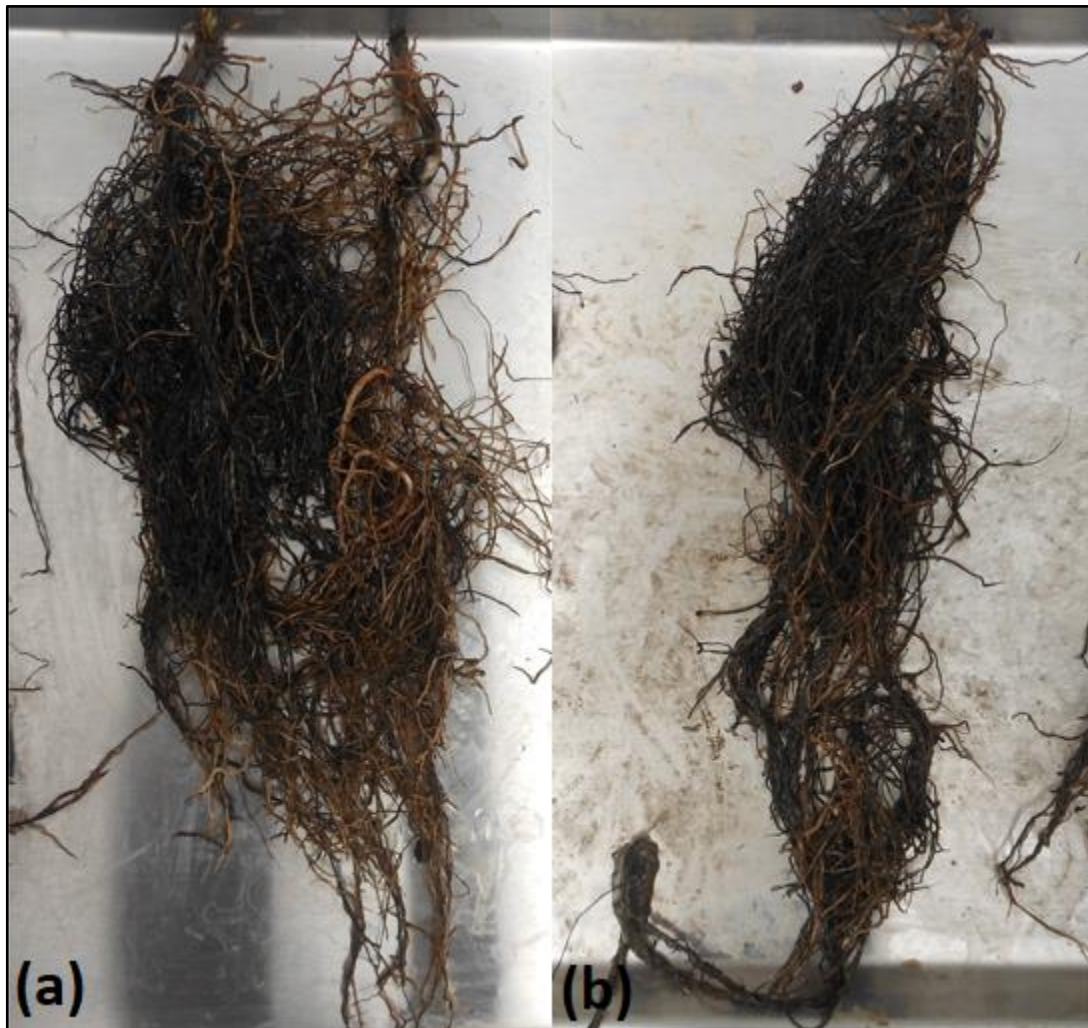


Figura 18. Raíces de haba en monocultivo. (a) Raíz tratada con bacterias fijadoras de nitrógeno y (b) raíz de plantas control.

Las plantas de maíz, en condición de cultivo mixto, cuando fueron inoculadas con la BSF más fertilizante químico 120-60-00, mostraron la mayor altura para esta condición de cultivo (136.75 cm), seguido de las plantas inoculadas con BSF + BFN y fertilizante químico 60-30-00, con un valor de 134.00 cm, con diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. El mayor diámetro de las plantas de maíz en cultivo mixto fue de 0.67 cm con la fertilización química 60-30-00, seguido por las plantas de maíz con fertilizante químico 120-60-00 y las tratadas con BFN, BSF y fertilizante químico 60-30-00, midieron 0.52 cm. La masa seca del tallo de las plantas de maíz en cultivo mixto carece de diferencias significativas entre los tratamientos, aunque se observa el dato mayor con fertilización química 120-60-00, cuyo valor fue de 19.90 g, seguido de las plantas inoculadas con BSF más fertilizante químico 120-60-00 con un valor de 19.65 g sin diferencias significativas entre los tratamientos. Cabe destacar que se observaron incrementos desde el 1.76% hasta el 6.47% con respecto al control (Cuadro 13).

Cuadro 13. Altura, diámetro y masa seca de tallo en las plantas de maíz en invernadero en cultivo mixto.

Tratamiento	Altura cm	Incremento %	Diámetro cm	Incremento %	Masa seca g	Incremento %
BFN	107.25 ± 3.77 d	-07.74	0.37 ± 0.05 b	23.33	17.39 ± 1.47 a	-06.95
BFN 60-30-00	119.25 ± 5.73 bcd	02.58	0.45 ± 0.12 ab	50.00	18.07 ± 1.19 a	-03.31
BSF	130.50 ± 5.06 abc	12.25	0.45 ± 0.05 ab	50.00	17.25 ± 0.48 a	-07.70
BSF 120-60-00	136.75 ± 8.42 a	17.63	0.47 ± 0.09 ab	56.66	19.65 ± 0.36 a	05.13
BSF 60-30-00	122.50 ± 2.64 abcd	05.37	0.47 ± 0.05 ab	56.66	19.02 ± 0.84 a	01.76
BFN + BSF	124.00 ± 4.96 abc	06.66	0.45 ± 0.05 ab	50.00	18.04 ± 0.13 a	-03.47
BFN + BSF 60-30-00	134.00 ± 9.38 ab	15.26	0.52 ± 0.05 ab	73.33	19.03 ± 1.41 a	01.81
120-60-00	126.75 ± 5.73 abc	09.03	0.52 ± 0.05 ab	73.33	19.90 ± 1.52 a	06.47
60-30-00	119.50 ± 8.73 bcd	02.79	0.67 ± 0.22 a	123.33	19.34 ± 0.70 a	03.47
Control	116.25 ± 6.84 cd	00.00	0.30 ± 0.08 b	0.00	18.69 ± 2.81 a	00.00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

Las plantas de haba en cultivo mixto tuvieron una altura de 51.25 cm con el tratamiento de fertilizante químico 120-60-00, seguidas de las plantas tratadas con BFN, BSF y fertilizante químico 60-30-00, que mostraron un valor de 50.75 cm, sin presentar diferencias significativas entre tratamientos. Para el diámetro de las plantas de haba en cultivo mixto, la inoculación con BFN más BSF mostró una tendencia a ser el valor más alto con 0.45 cm, seguido del tratamiento control con un valor de 0.43 cm, sin observarse diferencias significativas entre 1 tratamientos. Al medir la masa seca del tallo de las plantas de haba se observó que con la inoculación de BFN + BSF, los tallos alcanzaron 14.32 g, seguido por el tratamiento BFN + BSF más fertilizante químico 60-30-00 ,con un peso de 14.26 g, sin observarse diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 14).

Cuadro 14. Altura y diámetro en las plantas de haba en invernadero en cultivo mixto.

