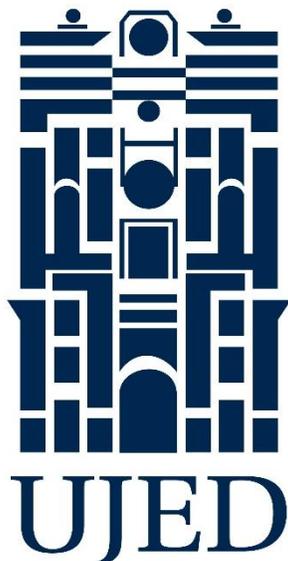


**UNIVERSIDAD JUAREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
FACULTAD DE AGRICULTURA Y ZOOTECNIA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**EFFECTO DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO EN  
LA PRODUCCIÓN DE MAÍZ FORRAJERO  
TESIS DE MAESTRIA**

**NERY CECILIA GARCIA DE LA PAZ**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN  
AGRICULTURA ORGÁNICA SUSTENTABLE**

**VENECIA, DURANGO**

**MAYO DE 2019**

**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**  
**FACULTAD DE AGRICULTURA Y ZOOTECNIA**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**MAYO DEL 2019**

La tesis “**EFFECTO DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE MAÍZ FORRAJERO**”, presentada por: NERY CECILIA GARCIA DE LA PAZ para obtener el grado académico de: **MAESTRO EN CIENCIAS EN AGRICULTURA ORGÁNICA SUSTENTABLE** ha sido aprobada por el Comité Particular de asesoría de Tesis

**EL COMITÉ PARTICULAR DE ASESORÍA DE TESIS**

Asesor principal

---

DR. MIGUEL ÁNGEL GALLEGOS ROBLES

Asesor

---

DR. JOSÉ LUIS GARCÍA HERNÁNDEZ

Asesor

---

DR. CIRILO VÁZQUEZ VÁZQUEZ

**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**

**FACULTAD DE AGRICULTURA Y ZOOTECNIA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**MAYO DEL 2019**

La tesis “**EFFECTO DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE MAÍZ FORRAJERO**”, presentada por: NERY CECILIA GARCIA DE LA PAZ para obtener el grado académico de: **MAESTRO EN CIENCIAS EN AGRICULTURA ORGÁNICA SUSTENTABLE** ha sido aprobada por el Comité Particular de Revisión de Tesis

**EL COMITÉ PARTICULAR DE REVISIÓN DE TESIS**

Presidente y asesor principal

---

DR. MIGUEL ÁNGEL GALLEGOS ROBLES

Secretario y asesor

---

DR. JOSÉ LUIS GARCÍA HERNÁNDEZ

Vocal y asesor

---

DR. CIRILO VÁZQUEZ VÁZQUEZ

## DEDICATORIA

A Dios, por ser tan bueno conmigo; no hay palabras más que para agradecer lo bueno que es conmigo y con mi familia. Gracias por ser siempre fiel.

A mis padres, Irene y Felipe, porque sin su apoyo y su fe en mí, ninguno de mis proyectos habría sido posible. Gracias por siempre estar ahí para mí, en cualquier circunstancia y situación.

A mis cachorros Nahum y Regina, ustedes son mi motivo y mi motor más grande. Son la razón por la que me despierto cada mañana a seguir adelante sin importarme más nada, porque cada buena decisión de mi vida la he tomado pensando en ustedes y su bienestar. Son lo mejor de mi vida, los amo infinitamente.

A mi esposo Joel, por su apoyo incondicional, por estar ahí para mí siempre, a pesar de todo. Gracias por tanto, perdón por tan poco.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Dios**

Por haberme dado la vida y lo más preciado que tengo que es mi familia. Y también por todos los momentos de dicha que me ha regalado cerca de la gente que más quiero.

### **A la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Juárez Del Estado De Durango, División de Estudios de Posgrado**

Por haberme abierto las puertas y darme la oportunidad de obtener un logro más en mi formación profesional.

### **Al CONACYT**

Por el apoyo económico y científico aportado para poder terminar el posgrado satisfactoriamente y así poder seguir desarrollándome profesionalmente.

### **A mis asesores**

Dr. Miguel Ángel Gallegos Robles, Dr. José Luis García Hernández, Dr. Cirilo Vázquez Vázquez por su apoyo como profesionistas, así como su participación en el comité de asesoría para la realización del presente trabajo.

### **A mis maestros**

Por su sabiduría y paciencia, en especial a los maestros de posgrado y a todos aquellos que de alguna manera proporcionaron sus conocimientos para mi formación profesional.

