



UAdeO
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

Universidad Autónoma de Occidente

Unidad Guasave

T E S I S

**Aislados nativos de bacterias nodulares y abono orgánico como alternativa
sustentable para el cultivo de frijol en el Norte de Sinaloa.**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN SUSTENTABILIDAD**

P R E S E N T A

M.C. Nataly López Soto

GUASAVE, SINALOA; MEXICO, MARZO DE 2020.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
VICERRECTORÍA ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
Dictamen del Comité Revisor

Guasave, Sinaloa., a 13 de enero de 2020.

M.C. Celia Ruth Sainz López
Jefe del Departamento de Investigación y Posgrado
Unidad Regional Guasave
Universidad Autónoma de Occidente
P r e s e n t e

At'n. Dra. Brenda Paulina Villanueva Fonseca
Coordinadora Académica del Programa Educativo de Posgrado
De Doctorado en Sustentabilidad

Hemos revisado el trabajo Proyecto Terminal titulado:

«Aislados nativos de bacterias nodulares y abono orgánico como alternativa sustentable para el cultivo de frijol en el Norte de Sinaloa»

Que para obtener el grado de Doctor en Sustentabilidad, presenta: el (la) C. Lopez Soto Nataly

Tomando en cuenta lo establecido en la Guía correspondiente y lo que se considera las buenas prácticas en la disciplina consideramos:

El Trabajo Proyecto Terminal cumple con los requisitos en cuanto a esencia y forma para su réplica en examen recepcional.

Así lo avalamos como Comité dictaminador

Atentamente
Por el Comité Revisor



Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero



Dra. María del Carmen Martínez Valenzuela



Dra. Rosa María Longoria Espinoza



Dr. Jesús Damián Cordero Ramírez



Dr. Iván Guadalupe Martínez Álvarez

Agradecimientos

- A Dios por siempre ponerme en el lugar preciso, porque sus decisiones siempre son las mejores para mi destino.
- A mi familia por su apoyo incondicional durante todo lo que he querido realizar en lo personal y en lo profesional.
- A la Universidad Autónoma de Occidente – Unidad Guasave por la oportunidad de pertenecer al programa y alcanzar esta meta profesional.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca proporcionada en el periodo de Septiembre de 2017 a Agosto de 2019.
- A la Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por sus consejos, orientación académica y regaños que fueron necesarios en su momento para que llegara hasta el final del programa.
- A la Dra. María del Carmen Martínez Valenzuela por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por sus consejos, orientación académica.
- A la Dra. Fridzia Izaguirre Díaz de León por sus consejos y orientación académica durante esta etapa.
- A mis tutores: Dra. Rosa María Longoria Espinoza, Dr. Jesús Damían Cordero Ramírez y Dr. Iván Guadalupe Martínez Álvarez por su apoyo incondicional, por sus críticas y sugerencias en el desarrollo de este proyecto.
- A M.C Gabriel Herrera Rodríguez por abrirme las puertas en la Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte y apoyarme de forma incondicional en el desarrollo de los muestreos, la identificación molecular de los aislados y experimentos realizados. Sin usted, esto no hubiera sido posible. Le agradezco infinitamente cada palabra de aliento que me dio en los momentos más difíciles.
- A M.C Araceli Fierro Ruiz por apoyarme con sus conocimientos de Biología Molecular, tus aportaciones fueron muy importantes para mí, tanto en lo profesional como en lo personal.
- A Ing. Jesús Adolfo Ordoñez Leyva por las facilidades otorgadas para realizar los abonos orgánicos, los consejos y la paciencia para orientarme siempre que lo necesito.
- A Ing. Aide García Llanes por apoyarme con el procesamiento de las muestras de la caracterización de los abonos orgánicos.
- A la Dra. Karla Yeriana Leyva Madrigal por las facilidades otorgadas para el desarrollo de los análisis filogenéticos de los aislados y consejos recibidos.

- A M.C Hugo Galindo Flores por sus consejos y apoyo otorgado para el desarrollo de esta investigación.
- A mis jefes M.I Julio Alberto Cruz Perales y M.C Oscar Garay Sincel por apoyarme incondicionalmente durante los tres años del doctorado, sin su comprensión y facilidades no hubiese culminado esta etapa de preparación.
- A mi compañera de viaje Kenia Iveth Verdugo Elguezabal por soportarme en los días buenos y en los malos escucharme, darme consejos y regañarme cuando es necesario.
- A mis compañeros de Doctorado: Rosa de Anda, Paul García, Karina Gámez, Mariela López, Gabriel González y Dulce Castro por todos los momentos que pasamos juntos, cada uno de ustedes me enseñó algo... ¡Suerte en lo que viene!

"Detrás de los sueños siempre hay esfuerzos que la gente no ve"

Arturo Vidal

Índice

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 2. ANTECEDENTES | 5 |
| 2.1 La agricultura | 5 |
| 2.2 El cultivo de frijol. | 7 |
| 2.3 El desarrollo sustentable y la agricultura | 8 |
| 2.4 Abonos orgánicos | 9 |
| 2.5 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPR..... | 11 |
| 2.6 Clasificación de PGPR por sus mecanismos de acción | 12 |
| 2.6.1 Mecanismos indirectos | 12 |
| 2.6.2 Mecanismos directos. | 12 |
| 2.6.2.1 Fijación de nitrógeno N ₂ | 13 |
| 2.6.2.2 Ciclo del nitrógeno N ₂ | 14 |
| 2.7 El género <i>Pseudomonas</i> | 15 |
| 2.8 Biofertilizantes. | 17 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 18 |
| 4. HIPÓTESIS | 19 |
| 5. OBJETIVOS..... | 19 |
| 5.1 Objetivo general | 19 |
| 5.2 Objetivos específicos..... | 19 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 20 |
| 6.1 Estrategia general del trabajo | 20 |
| 6.2 Elaboración un abono orgánico a partir de residuos de la industria alimentaria..... | 20 |
| 6.3 Aislamiento de cepas nativas asociados a la rizósfera de frijol a partir de nódulos..... | 22 |
| 6.3.1 Muestreo de nódulos de frijol en ciclo agrícola 2016.. | 23 |
| 6.3.2 Muestreo de nódulos de frijol en ciclo agrícola 2017.. | 23 |
| 6.4 Identificación morfológica y molecular de los aislados obtenidos de los nódulos de frijol | 24 |
| 6.4.1 Identificación morfológica | 24 |

| | |
|--|----|
| 6.4.2 Identificación molecular | 26 |
| 6.4.2.1 Verificación de la pureza del ADN | 27 |
| 6.4.2.2 Electroforesis de ADN | 27 |
| 6.4.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... | 28 |
| 6.4.2.3 Análisis filogenético | 29 |
| 6.5 Selección de bacterias fijadoras de nitrógeno. | 29 |
| 6.5.1 Experimento 1. | 29 |
| 6.5.2 Experimento 2. | 31 |
| 6.5.3 Experimento 3. | 33 |
| 6.6 Evaluación, a nivel maceta, del efecto de un abono orgánico y las bacterias fijadoras de nitrógeno en el cultivo de frijol | 35 |
| 6.6.1 Experimento 1. | 35 |
| 6.6.2 Análisis estadísticos..... | 36 |
| 7. RESULTADOS..... | 36 |
| 7.1 Elaboración de un abono orgánico a partir de residuos de la industria alimentaria..... | 36 |
| 7.2 Aislamiento de cepas nativas asociados a la rizósfera de frijol a partir de nódulos | 40 |
| 7.2.1 Ciclo agrícola 2016..... | 40 |
| 7.2.2 Ciclo agrícola 2017..... | 40 |
| 7.3 Identificación morfológica y molecular de los aislados obtenidos de los nódulos de frijol | 40 |
| 7.3.1 Identificación morfológica | 40 |
| 7.3.1.1 Ciclo agrícola 2016..... | 41 |
| 7.3.1.2 Ciclo agrícola 2017..... | 41 |
| 7.3.2 Identificación molecular | 42 |
| 7.4 Selección de bacterias fijadoras de nitrógeno. | 45 |
| 7.4.1 Experimento 1. | 45 |
| 7.4.2 Experimento 2. | 48 |
| 7.4.3 Experimento 3. | 51 |
| 7.5 Evaluación, a nivel maceta, del efecto de un abono orgánico y las bacterias fijadoras de nitrógeno en el cultivo de frijol | 54 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 56 |
| 9. CONCLUSIONES..... | 65 |

| | |
|-----------------------|----|
| 10. REFERENCIAS | 66 |
| 11. ANEXOS..... | 79 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representación esquemática del proceso de fijación biológica de nitrógeno por microorganismos de vidas libres y simbióticas | 15 |
| Figura 2. Estrategia general de trabajo | 20 |
| Figura 3. Mezcla de residuos sólidos con el que se elaboró el abono orgánico | 22 |
| Figura 4. Procedimiento de toma de muestras de raíces con nódulos de frijol | 23 |
| Figura 5. Procedimiento de toma de muestras de raíces con nódulos de frijol | 24 |
| Figura 6. Tipo de cepas representativas de diferentes géneros de acuerdo a Robledo et al., (2012) .. | 25 |
| Figura 7. Tipos de cepas representativas del género <i>Rhizobium</i> de acuerdo a Robledo et al., (2012) | 26 |
| Figura 8. Plantas de frijol variedad azufrado higuera, 10 días posterior a la siembra, crecidas bajo condiciones controladas..... | 31 |
| Figura 9. Plantas de frijol variedad azufrado higuera, crecidas bajo condiciones controladas en macetas de medio kilo con sustrato agrolita estéril | 33 |
| Figura 10. Plantas de frijol variedad azufrado regional crecidas en macetas de medio kilo utilizando como sustrato agrolita estéril bajo condiciones controladas | 34 |
| Figura 11. Plantas de frijol variedad azufrado regional tratadas con inoculo de cada bacteria de forma separadas en una mezcla con fertilización orgánica y suelo agrícola como sustrato..... | 35 |
| Figura 12. Gel de agarosa al 1% para verificar la amplificación de la región conservada 16S (~1500 pb) de 13 muestras de aislados de bacterias nodulares | 45 |
| Figura 13. Relaciones filogenéticas de aislados basados en la secuencia 16S rDNA obtenidas con máxima verosimilitud con el modelo de sustitución de dos parámetros de Kimura y 1000 bootstraps. | 45 |
| Figura 14. Alturas de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 10, 14, 21,25, 25a, 31, 9 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas. | 46 |
| Figura 15. Biomasa de raíz de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 10, 14, 21,25, 25a, 31, 9 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas | 46 |
| Figura 16. Biomasa de hojas de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 10, 14, 21,25, 25a, 31, 9 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas | 47 |

| | |
|---|----|
| Figura 17. Cantidad de flores de plantas de frijol inoculadas con las bacterias tratamientos (10, 14, 21,25, 25a, 31, 9 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas..... | 47 |
| Figura 18. Cantidad de vainas de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 10, 14, 21,25, 25a, 31, 9 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas | 48 |
| Figura 19. Altura de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 4, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas | 49 |
| Figura 20. Biomasa de raíz de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 4, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas | 49 |
| Figura 21. Biomasa de hojas de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 4, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas | 50 |
| Figura 22. Cantidad de flores de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 4, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas | 50 |
| Figura 23. Cantidad de vainas de plantas de frijol inoculadas con las bacterias tratamientos (21, 4, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas..... | 51 |
| Figura 24. Altura de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 35, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas | 52 |
| Figura 25. Biomasa de raíz de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 35, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas | 52 |
| Figura 26. Biomasa de hojas de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 35, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas | 53 |
| Figura 27. Cantidad de flores de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 35, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas | 53 |
| Figura 28. Cantidad de vainas de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 35, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas..... | 54 |
| Figura 29. Alturas de plantas de frijol inoculadas con fertilización orgánica (FO) más las bacterias (tratamientos FO+A18a, FO+A33, FO+A4, FO+A6, FO+A8), un control (suelo 100%) y FO (fertilización orgánica 100%), crecidas bajo condiciones de invernadero | 54 |
| Figura 30. Cantidad de flores de plantas de frijol inoculadas con fertilización orgánica (FO) más las bacterias (tratamientos FO+A18a, FO+A33, FO+A4, FO+A6, FO+A8), un control (suelo 100%) y FO (fertilización orgánica 100%) crecidas bajo condiciones de invernadero..... | 55 |
| Figura 31. Cantidad de vainas de plantas de frijol inoculadas con fertilización orgánica (FO) más las bacterias (tratamientos FO+A18a, FO+A33, FO+A4, FO+A6, FO+A8), un control (suelo 100%) y FO (fertilización orgánica 100%) crecidas bajo condiciones de invernadero..... | 55 |

| | |
|---|----|
| Figura 32. Rendimiento de semillas de plantas de frijol en gramos inoculadas con fertilización orgánica (FO) más las bacterias (tratamientos FO+A18a, FO+A33, FO+A4, FO+A6, FO+A8), un control (suelo 100%) y FO (fertilización orgánica 100%) crecidas bajo condiciones de invernadero.. | 56 |
|---|----|

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Especificaciones Fisicoquímicas del Humus de Lombriz (Lombricomposta) de acuerdo a la norma NMX-FF-109-SCFI-2008 | 22 |
| Tabla 2. Especificaciones Fisicoquímicas del Humus de Lombriz (Lombricomposta) de acuerdo a la norma NMX-FF-109-SCFI-2008 y comparación con los resultados de los abonos orgánicos analizados por el Laboratorio Agrícola “IBC ANALITYC MEXICO, S.A DE C.V” | 37 |
| Tabla 3. Contenido de macroelementos de los abonos orgánicos | 37 |
| Tabla 4. Contenido de microelementos de los abonos orgánicos | 38 |
| Tabla 5. Especificaciones fisicoquímicas de lixiviado de lombriz analizados por el Laboratorio Agrícola “IBC ANALITYC MEXICO S.A DE C.V” | 39 |
| Tabla 6. Contenido de macroelementos de lixiviado de lombriz | 39 |
| Tabla 7. Contenido de microelementos de lixiviados de lombriz | 39 |
| Tabla 8. Clasificación de los aislados bacterianos, colectados en 2016, de acuerdo a sus características morfológicas | 41 |
| Tabla 9. Clasificación de los aislados bacterianos, colectados en 2017, de acuerdo a sus características morfológicas | 42 |
| Tabla 10. Análisis de las secuencias de las bacterias formadoras de nódulos en el cultivo de frijol, de acuerdo al % de identidad otorgado por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) | 44 |

RESUMEN

El estado de Sinaloa es líder nacional en producción agrícola y en el procesamiento de alimentos. El Estado ocupa el segundo lugar en la producción de frijol, un producto estratégico en el desarrollo del país por ser un elemento de identificación cultural y formar parte de la dieta alimentaria. Las actividades agropecuarias en el Estado de Sinaloa son económicamente importante pero también generan contaminación por el uso de fertilizantes, plaguicidas y otros desechos que fluyen desde la superficie del suelo hacia los acuíferos. La fertilización sintética es utilizada casi en la totalidad de la superficie sembrada en la Entidad, lo cual ha dado lugar a la alteración de los flujos de nutrientes, particularmente de Nitrógeno (N) y Fósforo (P) hacia las costas. El aprovechamiento de los residuos de la industria alimentaria para la elaboración de abonos orgánicos y su aplicación en las prácticas agrícolas representan una alternativa para minimizar los impactos negativos derivados de la fertilización sintética. Además, agronómicamente el frijol, por ser el frijol una leguminosa, cumple una función mejoradora del suelo dada su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico a través de la simbiosis con bacterias; el potencial de dichas bacterias puede ser utilizado en combinación con los abonos orgánicos para mejorar el rendimiento de los cultivos. Por lo que se llevó acabo 1) la elaboraron y caracterizaron fisicoquímicamente dos abonos orgánicos provenientes de la industria alimentaria, 2) el aislamiento e identificación de bacterias nodulares asociadas al cultivo de frijol y 3) la evaluación del efecto de los abonos y bacterias en plantas de frijol. El abono 2 mostró estabilidad en los parámetros fisicoquímicos de acuerdo con la especificación de la norma NMX-FF-109-SCFI-2008. Además, se obtuvieron 93 aislamientos de nódulos de frijol, se identificaron 4 dentro del género *Pseudomonas*, uno de los aislados presentó un comportamiento similar al control de fertilización química bajo condiciones de invernadero.

ABSTRACT

Sinaloa is a national leader in agricultural production and food processing. The State has the second place in the production of common bean, a strategic product in the development of the country for being an element of cultural identification and being part of the food diet. Agricultural activities in the Sinaloa State are economically important but also polluting the environment by the use of fertilizers, pesticides and other wastes that flow from the soil surface to aquifers. Synthetic fertilization is used almost all of the crop area in the State, which has resulted in the alteration of nutrients cycles, particularly of Nitrogen (N) and Phosphorus (P) towards the coasts. The use of waste from the food industry for the production of organic fertilizers and its application in agricultural practices represents an alternative to reduce the negative damages derived from synthetic fertilization. In addition, agronomically, common bean being legumes, fulfill an improved function of the soil, given their ability to fix atmospheric nitrogen through symbiosis with bacteria; the potential of bacteria can be used in combination with organic fertilizers to improve crop yield. Therefore, 1) it was prepared and physicochemical characterized two organic fertilizers from the food industry, 2) the isolation and identification of nodulating bacteria associated with common bean cultivation and 3) the evaluation of the effect of fertilizers and bacteria on common bean plants. The amendment 2 showed stability of physicochemical parameters in accordance with the specification of the standard NMX-FF-109-SCFI-2008. In addition, 93 isolates of root nodules were obtained, 4 of them were identified, and belonging to the *Pseudomonas* genus, one of these has similar trend to the chemical control under greenhouse conditions.

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura es una de las actividades económicas más relevantes en el Estado de Sinaloa; en el año 2017 la entidad contó con un total de 1,075,581.99 hectáreas sembradas, en la cual se empleó fertilización química casi en un 100% de esta superficie, de acuerdo con los datos que reportó el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER, 2017). Dentro de los principales cultivos en el Estado se encuentra el frijol.

El frijol es uno de los alimentos más antiguos que el hombre conoce y se encuentra entre las primeras plantas alimenticias domesticadas. Además de ser un cultivo central en la dieta de la población mexicana, es una actividad económica y de subsistencia fundamental para muchas familias en el país debido a las propiedades nutritivas que posee; como lo es el alto contenido proteico, aporte de carbohidratos, vitaminas y minerales (Hernández et al., 2010; Ulloa et al., 2011; Blanco et al., 2016).

Para la producción de frijol, al igual que en la mayoría de los cultivos agrícolas en la región, se emplean de manera excesiva fertilizantes químicos los cuales provocan la erosión de suelo, contaminación y cuando los residuos de los fertilizantes químicos son arrastrados por la lluvia causan eutrofización de las aguas que resulta en muertes de peces y otros seres vivos; es decir, pérdida de la diversidad. Además, éstas sustancias, al no ser absorbidas por las plantas, comienzan a acumularse en el agua subterránea (Savci, 2012). Estos químicos afectan negativamente al suelo en términos de agotamiento de la capacidad de retención de agua, fertilidad, aumento de la salinidad y disparidad en los nutrientes (Mahanty et al., 2017). Por lo que se requiere de estrategias

en donde estos insumos agrícolas se reduzcan, para seguir asegurando el rendimiento sin deterioro de la fertilidad del suelo y otros factores involucrados (Hernández et al., 2010).

Por otra parte, la agricultura orgánica es un movimiento que promueve la conversión de los desechos orgánicos (procedentes del hogar, la agricultura, el mercado, la industria, entre otros), siendo estos la materia prima para la elaboración de abonos o fertilizantes orgánicos de los cuales las plantas pueden obtener cantidades importantes de nutrientes. Dentro de la clasificación de abonos orgánicos destacan los estiércoles, compostas, vermicompostas, abonos verdes, residuos de cosechas y residuos industriales (Herrán et al., 2008). El uso en la agricultura de abonos orgánicos ofrece una alternativa al uso de fertilizantes químicos, plaguicidas y otros insumos agrícolas (Bhattacharyya y Jha, 2012).

Aunado a lo anterior, el uso de microorganismos benéficos (del tipo considerado como biofertilizantes), que contribuyen a la absorción y asimilación de nutrientes, ofrece efectos favorables que influyen en la adecuada nutrición de las plantas y su rendimiento sin contaminar al medio ambiente; siendo también los biofertilizantes una estrategia sustentable para disminuir los efectos de la fertilización sintética sin perder la rentabilidad de la actividad (Hernández et al., 2010).

Algunos microorganismos que habitan la rizósfera pueden ser aislados y utilizados en beneficio de los sistemas agrícolas, principalmente los microorganismos antagonistas a fitopatógenos y los que promueven el crecimiento vegetal (Ortíz et al., 2009), como es el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno (McNear Jr, 2013). La fijación de nitrógeno, es un mecanismo que consiste en la

reducción enzimática de dinitrógeno atmosférico a amonio por microorganismos de vida libre (*Azotobacter*, *Cianobacterias* y *Pseudomonas*) y simbióticos (*Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*) (Mehnaz, 2011; Orr et al., 2011; Shridhar, 2012), considerándose un proceso de bajo costo, ambientalmente sustentable y que ha llevado a algunos agricultores a buscar estrategias de manejo de nitrógeno en los suelos (De Bruijn, 2015).