Tratamiento	Altura haba cm	Incremento %	Diámetro haba cm	Incremento %
BFN	44.00 ± 09.42 a	-09.74	0.33 ± 0.05 a	-23.26
BFN 60-30-00	44.75 ± 04.57 a	-08.21	0.30 ± 0.00 a	-30.23
BSF	46.00 ± 08.87 a	-05.64	0.33 ± 0.10 a	-23.26
BSF 120-60-00	38.50 ± 03.87 a	-21.03	0.30 ± 0.08 a	-30.23
BSF 60-30-00	49.75 ± 03.10 a	02.05	0.28 ± 0.10 a	-34.88
BFN + BSF	49.00 ± 05.48 a	00.51	0.45 ± 0.06 a	04.65
BFN + BSF 60-30-00	50.75 ± 06.40 a	04.10	0.40 ± 0.08 a	-06.98
120-60-00	51.25 ± 03.10 a	05.13	0.35 ± 0.13 a	-18.60
60-30-00	47.75 ± 09.00 a	-02.05	0.35 ± 0.13 a	-18.60
Control	48.75 ± 13.05 a	00.00	0.43 ± 0.10 a	00.00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

Al determinar la masa seca de las raíces de las plantas de haba en cultivo mixto se obtuvo que las plantas control alcanzaron 32.23 g, seguido del tratamiento BFN más fertilizante químico 60-30-00 con una masa de 30.93 g, sin presentarse diferencias significativas entre los tratamientos. Al comparar los cuadros de los tratamientos en monocultivo se encontraron semejanzas con lo obtenido por Hauggaard-Nielsen y Jensen (2005); Agegnehu *et al.* (2008); Li *et al.*, (2010) y Li *et al.* (2015), quienes registraron una mayor masa seca al establecer sistemas de cultivo mixto de maíz y haba en condiciones de invernadero, en comparación a las mismas plantas en condición de monocultivo.

En el conteo de nódulos en raíces de las plantas de haba en cultivo mixto, se observó que el tratamiento con fertilizante químico 60-30-00 presentó un valor promedio de 36 nódulos por planta, seguido del tratamiento control con 24 nódulos (Cuadro 15).

Cuadro 15. Masa seca de tallo y raíz, y número de nódulos en las plantas de haba en invernadero en cultivo mixto.

Tratamiento	Masa seca tallo g	Incremento %	Masa seca raíces g	Incremento %	Nódulos	Incremento %
BFN	13.90 ± 0.68 a	00.51	26.19 ± 1.12 a	-18.74	17.25 ± 3.30 bc	-30.30
BFN 60-30-00	14.01 ± 0.57 a	00.30	30.93 ± 3.07 a	-04.03	04.00 ± 0.00 de	-83.84
BSF	13.71 ± 0.66 a	-00.87	27.38 ± 2.40 a	-15.04	10.00 ± 3.56 cd	-59.60
BSF 120-60-00	13.58 ± 0.61 a	-01.81	26.74 ± 2.20 a	-17.03	00.00 ± 0.00 e	-100.00
BSF 60-30-00	14.10 ± 0.15 a	01.95	25.99 ± 0.74 a	-19.36	02.75 ± 0.47 de	-88.89
BFN + BSF	14.32 ± 0.46 a	03.54	29.00 ± 1.49 a	-10.02	06.00 ± 0.82 de	-75.76
BFN + BSF 60-30-00	14.26 ± 0.98 a	03.11	27.88 ± 4.93 a	-13.49	18.00 ± 4.32 bc	-27.27
120-60-00	13.34 ± 0.99 a	-03.54	29.02 ± 3.28 a	-09.95	10.75 ± 2.50 cd	-56.57
60-30-00	13.73 ± 0.43 a	-00.72	28.57 ± 5.45 a	-11.35	36.00 ± 2.94 a	45.45
Control	13.83 ± 1.06 a	00.00	32.23 ± 4.76 a	00.00	24.75 ± 9.57 b	00,00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

Existieron diferencias significativas entre tratamientos. Se observó que el cultivo mixto superó la cantidad máxima de nódulos registrada en el monocultivo en algunos casos.

Los datos obtenidos mostraron una disminución en el número de nódulos en casi todos los tratamientos en comparación al control, según el trabajo de Abd-Alla *et al.* (2014) la temperatura juega un papel importante para la formación de nódulos en plantas, colocando un rango de temperatura ideal de los 25 a los 33 °C.

En el Cuadro 16 se presentan los valores de masas seca de tallos y raíces para las plantas de maíz y haba en conjunto. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos aunque el tratamiento con BFN + BSF adicionado de fertilizante químico 60-30-00, exhibió el valor más alto con 32.29 g, seguido del tratamiento con fertilización química con 32.25 g.

Cuadro 16. Masa seca de la raíz combinada de las plantas de haba y maíz en cultivo mixto en invernadero.

Tratamiento	Masa seca de tallos (maíz + haba) g	Incremento %	Masa seca raíces (maíz + haba) g	Incremento %
BFN	31.30 ± 2.47 a	-03.75	26.19 ± 1.12 a	-18.74
BFN				
60-30-00	32.09 ± 2.87 a	-01.32	30.93 ± 3.07 a	-04.03
BSF	30.96 ± 2.51 a	-04.80	27.38 ± 2.40 a	-15.04
BSF				
120-60-00	33.23 ± 4.29 a	-02.18	26.74 ± 2.20 a	-17.03
BSF				
60-30-00	33.13 ± 3.48 a	01.88	25.99 ± 0.74 a	-19.36
BFN + BSF	32.36 ± 2.63 a	-00.49	29.00 ± 1.49 a	-10.02
BFN + BSF				
60-30-00	33.29 ± 3.38 a	02.37	27.88 ± 4.93 a	-13.49
120-60-00	33.25 ± 4.64 a	02.24	29.02 ± 3.28 a	-09.95
60-30-00	33.08 ± 3.97 a	01.72	28.57 ± 5.45 a	-11.35
Control	32.52 ± 3.43 a	00.00	32.23 ± 4.76 a	00.00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

Al comparar estos resultados con los de altura para las plantas de maíz y haba en monocultivo, se observa un incremento de casi el doble para cada tratamiento. Estos

resultados corresponden a lo obtenido por autores como Song *et al.*, (2006) y Rezaei-Chianeh *et al.*, (2011), quienes encontraron un mayor rendimiento en plantas de maíz y haba en condiciones de cultivo mixto, en comparación al monocultivo.

En el Cuadro 17 se muestran los conteos de UFC de BSF realizados en el suelo de los tratamientos en condiciones de monocultivo y cultivo mixto. Para el caso del maíz en monocultivo, se obtuvieron 14×10^5 UFC g^{-1} en el tratamiento con fertilizante químico 120-60-00, seguido del tratamiento con BFN + BSF adicionado de fertilizante químico (60-30-00) con 13.33×10^5 UFC g^{-1} .

Cuadro 17. Unidades formadoras de colonias bacterianas solubilizadoras de fosfatos en el suelo de las plantas de haba en condición de invernadero. Se reportan las UFC de bacterias solubilizadoras de fosfatos con potencia de 10^5 unidades.

