

# Interacción de *Tsukamurella paurometabola* C-924 con *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH en el cultivo de frijol

## Interaction among *Tsukamurella paurometabola* C-924 and *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH in bean plants

Marieta Marín Bruzos, Jesús Mena Campos, Pavel Chaveli Chávez, Rolando Morán Valdivia y Eulogio Pimentel Vázquez

Laboratorio de Microbiología. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Circunvalación Norte y Avenida Finlay. CP 70100. Camagüey, Cuba. Autora para correspondencia: marieta.marin@cigb.edu.cu

Rec.: 07.08.12 Acept.: 20.08.13

### Resumen

En el estudio se evaluaron, mediante análisis de los parámetros fenológicos de las plantas, la interacción de *Tsukamurella paurometabola* C-924 con *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH en el cultivo de frijol. Se emplearon cuatro tratamientos: plantas sin inocular (control), inoculadas con *T. paurometabola* C-924, inoculadas con *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH e inoculadas con ambas cepas. Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) en los porcentajes de germinación de las plantas tratadas con microorganismos de forma independiente o conjunta con respecto al control sin inocular. Se determinó que la inoculación de *T. paurometabola* C-924 afectó el proceso de nodulación de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH. Sin embargo, esto no incidió de manera significativa en la altura de las plantas ni en el diámetro del tallo, ya que no se encontraron diferencias entre los tratamientos para estos parámetros. Para el número de hojas, los mejores resultados se obtuvieron con la aplicación de *T. paurometabola* C-924. Se concluyó que la interacción de *T. paurometabola* C-924 con *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH en el frijol estimuló significativamente la germinación de las semillas y el número de hojas de las plantas con respecto al control sin inocular. Aunque la aplicación de *T. paurometabola* C-924 no favoreció la nodulación de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH, esto no afectó las características fenológicas del cultivo.

**Palabras clave:** Frijol; germinación; nodulación; *Rhizobium leguminosarum*; *Tsukamurella paurometabola*.

### Abstract

The experiment was carried out to evaluate the interaction between *Tsukamurella paurometabola* C-924 and *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH in bean plants. Treatments consisted of non-inoculated plants (control), plants inoculated with *T. paurometabola* C-924, inoculated with *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH and inoculated with both strains. The application of the microorganisms single or in coinoculation improved the germination of seeds. *T. paurometabola* C-924 did not enhance *Rhizobium* nodulation. However, no significant differences were found among treatments for shoot height and diameter. There was an increase in number of leaves in the plants inoculated with *T. paurometabola* C-924. We concluded that the interaction between *T. paurometabola* C-924 and *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH improved the number of leaves and the germination of seeds and even though *T. paurometabola* C-924 did not enhance nodulation, this fact did not affect the plants growth.

**Key words:** Bean; germination; nodulation; *Rhizobium leguminosarum*; *Tsukamurella paurometabola*.

## Introducción

En la actualidad, el principal reto de la agricultura moderna es la producción de alimentos de alta calidad, ecológicamente seguros y económicamente asequibles para una población mundial en constante crecimiento. Con el aumento de los problemas asociados al uso de productos químicos en la agricultura y los impactos negativos que estos han tenido sobre la salud y el medio ambiente, así como el desarrollo de resistencia en los patógenos de plantas, se ha incrementado el interés por el empleo de microorganismos benéficos nativos y no-nativos para mejorar el rendimiento de los cultivos y aumentar la producción. De esta forma se hace más seguro el consumo por los humanos y se protege el ambiente. Es en este contexto, que numerosos microorganismos del suelo, con potencialidades, han sido incluidos en diferentes prácticas de manejo integrado de plagas y mejoramiento de la productividad agrícola (Avis *et al.*, 2008).