La agricultura actual demanda retomar con fuerza los diversos cambios para mejorar la producción, el uso y la aplicación de abonos orgánicos con sus beneficios considerado dos aspectos esenciales: 1) respetar la diversidad de procesos y 2) el buen manejo de suelo y de los nutrientes; por lo que con esta propuesta se pretende reducir el uso de la fertilización sintética, incrementar las poblaciones de microorganismos, la cual se ha ido perdiendo a causa de las grandes cantidades de fertilizantes que se agregan en cada inicio de cultivo, mejorar las condiciones del suelo y pH, favorecer el desarrollo de las plantas, obtención de productos orgánicos con diferentes características, entre otras situaciones positivas que ya se reportan en la literatura.

2. ANTECEDENTES

2.1 La agricultura

En el estado de Sinaloa, la agricultura es una de las actividades económicas más relevantes, la entidad cuenta con un total de 1, 075,581.99 hectáreas sembradas, en las cuales se utilizan fertilizantes químicos en un 99.68%, estos datos corresponden al año agrícola 2017 como lo reporta el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER, 2018).

En Sinaloa, el desarrollo agrícola tuvo auge entre 1970 y 1990 cuando se duplicó la superficie irrigada y se distribuyó ésta entre los ejidatarios. Debido a la necesidad de incrementar los rendimientos de los cultivos, aumentó el uso de fertilizantes, plaguicidas y herbicidas, en la llamada “Revolución Verde” (Campos et al., 2010).

En la prácticas agrícolas convencionales en el Estado, la reposición de nutrientes como el nitrógeno y fósforo se realiza principalmente mediante la aplicación de fertilizante inorgánico al suelo; por lo tanto, es muy desafiante para los agricultores el complementar los fertilizantes N y P en el suelo para evitar las deficiencias de éstos (Korir et al., 2017).

La agricultura convencional juega un papel importante en la reunión de las demandas de alimentos de una creciente población humana, que también ha llevado a un incremento en la dependencia de productos químicos, particularmente de los fertilizantes y pesticidas (Bhardwaj et al., 2014).

Las grandes cosechas generan ingresos, pero también costos por la contaminación de la superficie por el uso de fertilizantes, plaguicidas y otros desechos que fluyen hacia los acuíferos; en la región se ha observado que la actividad agrícola es el factor más importante en la alteración de los flujos de nutrientes particularmente de Nitrógeno (N) y Fosforo (P) hacia las costas, las cuales corresponden a los eventos de fertilización de parte de la agricultura (Escobedo, 2010).

2.2 El cultivo de frijol

El frijol es la leguminosa alimenticia más importante para cerca de 300 millones de personas, que en su mayoría viven en países en desarrollo (Camacho et al., 2010). Se considera a México como uno de los centros de origen de varios tipos de frijoles del género *Phaseolus*, entre ellos el que más destaca por su valor comercial es *Phaseolus vulgaris* (Peña et al., 2015).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) es uno de los productos más importantes en la alimentación humana del mundo (Blanco et al., 2016); entre las leguminosas de grano alimenticias, esta representa un componente significativo del consumo en los países en desarrollo.

En el año agrícola 2017, la producción nacional de frijol fue de 1, 183,868.06 toneladas; en el estado de Sinaloa, a partir de una superficie sembrada de 83, 993.54 Hectáreas, se obtuvo una cosecha de 158,226.77 toneladas, información que fue consultada en el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER, 2018).

2.3 El desarrollo sustentable y la agricultura

El concepto de desarrollo sustentable se dio a conocer en 1987, en el reporte del *World Commission on Environment and Development (WCED)*, conocido como El Informe Brundtland “*Our Common Future* (Nuestro Futuro Común)”, que lo definió como “el desarrollo que satisface las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras de satisfacer sus propias necesidades” (Pereira y Escorcía, 2015).

El incremento de la población mundial, asociado a una mayor demanda de alimentos, ha provocado un uso intensivo de los recursos naturales; esto ha producido impactos negativos en el ambiente y ha afectado la sustentabilidad de los sistemas productivos (Ramos et al., 2014).

El Desarrollo Sustentable (DS) se ha convertido en un concepto aceptado a nivel mundial, para guiar las interacciones entre la naturaleza y la sociedad, con el fin de dominar los cambios locales y globales como cambio climático, inequidad social, pobreza, pérdida de biodiversidad, sobrepoblación y falta de recursos (Mura y Reyes, 2015). El DS obedece al doble imperativo ético de la solidaridad con las generaciones presentes y futuras, y exige la explicación de criterios de sustentabilidad social y ambiental y de viabilidad económica (de Souza et al., 2015).

En los últimos años, la creciente conciencia acerca del impacto ambiental, social y cultural de prácticas de la agricultura moderna como es el uso ineficiente de insumos sintéticos derivados del petróleo, ha ocasionado la erosión y salinización de suelos, contaminación de aguas y aumento de gases de efecto invernadero; otras prácticas han ocasionado la pérdida de cultivos tradicionales, aumento de plagas y enfermedades, pérdida de hábitats y su biodiversidad asociada, y con ellos la pérdida de los servicios ecosistémicos (Machado y Ríos, 2016).

El desarrollo sustentable puede ser entendido como el mantenimiento o mejoramiento de las condiciones de calidad en la relación sociedad-naturaleza, en la práctica puede definirse como lo que se quiere sostener para que dicha relación pueda ser verdaderamente sustentable a través del respeto a las leyes de la naturaleza como condición para mejorar la calidad de vida de las sociedades y de los ecosistemas (Pereira y Escorcia, 2015).

2.4 Abonos orgánicos

El uso de materiales orgánicos como fertilizantes ha estado unido a la actividad agrícola desde sus orígenes, y su empleo está relacionado directamente, desde una perspectiva histórica, con el mantenimiento de la productividad de los suelos de cultivo, y los beneficios en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, las cuales se reflejan en un considerable aumento del rendimiento de los cultivos (Antomarchi et al., 2015).

Los abonos orgánicos se han utilizado desde tiempos remotos y su influencia sobre la fertilidad de los suelos ha sido demostrada, aunque su composición química, el aporte de nutrimentos a los cultivos y su efecto en el suelo, varían según su procedencia, edad, manejo y contenido de humedad (Fortis et al., 2009).

Esta mezcla, es el material resultante de la descomposición natural de la materia orgánica por acción de los microorganismos presentes en el medio, los cuales digieren los materiales, es un proceso controlado y acelerado de descomposición de los residuos, que puede ser aeróbico o anaerobio, dando lugar a un producto estable de alto valor como mejorador del suelo transformándolos en otros benéficos que aportan nutrimentos al suelo y, por tanto, a las plantas que crecen en él (Ramos et al., 2014).

Se consideran abonos o fertilizantes orgánicos a los residuos de origen animal y vegetal de los cuales las plantas pueden obtener cantidades importantes de nutrientes; entre los cuales se incluyen, los estiércoles, compostas, vermicompostas, abonos verdes, residuos de cosechas y residuos industriales, aplicados en aquellas tierras sometidas a cultivo intenso con el propósito de

mantener y mejorar la estructura del suelo, aumentar la capacidad de retención de humedad y facilitar la disponibilidad de nutrimentos para las plantas (Reyes et al., 2013).

Al presentar, los abonos orgánicos, altos contenidos de nitrógeno mineral y cantidades significativas de otros elementos nutritivos para las plantas, dependiendo del nivel aplicado, originan un aumento en los contenidos de materia orgánica del suelo, en la capacidad de retención de humedad y en el pH, la disponibilidad de potasio, calcio y magnesio. También, las propiedades físicas mejoran; la infiltración de agua, la estructura del suelo y la conductividad hidráulica, disminuyen la densidad aparente y la tasa de evaporación, así como promueven un mejor estado fitosanitario de las plantas (Ramos et al., 2014).

El uso de abonos orgánicos mejora las condiciones de suelos que han sido deteriorados por el uso excesivo de agroquímicos y su sobre-explotación. Las consecuencias directas de estos dos últimos eventos son la pérdida de la materia orgánica, pérdida de la fertilidad y la contaminación de los suelos y de los mantos freáticos, cuya producción agrícola puede también estar contaminada (Hernández et al., 2010).

La importancia que han cobrado se debe a diversas razones; desde el punto de vista ecológico, se ha incrementado la preocupación por fomentar las prácticas agrícolas que armonicen con el cuidado del ambiente y el uso de abonos orgánicos mejora las condiciones de suelos que han sido deteriorados por el uso excesivo de agroquímicos y por la sobre explotación de los recursos naturales. Se reconoce que debido a la escasez de materias primas para la producción de fertilizantes químicos, ha crecido la tendencia en el re-aprovechamiento de los residuos urbanos,

industriales y agrícolas, con la intención de limpiar el ambiente y generar productos alternativos para el uso agrícola, como los fertilizantes organominerales (Moreno et al., 2014).

2.5 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

Kloepper y Schroth en 1978, introdujeron el término “rizobacterias” para referirse a la comunidad de bacterias del suelo que colonizan de forma competitiva las raíces de las plantas y estimulan el crecimiento de la misma, las cuales también pueden reducir la incidencia de enfermedades de las plantas (Bhattacharyya y Jha, 2012).

El uso de rizobacterias que tienen reconocida acción sobre el crecimiento y desarrollo vegetal (PGPR, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* por sus siglas en inglés), son bacterias capaces de estimular el desarrollo de las plantas, de manera directa e indirecta, y poseen una serie de mecanismos complejos que interactúan entre sí para establecer relaciones benéficas, especialmente con las raíces de las plantas (Camelo et al., 2011).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento tienen mecanismos directos que facilitan la absorción de nutrientes o aumentan la disponibilidad de nutrientes mediante la fijación de nitrógeno, la solubilización de nutrientes minerales, mineralización de compuestos orgánicos y la producción de fitohormonas (Gupta et al., 2015). Mientras que la resistencia sistémica inducida (ISR), la antibiosis, la competencia por los nutrientes, el parasitismo, la producción de metabolitos (cianuro de hidrógeno, sideróforos) supresores de las rizobacterias patógenas son algunos de los mecanismos que benefician indirectamente el crecimiento de las plantas (Jha y Saraf, 2015).

La mayoría de las bacterias reportadas como PGPR pertenece a los géneros *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Frankia*, *Serratia*, *Thiobacillus*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Goswami et al., 2016).

Actualmente, algunas de las PGPR y sus interacciones con las plantas se explotan comercialmente, lo cual contribuye a prácticas agrícolas con enfoque sustentable (Masciarelli et al., 2014). Se han investigado las aplicaciones de estas asociaciones en cultivos como el maíz, trigo, avena, cebada, chicharos, canola, soja, papas, tomates, lentejas, achicoria roja y pepino (Beneduzi et al., 2012).

2.6 Clasificación de PGPR por sus mecanismos de acción

2.6.1 Mecanismos indirectos

Las rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas mediante una variedad de mecanismos; a través de la producción de antibióticos, sideróforos, cianuro de hidrógeno (HCN), enzimas hidrolíticas, entre otras, se redujo la necesidad de agroquímicos (fertilizantes y pesticidas) para mejorar la fertilidad del suelo (Gupta et al., 2015). Por otro lado, el control biológico también puede estar mediado por la activación de la resistencia sistémica adquirida (SAR), las respuestas de resistencia sistémica inducida (ISR) en las plantas y por la modificación de los niveles hormonales en los tejidos vegetales (Martínez et al., 2010).

2.6.2 Mecanismos directos

Los mecanismos directos de las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas facilitan la absorción de nutrientes o aumentan la disponibilidad de nutrientes mediante la fijación de

nitrógeno, la solubilización de nutrientes minerales, mineralizan compuestos orgánicos y la producción de fitohormonas (Gupta et al., 2015).

2.6.2.1 Fijación de Nitrógeno N₂.

El Nitrógeno es un elemento esencial para todas las formas de vida y es el nutriente más vital para el crecimiento y la productividad de las plantas, este elemento es requerido para la formación de aminoácidos y proteínas (García et al., 2015).

Aunque el nitrógeno representa el 78% de los gases de la atmósfera, sigue sin estar disponible para las plantas. Lamentablemente, ninguna especie de planta es capaz de fijar dinitrógeno atmosférico (N₂) en amonio (NH₄⁺) y gastarlo directamente para su crecimiento. De este modo, el nitrógeno atmosférico se convierte en formas utilizables por la fijación biológica de nitrógeno (BNF) que cambia el nitrógeno (N₂) a amoníaco (NH₄⁺) por microorganismos fijadores de nitrógeno los cuales utilizan un complejo sistema enzimático conocido como nitrogenasa (Gupta et al., 2015). Este proceso es una característica exclusiva de procariontes, tanto en géneros de bacterias que son de vida libre en el suelo (por ejemplo, las cianobacterias, *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Azotobacter*), las cuales pueden fijar cantidades significativas de nitrógeno (Orr et al., 2011) como en aquéllos que son simbióticos dentro de los nódulos de las raíces de las plantas leguminosas, el mejor de los ejemplos el género *Rhizobium* (Franche et al., 2009; Luna et al., 2013).

La fijación biológica de nitrógeno es una alternativa económica y sustentable para el suministro de nitrógeno a cultivos de leguminosas, la fertilización a partir de nitrógeno es uno de los más

importantes factores en la generación de cultivos con altos rendimientos (Baginsky et al., 2015). Debido a la interacción entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y la planta se reduce la necesidad de aplicaciones de fertilizantes nitrogenados inorgánicos (Ruíz et al., 2015).

2.6.2.2 Ciclo del Nitrógeno N₂.

La fijación biológica del nitrógeno consiste en la incorporación del nitrógeno atmosférico a las plantas por microorganismos que se encuentran presentes en el suelo y por los de ambientes acuáticos (Figura 1). Esta fijación se da por medio de la conversión de nitrógeno gaseoso (N₂) en amoníaco (NH₄⁺) o nitratos (NO₃⁻), forma en que solamente las plantas toman el nitrógeno directamente desde el suelo. Las raíces pueden absorber ambas formas, aunque pocas especies prefieren absorber nitratos que amoníaco. El amonio es convertido a través de la nitrificación por microorganismos en la fase de inmovilización que se realiza en dos pasos, mismos que son efectuados por diferentes bacterias; primero, las bacterias del suelo convierten el amonio en nitrito (NO₂⁻), luego otra bacteria del suelo, oxida el nitrito en nitrato. La nitrificación les entrega energía a las bacterias y la asimilación ocurre cuando las plantas absorben a través de sus raíces, nitrato (NO₃⁻) o amonio (NH₄⁺), elementos formados por la fijación de nitrógeno o por la nitrificación. Luego, estas moléculas son incorporadas tanto a las proteínas, como a los ácidos nucleicos de las plantas. Así, cuando los organismos producen desechos que contienen nitrógeno, éstos son descompuestos por bacterias presentes en el suelo y en el agua, liberando el nitrógeno al medio bajo la forma de amonio (NH₄⁺). La inmovilización es el proceso contrario a la mineralización, por medio del cual las formas inorgánicas (NH₄⁺ y NO₃⁻) son convertidas a nitrógeno orgánico y, por tanto, no asimilables. La reducción de los nitratos (NO₃⁻) a nitrógeno gaseoso (N₂), y amonio (NH₄⁺) a amoníaco (NH₃), se llama desnitrificación, y es llevado a cabo por las bacterias

desnitrificantes que revierten la acción de las fijadoras de nitrógeno, regresando el nitrógeno a la atmósfera en forma gaseosa, Figura 1.

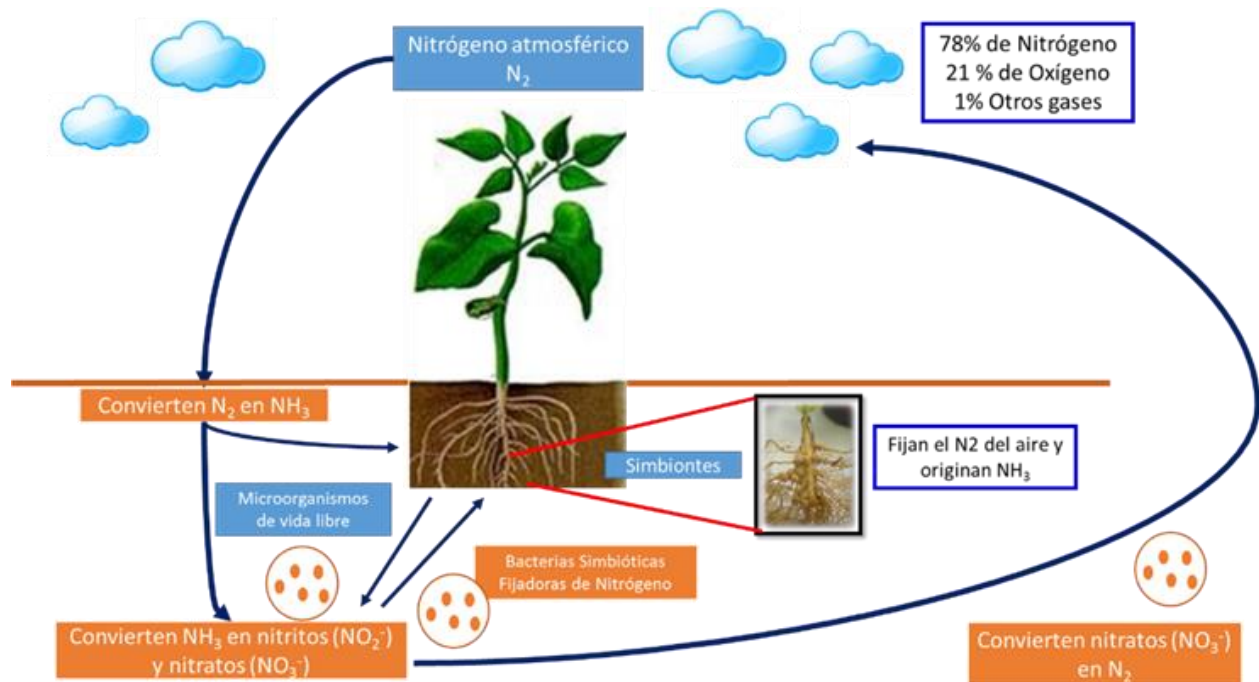


Figura 1. Representación esquemática del proceso de fijación biológica del nitrógeno por microorganismos de vidas libres y simbióticas (Mora et al., 2018).

2.7 El género *Pseudomonas*

Pseudomonas, es un género de bacterias que incluye a especies que habitan en los suelos agrícolas con características que las hacen adecuadas para promover el crecimiento vegetal en plantas (Saharan y Nehra, 2011).

Este género de bacterias, son conocidas por su capacidad para oxidar una gran variedad de compuestos orgánicos para su degradación, desnitrificación y fijación de nitrógeno; además de estar presente en diversos nichos ecológicos (Yu et al., 2011). Entre otras actividades que promueven el crecimiento en plantas están la producción de HCN, sideróforos, proteasas, antimicrobianos y enzimas solubilizadoras de fosfato (Noori y Saud, 2012).

La aparición y actividad de los microorganismos del suelo se ven afectados por una variedad de factores ambientales (tipo de suelo, cantidad de nutrientes, pH, contenido de humedad), y también, depende de su relación con las plantas (Saharan y Nehra, 2011).

Se han reportado varias especies de *Pseudomonas* consideradas como bacterias eficientes en la solubilización de fosfatos y bioinoculantes debido a sus múltiples actividades de biofertilización para mejorar el estado de los nutrientes del suelo, secreción de reguladores del crecimiento vegetal y supresión de patógenos (Parani y Saha, 2012), promoción del crecimiento vegetal y rendimiento de la planta cuando se inoculan como biofertilizante (Suhag, 2016).

Estas bacterias, se han encontrado junto otras bacterias endófitas como *Rhizobium*, *Bacillus* y *Enterobacter*, dentro de los nódulos de las leguminosas (Sánchez et al., 2014).

Las *Pseudomonas*, participan en la fijación de nitrógeno otorgándole ciertas ventajas a las plantas, como el aumento de los pelos radiculares, los nódulos y la actividad de nitrato reductasa la cual permite a la planta obtener el nitrógeno (Bhardwaj et al., 2014).

Por lo que se considera relevante el análisis de la biodiversidad de microorganismos, presentes en el Norte del Estado de Sinaloa asociados a nódulos de frijol, con potencial para la fijación biológica de nitrógeno. Los cuales puedan ser posteriormente evaluados para ser implementados en las prácticas agrícolas y con ello contribuir a la reducción de la fertilización química.

2.8 Biofertilizantes

Los biofertilizantes se definen como formulaciones, productos biológicamente activos o inoculantes microbianos que contiene una o más bacterias u hongos benéficos (Mazid & Khan, 2015), se incluyen algas verdes azules (Boraste et al., 2009). Se utilizan ampliamente para acelerar los procesos microbianos que aumentan la disponibilidad de nutrientes que las plantas pueden asimilar fácilmente (Mahanty et al., 2017).