Tratamiento	Maíz UFC X10 ⁵	Incremento %	Haba UFC X10 ⁵	Incremento %	Maíz-Haba UFC X10 ⁵	Incremento %
BFN	09.67 ± 2.5 abc	-21.57	14.33 ± 5.50 abc	-06.52	02.33 ± 0.57 d	-85.73
BFN 60-30-00	11.00 ± 4.00 abc	-10.79	05.00 ± 1.00 bc	-67.38	14.00 ± 1.00 ab	-14.26
BSF	06.00 ± 0.00 c	-51.34	04.00 ± 2.00 c	-73.91	17.00 ± 6.00 a	04.10
BSF 120-60-00	11.00 ± 1.00 abc	-10.79	11.00 ± 2.00 abc	-28.25	05.33 ± 2.51 cd	-67.36
BSF 60-30-00	07.00 ± 2.00 bc	-43.23	15.33 ± 2.51 ab	00.00	05.33 ± 1.52 cd	-67.36
BFN + BSF	08.33 ± 1.52 abc	-32.44	04.00 ± 3.00 c	-73.91	12.00 ± 1.00 abc	-26.51
BFN + BSF 60-30-00	13.33 ± 1.52 a	08.11	14.33 ± 7.50 abc	-06.52	08.33 ± 0.57 bcd	-48.98
120-60-00	14.00 ± 1.00 a	13.54	09.33 ± 3.51 abc	-39.14	12.00 ± 2.00 abc	-26.51
60-30-00	07.00 ± 2.00 bc	-43.22	17.33 ± 1.52 a	13.05	03.00 ± 1.00 d	-81.62
Control	12.33 ± 0.57 ab	00.00	15.33 ± 0.57 ab	00.00	16.33 ± 0.57 a	00.00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

En el suelo rizosférico asociado a plantas de haba en monocultivo, se obtuvieron 17.33×10^5 UFC g^{-1} en el tratamiento con fertilización química 60-30-00, seguido del tratamiento BSF más fertilizante químico 60-30-00 con 15.33×10^5 g^{-1} . En el cultivo mixto, el tratamiento con BSF presentó el mayor número de UFC con 17×10^5 , seguido del tratamiento control con 16.33×10^5 g^{-1} . Majumder y Palit (2016) reportaron desde 1.1×10^4 hasta 7.8×10^4 UFC de BSF por gramo de suelo (Cuadro 17).

8.3 Fase de campo

8.3.1 Cultivo en campo

En el Cuadro 18 se muestran los resultados obtenidos del conteo de UFC de BSF en las plantas de haba en condiciones de monocultivo y cultivo mixto en campo.

Cuadro 18. Unidades formadoras de colonias de bacterias solubilizadoras de fosfatos en el suelo de las plantas de haba en condición de campo. Se reportaron las unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias solubilizadoras de fosfatos en potencia de 10^5 unidades.

Tratamiento	Haba UFC	Incremento %	Maíz-Haba UFC	Incremento %
BFN	10.50 ± 2.12 cde	90.91	07.50 ± 0.71 cd	15.38
BFN 60-30-00	05.00 ± 1.41 f	-09.09	15.50 ± 2.12 b	138.46
BSF	15.50 ± 0.71 abc	181.82	21.00 ± 2.83 a	223.08
BSF 120-60-00	18.50 ± 2.12 a	236.36	07.00 ± 1.41 cd	07.69
BSF 60-30-00	15.50 ± 3.54 abc	181.82	06.50 ± 0.71 d	00.00
BFN + BSF	13.00 ± 4.24 bcd	136.36	15.50 ± 4.95 b	138.46
BFN + BSF 60-30-00	19.50 ± 3.54 a	254.55	03.50 ± 0.71 cd	-46.15
120-60-00	07.50 ± 2.12 def	36.36	06.50 ± 0.71 bc	0.00
60-30-00	17.50 ± 2.12 ab	218.18	07.50 ± 2.12 cd	15.38
Control	05.50 ± 0.71 ef	00.00	06.50 ± 0.71 d	00.00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

Se observó que para las plantas de haba en monocultivo, la inoculación con BFN + BSF adicionada de fertilizante químico 60-30-00) tuvo la mayor cantidad de UFC con 19.5×10^5 , seguido de la inoculación con BSF adicionado de fertilizante químico 120-60-00 con 18.5×10^5 .

Se observó que la mayor altura de las plantas de haba, en condiciones de monocultivo en campo, fue de 131.50 cm con el fertilizante químico 120-60-00, seguido del tratamiento con BFN + BSF adicionado de fertilizante químico 60-30-00 con 110.25 cm. Para las plantas de haba en cultivo mixto en campo, la mayor altura se obtuvo con la inoculación de BFS adicionado de fertilizante químico 60-30-00 con 103.16 cm, seguido de la inoculación con BFN y BSF, con una altura de 102.33 cm. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 19).

Cuadro 19. Comparación de la altura de las plantas de haba en el experimento de campo.

Tratamiento	Altura cm			
	Monocultivo	Incremento %	Cultivo mixto	Incremento %
BFN	112.75 ± 03.86 b	32.26	88.83 ± 02.04 c	25.70
BFN 60-30-00	107.25 ± 07.00 a	25.81	97.00 ± 04.65 ab	37.26
BSF	096.25 ± 10.08 cd	12.90	98.50 ± 06.25 ab	39.38
BSF 120-60-00	110.25 ± 07.04 bc	29.33	103.16 ± 04.31 a	45.97
BSF 60-30-00	095.50 ± 03.11 cd	12.02	88.83 ± 03.78 c	25.70
BFN + BSF	105.25 ± 07.30 bc	23.46	102.33 ± 03.20 a	44.80
BFN + BSF 60-30-00	108.25 ± 01.71 bc	26.98	94.33 ± 01.97 bc	33.48
120-60-00	131.50 ± 04.65 a	54.25	87.00 ± 05.22 c	23.11
60-30-00	110.25 ± 11.59 bc	29.33	93.16 ± 03.37 bc	31.82
Control	085.25 ± 05.32 d	00.00	70.67 ± 03.08 d	00.00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

El diámetro de las plantas de haba en monocultivo, en condición de campo, tuvo el valor más alto con BSF adicionado de fertilizante químico 120-60-00, con un valor de 1.28 cm; seguido del tratamiento con fertilización química 120-60-00, con un valor de 1.23 cm. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Para el diámetro de plantas de haba en condición de cultivo mixto, el mejor tratamiento fue donde se inoculo BSF adicionado de fertilizante químico 120-60-00 con un valor de 1.27 cm; seguido del tratamiento BFN adicionado de fertilizante químico 60-30-00 con un valor de 1.18 cm. Se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Cuadro 20).

Cuadro 20. Comparación del diámetro de las plantas de haba en el experimento de campo.

Tratamiento	Diámetro cm			
	Monocultivo	Incremento %	Cultivo mixto	Incremento %
BFN	1.12 ± 0.14 abc	28.74	0.97 ± 0.08 c	00.00
BFN 60-30-00	1.02 ± 0.10 bcd	17.24	1.18 ± 0.08 ab	21.65
BSF	1.19 ± 0.12 ab	36.78	1.08 ± 0.10 bc	11.34
BSF 120-60-00	1.28 ± 0.08 a	47.13	1.27 ± 0.14 a	30.93
BSF 60-30-00	1.10 ± 0.09 abc	26.44	1.07 ± 0.08 bc	10.31
BFN + BSF	1.17 ± 0.10 abc	34.48	1.05 ± 0.05 bc	54.64
BFN + BSF 60-30-00	1.00 ± 0.06 bcd	14.94	1.00 ± 0.06 c	03.09
120-60-00	1.23 ± 0.15 a	41.38	0.98 ± 0.04 c	01.03
60-30-00	1.00 ± 0.08 cd	14.94	1.07 ± 0.05 bc	10.31
Control	0.87 ± 0.12 d	00.00	0.97 ± 0.05 c	00.00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

En el Cuadro 21, se presentan los datos obtenidos para el conteo del número de vainas por planta de haba, en condiciones de monocultivo en campo. El mayor número de vainas e presentaron cuando se inoculó con BSF adicionado de fertilización química 120-60-00, y el tratamiento con fertilización química 120-60-00, ambos con 19.33 vainas por planta. En segundo lugar, la inoculación de BFN + BSF mostró 10 vainas. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Para el cultivo mixto de plantas de haba en campo, el tratamiento BFN + BSF adicionado de fertilizante químico 60-30-00 resultó en 4.83 vainas por planta, seguido del tratamiento BSF más fertilizante químico 60-30-00) con 4.67 vainas.