Actualmente los biofertilizantes son considerados como componentes del manejo integrado de la nutrición vegetal y han sido definidos como sustancias que contienen microorganismos vivos que una vez son aplicados a semillas, plantas o suelo, colonizan la rizosfera o el interior de la planta y estimulan su desarrollo, lo cual incrementa la disponibilidad de nutrientes y la sanidad vegetal del cultivo (Vessey, 2003). En pruebas experimentales y de campo se ha reconocido el efecto de los biofertilizantes como una forma de manejo sostenible de los agroecosistemas, sin embargo, el éxito en su empleo reside en el estudio de cepas compatibles, muchas veces específicas de un cultivo, y de las condiciones ecológicas del suelo (Höfte y Altier, 2010).

En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, Cuba, se aisló a partir de la rizosfera de plantas de plátano la cepa *Tsukamurella paurometabola* C-924. Es un bacilo de vida libre, Gram positivo, aerobio estricto, ligeramente curvado (0.5 - 0.8 x 1.0 - 1.2 mm) que puede encontrarse de forma simple en pares o en masas. Su temperatura óptima es de 37 °C y es de crecimiento lento (Marín *et al.*, 2010). De acuerdo con los ensayos toxicológicos y ecotoxicológicos

previamente efectuados, *T. paurometabola* C-924 se clasifica como cepa de nivel 1 de riesgo biológico y no tiene efectos negativos sobre plantas, animales o el hombre (Aldana *et al.*, 2012). Esta cepa ha mostrado potencialidades como estimulador del crecimiento vegetal, así como en el control biológico de nematodos en experimentos *in vitro*, en macetas y en campo y constituye el principio activo del producto biofertilizante HeberNem® (Mena *et al.*, 2008).

Conocer el efecto de esta cepa en diferentes cultivos de interés económico, así como su interacción con otros microorganismos beneficiosos del suelo, es de vital importancia para un empleo efectivo del bioproducto en los sistemas agrícolas. Por tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar, mediante el análisis de los parámetros fenológicos de las plantas, la interacción de *T. paurometabola* C-924 con *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH en el cultivo en macetas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Crema.

## Materiales y Métodos

### Localización

El experimento se realizó en una 'casa verde' de la Estación Experimental de Suelos de la provincia de Camagüey, Cuba, en condiciones semi-controladas. Se emplearon macetas de 1 dm<sup>3</sup> de volumen, que contenían cada una 1.2 kg de suelo pardo con carbonatos, sin esterilizar. El suelo contenía un 3.74% de M.O. (Walkley y Black, 1934) y 19.14 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g de suelo (Olsen y Sommers, 1982).

### Tratamientos

Para la preparación del inóculo se aislaron colonias de *T. paurometabola* C-924 que fueron cultivadas con agitación (200 r.p.m.) durante 18 h en 250 ml de Caldo Triptona Soya a 37 °C. Cuando el cultivo alcanzó la fase logarítmica fue centrifugado (7500 g durante 10 min a 4 °C) y resuspendido en solución salina (NaCl 0.85%). La concentración bacteriana final se ajustó a 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias (ufc)/ml de acuerdo con una correlación previamente establecida entre densidad óptica y el número de ufc (Marín, 2006).

Los tratamientos empleados fueron: (1) plantas sin inocular (control), (2) plantas inoculadas con *T. paurometabola* C-924, (3) plantas inoculadas con *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH, y (4) plantas inoculadas con ambas cepas, a razón de 20 plantas por tratamiento. En cada nido se sembró una semilla y en cada maceta se establecieron cuatro nidos, a una profundidad de 3 cm.

La cepa *T. paurometabola* C-924 se inoculó 7 días antes y 7 días después de la siembra, de acuerdo con la metodología recomendada. La dosis aplicada fue 100 ml/maceta con una concentración de  $10^8$  ufc/ml. *Rhizabium leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH se encontraba en una concentración de  $2.5 \times 10^8$  ufc/ml en solución sólida mezclada con humus previamente tamizado y se aplicó a una dosis de 1 kg por 45 kg de semilla.