Los biofertilizantes son preparados que contienen células vivas o latentes de cepas de microorganismos que colonizan a la rizósfera de las plantas incrementando la disponibilidad de los nutrientes principales y promoviendo el crecimiento del cultivo a través de la fijación de nitrógeno, microorganismos solubilizadores de fosfatos o celulolíticos; utilizados para su aplicación en semillas, suelo o áreas de compostaje (Bhattacharjee y Dey, 2014).

En los últimos años, los biofertilizantes han ganado popularidad debido a que son productos que se agregan a las plantas otorgándole beneficios para su crecimiento, estos productos funcionan en el desarrollo de la agricultura sustentable mejorando la fertilidad del suelo, tolerancia en plantas y la productividad de los cultivos (Bhardwaj et al., 2014). Los biofertilizantes son rentables, respetuosos con el medio ambiente y su uso prolongado mejora sustancialmente la fertilidad del suelo e incluyen una fuente económica de nutrientes, excelentes proveedores de micronutrientes y de materia orgánica, secreción de hormonas de crecimiento; con lo que se puede reducir las aplicaciones de agroquímicos y sus impactos negativos (Mahanty et al., 2017).

Debido al impacto negativo sobre el medio ambiente y al alto precio en el mercado internacional que tienen los fertilizantes y pesticidas químicos, los agricultores del mundo entero, especialmente los de países subdesarrollados, se interesan cada día más por la biofertilización de los cultivos, con el fin de mejorar el rendimiento (Rives, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN.

La sustentabilidad hace referencia a través de sus tres ejes (Económico, Social y Ambiental) a la capacidad que han desarrollado los seres humanos para satisfacer las necesidades de las generaciones actuales sin comprometer los recursos y oportunidades para el crecimiento y desarrollo de las generaciones futuras, lo que permitirá un equilibrio entre el hombre y los recursos de su entorno.

Actualmente la sociedad, busca satisfacer las demandas de alimentos a través de la agricultura para erradicar el hambre en el mundo de acuerdo con los objetivos del desarrollo sustentable. Sin embargo, esta actividad depende en gran medida de la fertilización química; principalmente de compuestos de nitrógeno, lo que causa contaminación. Visto desde el punto ambiental se ven atentados la vida de los ecosistemas terrestres y marinos, faltando a la producción y consumos responsables.

El reaprovechamiento de los residuos de la industria alimentaria da valor económico a los desperdicios y reduce los daños al medio ambiente. Además; la incorporación de microorganismos nativos al suelo es una alternativa para mantener el nivel de producción agrícola aumentando la diversidad del suelo y la cantidad de nutrientes mediante la fijación biológica de nitrógeno,

beneficiando la productividad de los cultivos particularmente en las leguminosas como el frijol que interactúan de forma natural para obtener nitrógeno de la atmósfera.

4. HIPÓTESIS

La mezcla de fertilización orgánica y bacterias fijadoras de nitrógeno contribuye a la reducción de la fertilización sintética en el cultivo de frijol en el norte de Sinaloa

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Elaborar un fertilizante, a partir de residuos orgánicos industriales y bacterias fijadoras de nitrógeno, para el uso en la producción de frijol.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Elaborar un abono orgánico a partir de residuos de la industria alimentaria
2. Aislar cepas nativas asociados a la rizósfera de frijol a partir de nódulos
3. Realizar la identificación morfológica y molecular de los aislados obtenidos de los nódulos de frijol
4. Seleccionar bacterias fijadoras de nitrógeno
5. Evaluar a nivel maceta el efecto de un abono orgánico y las bacterias fijadoras de nitrógeno en el cultivo de frijol

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estrategia del trabajo

La estrategia general de trabajo se describe en la Figura 2.



Figura 2. Estrategia general de trabajo.

6.2 Elaboración de un abono orgánico a partir de residuos de la industria alimentaria

El estudio se estableció en un invernadero tipo capilla de 3 metros de largo por 2 metros de ancho. Se elaboraron 2 abonos orgánicos con la mezcla de desechos de maíz obtenidos del proceso de enlatado de la industria alimentaria, estiércol de vaca y rastrojo de maíz, como fuente de carbono (Figura 3), los cuales después de ser mezclados en la misma proporción de cantidades fueron humedecidos con agua hasta saturar y finalmente descompuestos por efecto de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*), toda la mezcla fue empleada para lombricompostaje. Se establecieron 2 mezclas con las mismas características en la composición, dando mantenimiento de alimento y agua para el desarrollo óptimo de las lombrices. La mezcla 1 (abono 1) permaneció

activa de diciembre de 2016 a agosto de 2018 mientras que la mezcla 2 (abono 2) se estableció de marzo 2017 a agosto 2018.

Las mezclas o revuelta de los abonos orgánicos se hicieron de forma manual, mezclándose cada 3 días después de agregar la lombriz, y cada 10 días posterior a los 2 meses. Se aplicó riego manual diariamente, se agregó rastrojo de maíz de maneja mensual para cuidar la humedad de la mezcla. Se midió el pH, conductividad eléctrica, humedad, % de carbono, % de materia orgánica, relación carbono/nitrógeno, a los 18 y 15 meses, respectivamente para cada uno de los abonos. Así como, la cantidad de macroelementos; nitrógeno total, el nitrógeno amoniacal, fósforo total, potasio total, magnesio, calcio, azufre soluble en agua y cantidad de sodio, y la cantidad de microelementos; hierro, zinc, manganeso, cobre y boro. Todos los parámetros fueron evaluados en el Laboratorio Agrícola “IBC ANALITYC MEXICO, S.A DE C.V”, ubicado en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Occidente –Unidad Regional Los Mochis. Los análisis de los resultados de los parámetros se efectuó bajo las especificaciones de la norma NMX-FF-109-SCFI-2008 para HUMUS DE LOMBRIZ (LOMBRICOMPOSTA) – ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA, esta norma mexicana establece las especificaciones de calidad que debe cumplir el humus de lombriz que se produce o se comercializa en territorio nacional. Se excluye el humus de lombriz en presentación líquida (Ver tabla 1).



Figura 3. Mezcla de residuos sólidos con el que se elaboró el abono orgánico.

Tabla 1. Especificaciones Fisicoquímicas del Humus de Lombriz (Lombricomposta) de acuerdo con la norma NMX-FF-109-SCFI-2008.

| Características | Valor (base seca) |
|-------------------------|-------------------|
| Nitrógeno total (%) | De 1 a 4 |
| Materia orgánica (%) | De 20 a 50 |
| Relación C/N | ≤ 20 |
| Humedad (%) | De 20 a 40 |
| pH | De 5.5 a 8.5 |
| Conductividad eléctrica | ≤ 4 dS/m |

6.3 Aislamiento de cepas nativas asociados a la rizósfera de frijol a partir de nódulos.

Las cepas nativas se aislaron de raíces de frijol con nódulos, obtenidas de parcelas con cultivo de frijol en etapa floración (50 a 60 días aproximadamente después de la siembra) ubicados en diferentes lotes municipios de Ahome y El Fuerte en el ciclo agrícola otoño invierno 2016 y 2017, para éste último ciclo, solamente se muestreo en lotes del municipio de Ahome.

6.3.1 Muestreo de nódulos de frijol en ciclo agrícola 2016

Para el ciclo agrícola 2016, las muestras se tomaron de suelos agrícolas con siembra de frijol en los municipios de Ahome y El Fuerte, para ello se realizó un muestreo dirigido de cinco de oros con guía de la Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte, el cual consistió en trazar un cuadrante y tomar cinco puntos equidistantes, cuatro puntos en los extremos y un punto al centro de la parcela a muestrear. Se tomaron 5 plantas por cada punto de muestreo; así mismo, se tomó referencia de la coordenada geográfica. Las plantas de frijol fueron analizadas de su sistema radicular y las raíces que presentaban nódulos fueron colectadas en tubos Falcón de 50 ml con silica gel y algodón para resguardarlas, se refrigeraron a 4°C para su posterior tratamiento (Figura 4).



Figura 4. Procedimiento de toma de muestras de raíces con nódulos de frijol.

6.3.2 Muestreo de nódulos de frijol ciclo agrícola 2017

Para el ciclo agrícola 2017, las muestras se tomaron de suelos agrícolas con siembra de frijol en etapa de floración en lotes del municipio de Ahome, se realizó el muestreo bajo las mismas descripciones que el ciclo agrícola 2016. De la misma manera la colecta y almacenamiento de las

muestras, en tubos Falcón de 50 ml con silica gel y algodón, almacenarlas a 4°C para su posterior tratamiento (Figura 5).



Figura 5. Procedimiento de toma de muestras de raíces con nódulos de frijol.

6.4 Identificación morfológica y molecular de los aislados obtenidos de los nódulos de frijol

6.4.1 Identificación morfológica

Los nódulos fueron procesados utilizando la metodología por Somasegaran y Hoben, 1994; la desinfección de nódulos se realizó por inmersión sucesiva en etanol al 95% por un minuto, seguido por una desinfección en hipoclorito de sodio al 3% (v/v) durante 3 minutos, posteriormente, se enjuagaron los nódulos con agua destilada estéril hasta que no se percibió el olor a lejía, los nódulos desinfectados fueron colocados en tubos eppendorf de 1.5 ml y macerados con un pistilo estéril para finalmente ser estriados en cajas Petri.

De los nódulos desinfectados y macerados, se tomó un asada bacteriológica, la cual fue sembrada por estría de acotamiento en cajas Petri con medio ELMARC (10.0 g de manitol, 0.5 g de K_2HPO_4 , 0.2 g de $MgSO_4$, 0.1 g de NaCl, 0.5 g de extracto de levadura y 15 g de agar bacteriológico para un litro de agua destilada), se ajustó el pH a 6.8 y agregó 10 ml de rojo congo a una concentración de 25 ppm.

Las cajas Petri se incubaron a una temperatura de 28°C, en un periodo de 2 a 10 días, se observó el crecimiento diario de las colonias bacterianas (Figura 6 y Figura 7) de acuerdo a la morfología descrita por Robledo et al., (2012) en la Figura 6 se representan las colonias 1. *R. phaseoli*, 2. *E. meliloti*, 3. *M. loti*, 4. *B. elkani*, 5. *P. trifolii*, 6. *A. caulinodans*, 7. *D. neptuniae*. En la Figura 7 se describen los géneros: 1. *R. hainanense*, 2. *R. leguminosarum*, 3. *R. galegae*, 4. *R. etli*, 5. *R. lusitanum*, 6. *R. loessense*, 7. *R. giardinii*, 8. *R. mongolense*, 9. *R. indigoferae*, 10. *R. tropici*, 11. *R. yanglingense*, 12. *R. huautlense*, 13. *R. gallicum*, 14. *R. cellulosityticum*; las colonias características del género en estudio fueron aisladas y purificadas, para su uso y conservación.

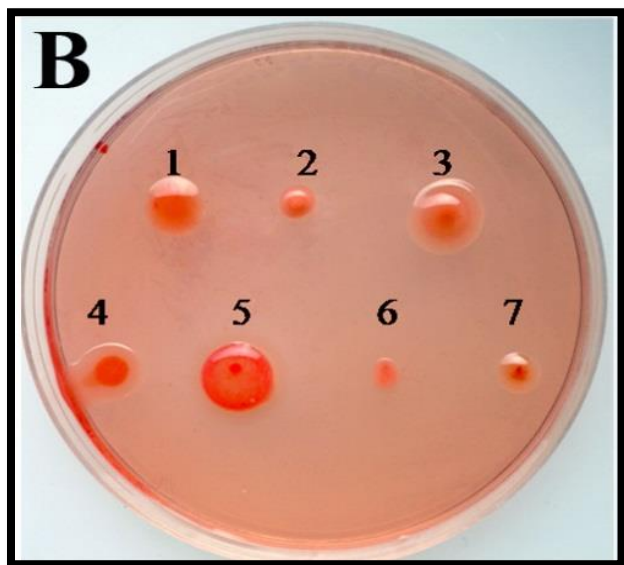


Figura 6. Tipo de cepas representativa de diferentes géneros de acuerdo a Robledo et al., (2012).

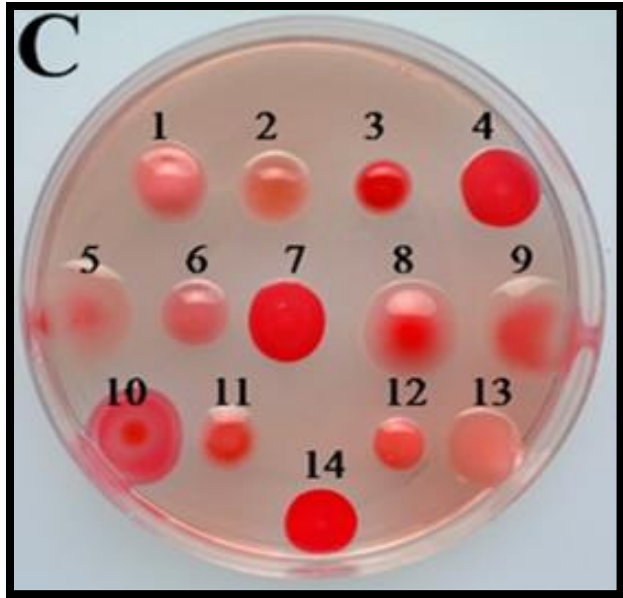


Figura 7. Tipos de cepas representativas del género *Rhizobium* de acuerdo a Robledo et al., (2012).

6.4.2 Identificación molecular

Los microorganismos obtenidos del aislamiento de las raíces con nódulos de frijol, se crecieron en cajas Petri con agar nutritivo por 48 horas a temperatura ambiente, se tomó una asada del aislado y se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 ml con 300 μ l de solución de lisis celular DNazol (Invitrogen, catalogo número 10503-027; Lote numero 52561707), se agitó suavemente e incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó 300 μ l de cloroformo frio y se mezcló vigorosamente, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos, se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril de 1.5 ml, se adicionó 225 μ l de etanol absoluto invirtiendo el tubo de 6 a 8 veces, posteriormente se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó por 4 minutos a 4000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se preparó una solución de lavado mezclando 171 μ l de DNazol y 129 μ l de etanol absoluto por cada muestra, la cual se agregó a la pastilla, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugó por 4 minutos a 4000 rpm. Se adicionó 300 μ l de etanol al 75% y se mezcló vigorosamente, se centrifugó por 4 minutos a 4000 rpm y se desechó el sobrenadante, se dejó secar

la pastilla, colocando el tubo de manera vertical durante 10 minutos, finalmente se diluyó el ADN en 70 µl de agua libre de nucleasas y se almacenó a -20°C después de verificar la integridad por electroforesis y calidad en el NanoDrop One/One© UV-VIS.

6.4.2.1 Verificación de la pureza de ADN.

La verificación de la pureza por espectrofotometría de ADN se realizó en un NanoDrop One/One© UV-VIS, se limpiaron los pedestales del NanoDrop con papel seda, se colocó 1 µl de blanco (agua libre de nucleasas) verificando que la lectura del blanco y que esta no tenga $A_{250} > 250$ nm, posteriormente se limpió de nuevo los pedestales con papel seda. Se dejaron las muestras a temperatura ambiente, se mezcló y colocó 1 µl del producto de la extracción de ADN genómico, de cada muestra, sobre el pedestal cuidando colocar todo el volumen y evitando la presencia de burbujas para no ocasionar error en la lectura y obtener una concentración errónea.

Se considera una que la pureza es óptima cuando la relación A_{260}/A_{280} del ADN tiene un valor entre 1.8-2.0 y aceptable con un valor >1.6 y <2.1 , en el ratio de A_{260}/A_{230} se considera que el ADN es puro cuando se sitúa en torno a 1.5-2.2, un ratio <1.5 indicará presencia de contaminantes en la muestra.

6.4.2.2 Electroforesis de ADN.

La visualización de los productos de la extracción de ADN se realizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v), teñido con GelRed, se utilizó 5 µl del marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen No. Cat. 10787-018), 5 µl del producto de la extracción de ADN y 3 µl de Buffer de carga, se utilizó un sistema de foto-documentación Chemidoc (Bio-Rad).

6.4.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El ADN genómico obtenido fue empleado para la identificación molecular mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se emplearon los oligonucleótidos F2C (5'-AGAGTTTGATCATGGCTC-3') y C (5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3') para amplificar un fragmento de aproximadamente 1500 pb de la región 16S del ADN ribosomal (Shi, 1997).

La amplificación se llevó a cabo en una reacción de 25 µl que contenía 5 µl de Buffer de Taq 10X, 2 µl de MgCl₂ (50 mM), 0.5 µl de una mezcla de dNTP's (10 mM), 0.5 µl de Taq Polimerasa (50 U/µl), 2 µl de cada oligo (10 µM) y 2 µl de ADN, el programa de amplificación consistió en 1 ciclo (95°C, 4 min), 32 ciclos (95°C, 1 min; 52°C, 1 min; 72°C, 2 min) y 1 ciclo (72°C, 5 min) en un termociclador (Bio-Rad C1000).

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v). Se utilizó 5 µl del marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen No. Cat. 10787-018), 5 µl del producto de PCR y 3 µl de Buffer de carga. Los factores programados en la fuente de poder de la cámara de electroforesis fueron los siguientes: 90 Volts y 500 mA por 60 minutos, se utilizó un sistema de foto-documentación Chemidoc (Bio-Rad).

Posteriormente, se realizó la purificación de los productos de PCR, utilizando el kit QIAquick® PCR Purification, siguiendo las indicaciones del fabricante, y su respectiva cuantificación espectrofotométrica, en un NanoDrop One, para su envío al proceso de secuenciación. El producto obtenido de la limpieza de las muestras de PCR, se envió al Laboratorio Nacional de Biotecnología

Agrícola, Médica y Ambiental Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C, en San Luis Potosí, México; para la secuenciación de ADN.

6.4.2.4 Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con el banco de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.gov>), utilizando la plataforma *BLASTn* para determinar la similitud de las secuencias obtenidas con organismos que mostraran una identidad mayor al 90%, como criterio de identificación. El árbol filogenético se construyó en el programa *MEGA X* con el método de máxima verosimilitud (Tavaré, 1986) y el modelo de sustitución de dos parámetros (Kimura, 1980). La solidez de la topología se evaluó mediante la prueba de *bootstrap* usando 1000 réplicas, se incluyeron las secuencias de cuatro aislados (A4, A6, A9 y A33) y cepas de referencia de los géneros más cercanos, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Pseudomonas*.

6.5 Selección de bacterias fijadoras de nitrógeno

6.5.1 Experimento 1

Las bacterias aisladas de raíces de frijol con nódulos fueron estudiadas *in planta*, el objetivo de este experimento fue evaluar las bacterias fijadoras de nitrógeno en cuanto a su capacidad de formar nódulos en raíces y promover el crecimiento de la planta, el ensayo se realizó según la metodología de Ángeles y Cruz, (2015).

Todas las bacterias aisladas, se cultivaron en caldo ELMARC a 220 rpm y temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) hasta alcanzar la densidad óptica (DO) de 0.500 – 0.600 a una

longitud de onda de 600 nm, se centrifugaron por una hora a 14000 rpm posteriormente se re-suspendieron en agua destilada estéril y se agregó un mililitro de la suspensión bacteriana sobre el sistema radicular de plantas de frijol.

Se emplearon semillas de frijol variedad azufrado higuera, las cuales desinfectaron por inmersión en una mezcla de cloro al 10% (v/v) durante 14 minutos, después se sumergieron en etanol al 70% (v/v) por un periodo de 5 minutos y finalmente se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril (1 minuto cada lavado). Las semillas germinadas fueron tratadas con inóculo de cada bacteria de forma individual, el bioensayo se realizó en charolas de 77 cavidades utilizando como sustrato vermiculita estéril. El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar y las plantas se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura a 25°C con lámparas adaptadas a un estante para lograr fotoperiodos de 8 horas luz y 16 horas oscuridad (Figura 8).

Las plantas se mantuvieron por 18 días de crecimiento después de ser inoculadas (13 de febrero de 2018 - 13 de marzo de 2018), se probaron los aislados bacterianos etiquetados como 9, 10, 14, 18, 21, 25, 25a, 3, se incluyó un control sin inocular. Los parámetros a evaluar fueron altura de planta, flores, vainas, biomasa fresca de la parte aérea y de raíces al final del experimento.



Figura 8. Plantas de frijol variedad azufrado higuera a los 10 días posterior a la siembra, crecidas bajo condiciones controladas.

6.5.2 Experimento 2

Las bacterias aisladas fueron estudiadas *in planta*, el objetivo de este experimento fue evaluar las bacterias etiquetadas como 4, 8, 21, se incluyó un control sin inocular, en cuanto a su capacidad de formar nódulos en raíces y promover el crecimiento. El ensayo se realizó según la metodología de Valdés (2018), todas las bacterias aisladas de raíces de frijol con nódulos fueron crecidas a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por 24 horas con agitación a 220 rpm en 300 ml de caldo PY (Peptona y extracto de levadura) + CaCl₂ 0.07M en matraces de 500 ml, tomando tres asadas de la caja con agar PY CaCl₂ 0.07M, se inoculó con 1 ml sobre el sistema radicular y 1 ml más sobre el sustrato de la planta.