Cuadro 21. Número de vainas de haba por planta en el experimento de campo.

Tratamiento	Número de vainas			
	Monocultivo	Incremento %	Cultivo mixto	Incremento %
BFN	06.67 ± 1.53 bc	401.50	1.17 ± 0.41 d	-49.79
BFN 60-30-00	04.00 ± 1.00 bc	200.75	3.17 ± 1.00 abc	36.05
BSF BSF 120-60-00	05.33 ± 0.58 bc	300.75	4.33 ± 1.63 ab	85.84
BSF 60-30-00	19.33 ± 4.16 a	1353.38	3.00 ± 0.63 abcd	28.76
BSF 60-30-00	06.00 ± 1.00 bc	351.13	4.67 ± 1.21 ab	100.43
BFN + BSF	10.00 ± 1.00 b	651.88	4.17 ± 1.00 abc	78.97
BFN + BSF 60-30-00	09.67 ± 2.52 b	627.07	4.83 ± 1.17 a	107.30
120-60-00	19.33 ± 5.51 a	1353.38	2.83 ± 0.75 bcd	21.46
60-30-00	08.33 ± 2.08 bc	526.32	4.00 ± 1.10 abc	71.67
Control	01.33 ± 0.58 c	00.00	2.33 ± 0.52 cd	00.00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Los resultados obtenidos son semejantes a los trabajos de autores como Mei *et al.*, (2012), quienes obtuvieron mayor rendimiento en granos de cultivos con tratamientos inoculados con biofertilizantes. El cultivo mixto favorece la productividad de los cultivos, la cantidad de fósforo y nitrógeno disponible en el suelo, el uso eficiente de los nutrientes, disminuye la competencia entre plantas y brinda resistencia a la erosión del suelo (Brooker *et al.*, 2015; Duchene *et al.*, 2017). La masa seca de vainas de haba en condiciones de monocultivo en campo obtuvo un valor de 770 g con el tratamiento de fertilizante químico 120-60-00), seguido del tratamiento con BFN más BSF más fertilizante químico 60-30-00, con 490 g. Hubo diferencias significativas entre tratamientos. La masa seca de las vainas de haba en el cultivo mixto en campo, fue de 420 g con la inoculación de BFN y BSF más fertilizante químico 60-30-00, seguido del tratamiento con fertilizante químico 60-30-00, con 350g.

Los tratamientos utilizados alcanzaron incrementos en masa seca de vainas desde el 30 hasta superar el 100% con respecto al control (Cuadro 22). Con respecto a lo anterior, García-Fraile *et al* (2015) publicaron que la aplicación de biofertilizantes mejoran el desarrollo de los cultivos, aumentan los rendimientos y son una alternativa para la creciente demanda de alimentos en el mundo. Por otro lado, Zendejas *et al.* (2015) mencionan la importancia de extender no solo el conocimiento, sino el uso y los beneficios de la aplicación de biofertilizantes en comparación a los fertilizantes químicos.

Cuadro 22. Comparación de la masa seca promedio de las vainas de haba, en monocultivo y cultivo mixto, en el experimento de campo.

Tratamiento	Masa seca de vainas			
	Monocultivo	Incremento %	Cultivo mixto	Incremento %
BFN	230 ± 24.10 c	187.50	80 ± 22.12 d	-20.00
BFN 60-30-00	130 ± 15.22 d	62.50	130 ± 27.15 c	30.00
BSF	190 ± 44.17 cd	137.50	20 ± 07.14 e	-80.00
BSF 120-60-00	430 ± 73.97 b	437.50	30 ± 06.25 e	-70.00
BSF 60-30-00	150 ± 22.85 d	87.50	180 ± 33.18 c	80.00
BFN + BSF	250 ± 55.14 c	212.50	330 ± 86.37 b	230.00
BFN + BSF 60-30-00	490 ± 16.77 b	512.50	420 ± 55.82 a	320.00
120-60-00	770 ± 22.13 a	862.50	280 ± 12.94 cd	180.00
60-30-00	260 ± 48.60 c	225.00	350 ± 33.29 b	250.00
Control	80 ± 02.35 e	00.00	100 ± 15.37 d	00.00

BFN = bacteria fijadora de nitrógeno. BSF = bacteria solubilizadora de fosfato. Valores promedio de tres repeticiones por tratamiento, seguido de su desviación estándar. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas significativas a Tukey $P \leq 0.05$.

Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Se obtuvieron plantas de mayor altura y diámetro, las cuales produjeron un mayor número de vainas con mayor masa seca al inocular bacterias solubilizadoras de fosfatos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Song *et al.* (2006) y Rfaki *et al.* (2015), quienes reportaron que el rendimiento de las plantas de haba aumenta en presencia de biofertilizantes. Bhardwaj *et al.* (2014) consideran que las presiones ambientales sobre los organismos, en específico, los cultivos, están incrementando su magnitud. Indican que es necesario fomentar el uso de tecnologías con menor impacto ambiental, como los biofertilizantes.

IX. Conclusiones

La fertilización química acidificó el suelo de las plantas de maíz y haba en condiciones de cultivo mixto y monocultivo.

La conductividad eléctrica aumentó en el cultivo de plantas de haba en monocultivo y cultivo mixto, en comparación al maíz en monocultivo al agregar biofertilizantes mezclados con fertilizante químico.

El monocultivo de maíz fue altamente extractivo de fósforo en el suelo, sin embargo, las BSF tuvieron un aporte que permitió mitigar este efecto.

El incremento en la cantidad de fósforo disponible fue mayor al sembrar plantas en condición de cultivo mixto.

Las cepas aisladas mostraron actividad solubilizadora de fosfatos en presencia de glucosa como fuente de carbono.

Existen interacciones antagonistas entre algunas cepas bacterianas, como el caso de *Paraburkholderia graminis* y *Variovorax soli*.

La actividad de la enzima deshidrogenasa se incrementó cuando se inoculó BSF y fertilizante químico en el suelo de las plantas de maíz y haba.

La altura, el diámetro y la masa seca de las plantas de maíz y haba, en condiciones de monocultivo, aumentaron al incluir biofertilizantes en sus tratamientos.

El cultivo mixto y los biofertilizantes favorecieron la masa seca de todos los tratamientos, por lo que deben considerarse estas alternativas para sistemas de producción de forraje.

El cultivo mixto y el fertilizante químico aumentaron el número de nódulos en las raíces de haba.

El número de vainas de haba se vio beneficiado por la presencia de BFN y fertilizante químico en monocultivo. La mezcla de BSF, BFN y fertilizante químico, en cultivo mixto, promovió el aumento del número de vainas por planta.

En condiciones de monocultivo, el tratamiento con fertilizante químico tuvo la mayor masa seca de vainas de haba, pero en cultivo mixto, la inoculación con BFN y BSF más fertilizante químico presentó la mayor masa seca.

La aplicación de bacterias solubilizadoras de fosfato y el establecimiento de cultivos mixtos son importantes para el desarrollo, la productividad de las plantas y un mejor aprovechamiento de los componentes del suelo.

Se considera que el tratamiento donde se inoculó BFN + BSF con fertilizante químico 60-30-00, representa una alternativa viable para beneficiar la productividad de cultivos mixtos de maíz y haba, y reducir los impactos al suelo generados por el monocultivo de maíz y sus efectos en las poblaciones de microorganismos asociados a la rizósfera.