### Mediciones

El porcentaje de semillas germinadas se midió 7 días después de la siembra. Para estudiar la persistencia de *T. paurometabola* C-924 en la rizosfera de los cultivos se tomaron muestras del suelo adherido a las raíces de las plantas. Los muestreos se realizaron durante la siembra de las semillas y a los 7, 14, 28 y 42 días. Para cada muestra se pesó un gramo de suelo y se resuspendió durante 1 h en 99 ml de solución salina peptonada (NaCl 0.85%, Peptona 0.1%) con una agitación de 100 r.p.m. a 30 °C. Transcurrido este tiempo, se realizaron diluciones decimales seriadas hasta  $10^{-7}$ . De cada dilución se tomaron 100 ml y se sembraron tres placas con medio selectivo para *T. paurometabola* C-924 (Tryptona 10.0 g/lt, extracto de levadura 5.0 g/lt; NaCl 10.0 g/lt; agar 15.0 g/lt; ampicilina 50 mg/lt; kanamicina 50 mg/lt y telurito de potasio 0.0025%), que fueron incubadas a 30 °C. Una vez se observó crecimiento, se contaron las unidades formadoras de colonias típicas de la cepa en este medio y se calculó la viabilidad del microorganismo en el suelo. De cada uno de los aislamientos se tomaron dos colonias características y se comprobó la identidad de la cepa empleando kits API Coryne (API-bioMérieux, Inc., La Balme les Grottes, France).

Los caracteres fenológicos evaluados en las plantas fueron: número de hojas, diámetro del tallo y altura de la planta cada 7 días. Al concluir el experimento se determinó el número de nódulos activos en el sistema radical y el peso seco de 10 plantas seleccionadas aleatoriamente por tratamiento. Además se tomaron tres muestras de suelo por tratamiento para determinar los contenidos de fósforo asimilable (Olsen y Sommers, 1982), nitrógeno (Bremner y Sulvaney, 1982) y el porcentaje de M.O. (Walkey y Black, 1934).

### Procesamiento estadístico

Para el análisis de los datos, primero se verificaron los supuestos de normalidad mediante el método Sapiro Wilk, luego se hizo el análisis de varianza (ANOVA) empleando la prueba de rangos múltiples de Tukey (Sigarrosa, 1985) ( $P < 0.05$ ) teniendo en cuenta la comparación de los distintos tratamientos entre sí y con el testigo utilizando el paquete estadístico SPSS versión 8.0 (1997).

### Resultados y discusión

Para que una bacteria inoculada ejerza su efecto es necesario que se establezca en la rizosfera de las plantas (Dastager *et al.*, 2010). La viabilidad de *T. paurometabola* C-924 en el suelo fue similar en todos los tratamientos donde fue inoculada. En la Figura 1 se observa que una vez inoculada la población se establece y los conteos del microorganismo aumentan ligeramente. A través del tiempo los valores disminuyen progresivamente. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Mena *et al.* (2006) en ensayos de campo donde se aisló la cepa de suelos tratados con Hebernem, encontrando que la población de ésta no se establece de forma definitiva en los suelos donde es introducida y presenta una tendencia a disminuir en el tiempo hasta desaparecer en un período de 6 meses, aproximadamente. Esta tendencia puede ser favorable para reducir los posibles efectos negativos sobre la microbiota nativa (Cory y Myers, 2000).

Para confirmar la identidad de la cepa por el sistema API Coryne se tomaron muestras de las colonias aisladas en las cuales se confirmó que 100% correspondía a la especie