Las semillas de frijol variedad azufrado regional se desinfectaron por inmersión en un tubo falcón de 50 ml en una mezcla de etanol al 70% (v/v) por 1 minuto, cloro al 10% (v/v) durante 10

minutos y finalmente se lavaron con agua destilada estéril, en agitación suave, donde se pudiera apreciar el movimiento del agua, durante 10 minutos, se descartó el agua, se repitió este procedimiento de lavado 10 veces.

Para la germinación de las semillas, se colocaron sobre papel filtro estéril dentro de cajas Petri con la humedad de 8 ml de agua destilada estéril, se acomodaron las semillas y se cerraron las cajas, se resguardaron por 48 horas en papel aluminio para que no pasara la luz, una vez que las semillas germinaron bajo condiciones asépticas, fueron transferidas a macetas de medio kilo utilizando como sustrato agrolita estéril y colocadas en un estante con lámparas adaptadas a un estante con fotoperiodos de 8 horas luz y 16 horas oscuridad bajo condiciones controladas de temperatura a 25°C.

El experimento tuvo una duración de ocho semanas (17 de junio de 2018 - 12 de agosto de 2018), se empleó un diseño completamente al azar con 3 macetas con 3 plantas cada una por tratamiento y fertilizadas tres veces por semana con solución Sommerfield (Figura 9). Los parámetros evaluados fueron altura de la planta, flores, vainas, biomasa fresca de parte aérea y de raíces al final del experimento.



Figura 9. Plantas de frijol variedad azufrado higuera, crecidas bajo condiciones controladas en macetas de medio kilo con sustrato agrolita estéril.

6.5.3 Experimento 3

El objetivo de este experimento fue evaluar las bacterias etiquetadas como 8, 21, 35 en cuanto a su capacidad para formar nódulos en raíces y promover el crecimiento de la planta, el ensayo se realizó empleando una combinación de la metodología de Ángeles y Cruz, (2015); y Valdés, (2018); las bacterias fueron crecidas a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por 24 horas con agitación a 220 rpm en 300 ml de caldo PY (Peptona y extracto de levadura) + CaCl₂ 0.07M en matraces de 500 ml tomando tres asadas de la caja con agar PY CaCl₂ 0.07M.

Las semillas de frijol variedad azufrado higuera se desinfectaron por inmersión en una mezcla de cloro al 10% (v/v) durante 14 minutos, después se sumergieron en etanol al 70% (v/v) por un periodo de 5 minutos y finalmente se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril (1 minuto cada lavado).

Las semillas germinadas fueron tratadas con inoculo de cada bacteria de forma separadas, se realizó en macetas de medio kilo utilizando como sustrato agrolita estéril, el experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar con 3 macetas con 4 repeticiones por cada tratamiento y fertilizadas tres veces por semana con solución Sommerfield bajo condiciones controladas de temperatura a 25°C con lámparas adaptadas a un estante con fotoperiodos de 8 horas luz y 16 horas oscuridad (Figura 10).

Este ensayo duró 7 semanas (18 de julio de 2018 - 6 de septiembre de 2018), los parámetros evaluados fueron igualmente altura de la planta, flores, vainas, biomasa fresca de parte aérea y de raíces al final del experimento.



Figura 10. Plantas de frijol variedad azufrado regional crecidas en macetas de medio kilo utilizando como sustrato agrolita estéril bajo condiciones controladas.

6.6 Evaluar a nivel maceta el efecto de un abono orgánico y las bacterias fijadoras de nitrógeno en el cultivo de frijol

6.6.1 Experimento 1

Las bacterias aisladas fueron estudiadas *in planta*, el objetivo de este experimento fue evaluar las bacterias fijadoras de nitrógeno etiquetadas como 4, 6, 8, 18a, 33 inoculados en la mezcla de fertilización orgánica y suelo agrícola como sustrato (1:1 v/v), se incluyó como control químico suelo sin inocular. Las bacterias fueron crecidas e inoculadas en la planta de la misma manera que se describió en la sección 6.5.3. Las semillas germinadas fueron tratadas con inoculo de cada bacteria de forma separadas, el experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar con 5 repeticiones por cada tratamiento bajo condiciones de invernadero, en macetas rectangulares de 75 cm de largo (Figura 11). Las plantas fueron fertilizadas dos veces por semana con solución Sommerfield, este ensayo inició el 24 de noviembre de 2018 y concluyó el 21 de marzo de 2019, coincidiendo con la temporada de siembra de frijol en esta región norte del estado de Sinaloa. Los parámetros a evaluar fueron altura de la planta, flores y vainas a los 60 días post siembra, biomasa fresca de parte aérea y raíces; y rendimiento en la cosecha.



Figura 11. Plantas de frijol variedad azufrado regional tratadas con inoculo de cada bacteria de forma separadas en una mezcla con fertilización orgánica y suelo agrícola como sustrato.

6.6.2 Análisis estadísticos.

Los resultados fueron sometidos a una prueba normalidad para indicar si se debe rechazar o no se puede rechazar la hipótesis nula de que los datos provienen de una población distribuida normalmente y para calcular la probabilidad de que una variable aleatoria de un conjunto de datos se distribuya de manera normal. Se realizó la prueba normalidad de Kolmogorov-Smirnov (K-S), si los datos cumplen con esta prueba de la distribución de forma normal. Se empleó un ANOVA y una comparación de medias Tukey y Dunnett con un nivel de significancia del 95%, los resultados fueron analizados usando el paquete estadístico SPSS. De lo contrario, al no cumplirse la hipótesis de la prueba de normalidad, el uso de pruebas no paramétricas resultó recomendable cuando los datos analizados no cumplen los supuestos de normalidad y se empleó la prueba Kruskal-Wallis y una prueba de medias de Wilcoxon con un nivel de significancia del 95%, usando el paquete estadístico SPSS.

7. RESULTADOS

7.1 Elaboración de un abono orgánico a partir de residuos de la industria alimentaria

Se elaboraron dos abonos orgánicos obtenidos a partir de la mezcla de desperdicios de maíz del proceso de enlatado de la industria alimentaria, estiércol de vaca y rastrojo de maíz, como fuente de carbono, y digeridos por *Eisenia foetida*. La mezcla activa fue evaluada a los 18 meses (abono 1) y 15 meses (abono 2), se midieron los parámetros pH, conductividad eléctrica, humedad, % de carbono, % de materia orgánica, relación carbono/nitrógeno, nitrógeno total (ver tabla 2). Además se midieron los macroelementos (nitrógeno amoniacal, fósforo y potasio total, magnesio, calcio, azufre soluble en agua y sodio) y los microelementos (hierro, zinc, manganeso, cobre y boro). Los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica se muestran en las tablas 3 y 4.

Tabla 2. Especificaciones Fisicoquímicas del Humus de Lombriz (Lombricomposta) de acuerdo con la norma NMX-FF-109-SCFI-2008 y comparación con los resultados de los abonos orgánicos analizados por el Laboratorio Agrícola “IBC ANALITYC MEXICO, S.A DE C.V”.

| Características | Valor (base seca) | Abono Orgánico 1 | Abono Orgánico 2 |
|-------------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Nitrógeno total (%) | De 1 a 4 | 0.656 | 1.080 |
| Materia orgánica (%) | De 20 a 50 | 27.78 | 30.46 |
| Relación C/N | ≤ 20 | 24.56 | 16.36 |
| Humedad (%) | De 20 a 40 | 61.08 | 63.49 |
| pH | De 5.5 a 8.5 | 8.58 | 8.33 |
| Conductividad eléctrica | ≤ 4 dS/m | 0.11 | 0.12 |

Tabla 3. Contenido de macroelementos de los abonos orgánicos.

| Macroelementos (%) | Abono Orgánico 1 | Abono Orgánico 2 |
|--|------------------|------------------|
| Nitrógeno Amoniacal (NH ₄ -N) | 0.081 | 0.098 |
| Fosforo total (P ₂ O ₅) | 0.875 | 1.152 |
| Potasio total (K ₂ O) | 2.370 | 3.35 |
| Magnesio (Mg) | 0.396 | 0.349 |
| Calcio (Ca) | 0.460 | 0.436 |
| Azufre soluble en agua (SO ₄ S) | 0.096 | 0.088 |
| Sodio (Na) | 0.078 | 0.021 |

Tabla 4. Contenido de microelementos de los abonos orgánicos.

| Microelementos (mg kg ⁻¹) | Abono Orgánico 1 | Abono Orgánico 2 |
|--|------------------|------------------|
| Fierro (Fe) | 13188 | 16364 |
| Zinc (Zn) | 2071 | 2228 |
| Manganeso (Mn) | 403 | 445 |
| Cobre (Cu) | 125 | 164 |
| Boro (B) | 60 | 80 |

Los resultados fueron comparados con los parámetros de referencia de la norma mexicana NMX-FF-109-SCFI-2008 sobre el HUMUS DE LOMBRIZ (LOMBRICOMPOSTA) - ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA, la cual sugirió de manera general el procedimiento practicado en la elaboración del abono orgánico o también denominado Humus de Lombriz (lombricomposta) al producto resultante de la transformación digestiva y metabólica de la materia orgánica, mediante la crianza sistemática de lombrices de tierra, debido a que esta norma mexicana establece las especificaciones de calidad que debe cumplir el humus de lombriz que se produce o se comercializa en territorio nacional y se excluye el humus de lombriz en presentación líquida. Sin embargo, se hizo también el análisis de los lixiviados, de ambos fertilizantes (tabla 5), pero no se emplearon debido a la exclusión citada en la norma anteriormente descrita. Se analizó en los lixiviados, el contenido de macro y micronutrientes presentes de los abonos orgánicos (tablas 6 y 7).

Tabla 5. Especificaciones fisicoquímicas de lixiviado de lombriz analizados por el Laboratorio Agrícola “IBC ANALITYC MEXICO, S.A DE C.V”.

| Características | Abono Orgánico 1 | Abono Orgánico 2 |
|-------------------------|------------------|------------------|
| Nitrógeno total (%) | 0.110 | 0.108 |
| Materia orgánica (%) | 0.46 | 0.50 |
| Relación C/N (%) | 2.45 | 2.69 |
| pH | 7.28 | 7.28 |
| Conductividad eléctrica | 4.48 | 5.39 |

Tabla 6. Contenido de macroelementos de lixiviado de lombriz.

| Macroelementos % | Abono Orgánico 1 | Abono Orgánico 2 |
|--|------------------|------------------|
| Nitrógeno Amoniacal (NH ₄ -N) | 0.032 | 0.027 |
| Fosforo total (P ₂ O ₅) | 0.090 | 0.142 |
| Potasio total (K ₂ O) | 0.396 | 0.394 |
| Magnesio (Mg) | 0.029 | 0.038 |
| Calcio (Ca) | 0.000 | 0.063 |
| Azufre soluble en agua (SO ₄ -S) | 0.036 | 0.039 |
| Sodio (Na) | 0.032 | 0.038 |

Tabla 7. Contenido de microelementos de lixiviado de lombriz.

| Microelementos % | Abono Orgánico 1 | Abono Orgánico 2 |
|------------------|------------------|------------------|
| Z Fierro (Fe) | 0.046 | 0.056 |
| Zinc (Zn) | 0.005 | 0.006 |
| Manganeso (Mn) | 0.004 | 0.004 |
| Cobre (Cu) | 0.006 | 0.006 |
| Boro (B) | 0.003 | 0.003 |

7.2 Aislamiento de cepas nativas de nódulos de frijol.

Se colectaron raíces de frijol con nódulos obtenidos de parcelas con siembra de frijol en etapa floración (50 a 60 días aproximadamente después de la siembra) ubicados en diferentes lotes de Ahome y El Fuerte en el ciclo agrícola otoño invierno 2016. Solamente se muestreó en lotes del municipio de Ahome en el ciclo agrícola otoño invierno 2017.

7.2.1 Ciclo agrícola 2016

Para el ciclo agrícola 2016 se muestrearon en total 83 lotes, 63 lotes corresponden al municipio de Ahome y 20 lotes pertenecen al municipio de El Fuerte. Se colectaron 25 raíces de frijol con nódulos, las cuales fueron guardadas en tubos Falcón de 50 ml con silica gel y algodón para su posterior tratamiento. Se obtuvieron 17 aislados bacterianos (Ver Anexo 1).

7.2.2 Ciclo agrícola 2017

Para el ciclo agrícola 2017, se realizaron muestreos en 32 lotes de suelos agrícolas con siembra de frijol en los municipios de Ahome. Se colectaron 115 raíces de frijol con nódulos, las cuales fueron guardadas en tubos Falcón de 50 ml con silica gel y algodón para su posterior tratamiento. Se obtuvieron 76 aislados bacterianos (Ver Anexo 2).

7.3 Identificación morfológica y molecular de los aislados obtenidos de los nódulos de frijol.

7.3.1 Identificación morfológica

Los nódulos obtenidos fueron procesados utilizando la metodología por Somesagaran y Hoben, (1994); se observó diariamente el crecimiento de las colonias de bacterias de acuerdo a la morfología (Figura 6 y Figura 7) que se describe por Robledo et al., (2012).

7.3.1.1 Ciclo agrícola 2016

Para el ciclo agrícola 2016 se procesaron 25 raíces de frijol con nódulos, desinfectadas y maceradas, de las cuales se obtuvieron 17 aislados con características similares al género *Rhizobium*, clasificados en 9 morfotipos como lo describió Robledo et al., 2012 (Ver tabla 8).

Tabla 8. Clasificación de los aislados bacterianos, colectados en 2016 de acuerdo a sus características morfológicas.

| Morfotipo | Cantidad de aislados | Crecimiento (2 a 5 días) | Color | Forma | Textura | Elevación | Margen |
|-----------|----------------------|--------------------------|---------|-----------------------|--------------------|-----------|----------|
| 1 | 1 | Abundante | Salmón | Circular | Puntiforme | Pulvinada | Entera |
| 1B | 1 | Ligero | Naranja | Puntiforme | Rígida | Convexa | Entera |
| 2 | 2 | Moderado | Rosáceo | Circular | Suave-Mucilaginoso | Pulvinada | Entera |
| 3 | 1 | Ligero | Rosáceo | Circular | Suave | Convexa | Entera |
| 6 | 3 | Moderado | Coral | Circular | Mucilaginoso | Pulvinada | Entera |
| 7 | 5 | Ligero | Naranja | Granular-Filamentosos | Plegada | Plana | Lobulada |
| 8 | 2 | Moderado | Rojo | Granular | Suave-Mucilaginoso | Convexa | Ondulada |
| 10 | 1 | Ligero | Rojo | Granular | Suave | Elevada | Ondulada |
| 12 | 1 | Ligero | Coral | Circular | Suave | Convexa | Entera |

7.3.1.2 Ciclo agrícola 2017

Para el ciclo agrícola 2017, se colectaron 115 raíces de frijol con nódulos, se desinfectaron, maceraron y estriadas en medio ELMARC. Después de su incubación y purificación se obtuvieron 76 aislados clasificados en 7 diferentes morfotipos de acuerdo a Robledo et al., (2012) (Ver tabla 9).

Tabla 9. Clasificación de los aislados bacterianos colectados en 2017 de acuerdo a sus características morfológicas.

| Morfotipo | Cantidad de aislados | Crecimiento (2 a 5 días) | Color | Forma | Textura | Elevación | Margen |
|-----------|----------------------|--------------------------|---------|------------|--------------------|-----------|----------|
| 3 | 3 | Ligero | Rosáceo | Circular | Suave | Convexa | Entera |
| 5 | 32 | Abundante | Rosáceo | Circular | Mucilaginosa | Elevada | Ondulada |
| 8 | 11 | Moderado | Rojo | Granular | Suave-Mucilaginosa | Convexa | Ondulada |
| 9 | 17 | Abundante | Rojo | Puntiforme | Suave | Plana | Lobulada |
| 10 | 1 | Ligero | Rojo | Granular | Suave | Elevada | Ondulada |
| 11 | 9 | Ligero | Rojo | Circular | Suave | Plana | Entera |
| 13 | 2 | Abundante | Rosáceo | Puntiforme | Suave | Plana | Entera |

7.3.2 Identificación molecular

Los microorganismos obtenidos del aislamiento de las raíces de frijol, con nódulos se crecieron en cajas Petri con agar nutritivo por 48 horas a temperatura ambiente, se realizó extracción de ADN de 13 aislados por el método de DNazol. Se consideró, solamente 1 aislado por cada morfotipo encontrado. La visualización de los productos de PCR se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% para poder visualizar las bandas bajo luz ultravioleta, y los resultados se documentaron en un fotodocumentador (Figura 12). Se limpió el producto de PCR bajo el protocolo de QUIAquick purification de QIAgen.

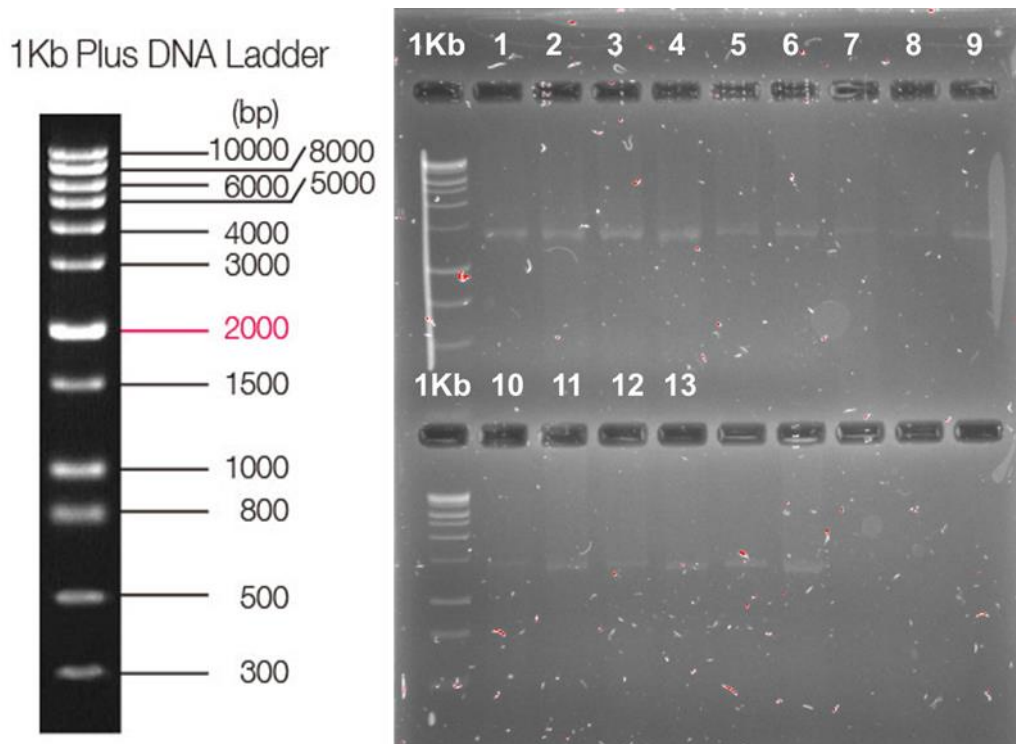


Figura 12. Gel de agarosa al 1% para verificar la amplificación de la región conservada 16S (~1500 pb) de 13 muestras de aislados de bacterias nodulares.

El análisis de las secuencias de la zona 16S del ADN ribosomal de los aislados A4, A6, A9 y A33 mostró una identidad del 100% a especies del género *Pseudomonas*. Se realizó un árbol filogenético con las secuencias de los aislados y con las secuencias de referencia obtenidas del *Genbank*; donde, el aislado A4 corresponde a *Pseudomonas* sp., A6 y A9 a *Pseudomonas azotoformans*, mientras que el aislado A33 a *Pseudomonas syringae* (Figura 13).