X. Bibliografía

- Abd-Alla M. H., El-Enany A.-W. E., Nafady N. A., Khalaf D. M., Morsy F. M. (2014). Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L.) in alkaline soil. *Microbiological Research*. 169: 49-58.
- Abd-Alla M. H., Issa A. A. y Ohyama T. (2014). Impact of *Harsh Environmental Conditions* on Nodule Formation and Dinitrogen Fixation of Legumes. *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*. IntechOpen, DOI: 10.5772/56997. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/advances-in-biology-and-ecology-of-nitrogen-fixation/impact-of-harsh-environmental-conditions-on-nodule-formation-and-dinitrogen-fixation-of-legumes>
- Agegnehu, G., Ghizaw, A. y Sinebo, W. (2008). Yield potential and land-use efficiency of wheat and faba bean mixed intercropping. *Agronomy for Sustainable Development, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA*, 28 (2): 257-263.
- Aguilar C. C., Escalante E. J. A. S. y Aguilar M. I. (2015). Análisis de crecimiento y rendimiento de maíz en clima cálido en función del genotipo, biofertilizante y nitrógeno. *Terra latinoamericana* 33(1): 51-62.
- Aguilar-Carpio C., Escalante E. J. A. S., Aguilar M. I., Perez-Ramirez A. (2017) Crecimiento, rendimiento y rentabilidad del maíz VS-535 en función del biofertilizante y nitrógeno. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 4(12): 475-483.
- Akram N. A., Ashraf M. (2013). Regulation in Plant stress Tolerance by a Potential Plant Growth Regulator, 5-Aminolevulinic Acid. *Journal of Plant Growth Regulation* 32. 663-679.
- Alcántar G. G., Trejo-Tellez L. (2007). Nutrición de cultivos 275-289 en Nutrición de cultivos. *1ª Edición. Editorial Mundi Prensa*. Montecillo, México SA.
- Altieri, M. A., Hecht, S., Liebman, M., Magdoff, F., Norgaard, E. y Sikor, T. O. (1999). Agroecología Bases científicas para una agricultura sustentable. Tercera parte: Sistemas Alternativos de Producción 191-201. ed. Nordan-Comunidad. Montevideo, Uruguay.
- Alvarado T. R., Aceves R. E., Guerrero R. J. de D., Olvera H. J. I., Bustamante G. A., Vargas L. S. y Hernández S. J. H. (2018). Respuesta de variedades de maíz (*Zea mays* L.) a diferentes fuentes de fertilización en el Valle de Puebla. *Terra latinoamericana* 36(1): 49-59.
- Álvarez-Solis, J. D., Gómez-Velasco, D. A., León-Martínez, N. S. y Gutiérrez-Miceli, F. A. (2010) Manejo integrado de fertilizantes y abonos orgánicos en el cultivo de maíz. *Agrociencia* 44(5): 575-586.
- Anderson N. P., Hart J. M., Sullivan D. M., Chirstensen N. W., Horneck D. A., Pirelli G. J. (2013). Applying Lime to Raise Soil pH for Crop Production (Western Oregon). *Oregon State University EM 9057*. 1-21

- Andrade M. M. M., Stamford N. P., Santos C. E. R. S., Freitas A. D. S., Sousa C. A. y Lira J. M. A. (2013). Effects of biofertilizer with diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungi in soil attribute, cowpea nodulation yield and nutrient uptake in field conditions. *Scientia Horticulturae* 162: 374-379.
- Armenta, B. A. D., Gutiérrez, C. G., Báez, J. R. C., Ángel, M., Sánchez, A. y Nava, E. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*, 6(1): 51–56.
- Bhardwaj D., Ansari M. W., Sahoo R. K., Tuteja N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories* 13:66. Disponible en: <http://www.microbialcellfactories.com/content/13/1/66>
- Bashan Y., de-Bashan L. E., Prabhu S. R. y Hernández J-P. (2013). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives. *Plant Soil* 378: 1-33.
- Beltrán P. M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria* 15(1): 101-113.
- Beneduzi A., Moreira F., Costa P. B., Vargas L. K., Lisboa B. B., Favreto R., Baldani J. I., y Passaglia L. M. P. (2013). Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology* 63: 94-104.
- Betancur-Corredor B., Pino N. J., Cardona S. y Peñuela G. A. (2015). Evaluation of biostimulation and Tween 80 addition for the bioremediation of long-term DDT-contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences* 28: 101-109.
- Bispo, D. F. A., Naves S. M., Machado P. L., Vieira G. D., Granate de Sá M. M. J. y Curi N. (2017). Soil, water, nutrients and soil organic matter losses by water erosion as a function of soil management in the Posses sub-watershed, Extrema, Minas Gerais, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias* 38(4): 1813-1824.
- Bituh T., Marovic G., Franic Z., Sencar J. y Bronzovic M. (2009). Radioactive contamination in Croatia by phosphate fertilizer production. *Journal of Hazardous Materials* 162(2-3): 1199-1203.
- Bolaños, G. M. A., Paz, P. F., Cruz G. C. O., Argumedo E. J. A., Romero B. V. M. y de la Cruz C. J. C. (2016). Mapa de erosión de los suelos de México y posibles implicaciones en el almacenamiento de carbono orgánico del suelo. *Terra Latinoamericana* 34(3): 271-288.
- Brooker, R. W., Bennett, A. E., Cong, W. F., Daniell, T. J., George, T. S., Hallett, P. D., Li, L. (2015). Improving intercropping: a synthesis of research in agronomy, plant physiology and ecology. *New Phytologist*, 206(1), 107-117.
- Bouyoucos G. J. (1962). Hydrometer Method Improved for Making Particle Size Analyses of Soils. *Agronomy Journal* 54. 464-465.
- Bray R H y Kurtz L T. (1945) Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science* 59. 39-45.

- Brooker R. W., Bennett A. E., Cong W.-F., Daniell T. J., George T. S., Hallett P. D., Hawes C., Iannetta P. P. M., Jones H. G., Karley A. K., Li L., McKenzie B. M., Pakeman R. J., Paterson E., Schöb C., Shen J., Squire G., Watson C. A., Zhang C., Zhang F., Zhang J y White P. J. (2015). Improving intercropping: a synthesis of research in agronomy, plant physiology and ecology. *New Phytologist* 206: 107-117.
- Brown, L. R., (1970). Seeds of change. The green revolution and development in the 1970's. Vol 275 de Praeger paperbacks: Economics. ed. *Overseas Development Council*. Washington DC. 205 p.
- Cano C. E. J. (2015). Huertos familiares: un camino hacia la Soberanía alimentaria. *Revista Pueblos y Fronteras*. 10(20): 70-91.
- Cardona W. A., Bolaños B. M. M. y Chavarriaga M. W. (2016). Efecto de fertilizantes químicos y orgánicos sobre la agregación de un suelo cultivado con *Musa acuminata* AA. *Acta agronómica* 65(2): 144-148.
- Castañeda S. M. C., Gómez G. G., Tapia C. E., Núñez M. O. Barajas P. J. S. y Rujano S. M. L. (2013). Efecto de *Azospirillum brasilense* y fertilización química sobre el crecimiento, desarrollo, rendimiento y calidad de fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch). *Interciencia* 38(10): 737-744.
- Chu S., Zhang D., Zhi Y., Wang B., Chi C-P., Zhang D., Liu Y. y Zhou P. (2018). Enhanced removal of nitrate in the maize rhizosphere by plant growth-promoting *Bacillus megaterium* NCT-2, and its colonization pattern in response to nitrate, *Chemosphere* 208: 316-324.
- Cubillos-Hinojosa J. G., Valero N. y Peralta C. A. de J. (2017). Effect of a low rank coal inoculated with coal solubilizing bacteria for the rehabilitation of a saline-sodic soil in field conditions. *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 70(3): 8271-8283.
- Dahmardeh, M., Ghanbari, A., Syahsar, B. A. y Ramrodi, M. (2010). The role of intercropping maize (*Zea mays* L.) and Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) on yield and soil chemical properties. *African Journal of Agricultural Research*. 5(8): 631-636.
- Damian-Huato M. A., Ramírez-Valverde B., Aragón-García A., Huerta-Lara M., Sangerman-Jarquín D. M. de J. y Romero-Arenas O. (2010). Manejo del maíz en el estado de Tlaxcala, México: entre lo convencional y lo agroecológico. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 6(2): 67-76.
- de-Bashan, L. E., Hernández, J-P., Bashan, Y. (2012). The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology* 61: 171-189.
- Díaz F. A., Gálvez L. D. y Ortiz C. F. E. (2015). Bioinoculación y fertilización química reducida asociadas con el crecimiento de planta y productividad de sorgo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 31(3): 245-252.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). (1999) Norma Oficial Mexicana NOM-003-STPS-1999, Actividades agrícolas- Uso de insumos fitosanitarios o plaguicidas e insumos de nutrición