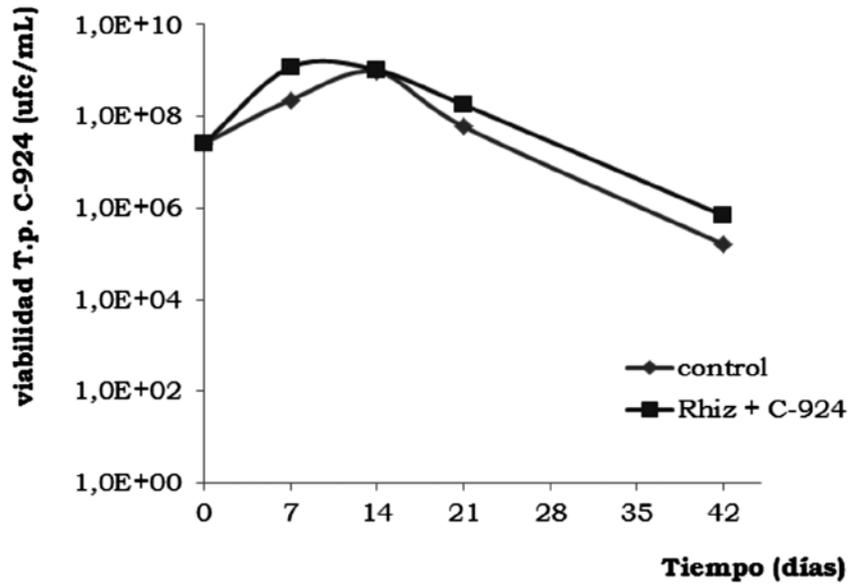


Figura 1. Persistencia de *T. paurometabola* C-924 en la rizosfera de frijol.

*T. paurometabola*, mientras que en el testigo no se encontró la cepa.

Se observaron diferencias ( $P < 0.05$ ) en los porcentajes de semillas germinadas en cada tratamiento frente al tratamiento control sin inocular (Figura 2). Estos resultados coinciden con los hallazgos de Reyes *et al.* (2008) quienes observaron estimulación de

la germinación de semillas de pimentón y maíz al ser inoculadas con *Azospirillum*, *Rhizobium* o *Azotobacter*. Igualmente Yadegari y Rahamani (2010) obtuvieron mayores porcentajes de germinación en el cultivo del frijol al inocular semillas con cepas de *Rhizobium* o combinación de *Rhizobium* y *Pseudomonas fluorescens* P-93. Estos resultados se explican

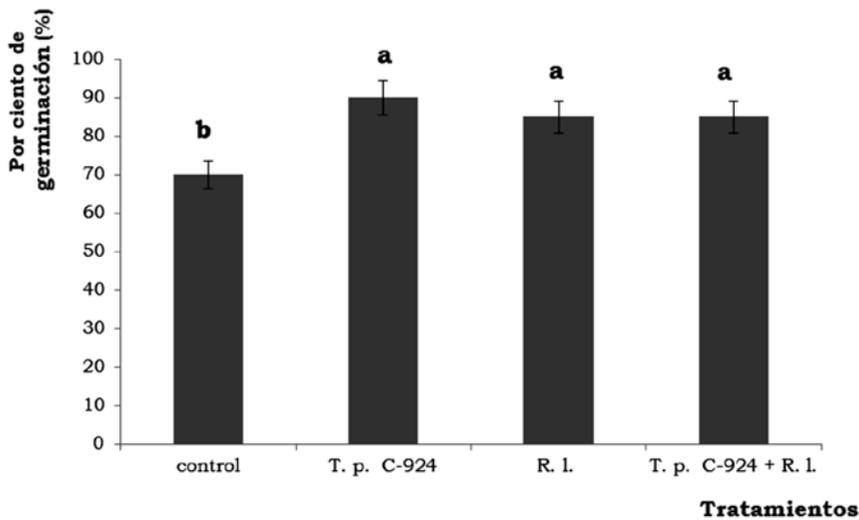


Figura 2. Porcentajes de germinación de semillas de plantas de frijol con y sin inocular. Control: plantas sin inocular, T.p. C-924: *T. paurometabola* C-924, R.l.: *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH. Promedios con letras distintas difieren significativamente ( $P < 0.05$ ), según la prueba de rango múltiple de Tukey