## ÍNDICE

Dedicatoria.....	I
Agradecimientos.....	II
Índice.....	III
Índice de cuadros.....	V
Índice de figuras.....	VI
Resumen.....	VII
Abstract.....	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	3
HIPÓTESIS.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
El maíz como forraje.....	4
Nitrógeno.....	5
Ciclo biogeoquímico del nitrógeno.....	6
Fósforo.....	8
Ciclo del fósforo.....	10
Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	11
El género <i>Bacillus</i> .....	12
Principales características <i>Bacillus</i> .....	14
Mecanismos de acción del género <i>Bacillus</i> en beneficio de las plantas.....	14
Solubilización de fosfatos.....	15
Fijación biológica del nitrógeno.....	16
Efecto en la rizósfera.....	17
Fitoestimulación.....	18

Nitrogenasas de <i>Bacillus</i> .....	19
Fitasas de <i>Bacillus</i> .....	19
Descripción varietal de los híbridos.....	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Localización del sitio experimental.....	22
Preparación del área de trabajo.....	22
Siembra.....	22
Labores culturales.....	22
Factores de estudio y tratamientos.....	22
Diseño experimental.....	24
Modelo estadístico.....	24
Fertilización.....	24
Cosecha.....	25
Variables evaluadas.....	25
Aislamiento de <i>Bacillus</i> en las parcelas experimentales.....	26
Análisis molecular.....	26
Caracterización de las cepas aisladas.....	26
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
Confirmación del género por PCR.....	35
V. CONCLUSIONES.....	38
VI. LITERATURA CITADA.....	39

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Híbridos y cepas de <i>Bacillus</i> y combinaciones entre ellas.....	23
Cuadro 2. Análisis de varianza.....	28
Cuadro 3. Tabla de comparación de medias entre los tratamientos.....	31
Cuadro 4. Tabla de comparación de medias entre los híbridos.....	34

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo del nitrógeno.....	7
Figura 2. Transformaciones de nitrógeno en el suelo.....	8
Figura 3. Ciclo del fósforo.....	10
Figura 4. Resultado de PCR.....	36
Figura 5. Resultado de PCR.....	37

## RESUMEN

La contaminación del ambiente por fertilizantes químicos ha cobrado relevancia a partir de la necesidad que tiene el ser humano de producir una cantidad mayor de alimentos. Las consecuencias que ha traído esta contaminación han provocado que se busquen alternativas más sustentables para seguir manteniendo la producción de alimentos, que cada día es mayor.

Una de estas alternativas es el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), que han demostrado traer múltiples beneficios si se usan como alternativa a la fertilización química. El uso de distintos géneros bacterianos, inoculados por separado y en combinaciones, ha resultado ser una de las alternativas a esta contaminación.

En este trabajo se inocularon distintas cepas de *Bacillus* para producir maíz forrajero, usando las bacterias y la mitad de la dosis de fertilización química habitual. Los resultados mostraron que en algunos tratamientos hubo diferencia estadística en las variables de peso verde, el cual se incrementó en algunos tratamientos. También se observó que las bacterias tienen una mejor respuesta al usarlas e manera combinada, y que interactúan mejor con determinado material vegetal. Esto nos da la pauta para seguir usando este tipo de alternativas, que mantienen y llegan a mejorar la producción de alimentos.

Palabras clave: BPCV, *Bacillus*, maíz.

## ABSTRACT

Environment contamination by chemical fertilizers has gained relevance from the need of the human being to produce a greater quantity of food. The consequences that this contamination has brought have led to the search for more sustainable alternatives to continue maintaining the production of food, which is increasing every day.

One of these alternatives is the use of plant growth promoting bacteria (PGPR), which have been shown to bring multiple benefits if used as an alternative to chemical fertilization. The use of different bacterial genera inoculated separately and in combinations, has turned out to be one of the alternatives to this contamination.

In this work, different strains of *Bacillus* were inoculated to produce forage maize, using the bacteria and half of the usual chemical fertilization dose. The results showed that in some treatments there was statistical difference in the green weight variables, which increased in some treatments. It was also observed that bacteria have a better response when used in combination, and that they interact better with certain plant material. This gives us the guidelines to continue using this type of alternatives, which maintain and even improve the production of food.

Key words: PGPR, *Bacillus*, maize.