Tabla 10. Análisis de las secuencias otorgadas para bacterias formadoras de nódulos en el cultivo de frijol, de acuerdo al % de identidad otorgado por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés).

| Aislados | Descripción | % Identidad |
|----------|-----------------------------|-------------|
| 1 | <i>Pseudomonas sp.</i> | 100% |
| 2 | <i>Pseudomonas sp.</i> | 100% |
| 3 | <i>Stenotrophomonas sp.</i> | 100% |
| 4 | <i>Pseudomonas sp.</i> | 100% |
| 5 | NO SE IDENTIFICO | - |
| 6 | NO SE IDENTIFICO | - |
| 7 | NO SE IDENTIFICO | - |
| 8 | NO SE IDENTIFICO | - |
| 9 | <i>Pseudomonas sp.</i> | 100% |
| 10 | NO SE IDENTIFICO | - |
| 11 | NO SE IDENTIFICO | - |
| 12 | NO SE IDENTIFICO | - |
| 13 | <i>Chryseobacterium sp.</i> | 100% |

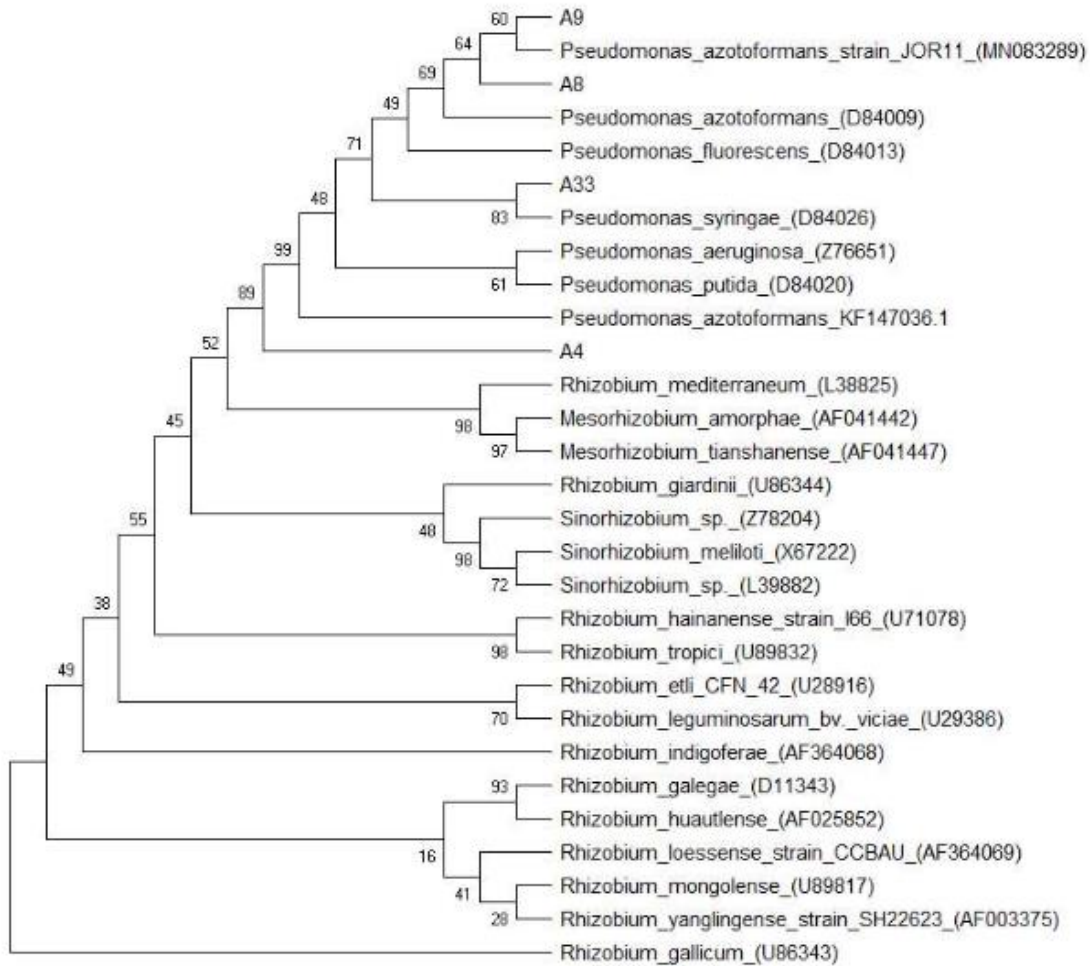


Figura 13. Relaciones filogenéticas de aislados basados en la secuencia 16S rDNA obtenidas con máxima verosimilitud con el modelo de sustitución de dos parámetros de Kimura y 1000 bootstraps.

7.4 Seleccionar bacterias fijadoras de nitrógeno

7.4.1 Experimento 1

Plantas de frijol variedad azufrado higuera fueron sembradas en charolas de 77 cavidades utilizando como sustrato vermiculita estéril. Después de 30 días, no se observa diferencia significativa en la altura de la planta (Figura 14), biomasa fresca de raíz (Figura 15) y hojas (Figura 16), ni en la cantidad de flores (Figura 17) y vainas (Figura 18) de plantas de frijol, en los aislados 10, 14, 21,25, 25a, 31 y 9 con respecto al control.

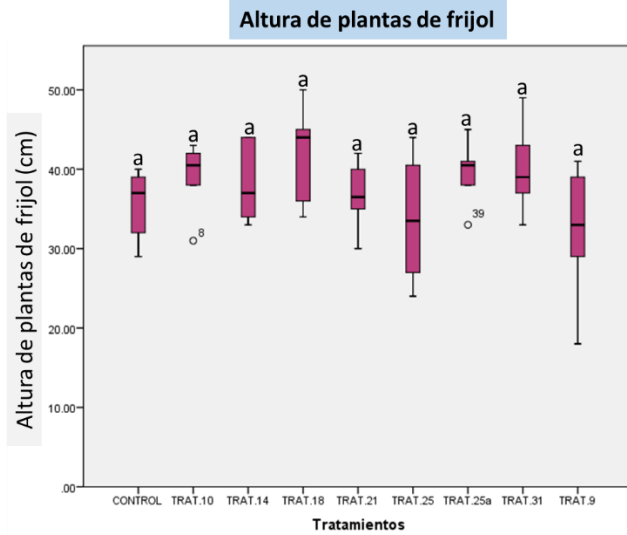


Figura 14. Alturas de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 10, 14, 21,25, 25a, 31, 9 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas. Los símbolos con número indican valores fuera del rango de la variable. Letras iguales indican no diferencia significativa (ANOVA; Tukey $\alpha= 0.05$; Dunnett $\alpha= 0.05$).

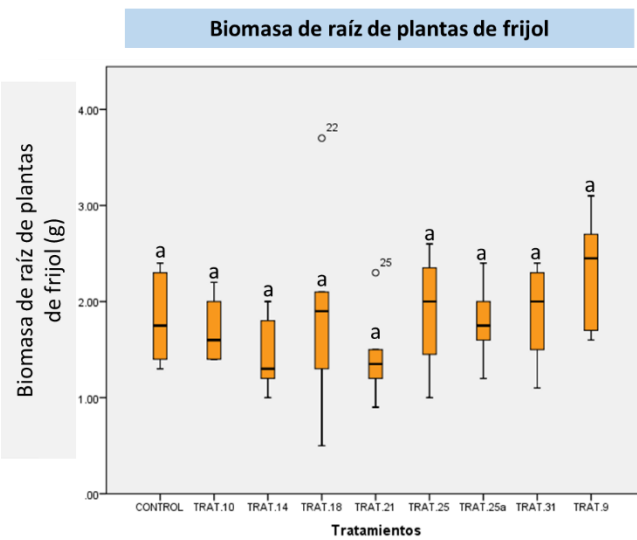


Figura 15. Biomasa de raíz de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 10, 14, 21,25, 25a, 31, 9 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas. Los símbolos con número indican valores fuera del rango de la variable. Letras iguales indican no diferencia significativa (ANOVA; Tukey $\alpha= 0.05$; Dunnett $\alpha= 0.05$).

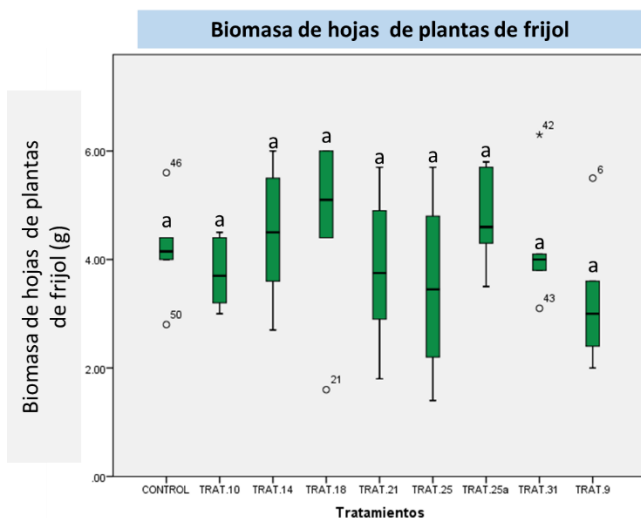


Figura 16. Biomasa de hojas de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 10, 14, 21,25, 25a, 31, 9 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas. Los símbolos con número indican valores fuera del rango de la variable. Letras iguales indican no diferencia significativa (ANOVA; Tukey $\alpha= 0.05$; Dunnett $\alpha= 0.05$).

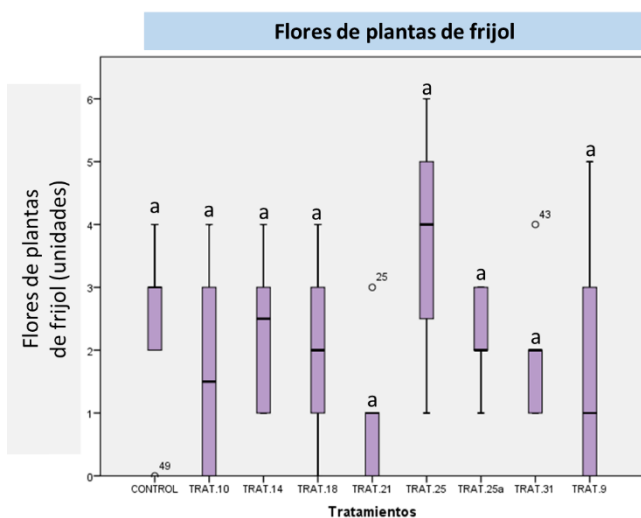


Figura 17. Cantidad de flores de plantas de frijol inoculadas con las bacterias tratamientos (10, 14, 21,25, 25a, 31, 9 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas. Los símbolos con número indican valores fuera del rango de la variable. Letras iguales indican no diferencia significativa (Kruskal-Wallis; Wilcoxon $\alpha=0.05$)

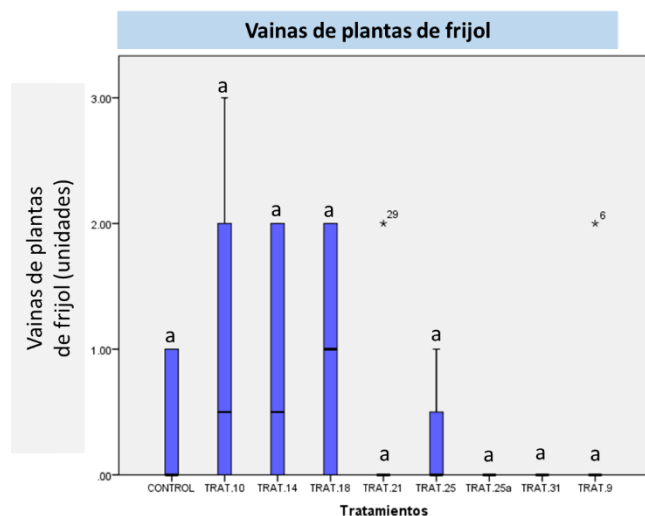


Figura 18. Cantidad de vainas de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 10, 14, 21,25, 25a, 31, 9 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas. Los símbolos con número indican valores fuera del rango de la variable. Letras iguales indican no diferencia significativa (Kruskal-Wallis; Wilcoxon $\alpha=0.05$).

7.4.2 Experimento 2

Las semillas de frijol variedad azufrado higuera se desinfectaron, se colocaron sobre papel filtro estéril húmedo dentro de cajas Petri, las semillas germinadas fueron transferidas a macetas de medio kilo utilizando como sustrato agrolita estéril y mantenidas en un estante con lámparas adaptadas a un estante con fotoperiodos de 8 horas luz y 16 horas oscuridad bajo condiciones controladas de temperatura a 25°C, el experimento tuvo una duración de ocho semanas.

Al finalizar el experimento a los 60 días post siembra, se evaluó la altura en centímetros que presentaron las plantas de frijol, el tratamiento 4 y el tratamiento 8 mostraron diferencias significativas con respecto al control sin inocular (Figura 19).

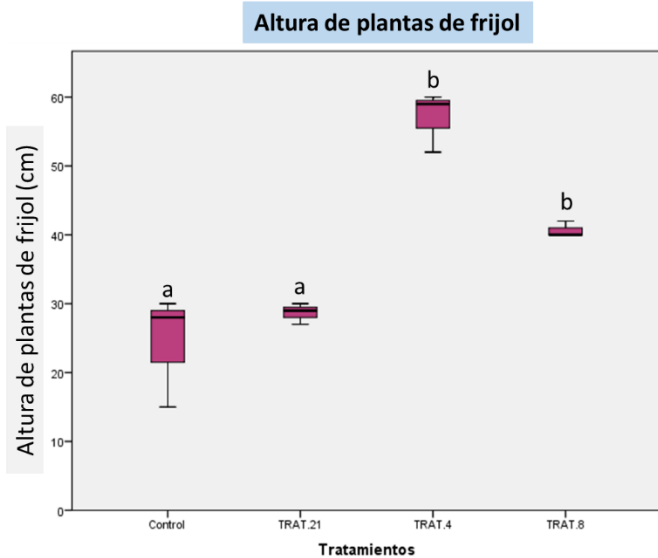


Figura 19. Altura de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 4, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas. Letras diferentes indican diferencia significativa (ANOVA; Tukey $\alpha= 0.05$; Dunnett $\alpha= 0.05$).

La biomasa de raíz de plantas de frijol, el tratamiento 4 mostró diferencias significativas respecto al control sin inocular (Figura 20).

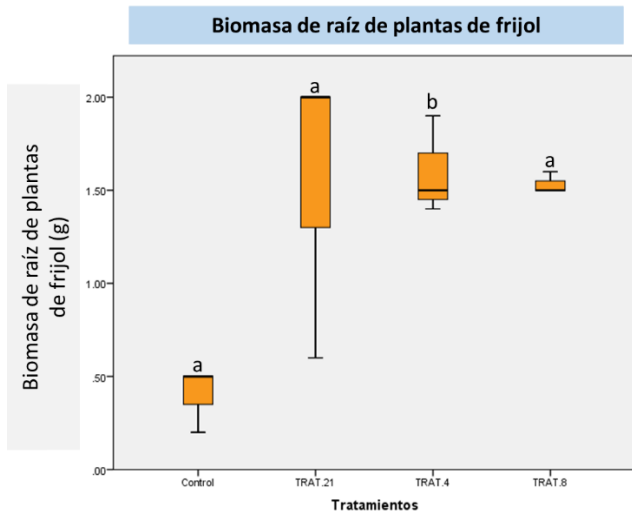


Figura 20. Biomasa de raíz de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 4, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas. Letras diferentes indican diferencia significativa. (ANOVA; Tukey $\alpha= 0.05$; Dunnett $\alpha= 0.05$).

Al realizar el análisis estadístico para la cantidad en gramos de biomasa de hojas de plantas de frijol después de ocho semanas de crecimiento, el tratamiento 4 y el tratamiento 8 presentaron

diferencias significativas con respecto al control sin inocular (Figura 21). Respecto a la cantidad de flores (Figura 22) y vainas (Figura 23), no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos.

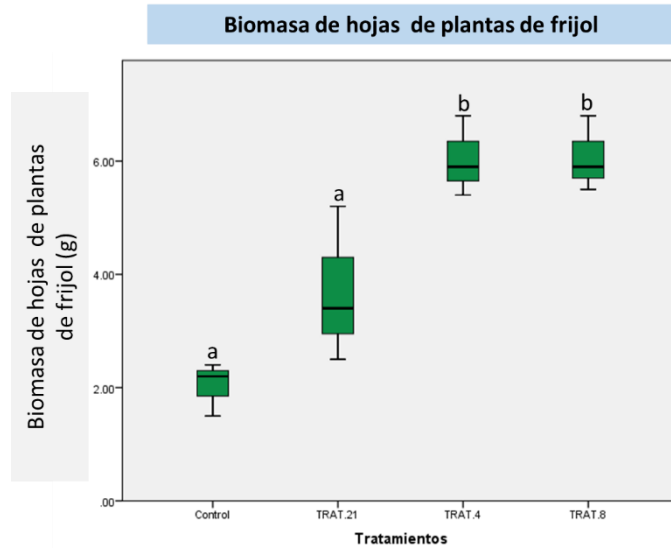


Figura 21. Biomasa de hojas de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 4, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas. Letras diferentes indican diferencia significativa (ANOVA; Tukey $\alpha= 0.05$; Dunnett $\alpha= 0.05$).

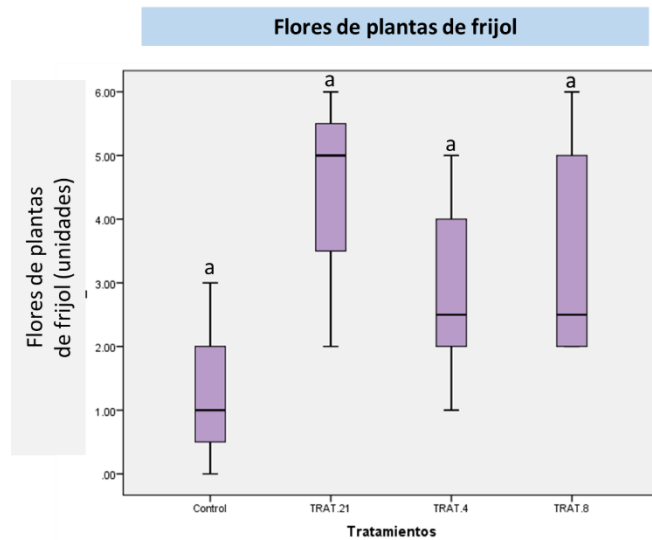


Figura 22. Cantidad de flores de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 4, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas. Letras iguales indican no diferencia significativa (ANOVA; Tukey $\alpha= 0.05$; Dunnett $\alpha= 0.05$).

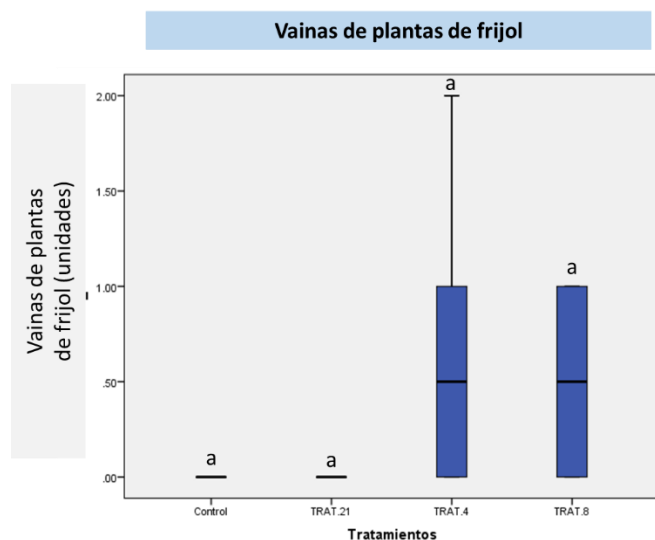


Figura 23. Cantidad de vainas de plantas de frijol inoculadas con las bacterias tratamientos (21, 4, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas. Letras iguales indican no diferencia significativa (ANOVA; Tukey $\alpha= 0.05$; Dunnett $\alpha= 0.05$).

7.4.3 Experimento 3

El experimento se realizó en macetas de medio kilo utilizando agrolita estéril como sustrato, bajo un diseño completamente al azar con 3 macetas con 4 repeticiones por cada tratamiento y fertilizadas tres veces por semana con solución Sommerfield bajo condiciones controladas con una duración de 7 semanas, después de este periodo se midió la altura de las plantas de frijol al final del experimento, los tratamientos 21 y 8 mostraron diferencias significativas con respecto al control sin inocular (Figura 24), solo el tratamiento 21 mostró diferencias significativas con respecto al control en cantidad de biomasa de raíz (Figura 25). Pero, no se observaron diferencias significativas en la biomasa de hoja, entre los tratamientos con respecto al control (Figura 26).

Al evaluar la cantidad de flores de las plantas de frijol al final del experimento, el tratamiento 21 mostró diferencias significativas entre los tratamientos al compararse con el control sin inocular (Figura 27). No se observó diferencias significativas en la cantidad de vainas entre los tratamientos (Figura 28).

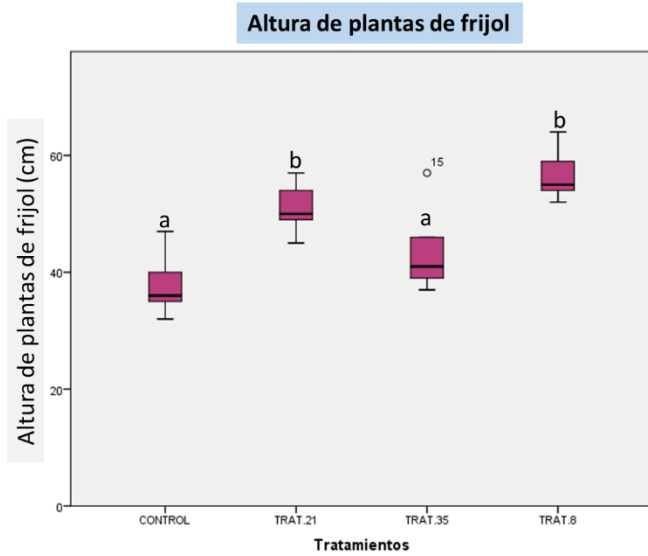


Figura 24. Altura de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 35, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas. Letras diferentes indican diferencia significativa (ANOVA; Tukey $\alpha= 0.05$; Dunnett $\alpha= 0.05$).