vegetal o fertilizantes-Condicion de seguridad e higiene. México. 28 de diciembre de 1999.

DOF (Diario Oficial de la Federación). (2000) Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. México. 17 de octubre de 2000.

Duc G. (1997). Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Research* 53: 99-109.

Duchene O., Vian J.-F., Celette F. (2017). Intercropping with legume for agroecological cropping systems: Complementarity and facilitation processes and the importance of soil microorganisms. A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 240: 148-161.

Escalona-Aguilar, M., Leal-Ascencio, M., Pineda-López, M., Ruíz-Cervantes, E. y Sánchez-Velázquez, L. (2015). El papel de la Universidad Pública en la Soberanía Alimentaria. *Revista Mexicana de Investigación Educativa*. 20(67): 1215-1231.

Fideicomisos instituidos en relación con la agricultura (FIRA). (2016). Panorama Agroalimentario. Maíz 2016. 40 p.

Flores C. L. S., Pérez L. D. de J., González H. A., Rubí A. M., Balbuena M. A. y Gutiérrez R. F. (2016). Estabilidad del rendimiento de 36 cultivares de haba colectadas en el Estado de México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 7(8): 1905-1917.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (1993). Erosion de suelos en America Latina. Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile. Obtenida en línea el 25 de Septiembre de 2018 de: <http://www.fao.org/docrep/t2351s/T2351S06.htm#Relación%20entre%20erosión%20y%20pérdida%20de%20fertilidad%20del%20suelo>.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2001). Improving nutrition through home gardening. A training package for preparing field workers in Africa. Obtenida en línea el 25 de Septiembre de 2018 de: <http://www.fao.org/docrep/v5290e/v5290e00.htm>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), International Fertilizer Association (IFA). (2002). Los fertilizantes y su uso. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Asociación Internacional de la Industria de los Fertilizantes*. 4ª edición. Roma, 2002. 86p.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), IFAD and WFP. (2013). *The State of Food Insecurity in the world 2013. The multiple dimensions of food security*. Rome, FAO. 52p.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2015). Los suelos están en peligro, pero la degradación puede revertirse. Obtenida el 10 de Septiembre de 2016, de: <http://www.fao.org/news/story/es/item/357165/icode/>.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2016). World Fertilizer trends and outlook to 2019. Obtenida el 15 de Enero de 2018, de: <http://www.fao.org/3/a-i5627e.pdf>

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2018). FAO SOILS PORTAL. Key Definitions. Obtenida el 15 de Abril de 2018, de: <http://www.fao.org/soils-portal/about/all-definitions/en/>
- Friedrich, T. (2014). La seguridad alimentaria: retos actuales. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 48(4): 319-322.
- García-Fraile P., Menéndez E. y Rivas R. (2015). Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *Bioengineering* 2(3): 183-205.
- García-Olivares, J.G., Mendoza-Herrera, A. y Mayek-Pérez, N. (2012). Efecto de *Azospirillum brasilense* en el rendimiento del maíz en el norte de Tamaulipas, México. *Universidad y ciencia* 28(1): 79-84.
- Geisseler D. y Scow K M. (2014). Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms – A review. *Soil Biology and Biochemistry* 75: 54-63.
- Gliessman, S. R. (2000). Agroecology: ecological processes in sustainable agriculture. CRC Press: Boca Raton FL, USA. 357p.
- González, B. P. (2006). La revolución verde en México. *Agrária, São Paulo*. N° 4: 40-68.
- Hauggaard-Nielsen, H., y Jensen, E. S. (2005). Facilitative root interactions in intercrops. *Plant and Soil*, 274(1–2): 237–250.
- Henríquez, C.; Uribe, L., Valenciano, A. y Nogales, R. (2014). Actividad enzimática del suelo –deshidrogenasa, β -glucosidasa, fosfatasa y ureasa- bajo diferentes cultivos. *Agronomía Costarricense* 38(1): 43-54.
- Hermosín Ma. C., Rodríguez-Lizana, A., Cornejo, J. y Ordóñez-Fernández, R. (2009). Efecto del uso de agroquímicos en olivar sobre la calidad de las aguas. *Sostenibilidad de la producción de olivar en Andalucía*. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Secretaría General Técnica. Servicio de Publicaciones y Divulgación. España.
- Holguín, G., Bashan, Y., Puente, E., Carrillo, A., Bethlenfalvay, G., Rojas, A., Vázquez, P., Toledo, G., Jiménez, M. B., Glick, B. R., González de Bashan, L., Lebsky, V., Moreno, M. y Hernández, J. P. (2003). Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizosfera. *Agricultura Técnica en México*. 29(2): 201-211.
- Holt-Giménez, E. y Altieri, M. A., (2013). Agroecología, soberanía alimentaria y la nueva revolución verde. *Agroecología*. 8(2): 65-72.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2018) Población. Obtenida en línea el 11 de Junio de 2018, de: <http://www.beta.inegi.org.mx/temas/estructura/>
- Kalaji, H. M., Oukarroum, A., Alexandrov, V., Kouzmanova, M., Brestic, M., Zivcak, M., Goltsev, V. (2014). Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements. *Plant Physiology and Biochemistry* 81. 16-25.
- Köpke U., Nemecek T. (2010) Ecological services of faba bean. *Field Crops Research* 115: 217-233.