## I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la actividad agrícola intensiva de regadío en la segunda mitad del siglo XX a nivel global, ha producido que las aguas superficiales y subterráneas se hayan visto sometidas a diversos tipos de estrés. Uno de los más importantes es su estado cualitativo, en el que la lixiviación del exceso de fertilizantes nitrogenados aplicados a los campos agrícolas es el principal mecanismo responsable de las elevadas concentraciones de nitratos medidas en las aguas subterráneas, superiores al límite máximo permitido y recomendado por la legislación existente. (Silva, 2017)

La agricultura convencional se enfrenta a la reducción de la producción o el aumento de los costos, o ambos. Una cantidad cada vez mayor de fertilizantes y pesticidas, así como los requerimientos energéticos para la siembra para airear los suelos y el aumento de los costos de riego son de suma preocupación. Si bien los métodos convencionales permitieron grandes aumentos en los rendimientos de los cultivos, los altos beneficios sólo inicialmente, no siendo considerados como el enfoque ideal para el futuro. (Rocheli de Souza *et al.*, 2015)

Una alternativa sustentable para esta problemática es el uso de bacterias promotoras del crecimiento. Las bacterias que promueven el crecimiento de las plantas (BPCV) son bacterias que pueden aumentar el crecimiento de las plantas y proteger a las plantas de las enfermedades y el estrés abióticos a través de una amplia variedad de mecanismos. (Rajeshwar *et al.*, 2014)

El maíz (*Zea mays*, L) es una de las gramíneas de mayor importancia a nivel mundial. Se emplea tanto en la alimentación humana, animal y como biocombustible. Como forraje, es un alimento excelente para los rumiantes debido al elevado contenido de energía que aporta el grano, a través del almidón.

En la Comarca Lagunera de México, la producción de leche de bovino es la principal actividad agropecuaria, y demanda una gran cantidad de forraje de calidad. El rendimiento promedio de forraje verde es de 49 tan ha<sup>-1</sup>, teniendo un promedio de 17 ton ha<sup>-1</sup> de materia seca. (Cueto *et al.*, 2006)

Varias características bacterianas importantes, como la fijación biológica del nitrógeno, la solubilización del fósforo, la actividad de la desaminasa ACC y la producción de sideróforos y fitohormonas, pueden evaluarse como rasgos de promoción del crecimiento de las plantas. Los inoculantes bacterianos pueden contribuir a aumentar la eficiencia agronómica reduciendo los costos de producción y la contaminación ambiental, una vez que el uso de fertilizantes químicos puede ser reducido o eliminado si los inoculantes son eficientes. (Rajeshwar *et al.*, 2014). Pueden clasificarse en dos grupos:

- i) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas, donde la bacteria afecta a las plantas suprimiendo otros microorganismos.
- ii) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas con capacidad de control biológico, las cuales promueven el crecimiento de la planta al suprimir los fitopatógenos. (de-Bashan *et al.*, 2007).

## JUSTIFICACIÓN

La agricultura sustentable requiere de la reducción en la aplicación de productos químicos, tales como los fertilizantes. Éstos ocasionan problemas ambientales debido a que sus componentes se lixivian (nitratos) ocasionando la contaminación en los mantos freáticos. Existen tecnologías amigables con el ambiente, como es la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPRs, por sus siglas en inglés) con las cuales se puede reducir la aplicación de fertilizantes químicos, tienen características como fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo, producción de hormonas, etc. las cuales proporcionan beneficio al cultivo.

## OBJETIVOS

### General

- Evaluar el efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) en el cultivo de maíz (*Zea mays*, L)

### Específico

- Evaluar la respuesta en producción de forraje de dos híbridos de maíz inoculados con BPCV.
- Caracterizar molecularmente las bacterias seleccionadas mediante el gen 16 S rDNA.

## HIPÓTESIS

- El uso de bacterias promotoras del crecimiento en el cultivo de maíz mantienen la producción y calidad del forraje de maíz.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### El maíz como forraje

El maíz (*Zea mays*, L) es una de las gramíneas de mayor importancia a nivel mundial. Se emplea tanto en la alimentación humana, animal y como biocombustible. Como forraje, es un alimento excelente para los rumiantes debido al elevado contenido de energía que aporta el grano, a través del almidón.

En México, el maíz ocupa la mayor superficie cultivada anualmente. En 2017, la producción de maíz forrajero verde fue de 2, 318 598.07 toneladas en la región lagunera, con un rendimiento de 42.83 toneladas por hectárea. (SIAP, 2017).