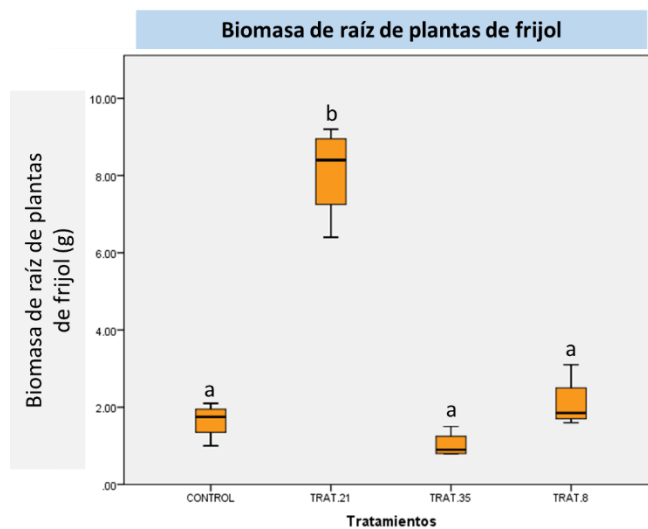


Figura 25. Biomasa de raíz de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 35, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas. Letras diferentes indican diferencia significativa (Prueba Kruskal-Wallis; Wilcoxon $\alpha=0.05$).

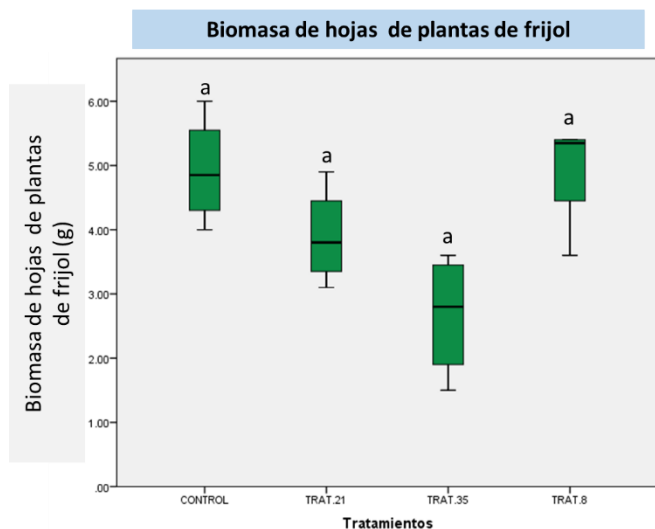


Figura 26. Biomasa de hojas de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 35, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas. Letras iguales indican no diferencia significativa (Prueba Kruskal-Wallis; Wilcoxon $\alpha=0.05$).

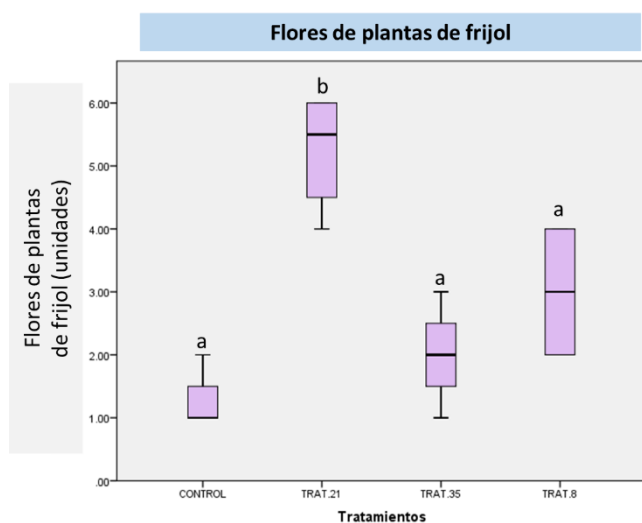


Figura 27. Cantidad de flores de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 35, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas. Letras diferentes indican diferencia significativa (Prueba Kruskal-Wallis; Wilcoxon $\alpha=0.05$).

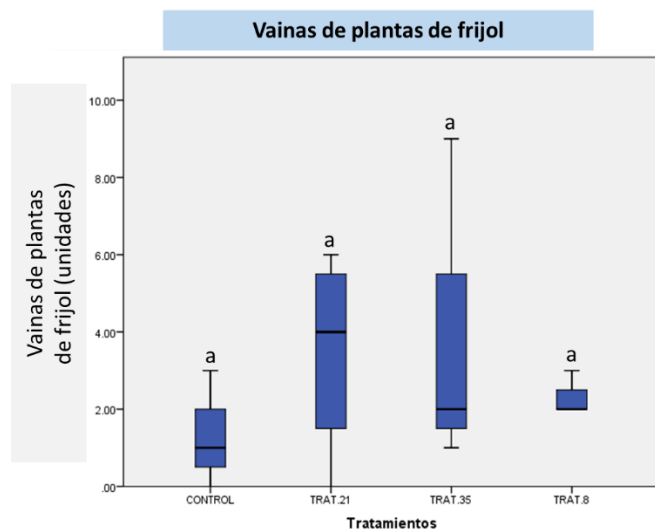


Figura 28. Cantidad de vainas de plantas de frijol inoculadas con las bacterias (tratamientos 21, 35, 8 y un control sin inocular), crecidas bajo condiciones controladas. Letras iguales indican no diferencia significativa (Prueba Kruskal-Wallis; Wilcoxon $\alpha=0.05$).

7.5 Evaluación del efecto, a nivel maceta, de un abono orgánico y las bacterias en plantas de frijol.

Se midió la altura, cantidad de flores y vainas, así como el rendimiento en gramos de plantas de frijol a los 60 días post inoculación, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas (Figura 29- 31).

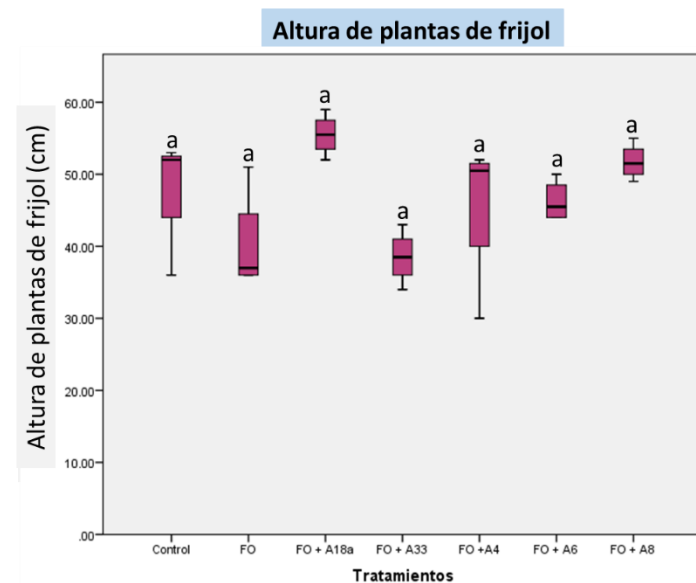


Figura 29. Alturas de plantas de frijol inoculadas con fertilización orgánica (FO) más las bacterias (tratamientos FO+A18a, FO+A33, FO+A4, FO+A6, FO+A8), un control (suelo 100%) y FO (fertilización orgánica 100%), crecidas

bajo condiciones de invernadero. Letras iguales indican no diferencia significativa (Prueba Kruskal-Wallis; Wilcoxon $\alpha=0.05$).

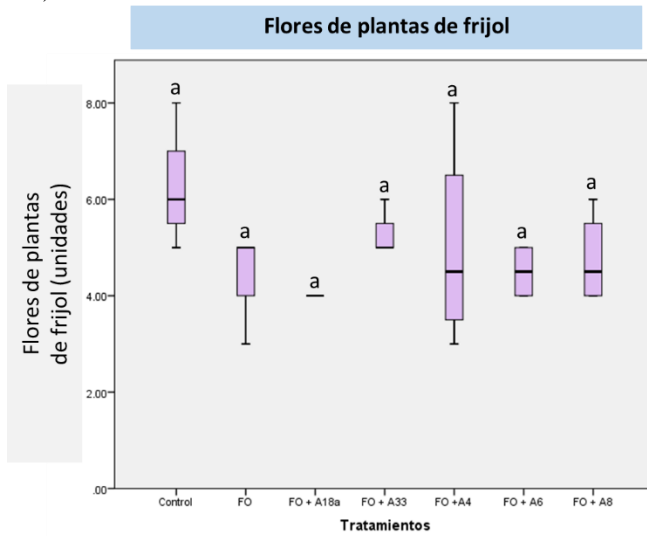


Figura 30. Cantidad de flores de plantas de frijol inoculadas con fertilización orgánica (FO) más las bacterias (tratamientos FO+A18a, FO+A33, FO+A4, FO+A6, FO+A8), un control (suelo 100%) y FO (fertilización orgánica 100%) crecidas bajo condiciones de invernadero. Letras iguales indican no diferencia significativa (Prueba Kruskal-Wallis; Wilcoxon $\alpha=0.05$).

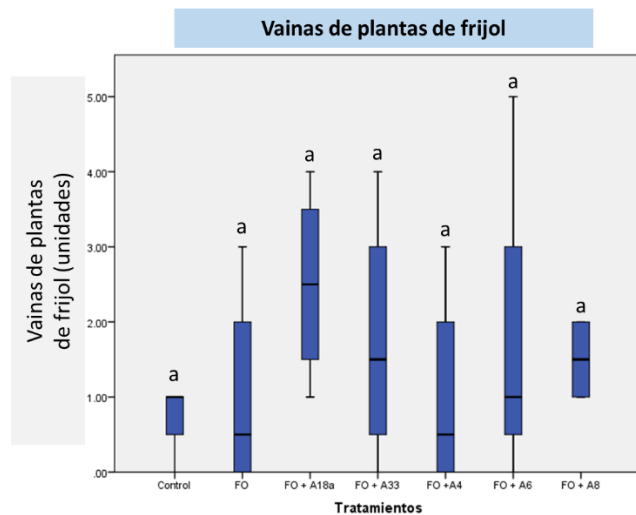


Figura 31. Cantidad de vainas de plantas de frijol inoculadas con fertilización orgánica (FO) más las bacterias (tratamientos FO+A18a, FO+A33, FO+A4, FO+A6, FO+A8), un control (suelo 100%) y FO (fertilización orgánica 100%) crecidas bajo condiciones de invernadero. Letras iguales indican no diferencia significativa (Prueba Kruskal-Wallis; Wilcoxon $\alpha=0.05$).

Al cuantificar el rendimiento de semillas de plantas de frijol, ninguno de los tratamientos que contienen las bacterias y la fertilización orgánica mostró un efecto similar al del control absoluto (100% suelo). Sin embargo, el tratamiento FO+A33 tiene un comportamiento similar con un potencial importante en cuanto a las necesidades nutricionales que pudiera tener el suelo con

respecto a la fertilización orgánica que contiene 50% de suelo y 50% de FO probados en condiciones de invernadero (Figura 32).

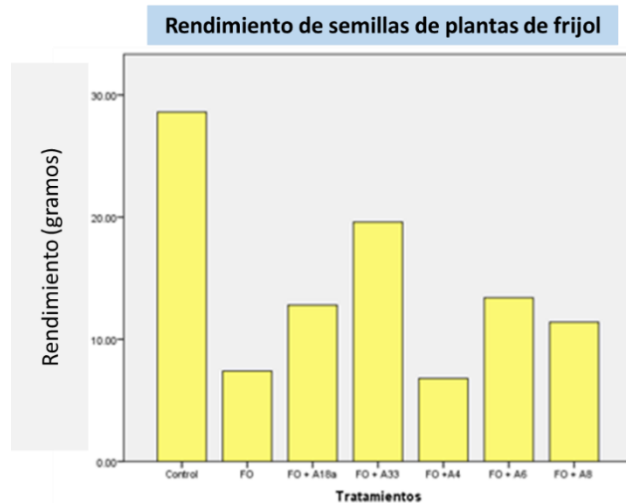


Figura 32. Rendimiento de semillas de plantas de frijol en gramos inoculadas con fertilización orgánica (FO) más las bacterias (tratamientos FO+A18a, FO+A33, FO+A4, FO+A6, FO+A8), un control (suelo 100%) y FO (fertilización orgánica 100%) crecidas bajo condiciones de invernadero.

8. DISCUSIÓN

Las actividades agrícolas en el Estado de Sinaloa son económicamente importantes pero también generan contaminación principalmente por el uso de fertilizantes, estos productos de origen sintético se utilizan en casi la totalidad de la superficie del estado. Así como, el aprovechamiento de los residuos de la industria alimentaria para la elaboración de abonos orgánicos y su aplicación en las prácticas agrícolas representan una alternativa para minimizar los impactos negativos derivados de la fertilización sintética, a su vez el uso de bacterias simbióticas en el cultivo de frijol capaces de fijar de nitrógeno atmosférico en combinación con los abonos orgánicos para mejorar el rendimiento de los cultivos.

8.1 Elaboración de un abono orgánico a partir de residuos de la industria alimentaria.

Existe actualmente una mayor preocupación ambiental en la sociedad, la cual demanda a la agroindustria a ser sensible con los temas ambientales y no producir a costa del planeta, sino de una manera sostenible; considerando que los subproductos agroindustriales generados desde el lugar de siembra y los que se derivan de su manejo y comercialización constituyen un problema creciente (Cury et al., 2017).

Existe también un mayor interés por el reciclaje de los residuos orgánicos, como una forma de devolver al suelo los elementos extraídos durante el proceso productivo y como una fuente de nutrientes para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Ramos et al., 2014). Por lo que el lombricompostaje es una estrategia viable para el aprovechamiento de los residuos de la industria agroalimentaria, que son generados en grandes cantidades, los cuales pueden ser utilizados en prácticas agrícolas, contribuyendo con esto al desarrollo sustentable. Pero es importante el análisis previo de los parámetros físico-químicos de éstos para asegurar su calidad.

En el presente trabajo, los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica fueron comparados con las especificaciones de la norma NMX-FF-109-SCFI-2008 para HUMUS DE LOMBRIZ (LOMBRICOMPOSTA) - ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA, la cual establece las especificaciones de calidad que debe cumplir el humus de lombriz que se produce o se comercializa en territorio nacional (Ver tabla 1). Se excluyen los resultados de la evaluación del humus de lombriz en presentación líquida, debido a la exclusión citada en la norma anteriormente descrita. Los abonos orgánicos presentaron un mayor contenido de humedad (>60%), fuera de los límites de la NMX-FF-109-SCFI-2008, ya que en ambos casos rebasa el

porcentaje permitido para este parámetro, el valor habitual establecido en regulaciones revisadas indica que es necesario secarlo antes de la venta, una composta madura debe tener una humedad entre 30% y 40% (Maso y Blasi, 2008). En cuanto a la materia orgánica, el contenido debe oscilar entre 20 y 25%, que es un valor más de lo que normalmente se encuentra en las compostas de esta naturaleza (Singh y Singh, 2017); mientras que la norma en mención cita de 20 a 50% por lo que la cantidad de materia orgánica en ambos abonos es aceptable. Una relación C/N de <20 indica un grado avanzado de estabilización de la materia orgánica y refleja un grado satisfactorio de desechos orgánicos (Lim et al., 2015), el abono orgánico 1 rebasa el valor permitido, lo que sugiere que el proceso de descomposición es lento lo que genera inmovilización de N por parte de los microorganismos (Figuroa et al., 2017), el abono orgánico 2 cumple con dicho parámetro. Los valores de pH obtenidos en los abonos orgánicos cumplen con el rango de referencia establecido de pH de 7 a 8.5 (Maso y Blasi, 2008). El contenido de nitrógeno total presente en la mezcla evaluada debe ser del 1 al 4% por lo que solo el abono orgánico 2 presentó 1.080% de nitrógeno, característica que a su vez cumple con la especificación. Sin embargo, la cantidad de N total fueron inferiores a lo deseable en un abono con estas características por lo que este caso, es necesario agregar residuos con mayores contenidos de N para mejorarlo (Palma et al., 2016). Por último, la conductividad eléctrica para ambos abonos orgánicos es baja, es preferible que los valores sean bajos puesto que la existencia de sales está asociada con la concentración de elementos como el sodio y potasio así como también compuestos de cloruro, nitrato, sulfato y sales de amonio que en concentraciones elevadas inhiben el crecimiento de las plantas (Hanníbal et al., 2016).

De acuerdo a las características presentadas en el análisis, se considera al abono 2 como una mezcla estable, lo cual es recomendable debido a su calidad de producción y su factible

comercialización en el territorio nacional. A pesar de que el abono 1 se mantuvo por más tiempo desde su elaboración en comparación con el abono 2, no se logró la estabilidad requerida, esto pudo haber estado influenciado por las características climatológicas que prevalecieron durante el desarrollo de éstos.

Los nutrientes para los cultivos agrícolas representan un componente elemental en la producción mundial de alimentos, los cuales pueden ser obtenidos de los fertilizantes químicos sintéticos, fertilizantes naturales y abonos orgánicos, entre otras fuentes (Rodríguez y Hernández, 2012). Los abonos orgánicos se han recomendado en aquellas tierras sometidas a cultivo intenso para mantener y mejorar la estructura del suelo, aumentar la capacidad de retención de humedad y facilitar la disponibilidad de nutrimentos para las plantas (Mtz et al., 2001). La lombricomposta mejora la absorción de nutrientes por las plantas (Adhikary, 2012).

Los abonos orgánicos comerciales deben tener valores totales mayores de 1% para cada uno de los nutrientes N, P₂O₅, K₂O (Pérez et al., 2010). Una lombricomposta contiene en promedio de 1.5% - 2.2% de nitrógeno, 1.8% - 2.2% fósforo y 1.0% - 1.5% potasio (Adhikary, 2012), el contenido de nitrógeno de ambos abonos orgánicos está por debajo del porcentaje esperado, este elemento se encuentra en los estiércoles como material orgánico y requiere de una mineralización previa que puede durar semanas hasta meses para estar disponible a las plantas (Romero et al., 2015) y es un elemento útil para conocer la calidad, seguido del contenido de fósforo (Bernui y Rivero, 2017). Sin embargo la cantidad de nitrógeno amoniacal cambia su valor con el paso de los días por efectos del pH en la mezcla (Liu et al., 2011).

El % de fosforo y potasio total son mayores los resultados obtenidos en los dos abonos caracterizados, las cantidades de magnesio, calcio y sodio son menores a lo reportado por (Olivares et al., 2012), sucede algo similar en las cantidades de fierro, zinc, manganeso y cobre en ambos abonos orgánicos reportados en mg/kg.

Un abono con características similares en sus componentes presenta cantidades de fósforo de 1.5% y potasio de 1.6%, al ser comparados con los resultados obtenidos de las mezclas de los abonos 1 y 2 respectivamente (Rodríguez y Hernández, 2012), las cantidades de fósforo evaluadas se encuentran en el rango del abono orgánico 2. Ambos abonos, presentan valores de potasio (>1.6%) en su composición (Bernui y Rivero, 2017).

En los micronutrientes, la presencia de zinc se reporta en 89 (mg/kg), cobre 57 (mg/kg), hierro 412 (mg/kg) y manganeso 98 (mg/kg) tomados como referencia se observa presentan valores mayores por lo que se requiere revisar estos parámetros debido a su importancia en pequeñas cantidades para mejorar el crecimiento de las plantas, ya que en mayor concentración, es probable que tengan efectos desfavorable sobre el crecimiento de las plantas (Lim et al., 2015).

8.2 Aislamiento de cepas nativas asociados a la rizósfera de frijol a partir de nódulos, En el ciclo agrícola 2016, se obtuvieron 17 muestras con morfología colonial similar a bacterias del género *Rhizobium*, se encontraron 9 morfotipos (Robledo et al., 2012). Se realizó un segundo muestreo, donde se obtuvieron 76 muestras que tienen morfología colonial similar a bacterias del género *Rhizobium*, se encontraron 7 morfotipos (Robledo et al., 2012) en el ciclo agrícola 2017. En ambos muestreos, se logró coleccionar 93 aislados obtenidos de nódulos de frijol en suelos del

municipio los cuales, podrían tener potencial participación en la fijación biológica de nitrógeno atmosférico.

8.3. Identificación morfológica y molecular de los aislados obtenidos de los nódulos de frijol.

El nitrógeno es el principal nutriente que limita el crecimiento en las plantas, la mayoría de lo obtienen a través de bacterias fijadoras y descomposición microbiana de material vegetal y animal (Behie et al., 2012). Particularmente, la asociación entre las especies del género *Rhizobium* y las leguminosas como el frijol representa una fuente renovable de nitrógeno para la agricultura, razón por la cual este estudio fue dirigido principalmente a nódulos, la estructura resultante de la interacción simbiótica. Esto como un primer paso en la búsqueda de especies bacterianas que puedan ser empleadas en los sistemas agrícolas y con ello contribuir en un futuro a minimizar el uso de fertilizantes nitrogenados inorgánicos, la sustentabilidad de la tierra y la reducción de los gases de efecto invernadero (Black et al., 2012). En este estudio, se obtuvieron 4 aislados a partir de nódulos de frijol; basados solo en la caracterización morfológica dichos aislados son similares al género *Rhizobium*, siguiendo la descripción de Robledo et al., (2012). Sin embargo al llevar a cabo la identificación molecular se observa que corresponden al género *Pseudomonas* con un 100% de identidad (Figura 13). Durante décadas, los rizobios se describieron como los únicos habitantes de los nódulos de leguminosas, pero otras bacterias, diferentes a los típicos rizobios, se encuentran a menudo dentro de los nódulos (De Meyer et al., 2015; Lu et al., 2017; Ríos et al., 2019), las cuales pueden agruparse como bacterias inductoras de nódulos no-rizobiales y endófitos no formadores de nódulos (Martínez-Hidalgo y Hirsch, 2017). El género *Pseudomonas* ha sido identificado como las inductoras de nódulos no rizobiales que habitan dentro de los nódulos de las

leguminosas, las cuales contienen genes *nod* y *nif*, dichos genes desencadenan la formación nódulos y fijación de nitrógeno atmosférico (Martínez-Hidalgo y Hirsch, 2017; Tokgöz, 2018).