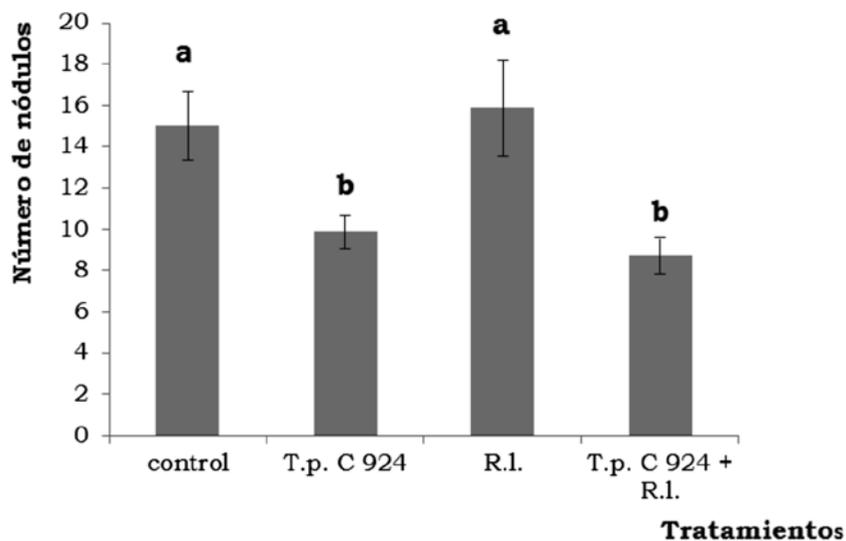
porque las rizobacterias secretan sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal que actúan sobre la activación de los procesos metabólicos en las semillas (Nezarat y Ghomami, 2009).

Los nódulos radicales de las leguminosas son estructuras complejas, cuyo desarrollo y funcionamiento son regulados principalmente por la planta, la cual controla su número mediante un mecanismo endógeno de retro-inhibición llamado de autorregulación. Pero, a su vez, este proceso también está controlado por factores externos entre los que el nivel de nitrógeno y las cepas de *Rhizobium* presentes en el suelo son de especial importancia (Patriarca *et al.*, 2002).

Los resultados del conteo de nódulos activos en el sistema radicular de las plantas tratadas se observan en la Figura 3. La mayor formación de nódulos ocurrió en los tratamientos donde no se aplicó *T. paurometabola* C-924, incluyendo el control. Este hecho sugiere la presencia de cepas nativas en el suelo empleado. Se sabe que *T. paurometabola* C-924 produce durante la degradación de la materia orgánica grandes cantidades de compuestos nitrogenados y amoníaco (Her-

nández *et al.*, 1998). Esta alta concentración de nitrógeno en el medio puede inhibir la formación de nódulos de *R. leguminosarum* en el sistema radical de la planta, debido a que existe suficiente nitrógeno en el suelo para satisfacer las necesidades del cultivo sin requerir de nodulación.

La inhibición de la nodulación por nitrógeno es un tema conocido en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y va mas allá de un efecto nutricional como en un tiempo se pensó. Es un mecanismo más complejo que implica estadios tempranos en la ontogenia del nódulo de forma similar a la respuesta de autorregulación, pero al contrario de ésta, se trata de un efecto localizado y no sistémico (Patriarca *et al.*, 2002). De igual forma, es posible que exista competencia entre ambos microorganismos por el espacio o los nutrientes a nivel de la rizosfera de la planta que incide de manera negativa sobre la colonización de la misma por parte de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH, ya que *T. paurometabola* C-924 fue aplicado 7 días antes de la siembra y por tanto el tiempo para colonizar y establecerse en el suelo fue mayor. De-Ming y Martin (1986) encontraron resultados similares a



**Figura 3** Número de nódulos activos de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH en el cultivo de frijol. Control: plantas sin inocular, T.p. C-924: *T. paurometabola* C-924, R.I.: *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH. Promedios con letras distintas difieren significativamente ( $P < 0.05$ ), según la prueba de rango múltiple de Tukey.

los del presente estudio y concluyeron que la competencia de las bacterias en el suelo puede reducir de forma significativa la nodulación por rizobios. Plazinski y Rolfe (1985) observaron inhibición de la nodulación en plantas de trébol cuando trabajaron con la interacción *Rhizobium trifolii*-*Azospirillum*; no obstante la diferencia en los niveles de nodulación no incidió en la altura de las plantas ni en el diámetro del tallo, tal como ocurrió en el presente estudio (Cuadro 1).