En la Comarca Lagunera de México, la producción de leche de bovino es la principal actividad agropecuaria, y demanda una gran cantidad de forraje de calidad. El rendimiento promedio de forraje verde es de 49 tan ha<sup>-1</sup>, teniendo un promedio de 17 ton ha<sup>-1</sup> de materia seca. (Cueto *et al.*, 2006)

La Comarca Lagunera está entre 101° 41' y 104° 61' O, y 24° 59' y 26° 53' N; tiene una superficie de 47 887 km<sup>2</sup> con una altitud media de 1100 m, con una extensión montañosa y una superficie plana donde se localiza el área agrícola. Su clima es seco desértico, con lluvias en verano e invierno fresco, la precipitación pluvial media anual es 258 mm y la evaporación media anual es 2000 mm, por lo cual la relación precipitación-evaporación es 1:10; la temperatura media anual es 21 °C con máxima de 33.7 °C y mínima 7.5 °C. El periodo de temperaturas bajas o heladas se presentan de noviembre a marzo, aunque en algunas ocasiones se presentan tempranamente en octubre y tardíamente en abril (García, 2004).

La agricultura tradicional ha buscado acrecentar la producción agrícola mediante el manejo del agua, los nutrientes y el control de malezas, insectos y organismos fitopatógenos. Prácticas más recientes, apuntan a utilizar los insumos agrícolas en forma dirigida y controlada en el manejo integrado de plagas y enfermedades, la

agricultura de precisión, entre otros. Así, se busca identificar los puntos más sensibles del manejo del cultivo para aumentar su rendimiento y disminuir la cantidad de agroquímicos utilizados. Por último, cabe considerar que el costo de los insumos agrícolas es altamente dependiente de variables internacionales y que sus efectos en el ambiente pueden ser perjudiciales cuando su uso es excesivo y no controlado. (Pedraza *et al.*, 2010)

## **Nitrógeno**

El nitrógeno (N) es el nutriente más importante para el crecimiento y la productividad de las plantas. Aunque, hay alrededor del 78% de N<sub>2</sub> en la atmósfera, no está disponible para las plantas en crecimiento. El N<sub>2</sub> atmosférico se convierte en formas utilizables en las plantas mediante fijación biológica de N<sub>2</sub> (FBN), que cambia el nitrógeno en amoníaco por microorganismos fijadores de nitrógeno utilizando un sistema enzimático complejo conocido como nitrogenasa. De hecho, la FBN representa aproximadamente dos tercios del nitrógeno fijado a nivel mundial, mientras que el resto del nitrógeno se sintetiza industrialmente. (Rocheli de Souza *et al.*, 2015)

La fijación biológica de nitrógeno se produce mediante microorganismos fijadores de nitrógeno, que están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Además, la FBN representa una alternativa económicamente beneficiosa y ambientalmente sana en comparación con los fertilizantes químicos. Los organismos fijadores de nitrógeno se clasifican en general como:

- (a) Bacterias fijadoras de N<sub>2</sub>, incluyendo miembros de la familia rhizobiaceae que forman simbiosis con plantas leguminosas (por ejemplo, *rizobios*) y no leguminosas (por ejemplo *Frankia*).
- (b) No simbióticas (vida libre, asociativas y endófitas), formas fijadoras de nitrógeno tales como cianobacterias, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus* y *Azocarus*. (Rocheli de Souza *et al.*, 2015)

Se han descrito algunas especies de bacterias y algas capaces de fijar nitrógeno para formar amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), el cual se incorpora al suelo donde bacterias nitrificantes lo oxidan a nitritos ( $\text{NO}_2^{-1}$ ) y posteriormente a nitratos ( $\text{NO}_3^{-1}$ ), proceso conocido como nitrificación. La mayoría de los microorganismos y las plantas son dependientes de este elemento en forma inorgánica, es decir, en forma de iones de nitratos ( $\text{NO}_3^{-1}$ ) o de amonio ( $\text{NH}_4^{+1}$ ), o en algunas ocasiones como moléculas sencillas. Por el contrario, los animales necesitan del nitrógeno orgánico, es decir, formando parte de compuestos como aminas, amidas o aminoácidos, que son obtenidos de forma directa o indirecta de las plantas. La fuente de nitrógeno para las plantas está constituida por el amonio y el nitrato disuelto en el suelo (N asimilable), sin embargo, el 98% del N presente en el suelo está combinado en moléculas orgánicas y por lo tanto no está disponible para la nutrición vegetal. Entre el 1 y 3% de éste, es mineralizado en un año por los procesos biológicos denominados amonificación y nitrificación. La otra parte se volatiliza por procesos de desnitrificación como  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}$  y  $\text{N}_2\text{O}$ , mientras que el compuesto  $\text{NO}_3$  se precipita al no ser absorbido por suelos arcillosos, evento que evita la captación inmediata por los vegetales o microorganismos (Figuerola, 2004).

### **Ciclo biogeoquímico del nitrógeno**

El ciclo del nitrógeno está compuesto por 5 procesos que se definen como mineralización, nitrificación, desnitrificación, asimilación y fijación. La asimilación es el único proceso que no es realizado por las bacterias (Figuerola, 2004).