Se ha reportado previamente a *Pseudomonas* como un grupo dominante de bacterias asociadas a nódulos de soya (Tokgöz, 2018). El presente trabajo reporta a *Pseudomonas* sp., *P. azotoformans* y *P. syringae*; *P. azotoformans* se ha relacionado con fijación de nitrógeno principalmente en cereales (Fang et al., 2016; Fendri et al., 2010; Nonakaran et al., 2015) y como agente de control biológico (Fang et al., 2016). La presencia de esta bacteria puede deberse a que en los lotes agrícolas muestreados, tradicionalmente se siembra maíz (primavera verano), seguido por el cultivo de frijol (otoño-invierno).

Algunos patovares de *P. syringae* se han reportados como patógenos en cultivos de importancia económica, pero también cepas de esta especie son promotoras del crecimiento vegetal (Blakney y Patten, 2011; Wensing et al., 2010; Zafar-ul-Hye et al., 2014). Previamente se ha reportado el aislamiento de una cepa de *P. syringae* en nódulos de la leguminosa *Medicago truncatula* (Zakhia et al., 2006), lo cual sugiere que además de epífita es también endófito. En nuestro entendimiento, el presente trabajo reporta por primera vez a *P. syringae* y *P. azotoformans* aisladas de nódulos de frijol. El conocimiento de los endófitos de los nódulos puede abrir nuevas vías para el control biológico de enfermedades y promoción del crecimiento de las plantas. Estudios adicionales que comprendan la función de dichos aislados y el potencial para ser utilizados en prácticas agrícolas son requeridos.

8.3 Selección de bacterias fijadoras de nitrógeno en el cultivo de frijol, en la selección de bacterias fijadoras de nitrógeno.

En el experimento 1, de acuerdo con diversos estudios y metodologías reportadas con bacterias fijadoras de nitrógeno con capacidad de formar nódulos en raíces de frijol, los resultados son contrarios a lo esperado particularmente para la metodología de Ángeles y Cruz, 2015 empleada en esta prueba.

Se destaca que los cambios en el pH, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura y el estado del agua, entre otros factores, influyen considerablemente en el crecimiento, la supervivencia y actividad metabólica de las bacterias fijadoras de nitrógeno por tanto se modificó las condiciones del experimento (Ghasem et al., 2012). En algunos factores como la composición del suelo, el contenido de agua, la temperatura y el pH también pueden influir en el crecimiento de plantas-rizobios-nódulos y con la disminución del desarrollo de nódulos y la fijación de nitrógeno, por lo que al poner el siguiente experimento se cuidó que sustrato y condiciones óptimas para el desarrollo exitoso del siguiente experimento (Haag et al., 2013).

En el experimento 2, parte del objetivo 4. Se reporta que la inoculación de la planta de frijol con diferentes aislados de rizobios presentó un aumento de forma significativa el peso de la biomasa de las hojas y el peso de la biomasa de la raíz entre los aislados probados comparado con el control (Kawaka et al., 2014).

De forma similar a los resultados obtenidos se ha observado el efecto de la inoculación en el frijol común en los factores de crecimiento como la altura de la planta, la longitud de la raíz, la

biomasa de la raíz y hojas revelaron el efecto significativo de todas las bacterias aisladas en comparación con el control (Parandian y Samavat, 2012). Así como, al medir la altura de las plantas mostrando diferencias significativas en los tratamientos inoculados respecto al control en pruebas en invernadero, en cuanto al volumen de la raíz que no se vio afectado estadísticamente por ningún tratamiento opuesto a lo sucedido en este experimento (Armenta et al., 2016).

En el experimento 3, se observó que todos los aislamientos son capaces de formar nódulos en las raíces de las plantas huésped inoculadas que varían en tamaño, número y peso seco (Rahmani et al., 2011). Sin embargo, la cantidad de flores no es reportada en la literatura como un parámetro de interés para los efectos de los aislados bacterianos probados *in planta*.

8.5. Evaluación a nivel maceta el efecto de un abono orgánico y las bacterias fijadoras de nitrógeno en el cultivo de frijol.

Sin embargo, En la literatura destacan resultados positivos al realizar evaluaciones en planta, contrario a lo observado al utilizar suelo en macetas inoculados con bacterias fijadoras de nitrógeno, lo que sugiere revisar otros factores como acidez, toxicidad de aluminio y manganeso, la disponibilidad de fósforo en el suelo, la temperatura ambiente y la competencia con cepas nativas, también afectan significativamente la capacidad de nodulación y de fijación biológica del nitrógeno por esta leguminosa (Costales et al., 2016).

En el presente estudio, no se observaron diferencias significativas en las variables evaluadas (altura de planta, cantidad de flores y vainas, y rendimiento de granos de frijol), aunque ya se conoce sobre los efectos positivos de la adición de abono orgánico mejora todas las características

de la planta en comparación con los otros tratamientos incluso en comparación con el tratamiento control (Fernandez et al., 2016).

9. CONCLUSIONES

De los abonos orgánicos evaluados, el abono 2 mostró estabilidad en los parámetros fisicoquímicos de acuerdo con la especificación de la norma NMX-FF-109-SCFI-2008 y referenciando los datos obtenidos con otros autores. Los parámetros fisicoquímicos, indican de manera global que uno de los abonos generados en esta investigación tiene potencial para su uso en cultivos agrícolas. Los abonos orgánicos analizados no presentaron estabilidad en su calidad nutricional en el contenido de nitrógeno, se sugiere para que los abonos orgánicos pueden comercializarse deben tener valores totales mayores de 1% para cada uno de los nutrientes N, P₂O₅, K₂O.

Se obtuvieron 93 aislados de los dos muestreos realizados en los ciclos otoño – invierno de 2016 y 2017, se caracterizaban en 13 morfotipos diferentes para el género *Rhizobium*. Al concluir la caracterización molecular de los aislados, los resultados difieren con los resultados arrojados por la caracterización morfológica. El presente estudio soporta la evidencia de que especies diferentes a rizobios son capaces de colonizar nódulos; en este caso *P. azotoformans* y *P. syringae* por primera vez en nódulos de frijol, las cuales pueden tener roles en la fijación biológica del nitrógeno y/o en el control de enfermedades de plantas, sin embargo estudios adicionales son requeridos para demostrar el potencial de éstas especies.

10. REFERENCIAS

- Adhikary, S. (2012). Vermicompost, the story of organic gold: A review. *Agricultural Sciences*, 3(7), 905.
- Angeles-Núñez, J. G., & Cruz-Acosta, T. (2015). Aislamiento, caracterización molecular y evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de fríjol. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(5), 929-942.
- Antomarchi, A. B., Fabre, B., & Hernandez, Y. M. (2015). Efecto de la aplicación de abonos orgánicos en la respuesta agroproductiva del cultivo de habichuela (*Vigna unguiculata* L.). *Centro Agrícola*, 42(2), 11-16.
- Armenta-Bojórquez, A. D., Roblero-Ramírez, H. R., Camacho-Báez, J. R., Mundo-Ocampo, M., Garcia-Gutierrez, C., & Armenta-Medina, A. (2016). Organic versus synthetic fertilisation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Mexico. *Experimental agriculture*, 52(1), 154-162.
- Baginsky, C., Brito, B., Scherson, R., Pertuzé, R., Seguel, O., Cañete, A., . . . Johnson, W. E. (2015). Genetic diversity of *Rhizobium* from nodulating beans grown in a variety of Mediterranean climate soils of Chile. *Archives of microbiology*, 197(3), 419-429.
- Behie, S., Zelisko, P., & Bidochka, M. (2012). Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science*, 336(6088), 1576-1577.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology*, 35(4), 1044-1051.
- Bernui, F., & Rivero, J. (2017). Obtención de abono orgánico (compost) a partir de desechos agroindustriales y su influencia en el rendimiento del cultivo *Zea Mays*. *Revista Ciencia y Tecnología*, 12(1), 45-56.

- 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(1), 66.
- Bhattacharjee, R., & Dey, U. (2014). Biofertilizer, a way towards organic agriculture: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 8(24), 2332-2343.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.
- Black, M., Moolhuijzen, P., Chapman, B., Barrero, R., Howieson, J., Hungria, M., & Bellgard, M. (2012). The genetics of symbiotic nitrogen fixation: comparative genomics of 14 rhizobia strains by resolution of protein clusters. *Genes*, 3(1), 138-166.
- Blakney, A. J., & Patten, C. L. (2011). A plant growth-promoting pseudomonad is closely related to the *Pseudomonas syringae* complex of plant pathogens. *FEMS microbiology ecology*, 77(3), 546-557.
- Blanco, W. A. Q., Sandoval, E. H. P., & Torres, D. F. (2016). Evaluación del crecimiento de fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.) CV ICA Cerinza, bajo estrés salino. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 19(1).
- Boraste, A., Vamsi, K., Jhadav, A., Khairnar, Y., Gupta, N., Trivedi, S., . . . Mujapara, A. (2009). Biofertilizers: A novel tool for agriculture. *International Journal of Microbiology Research*, 1(2), 23.
- Camacho-Espinoza, M. K., Peinado-Guevara, L. I., López-Valenzuela, J. Á., Valdez-Ortiz, Á., Salinas-Pérez, R. A., Moreno-Herrera, C. G., & Medina-Godoy, S. (2010). Caracterización

- proteómica de granos de frijol azufrado (*Phamseolus Vulgaris*) cultivados en el estado de Sinaloa. *Ra Ximhai*, 6(1), 23-36.
- Camelo, M., Vera, S. P., & Bonilla, R. R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Ciencia y tecnología agropecuaria*, 12(2), 159-166.
- Campos, M. N., Fernández, C. G.-G., Cárdenas, O. L., Diéguez, E. T., & Sevilla, P. M. (2010). Análisis de la producción agrícola extensiva en Sinaloa: alternativas para el uso sostenible del agua. *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible*, 6(1), 45-50.
- Costales, D., Falcón, A. B., Nápoles, M. C., de Winter, J., Gerbaux, P., Onderwater, R. C. A., . . . Cabrera, J. C. (2016). Effect of chitosaccharides in nodulation and growth in vitro of inoculated soybean. *American Journal of Plant Sciences*, 7(9), 1380-1391.
- Cury, K., Aguas, Y., Martinez, A., Olivero, R., & Ch, L. C. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 122-132.
- De Bruijn, F. J. (2015). Biological nitrogen fixation *Principles of plant-microbe interactions* (pp. 215-224): Springer.
- De Meyer, S. E., De Beuf, K., Vekeman, B., & Willems, A. (2015). A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry*, 83, 1-11.
- de Souza, J. W. M., Shiki, S. d. F. N., & Pereira, P. A. R. (2015). DESARROLLO SUSTENTABLE. Un índice para el Circuito Turístico Trilha dos Inconfidentes–Minas Gerais, Brasil. *Estudios y perspectivas en turismo*, 24(3), 547-569.

- Escobedo Urias, D. C. (2010). *Diagnóstico y descripción del proceso de eutrofización en lagunas costeras del norte de Sinaloa*. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- Fang, Y., Wu, L., Chen, G., & Feng, G. (2016). Complete genome sequence of *Pseudomonas* azotoformans S4, a potential biocontrol bacterium. *Journal of biotechnology*, 227, 25-26.
- Fendri, I., Chaari, A., Dhouib, A., Jlassi, B., Abousalham, A., Carrière, F., . . . Abdelkafi, S. (2010). Isolation, identification and characterization of a new lipolytic *Pseudomonas* sp., strain AHD-1, from Tunisian soil. *Environmental technology*, 31(1), 87-95.
- Fernandez, A. L., Sheaffer, C. C., Wyse, D. L., Staley, C., Gould, T. J., & Sadowsky, M. J. (2016). Structure of bacterial communities in soil following cover crop and organic fertilizer incorporation. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(21), 9331-9341.
- Figueroa Barrera, A., Álvarez Herrera, J. G., Forero, A. F., Salamanca, C., & Pinzón, L. P. (2017). Determinación del nitrógeno potencialmente mineralizable y la tasa de mineralización de nitrógeno en materiales orgánicos.
- Fortis-Hernández, M., Leos-Rodríguez, J. A., Preciado-Rangel, P., Orona-Castillo, I., García-Salazar, J. A., García-Hernández, J. L., & Orozco-Vidal, J. A. (2009). Aplicación de abonos orgánicos en la producción de maíz forrajero con riego por goteo. *Terra Latinoamericana*, 27(4), 329-336.
- Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and soil*, 321(1-2), 35-59.
- García-Fraile, P., Menéndez, E., & Rivas, R. (2015). Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry.

- Ghasem, F., Poustini, K., Besharati, H., Mohammadi, V., ABOOEI, M. F., & Goettfert, M. (2012). PRE-INCUBATION OF SINO RHIZOBIUM MELILOTI WITH LUTEOLIN, METHYL JASMONATE AND GENISTEIN AFFECTING ALFALFA (MEDICAGO SATIVA L.) GROWTH, NODULATION AND NITROGEN FIXATION UNDER SALT STRESS CONDITIONS.
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1127500.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., & Singh, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J Microb Biochem Technol*, 7(2), 096-102.
- Haag, A. F., Arnold, M. F., Myka, K. K., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Zanda, M., . . . Ferguson, G. P. (2013). Molecular insights into bacteroid development during Rhizobium-legume symbiosis. *FEMS microbiology reviews*, 37(3), 364-383.
- Hanníbal, B., Rafaela, V., & Guevara, L. (2016). Obtención de compost a partir de residuos sólidos orgánicos generados en el mercado mayorista del Cantón Riobamba. *European Scientific Journal*, 12, 76-94.
- Hernández-López, V. M., Vargas-Vázquez, M., Luisa, P., Muruaga-Martínez, J. S., Hernández-Delgado, S., & Mayek-Pérez, N. (2013). Origen, domesticación y diversificación del frijol común: Avances y perspectivas. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(2), 95-104.
- Hernández-Rodríguez, O. A., Ojeda-Barrios, D. L., López-Díaz, J., & Arras-Vota, A. (2010). Abonos orgánicos y su efecto en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. *Tecnocienc. Chihuahua*, 4, 1-6.

- Herrán, J. A. F., Torres, R. R. S., Martínez, G. E. R., Ruiz, R. M., & Portugal, V. O. (2008). Importancia de los abonos orgánicos. *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible*, 4(1), 57-68.
- Jha, C. K., & Saraf, M. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Journal of Agricultural Research and Development*, 5(2), 108-119.
- Kawaka, F., Dida, M. M., Opala, P. A., Ombori, O., Maingi, J., Osoro, N., . . . Muoma, J. (2014). Symbiotic efficiency of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in soils of Western Kenya. *International Scholarly Research Notices*, 2014.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111-120.
- Korir, H., Mungai, N. W., Thuita, M., Hamba, Y., & Masso, C. (2017). Co-inoculation effect of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria on common bean growth in a low phosphorus soil. *Frontiers in plant science*, 8, 141.
- Lambrecht, M., Okon, Y., Broek, A. V., & Vanderleyden, J. (2000). Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. *Trends in microbiology*, 8(7), 298-300.
- Lim, S. L., Wu, T. Y., Lim, P. N., & Shak, K. P. Y. (2015). The use of vermicompost in organic farming: overview, effects on soil and economics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(6), 1143-1156.
- Liu, J., Xu, X.-h., Li, H.-t., & Xu, Y. (2011). Effect of microbiological inocula on chemical and physical properties and microbial community of cow manure compost. *Biomass and bioenergy*, 35(8), 3433-3439.

- Lu, J., Yang, F., Wang, S., Ma, H., Liang, J., & Chen, Y. (2017). Co-existence of Rhizobia and Diverse Non-rhizobial Bacteria in the Rhizosphere and Nodules of *Dalbergia odorifera* Seedlings Inoculated with *Bradyrhizobium elkanii*, *Rhizobium multihospitium*-Like and *Burkholderia pyrrocinia*-Like Strains. *Frontiers in microbiology*, 8, 2255-2255. doi:10.3389/fmicb.2017.02255
- Luna, M., Martínez, P., Hernández, I., Arvizu, M., & Pacheco, A. (2013). Characterization of rhizobacteria isolated from tomato and their effect on tomato and bell pepper growth. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(1), 63-69.
- Machado Vargas, M. M., & Ríos Osorio, L. A. (2016). Sostenibilidad en agroecosistemas de café de pequeños agricultores: revisión sistemática. *Idesia (Arica)*, 34(2), 15-23.
- Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A., & Tribedi, P. (2017). Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(4), 3315-3335.
- Martínez-Hidalgo, P., & Hirsch, A. M. (2017). The nodule microbiome: N₂-fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes*, 1(2), 70-82.
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G., & Mora, M. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3), 293-319.
- Masciarelli, O., Llanes, A., & Luna, V. (2014). A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiological research*, 169(7-8), 609-615.
- Maso, M. A., & Blasi, A. B. (2008). Evaluation of composting as a strategy for managing organic wastes from a municipal market in Nicaragua. *Bioresource technology*, 99(11), 5120-5124.

- Mazid, M., & Khan, T. A. (2015). Future of bio-fertilizers in Indian agriculture: an overview. *International Journal of Agricultural and Food Research*, 3(3).
- McNear Jr, D. H. (2013). The rhizosphere-roots, soil and everything in between. *Nature Education Knowledge*, 4(3), 1.
- Mehnaz, S. (2011). Plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane *Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems* (pp. 165-187): Springer.
- Moreno-Reséndez, A., García-Gutiérrez, L., Cano-Ríos, P., Martínez-Cueto, V., Márquez-Hernández, C., & Rodríguez-Dimas, N. (2014). Desarrollo del cultivo de melón (Cucumis melo) con vermicompost bajo condiciones de invernadero. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1(2), 163-173.
- Mtz, J. D. L., Estrada, A. D., Rubin, E. M., & Cepeda, R. D. V. (2001). Abonos orgánicos y su efecto en propiedades físicas y químicas del suelo y rendimiento en maíz. *Terra latinoamericana*, 19(4), 293-299.
- Mura, H. G. C., & Reyes, J. I. P. (2015). De la sostenibilidad a la sustentabilidad. Modelo de desarrollo sustentable para su implementación en políticas y proyectos. *Revista Escuela de Administración de Negocios*(78), 40-54.
- Nonakaran, S. H., Pazhouhandeh, M., Keyvani, A., Abdollahipour, F. Z., & Shirzad, A. (2015). Isolation and identification of *Pseudomonas* azotoformans for induced calcite precipitation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 1993-2001.
- Noori, M. S., & Saud, H. M. (2012). Potential plant growth-promoting activity of *Pseudomonas* sp. isolated from paddy soil in Malaysia as biocontrol agent. *J. Plant Pathol. Microb*, 3(2), 1-4.

- Olivares-Campos, M., Hernández-Rodríguez, A., Vences-Contreras, C., Jáquez-Balderrama, J., & Ojeda-Barrios, D. (2012). Lombricomposta y composta de estiércol de ganado vacuno lechero como fertilizantes y mejoradores de suelo. *Universidad y ciencia*, 28(1), 27-37.
- Orr, C. H., James, A., Leifert, C., Cooper, J. M., & Cummings, S. P. (2011). Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(3), 911-919.
- Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., & López-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant signaling & behavior*, 4(8), 701-712.
- Palma-López, D., Zavala-Cruz, J., Cámara-Reyna, J., Ruiz-Maldonado, E., & Salgado-García, S. (2016). USO DE RESIDUOS DE LA AGROINDUSTRIA DE LA CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum spp.*) PARA ELABORAR ABONOS ORGÁNICOS. *Agroproductividad*, 9(7).
- Parandian, F., & Samavat, S. (2012). Effects of Fulvic and Humic acid on Anthocyanin, soluble Sugar, Amylase Enzyme and some micronurient elements in *Lilium*. *Intl. Res. J. Appl. Basic. Sci*, 3(5), 924-929.
- Parani, K., & Saha, B. (2012). Prospects of using phosphate solubilizing *Pseudomonas* as bio fertilizer. *European journal of biological sciences*, 4(2), 40-44.
- Peña, M. J., Castro, J. C., & Soto, A. (2015). EVALUACIÓN DE INSECTICIDAS NO CONVENCIONALES PARA EL CONTROL DE *Aphis gossypii* Glover (HEMIPTERA: APHIDIDAE) EN FRÍJOL EVALUATION OF NON-CONVENTIONAL INSECTICIDES FOR THE CONTROL OF *Aphis gossypii* Glover: Scielo.