- Kumar S., Chaudhuri S. y Maiti S. K. (2013). Soil Dehydrogenase Enzyme Activity in Natural and Mine Soil – A Review. *Middle-East Journal of Scientific Research* 13(7): 898-906.
- Kumar, V., Behl, R. K. y Narula, N. (2000). Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiological Research* 156: 87-93.
- Lara-Ponce, E., Valdés-Vega L., Medina-Torres S. M. y Martínez-Ruíz R. (2017). Situación de la agricultura de mayos y mestizos del norte de Sinaloa, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo* 14(4): 577-597.
- Latati M., Bargaz A., Belarbi B., Lazali M., Benlahrech S., Tellah S., Kaci G., Drevon J. J., y Ounane S. M. (2016). The intercropping common bean with maize improves the rhizobial efficiency, resource use and grain yield under low phosphorus availability. *European Journal of Agronomy* 72: 80-90.
- Leff, E. (2007). La Complejidad Ambiental. *Polis (en línea)*, Vol. 16 consultado el 12 marzo de 2018 de: <http://journals.openedition.org/polis/4605>.
- Li G., Li H., Leffelaar P. A., Shen J. y Zhang F. (2015). Dynamics of phosphorus fractions in the rhizosphere of fababean (*Vicia faba* L.) and maize (*Zea mays* L.) grown in calcareous and acid soils. *Crop & Pasture Science* 66: 1151-1160.
- Li H., Shen J., Zhang., Marschner P., Cawthray G. y Rengel Z. (2010). Phosphorus uptake and rhizosphere properties of intercropped and monocropped maize, faba bean, and white lupin in acidic soil. *Biol Fertil Soils* 46: 79-91.
- López-Reyes L., Carcaño-Montiel M. G., Espinosa-Victoria D., Tapia-Hernández R. A. (2018). Biofertilizantes bacterianos. Un modelo biotecnológico microbiano para el desarrollo agrícola. 259-280. En: Sánchez, López, Vázquez, Negrete (Eds.) *Modelos microbianos para la investigación básica y la biotecnología*. Editorial UNAM-BUAP, México.
- Luo P., Han X., Wang Y., Han M., Shi H., Liu N., Bai, H. (2015). Influence of long-term fertilization on soil microbial biomass, dehydrogenase activity, and bacterial and fungal community structure in a brown soil of northeast China. *Annals of Microbiology* 65: 533-542.
- Majumder P. y Palit D. (2016). Microbial Diversity of Soil in Some Coal Mine Generated Wasteland of Raniganj Coalfield, West Bengal, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 5(2): 637-641.
- Mamta G., Rahi P., Pathania V., Gulati A., Singh B., Bhanwra R. K. y Tewari R. (2010). Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside-A contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Applied Soil Ecology* 46: 222-229.
- Marag P. S. y Suman A. (2018). Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.). *Microbiological Research* 214: 101-113.
- Martínez-Aguirre A. y García-León M. (1997). Radioactive impact of phosphate ore processing in a wet marshland in southwestern Spain. *Journal of Environmental Radioactivity* 34(1): 45-57.

- Masís, F., Valdez, J., Coto, T. y León, S. (2008) Residuos de agroquímicos en sedimentos de ríos, Poás, Costa Rica.. *Agronomía Costarricense* 32(1): 113-123.
- Matusso J. M. M., Mugwe J. N. y Mucheru-Muna M. (2014). Effects of different maize (*Zea mays* L.) – soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) intercropping patterns on soil mineral-N, N-Uptake and soil properties. *African Journal of Agricultural Research* 9(1): 42-55.
- Mei, P.-P., Gui, L.-G., Wang, P., Huang, J.-C., Long, H.-Y., Christie, P. y Li, L. (2012). Maize/faba bean intercropping with rhizobia inoculation enhances productivity and recovery of fertilizer P in a reclaimed desert soil. *Field Crops Research* 130: 19-27.
- Midega, C. A., Salifu, D., Bruce, T. J., Pittchar, J., Pickett, J. A., Khan, Z. R. (2014). Cumulative effects and economic benefits of intercropping maize with food legumes on *Striga hermonthica* infestation. *Field Crops Research* 155, 144-152.
- Montejo-Martínez D., Casanova-Lugo F., García-Gómez M., Oroa-Ortega I., Díaz-Echeverría V. y Morales-Maldonado E. R. (2018). Respuesta foliar y radical del maíz a la fertilización biológica-química en un suelo Luvisol. *Agronomía Mesoamericana* 29(2): 325-341.
- Montero S. J. L., Duarte D. C. y Cun G. R. (2009). Factibilidad económica y ambiental del uso de biofertilizantes micorrízicos. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente* 8: 56-61.
- Mucheru-Muna, M., Pypers, P., Mugendi, D., Kung'u, J., Mugwe, J., Merckx, R., y Vanlauwe, B. (2010). A staggered maize-legume intercrop arrangement robustly increases crop yields and economic returns in the highlands of Central Kenya. *Field Crops Research*, 115(2): 132–139.
- Mundo-Rosas V., Shamah-Levy T. y Rivera-Dommarco J. A. (2013). Epidemiología de la inseguridad alimentaria en México. *Salud pública de México* 55(2): 206-213.
- Najjar, G., Godlinski, F., Vassilev, N. y Eichler-Löbermann, B. (2012) Dual inoculation with *Pseudomonas fluorescens* and arbuscular mycorrhizal fungi increases phosphorus uptake of maize and faba bean from rock phosphate. *Agriculture and Forestry Research* 3 (62): 77-82.
- Ortíz-Maya J., Escalante-Espinosa E., Fócil-Monterrubio R. L., Ramírez-Saad H. C. y Díaz R. I. J. (2017). Dinámica de poblaciones bacterianas y actividad deshidrogenasa durante la biorremediación de suelo recién contaminado e intemperizado con hidrocarburos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 33 (2): 237-246.
- Pachón-Arisa, F. A. (2013) Food sovereignty and rural development: beyond food security. *Agronomía Colombiana*. 31(3): 364-377.
- Paloviita, A., Kortetmäki, T., Puupponen, A. y Silvasti, T. (2016). Vulnerability matrix of the food system: Operationalizing vulnerability and addressing food security. *Journal of Cleaner Production* 135: 1242-1255.
- Patel, R., (2009). Food sovereignty. *The Journal of Peasant Studies*. 36(3): 663-706.

- Peña-Cabriales J. J., Grageda C. O. A. y Vera N. J. A. (2002). Manejo de los fertilizantes nitrogenados en México: uso de las técnicas isotópicas (15n). *Terra latinoamericana* 20(1): 51-56.
- Pérez-López R., Álvarez-Valero A. M. y Nieto J. M. (2007). Changes in mobility of toxic elements during the production of phosphoric acid in the fertilizer industry of Huelva (SW Spain) and environmental impact of phosphogypsum wastes. *Journal of Hazardous Materials* 148(3): 745-750.
- Pérez-Montaña, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., del Cerro, P., Espuny, M.R., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F. J., Ollero, F. J. y Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research* 167: 325-336.
- Pereira S. I. A., Monteiro C., Vega A. L. y Castro P. M. L. (2016). Endophytic culturable bacteria colonizing *Lavandula dentata* L. plants: Isolation, characterization and evaluation of their plant growth-promoting activities. *Ecological Engineering* 87: 91-97.
- Rangel L. J. A., Ramírez G. R. M., Cervantes O. F., Mendoza E. M., García M. E. y Rivera R. J. G. (2014). Biofertilización de *Azospirillum* spp. y rendimiento de grano de maíz, sorgo y trigo. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias* 46(2): 231-238.
- Ren-Yong S., Zhao-dong L., Li Y., Jiang T., Xu M., Li J. y Xu R.-k. (2018). Mechanisms for increasing soil resistance to acidification by long-term manure application. *Soil & Tillage Research* 185: 77-84.
- Restrepo-Franco, G. M., Marulanda-Moreno, S., de la Fe-Pérez, Y., Díaz-de la Osa, A., Lucía-Baldani, V. y Hernández-Rodríguez, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 46(1): 63-79.
- Rezaei-Chianeh E., Nassab A. D. M., Shakiba M. R., Ghassemi-Golezani K., Aharizad S. y Shekari F. (2011). Intercropping of maize (*Zea mays* L.) and faba bean (*Vicia faba* L.) at different plant population densities. *African Journal of Agricultural Research* 6(7): 1786-1793.
- Romero, M. P., Santamaría, D. M. y Zafra, C. A. (2009). Bioingeniería y suelo: abundancia microbiológica, pH y conductividad eléctrica bajo tres estratos de erosión. *Umbral científico*, 15: 67-74.
- Rfaki A., Nassiri L. y Ibijbijen J. (2015). Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria from the Rhizosphere of Faba Bean (*Vicia faba* L.) in Meknes Region, Morocco. *British Microbiology Research Journal* 6(5): 247-254.
- Rutherford P. M., Dudas M. J. y Samek R. A. (1994). Environmental impacts of phosphogypsum. *Science of The Total Environment* 149 (1-2): 1-38.
- Sánchez C. J. E. (2014). La Política Agrícola en México, Impactos y Retos. *Revista Mexicana de Agronegocios*, XVIII(35): 946-956.
- Santos, T. T., Fátima G. M. y Falci, D. S. C. (2011). The cost of soil erosion. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 35(2): 287-298.