El número de hojas/planta fue más alto con la aplicación de *T. paurometabola* C-924. A los 36 días después de la siembra se observaron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos. Cuando se aplicaron ambas cepas este parámetro fue similar al tratamiento con *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH y diferente en relación con el control. A edades mayores, debido a las limitantes intrínsecas de un experimento en macetas, se observó senescencia de las hojas lo que estuvo directamente relacionado con la producción de materia seca de la planta, siendo ésta si-

milar entre tratamientos. Este hecho podría estar vinculado con la presencia de cepas nativas en el suelo y el efecto positivo del *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH sobre el crecimiento del cultivo del frijol.

Brunet *et al.* (2002) estudiaron el efecto de la aplicación combinada de cepas de *Rhizobium* y fosfobacterias en *Leucaena* y encontraron un efecto depresivo de la inoculación conjunta sobre el desarrollo del cultivo, en comparación con la inoculación de solo *Rhizobium*. Lo anterior contrasta con los hallazgos en este estudio donde la interacción de cepas no afectó el desarrollo del cultivo de frijol.

En el Cuadro 2 se observan los resultados de los análisis de suelos al finalizar el estudio. La M.O. y el N presentaron valores similares en todos los tratamientos. Por el contrario el contenido de fósforo fue más alto cuando se utilizó el inoculo *T. paurometabola* C-924, debido a que este microorganismo tiene la capacidad de solubilizar fosfatos en el suelo (Mena *et al.*, 2008).

**Cuadro 1.** Resultados de la aplicación de las cepas inoculadas sobre los parámetros fenológicos en el cultivo de frijol.

Tratamientos (cepas)	Diámetro (cm)	Hojas (no.)	Altura (cm)	Materia seca (%)
Control	4.04	8.20 c*	28.22	6.25 ab
<i>T. paurometabola</i> C-924	4.02	12.10 a	25.46	5.91 b
<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i> CFH	3.93	10.60 b	25.23	6.57 a
<i>T. paurometabola</i> C-924 + <i>R. leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i> CFH	3.97	10.10 b	25.86	6.62 a
Error estándar	0.153 n.s.	0.47 *	1.22 n.s.	0.11*

\* Promedios con letras distintas difieren significativamente ( $P < 0.05$ ), según la prueba de rango múltiple de Tukey.

**Cuadro 2.** Resultados de la determinación de fósforo, materia orgánica y nitrógeno total en el suelo en el cultivo del frijol al concluir el experimento.

Tratamientos (cepas)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100 g suelo)	M.O. (%)	N total (%)
Control	8.35 b*	2.80	0.14
<i>T. paurometabola</i> C-924	10.06 a	2.85	0.14
<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i> CFH	9.15 b	2.74	0.14
<i>T. paurometabola</i> C-924 + <i>R. leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i> CFH	8.87 b	2.59	0.13
Error estándar	0.332*	0.138 ns	0.007 ns

\* Promedios con letras distintas difieren significativamente ( $P < 0.05$ ), según la prueba de rango múltiple de Tukey.

## Conclusión

- La interacción de *T. paurometabola* C-924 con *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH en el frijol estimuló significativamente la germinación de las semillas y el número de hojas de las plantas con respecto al control sin inocular. Aunque la aplicación de *T. paurometabola* C-924 no favoreció la nodulación de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* CFH, esto no afectó las características fenológicas del cultivo.