- Pereira, Y., & Escorcia, M. (2015). Ética ambiental y desarrollo sostenible: política ambiental en Colombia. *Multiciencias*, 14(2).
- Pérez, R., Pérez, A., & Vertel, M. (2010). Caracterización nutricional, físicoquímica y microbiológica de tres abonos orgánicos para uso en agroecosistemas de pasturas en la subregión Sabanas del departamento de Sucre, Colombia. *Tumbaga*, 1(5), 27-37.
- Rahmani, H. A., Räsänen, L., Afshari, M., & Lindström, K. (2011). Genetic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in soils of Iran. *Applied soil ecology*, 48(3), 287-293.
- Ramos Agüero, D., & Terry Alfonso, E. (2014). Generalidades de los abonos orgánicos: Importancia del Bocashi como alternativa nutricional para suelos y plantas. *Cultivos tropicales*, 35(4), 52-59.
- Ramos Agüero, D., Terry Alfonso, E., Soto Carreño, F., & Cabrera Rodríguez, J. A. (2014). Bocashi: abono orgánico elaborado a partir de residuos de la producción de plátanos en Bocas del Toro, Panamá. *Cultivos Tropicales*, 35(2), 90-97.
- Reyes Méndez, C. A., Cantú Almaguer, M., & de la Garza Caballero, M. (2013). Los abonos orgánicos: una alternativa para incrementar los rendimientos de maíz.
- Rives, N. (2012). Reseña bibliográfica Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 28(2), 29-38.
- Robledo, M., Rivera, L., Jiménez-Zurdo, J. I., Rivas, R., Dazzo, F., Velázquez, E., . . . Mateos, P. F. (2012). Role of Rhizobium endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microbial cell factories*, 11(1), 125.

- Rodríguez, R. O., & Hernández, R. M. (2012). Efecto de abonos orgánicos en las propiedades químicas del suelo y el rendimiento de la mora (*Rubus adenotrichus*) en dos zonas agroecológicas de Costa Rica. *Tecnología en marcha*, 25(1), 16-31.
- Romero-Figueroa, J., Sánchez-Escudero, J., Rodríguez-Mendoza, M., & Gutiérrez-Castorena, M. (2015). PRODUCCIÓN DE VERMICOMPOST A BASE DE RASTROJO DE MAÍZ (*Zea mays* L.) Y ESTIÉRCOL DE BOVINO LECHERO. *Agroproductividad*, 8(3).
- Ríos-Ruiz, W. F., Valdez-Nuñez, R. A., Bedmar, E. J., & Castellano-Hinojosa, A. (2019). Utilization of Endophytic Bacteria Isolated from Legume Root Nodules for Plant Growth Promotion. In D. K. Maheshwari & S. Dheeman (Eds.), *Field Crops: Sustainable Management by PGPR* (pp. 145-176). Cham: Springer International Publishing.
- Ruíz-Valdiviezo, V. M., Canseco, L. M. C. V., Suárez, L. A. C., Gutiérrez-Miceli, F. A., Dendooven, L., & Rincón-Rosales, R. (2015). Symbiotic potential and survival of native rhizobia kept on different carriers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 735-742.
- SADER-SIAP. (2017).
- SADER-SIAP. (2018).
- Saharan, B., & Nehra, V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res*, 21(1), 30.
- Sánchez, A. C., Gutiérrez, R. T., Santana, R. C., Urrutia, A. R., Fauvart, M., Michiels, J., & Vanderleyden, J. (2014). Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. *European Journal of Soil Biology*, 62, 105-112.
- Savci, S. (2012). An agricultural pollutant: chemical fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*, 3(1), 73.

- Shi, T., Reeves, R. H., Gilichinsky, D. A., & Friedmann, E. I. (1997). Characterization of Viable Bacteria from Siberian Permafrost by 16S rDNA Sequencing. *Microbial Ecology*, 33(3), 169-179. doi:10.1007/s002489900019
- Shridhar, B. S. (2012). RNitrogen fixing microorganisms. *Int J Microbiol Res*, 3(1), 46-52.
- Singh, A., & Singh, G. S. (2017). Vermicomposting: a sustainable tool for environmental equilibria. *Environmental Quality Management*, 27(1), 23-40.
- Somasegaran, P., & Hoben, H. (1994). Handbook for Rhizobia: Methods in legume-Rhizobium technology. xvi, 450. doi:10.1007/978-1-4613-8375-8.
- Suhag, M. (2016). Potential of biofertilizers to replace chemical fertilizers. *Int Adv Res J Sci Eng Technol*, 3(5), 163-167.
- Tavaré, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on mathematics in the life sciences*, 17(2), 57-86.
- Tokgöz, S. (2018). Exploration of Soybean Nodule Microbiome for Plant Health Management.
- Ulloa, J. A., Rosas Ulloa, P., Ramirez-Ramirez, J. C., & Ulloa Rangel, B. E. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos.
- Wensing, A., Braun, S. D., Büttner, P., Expert, D., Völksch, B., Ullrich, M. S., & Weingart, H. (2010). Impact of siderophore production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 on epiphytic fitness and biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* 1a/96. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(9), 2704-2711.
- Yu, H., Tang, H., Wang, L., Yao, Y., Wu, G., & Xu, P. (2011). Complete genome sequence of the nicotine-degrading *Pseudomonas putida* strain S16: Am Soc Microbiol.
- Zafar-ul-Hye, M., Muhammad, H., Zahir, F., Ahmad, Z., Hussain, M., & Hussain, A. (2014). Application of ACC-deaminase containing rhizobacteria with fertilizer improves maize

production under drought and salinity stress. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(3).

Zakhia, F., Jeder, H., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., & De Lajudie, P. (2006). Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbial Ecology*, 51(3), 375-393.

SIAP en su página de internet <http://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.

11. ANEXOS



Los Mochis, Sin., a 29 de Agosto de 2018

NATALY LÓPEZ
AT N: DRA. ARLENE MORA
MUESTRA: COMPOSTA 1

REPORTE 9689

La muestra enviada a laboratorio para su análisis, reportó los siguientes resultados:

| DETERMINACION | LAB # 19705 |
|--|-------------|
| pH en sl n al 10% = | 8.58 |
| Conductividad Eléctrica en sl n al 10% (mmhos/cm) = | 1.10 |
| Humedad (%) = | 61.08 |
| Densidad (g/cm ³) = | 1.111 |
| Carbono (%) = | 16.11 |
| Materia Orgánica (%) = | 27.78 |
| Relación Carbono/Nitrógeno = | 24.56 |
| MACROELEMENTOS | % |
| Nitrógeno Total (N.T.K.) = | 0.656 |
| Nitrógeno Amomacal (NH ₄ -N) = | 0.081 |
| Fósforo Total (P ₂ O ₅) = | 0.875 |
| Potaslo Total (K ₂ O) = | 2.370 |
| Magneslo (Mg) = | 0.396 |
| Calclo (Ca) = | 0.460 |
| Azufre Soluble en agua (SO ₄ -S) = | 0.096 |
| Sodio (Na) = | 0.078 |
| MICROELEMENTOS | ppm |
| Fierro (Fe) = | 13,188 |
| Zinc (Zn) = | 2,071 |
| Manganeso (Mn) = | 403 |
| Cobre (Cu) = | 125 |
| Boro (B) = | 60 |

ATENTAMENTE

I.B.A AIDE GARCIA
LLANES
 Responsable
 CED. PROF. 3982404



IBC ANALYTIC MÉXICO, S. A DE C.V.

Blvd. Mariano Gascón y Carr. Internacional S / N Aula B15,
Universidad de Occidente Los Mochis, Ahomé Sinaloa

Tel. Fax. (668) 313-85-92 C.P. 81213

Correo: garcia.aide1@gmail.com



Laboratorio Agrícola

Los Mochis, Sin., a 29 de Agosto de 2018

NATALY LÓPEZ
AT N: DRA. ARLENE MORA
MUESTRA: COMPOSTA 2

REPORTE 9690

La muestra enviada a laboratorio para su análisis, reportó los siguientes resultados:

| DETERMINACION | LAB # 19706 |
|---|-------------|
| pH en solución al 10% = | 8.33 |
| Conductividad Eléctrica en solución al 10% (mmhos/cm) = | 1.24 |
| Humedad (%) = | 63.49 |
| Densidad (g/cm ³) = | 1.111 |
| Carbono (%) = | 17.67 |
| Materia Orgánica (%) = | 30.46 |
| Relación Carbono/Nitrógeno = | 16.36 |
| MACROELEMENTOS | % |
| Nitrógeno Total (N.T.K.) = | 1.080 |
| Nitrógeno Amomiacal (NH ₄ -N) = | 0.098 |
| Fósforo Total (P ₂ O ₅) = | 1.152 |
| Potasio Total (K ₂ O) = | 3.354 |
| Magnesio (Mg) = | 0.349 |
| Calcio (Ca) = | 0.436 |
| Azufre Soluble en agua (SO ₄ -S) = | 0.088 |
| Sodio (Na) = | 0.021 |
| MICROELEMENTOS | ppm |
| Hierro (Fe) = | 16,364 |
| Zinc (Zn) = | 2,228 |
| Manganeso (Mn) = | 445 |
| Cobre (Cu) = | 164 |
| Boro (B) = | 80 |

ATENTAMENTE

I.B.A AIDE GARCIA
LLANES

Responsable
CED. PROF. 3982404



LABORATORIO AGRICOLA

IBC ANALYTIC MÉXICO, S. A DE C.V.

Bld. Macario Gaxiola y Carr. Internacional S / N Aula B15,
 Universidad de Occidente Los Mochis, Ahome Sinaloa
 Tel. Fax. (668) 812-85-32 C.P. 81223
 Correo: garcia.aide1@gmail.com



Los Mochis, Sin., a 29 de Agosto de 2018

**NATALY LOPEZ
 AT ´N: DRA. ARLENE MORA
 MUESTRA: LIXIVIADO 1**

REPORTE 9687

La muestra enviada a laboratorio para su análisis, reportó los siguientes resultados:

| DETERMINACION | | LAB # 19703 | |
|-----------------------|--|--------------------|--------------|
| | pH = | 7.28 | |
| | Conductividad Eléctrica (mmhos/cm) = | 4.48 | |
| | Densidad (Kg/L) = | 1.000 | |
| | Carbono (%) = | 0.27 | |
| | Materia Orgánica (%) = | 0.46 | |
| | Relación Carbono/Nitrógeno = | 2.45 | |
| MACROELEMENTOS | | % | ppm |
| | Nitrógeno Total (N.T.K.) = | 0.110 | 1,100 |
| | Nitrógeno Amoniacal (NH ₄ -N) = | 0.032 | 316 |
| | Fósforo Total (P ₂ O ₅) = | 0.090 | 900 |
| | Potasio Total (K ₂ O) = | 0.396 | 3,960 |
| | Magnesio (Mg) = | 0.029 | 288 |
| | Calcio (Ca) = | 0.000 | 0 |
| | Azufre Soluble en agua (SO ₄ -S) = | 0.036 | 356 |
| | Sodio (Na) = | 0.032 | 323 |
| MICROELEMENTOS | | % | ppm |
| | Fierro (Fe) = | 0.046 | 460 |
| | Zinc (Zn) = | 0.005 | 52 |
| | Manganeso (Mn) = | 0.004 | 36 |
| | Cobre (Cu) = | 0.006 | 64 |
| | Boro (B) = | 0.003 | 30 |

ATENTAMENTE

**I.B.A AIDE GARCIA
 LLANES**

Responsable
 CED. PROF. 3982404



LABORATORIO AGRICOLA

IBC ANALYTIC MÉXICO, S. A DE C.V.

Bld. Macario Gaxiola y Carr. Internacional S / N Aula B15,
 Universidad de Occidente Los Mochis, Ahome Sinaloa
 Tel. Fax. (668) 812-85-32 C.P. 81223
 Correo: garcia.aide1@gmail.com



Los Mochis, Sin., a 29 de Agosto de 2018

NATALY LOPEZ
AT ´N: DRA. ARLENE MORA
MUESTRA: LIXIVIADO 2

REPORTE 9688

La muestra enviada a laboratorio para su análisis, reportó los siguientes resultados:

| DETERMINACION | | LAB # 19704 | |
|----------------|--|-------------|-------|
| | pH = | 7.28 | |
| | Conductividad Eléctrica (mmhos/cm) = | 5.39 | |
| | Densidad (Kg/L) = | 1.000 | |
| | Carbono (%) = | 0.29 | |
| | Materia Orgánica (%) = | 0.50 | |
| | Relación Carbono/Nitrógeno = | 2.69 | |
| MACROELEMENTOS | | % | ppm |
| | Nitrógeno Total (N.T.K.) = | 0.108 | 1,078 |
| | Nitrógeno Amoniacal (NH ₄ -N) = | 0.027 | 267 |
| | Fósforo Total (P ₂ O ₅) = | 0.142 | 1,415 |
| | Potasio Total (K ₂ O) = | 0.394 | 3,941 |
| | Magnesio (Mg) = | 0.038 | 376 |
| | Calcio (Ca) = | 0.063 | 627 |
| | Azufre Soluble en agua (SO ₄ -S) = | 0.039 | 388 |
| | Sodio (Na) = | 0.038 | 376 |
| MICROELEMENTOS | | % | ppm |
| | Fierro (Fe) = | 0.056 | 559 |
| | Zinc (Zn) = | 0.006 | 64 |
| | Manganeso (Mn) = | 0.004 | 35 |
| | Cobre (Cu) = | 0.006 | 56 |
| | Boro (B) = | 0.003 | 30 |

I.B.A AIDE GARCIA
LLANES

Responsable
 CED. PROF. 3982404

Anexo 1. Aislamientos bacterianos obtenidos en el ciclo agrícola 2016.

| Aislado | Lote muestreado | Municipio |
|----------------|----------------------------|------------------|
| 1 | 25°49'46.6 N 109°01'38.9 W | Ahome |
| 2 | 25°49'46.6 N 109°01'38.9 W | Ahome |
| 3 | 25°49'46.6 N 109°01'38.9 W | Ahome |
| 4 | 25°49'46.6 N 109°01'38.9 W | Ahome |
| 8 | 25°49'46.6 N 109°01'38.9 W | Ahome |
| 9 | 25°49'46.6 N 109°01'38.9 W | Ahome |
| 10 | 25°49'46.6 N 109°01'38.9 W | Ahome |
| 14 | 25°52'49.2 N 109°07'08.3 W | Ahome |
| 17 | 25°52'49.2 N 109°07'08.3 W | Ahome |
| 18 | 25°52'49.2 N 109°07'08.3 W | Ahome |
| 18a | 25°52'49.2 N 109°07'08.3 W | Ahome |
| 20 | 25°52'49.2 N 109°07'08.3 W | Ahome |
| 20a | 25°52'49.2 N 109°07'08.3 W | Ahome |
| 21 | 25°52'49.2 N 109°07'08.3 W | Ahome |
| 25 | 25°52'45.2 N 109°03'12.4 W | Ahome |
| 25a | 25°52'45.2 N 109°03'12.4 W | Ahome |
| 31 | 25°52'45.2 N 109°03'12.4 W | Ahome |

Anexo 2. Aislamientos bacterianos obtenidos en el ciclo agrícola 2017.

| Aislado | Lote muestreado | Municipio |
|----------------|----------------------------|------------------|
| 2 | 25°52'12.3 N 109°09'48.9 W | Ahome |
| 3 | 25°52'12.3 N 109°09'48.9 W | Ahome |
| 4 | 25°48'60.0 N 109°11'47.3 W | Ahome |
| 5 | 25°48'60.0 N 109°11'47.3 W | Ahome |
| 6 | 25°48'60.0 N 109°11'47.3 W | Ahome |
| 7 | 25°48'60.0 N 109°11'47.3 W | Ahome |
| 8 | 25°48'60.0 N 109°11'47.3 W | Ahome |
| 9 | 25°48'60.0 N 109°11'47.3 W | Ahome |
| 10 | 25°48'60.0 N 109°11'47.3 W | Ahome |
| 11 | 25°48'60.0 N 109°11'47.3 W | Ahome |
| 12 | 25°48'60.0 N 109°11'47.3 W | Ahome |
| 13 | 25°48'60.0 N 109°11'47.3 W | Ahome |
| 14 | 25°48'60.0 N 109°11'47.3 W | Ahome |
| 15 | 25°48'60.0 N 109°11'47.3 W | Ahome |
| 16 | 25°48'60.0 N 109°11'47.3 W | Ahome |
| 17 | 25°48'60.0 N 109°11'47.3 W | Ahome |
| 18 | 25°48'60.0 N 109°11'47.3 W | Ahome |
| 19 | 25°48'60.0 N 109°11'47.3 W | Ahome |
| 20 | 25°53'05.1 N 109°08'41.9 W | Ahome |
| 21 | 25°53'05.1 N 109°08'41.9 W | Ahome |
| 22 | 25°46'51.7 N 109°04'22.3 W | Ahome |
| 23 | 25°46'35.5 N 109°04'06.2 W | Ahome |
| 24 | 25°46'35.5 N 109°04'06.2 W | Ahome |
| 25 | 25°45'41.1 N 109°04'33.2 W | Ahome |
| 26 | 25°45'41.1 N 109°04'33.2 W | Ahome |
| 27 | 25°45'41.1 N 109°04'33.2 W | Ahome |

| | | |
|-----------|----------------------------|-------|
| 28 | 25°45'41.1 N 109°04'33.2 W | Ahome |
| 29 | 25°45'41.1 N 109°04'33.2 W | Ahome |
| 30 | 25°45'41.1 N 109°04'33.2 W | Ahome |
| 31 | 25°45'41.1 N 109°04'33.2 W | Ahome |
| 32 | 25°45'41.1 N 109°04'33.2 W | Ahome |
| 33 | 25°45'41.1 N 109°04'33.2 W | Ahome |
| 34 | 25°45'41.1 N 109°04'33.2 W | Ahome |
| 35 | 25°45'41.1 N 109°04'33.2 W | Ahome |
| 36 | 25°45'41.1 N 109°04'33.2 W | Ahome |
| 37 | 25°45'41.1 N 109°04'33.2 W | Ahome |
| 38 | 25°46'13.0 N 109°05'04.5 W | Ahome |
| 39 | 25°48'34.1 N 109°02'25.9 W | Ahome |
| 40 | 25°44'38.1 N 109°04'43.8 W | Ahome |
| 41 | 25°44'38.1 N 109°04'43.8 W | Ahome |
| 42 | 25°44'38.1 N 109°04'43.8 W | Ahome |
| 43 | 25°44'38.1 N 109°04'43.8 W | Ahome |
| 44 | 25°44'38.1 N 109°04'43.8 W | Ahome |
| 45 | 25°46'38.8 N 109°03'56.7 W | Ahome |
| 46 | 25°46'38.8 N 109°03'56.7 W | Ahome |
| 47 | 25°46'38.8 N 109°03'56.7 W | Ahome |
| 48 | 25°46'38.8 N 109°03'56.7 W | Ahome |
| 49 | 25°47'20.4 N 109°03'34.5 W | Ahome |
| 50 | 25°47'20.4 N 109°03'34.5 W | Ahome |
| 51 | 25°47'20.4 N 109°03'34.5 W | Ahome |
| 52 | 25°47'20.4 N 109°03'34.5 W | Ahome |
| 53 | 25°47'20.4 N 109°03'34.5 W | Ahome |
| 54 | 25°47'20.4 N 109°03'34.5 W | Ahome |
| 55 | 25°47'20.4 N 109°03'34.5 W | Ahome |

| | | |
|-----------|----------------------------|-------|
| 56 | 25°47'20.4 N 109°03'34.5 W | Ahome |
| 57 | 25°47'20.4 N 109°03'34.5 W | Ahome |
| 58 | 25°49'33.8 N 109°01'23.8 W | Ahome |
| 59 | 25°49'33.8 N 109°01'23.8 W | Ahome |
| 60 | 25°49'33.8 N 109°01'23.8 W | Ahome |
| 61 | 25°49'42.2 N 109°01'30.5 W | Ahome |
| 62 | 25°49'42.2 N 109°01'30.5 W | Ahome |
| 63 | 25°49'42.2 N 109°01'30.5 W | Ahome |
| 64 | 25°49'42.2 N 109°01'30.5 W | Ahome |
| 65 | 25°49'42.2 N 109°01'30.5 W | Ahome |
| 66 | 25°49'47.8 N 109°01'39.0 W | Ahome |
| 67 | 25°49'47.8 N 109°01'39.0 W | Ahome |
| 68 | 25°49'47.8 N 109°01'39.0 W | Ahome |
| 69 | 25°49'47.8 N 109°01'39.0 W | Ahome |
| 70 | 25°49'47.8 N 109°01'39.0 W | Ahome |
| 71 | 25°49'47.8 N 109°01'39.0 W | Ahome |
| 72 | 25°49'47.8 N 109°01'39.0 W | Ahome |
| 73 | 25°49'47.8 N 109°01'39.0 W | Ahome |
| 74 | 25°49'47.8 N 109°01'39.0 W | Ahome |
| 76 | 25°49'45.9 N 109°01'37.6 W | Ahome |
| 77 | 25°56'24.3 N 109°03'31.8 W | Ahome |
| 78 | 25°55'49.5 N 109°06'22.3 W | Ahome |