- Scharlemann J. P.W., Tanner E. V.J., Hiederer R. y Kapos V. (2014). Global soil carbon: understanding and managing the largest terrestrial carbon pool. *Carbon Management* 5(1): 81-91.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2010). Maíz. Situación Actual y Perspectivas. 88 p.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2017). Maíz grano blanco y amarillo mexicano. Planeación agrícola nacional 2017-2030. SAGARPA. 28 p.
- Segura-Castruita, M. (2014). The soils of Mexico. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 66(1): 223-224.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2017). Boletín mensual. Balanza disponibilidad-consumo. SAGARPA, 2017. Obtenida en línea el 25 de Septiembre de 2018 de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/279945/Balanza_disponibilidad_consumo_nov.pdf
- Sharma S B., Sayyed R., Trivedi M. H. y Gobi T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2(1): 1-14.
- Sharma S., Kumar V. y Tripathi R. B. (2011). Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) From Soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 1(2): 90-95.
- Shrivastava P. y Kumar R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22: 123-131.
- Song, Y. N., Zhang, F.S., Marschner, P., Fan, F. L., Gao, H. M., Bao, X. G., Sun, F. H. y Li, L. (2006). Effect of intercropping on crop yield and chemical and microbiological properties in rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils* 43: 565-574.
- Steenkamp E. T., Zyl E. van, Beukes C. W., Avontuur J. R., Chan W. Y., Palmer M., Mthombeni L. S., Phalane F. L., Sereme T. K. y Venter S. N. (2015). *Burkholderia kirstenboschensis* sp. nov. nodulates papilionid legumes indigenous to South Africa. *Systematic and Applied Microbiology* 38: 545-554.
- Sundara B., Natarajan V. y Hari K. (2002) Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research* 77: 43-49.
- Suso M. J., Bocci R. y Chable V. (2013). La diversidad, una herramienta poderosa para el desarrollo de una agricultura de bajos-insumos. *Ecosistemas* 22(1): 10-15.

- Tadesse, T., Liben, M. y Asefa, A. (2012). Role of maize (*Zea mays* L.)- fababean (*Vicia faba* L.) intercropping planting pattern on productivity and nitrogen use efficiency of maize in northwestern Ethiopia highlands. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science*. 2(3): 102-112.
- Tadeo R. M., García Z. J. J., Aclántar L. H. J., Lobato O. R., Gómez M. N. O., Sierra M. M., Irizar G. M. B. G., Valdivia B. R., Zaragoza E. J., Martínez Y. B., López L. C., Espinosa C. A. y Turrent F. A. (2017). Biofertilización en híbridos de maíz androestériles y fértiles para los Valles Altos de México. *Terra Latinoamericana* 35(1): 65-72.
- Terry E. Terán Z., Martínez-Viera R. y Pino, M de los A. (2002). Biofertilizantes, una alternativa promisoriosa para la producción hortícola en organopónicos. *Cultivos tropicales* 23(3): 43-46.
- Trevors, J. T., (1984) Effect of substrate concentration, inorganic nitrogen, O₂ concentration, temperature and pH on dehydrogenase activity in soil. *Plant and Soil* 77: 285-293.
- United Nations (ONU), Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2017). World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables. Working Paper No. ESA/P/WP/248: 1-16.
- United States Department of Agriculture (USDA). (2014). Keys to Soil Taxonomy. *United States Department of Agriculture and Natural Resources Conservation Service (NRCS)*. 12th edition, 2014: 1-37.
- Urquía-Fernández, N. (2014). La seguridad alimentaria en México. *Salud Pública de México* 56(1): S92-S98.
- Vance, C. P. (2001) Symbiotic Nitrogen Fixation and Phosphorus Acquisition. Plant Nutrition in a World of Declining Renewable Resources. *Plant Physiology* 127: 390-397.
- Vásquez G. A. Y., Chávez M. C., Herrera T. F. y Carreño M., F. (2016). La milpa mazahua: baluarte de conocimientos y creencias. *Iberoforum. Revista de Ciencias Sociales de la Universidad Iberoamericana*. 11(21): 142-167.
- Velmourougane K., Venugopalan M. V., Bhattacharyya T., Sarkar D., Pal D. K., Sahu A., Ray S. K., Nair K. M., Prasad J. y Singh R. S. (2013) Soil dehydrogenase activity in agro-ecological sub regions of black soil regions in India. *Geoderma* 197-198: 186-192.
- Wang Z-G., Jin X., Bao X-G., Li X-F., Zhao J-H., Sun J-H., Chistie P. y Li L. (2014). Intercropping Enhances Productivity and Maintains the Most Soil Fertility Properties Relative to Sole Cropping. *PLOS one* 9(12): 1-24.
- Wang Z-G., Bao X-G., Li X-F., Jin X., Zhao J-H., Sun J-H., Chistie P. y Li L. (2015). Intercropping maintains soil fertility in terms of chemical properties and enzyme activities on a timescale of one decade. *Plant Soil* 391: 265-282.
- Xia H.-Y., Wang Z.-G., Zhao J.-H., Sun J.-H., Bao X.-G., Christie P., Zhang F.-S. y Li L. (2016). Contribution of interspecific interactions and phosphorus application to sustainable and productive intercropping systems. *Field Crops Research* 154: 53-64.

- Xue Y., Xia H., Christie P., Zhang Z., Li L. y Tang C. (2016). Crop acquisition of phosphorus, iron and zinc from soil in cereal/legume intercropping systems: a critical review. *Annals of Botany* 117: 367-377.
- Yilmaz, Ş., Atak, M. y Erayman, M. (2007). Identification of Advantages of Maize-Legume Intercropping over Solitary Cropping through Competition Indices in the East Mediterranean Region. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 32: 111-119.
- Youseif S. H. (2018). Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria and their effects on the growth of maize plants under greenhouse conditions. *Annals of Agricultural Sciences* 63: 25-35.
- Zhalnina K., Dias R., Dörr de Quadros P., Davis-Richardson A., Camargo F. A. O., Clark I. M., McGrath S. P., Hirsch P. R., Triplett E. W. (2015). Soil pH Determines Microbial Diversity and Composition in the Park Grass Experiment. *Microbial Ecology* 69. 395-406.
- Zarabi, M., Alahdadi, I., Akbari, G. A. Y Akbari, G. A. (2011). A study on the effects of different biofertilizer combinations on yield, its components and growth indices of corn (*Zea mays* L.) under drought stress condition. *African Journal of Agricultural Research* 6(3): 681-685.
- Zendejas H. S. L., Oba M. S., Oba A. S., Gallegos E. G. y Estrada J. L. G. (2015). A bioeconomic Approach for the Production of Biofertilizers and their influence on Faba Bean (*Vicia faba* L.) Productivity. *Journal of Natural Sciences* 3(2): 75-91.
- Zhang M., Huang X., Chuai X., Yang H., Lai L. y Tan J. (2015). Impact of land use type conversion on carbon storage in terrestrial ecosystems of China: A spatial-temporal perspective. *Scientific Reports* 5:10233. DOI: 10.1038/srep10233. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep10233>
- Zhang X., Liu W., Zhang G., Jiang L. y Han X. (2015). Mechanisms of soil acidification reducing bacterial diversity. *Soil Biology and Biochemistry* 81: 275-281.