## Referencias

- Aldana, L.; Bacardí, D.; Beiro, O.; Cosme, K.; Ramírez, Y.; Valenzuela, C.; Merino, N.; Sánchez, J.; Milá, L.; Amaya, R.; Suárez, J.; Carballo, O.; Mena, J.; y Borroto, C. 2012. Study of oral acute toxicity/pathogenicity of the *Tsukamurella paurometabola* active agent of the biological nematicide C-924 (Hebernem®). *Adv Pharm. Drug Safety* 1(1):1 - 6.
- Avis, T.; Gravel, V.; Antoun, H.; y Russell, J. 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol Biochem* 40:1733 - 1740.
- Bremner, J.; y Sulvaney, C. 1982. Total nitrogen. En: Page A. L. (ed.). *Methods of Soil Analysis*, part 2. Agron., 2nd ed. ASA and SSSA, Madison, WI. p. 595 - 624.
- Brunet, E.; Moreno, Y.; Almaguer, W.; y Espinosa, E. 2002. Estudio de los biofertilizantes *Rhizobium* y fosforina en *Leucaena*. Resúmenes de AGRONAT, Ciencias Agrarias. Universidad de Cienfuegos, Cuba, 62 p.
- Cory, J.; y Myers, J. 2000. Direct and indirect ecological effects of biological control. *Trends Ecol. Evol.* 15:137 - 139.
- Dastager, S.; Deepa, C.; y Pandey, A. 2010. Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp. NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant Physiol Biochem.* 48:987 - 992.
- De-Ming, L.; y Martin, A. 1986. Bacterial growth rates and competition affect nodulation and root colonization by *Rhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol.* 52(4):807 - 811.
- Hernández, A.; Expósito, M.; y Olivera, V. 1998. Establishment of pH interval for the control of extracellular ammonium concentration, during culture of *C. paurometabolum*. *Rev. Cub. Quím.* 10(4):170 - 171.
- Höfte, M. y Altier, N. 2010. Fluorescent *Pseudomonads* as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Res. Microbiol.* 16:1464 - 471.
- Marín, M. 2006. Interacción de la bacteria con actividad nematocida *Tsukamurella paurometabola* C 924 con microorganismos de uso frecuente en la agricultura. Tesis de Maestría. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba, 63 p.
- Marin, M.; Mena, J.; Franco, R.; Pimentel, E.; y Sánchez, I. 2010. Effects of the bacterial-fungal interaction between *Tsukamurella paurometabola* C 924 and *Glomus fasciculatum* and *Glomus clarum* fungi on lettuce microrrizal colonization and foliar weight. *Biotecnol. Apl.* 27(1):48 - 51.
- Mena, J.; Pimentel, E.; y Hernández, A. 2006. Uso del bionematicida HeberNem en los cultivos protegidos. *Fitosanidad* 10(2):168 - 171.
- Mena, J.; Pimentel, E.; Marín, M.; Hernández, A.; Sánchez, I.; Ramírez, Y.; González, S.; García, M.; y Borroto, C. 2008. Composición biofertilizante. World Intellectual Property International Bureau. WO 2008/131699 A2.
- Nezarat, S. y Gholami, A. 2009. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving seed germination, seedling growth and yield of maize. *Pak. J. Biol. Sci.* 12(1):26 - 32.
- Olsen, S. R. y Sommers, L. E. 1982. Phosphorus. En: Page A. L. (ed.). *Methods of soil analysis*. Part 2. Agron., 2nd ed. ASA and SSSA, Madison. p. 403 - 430.
- Patriarca, E.; Tate, R.; y Iaccarino, M. 2002. Key role of bacterial NH<sub>4</sub><sup>+</sup> metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:203 - 222.
- Plazinski, J. y Rolfe, B. 1985. Interaction of *Azospirillum* and *Rhizobium* strains leading to inhibition of nodulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(4):990 - 993.
- Reyes, I.; Alvarez, L.; El-Ayoubi, Y.; y Valery, A. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro* 20(1):37 - 48.
- Sigarroa, A. 1985. *Biometría y diseño experimental*. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* 255:571 - 586.
- Walkey, A. y Black, I. 1934. An examination of the Degtjareff method and a proposed modification of the chromic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 34:29 - 38.
- Yadegari, M. y Rahmani, A. 2010. Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds' inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting *Rhizobacteria* (PGPR) on yield and yield components. *Afric. J. Agric. Res.*