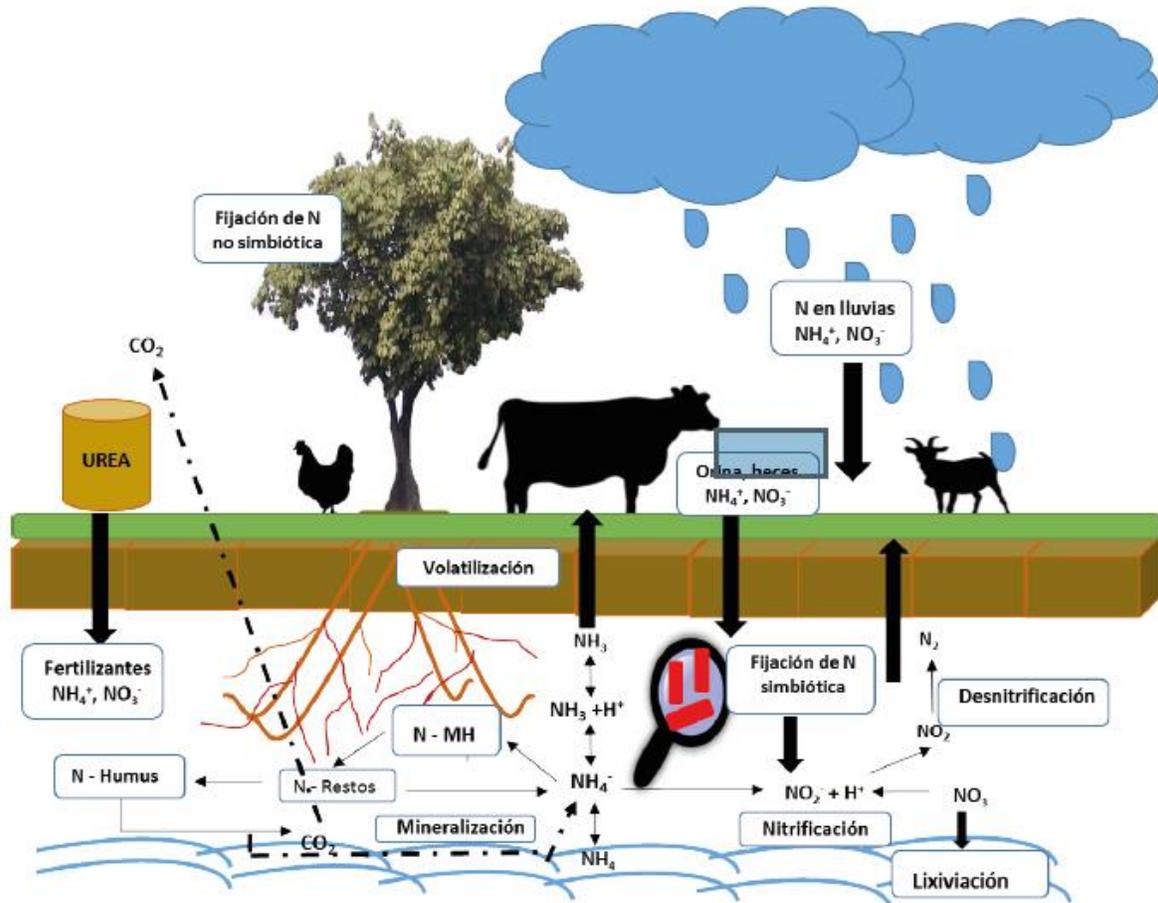


Figura 1. Ciclo del nitrógeno. (Corrales, 2016).

El nitrógeno que entra en el suelo está sujeto a muchas transformaciones. El nitrógeno de las fuentes orgánicas pasa a formar parte de la materia orgánica del suelo y una parte de éste se convierte en nitrógeno inorgánico a través del proceso llamado mineralización. El suelo contiene amonio ( $\text{NH}_4^{+1}$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^{-1}$ ). El  $\text{NH}_4^{+1}$  es atraído electrostáticamente por las cargas aniónicas y las sustancias coloidales del suelo (arcillas y humus) a través de reacciones iónicas. Por otro lado, el  $\text{NO}_3^{-1}$ , se solubiliza en el agua del suelo y no es retenido por las cargas aniónicas. El  $\text{NH}_4^{+1}$  y el  $\text{NO}_3^{-1}$  son las únicas formas de nitrógeno que pueden ser absorbidas por las raíces de las plantas (Menezes, 2009).

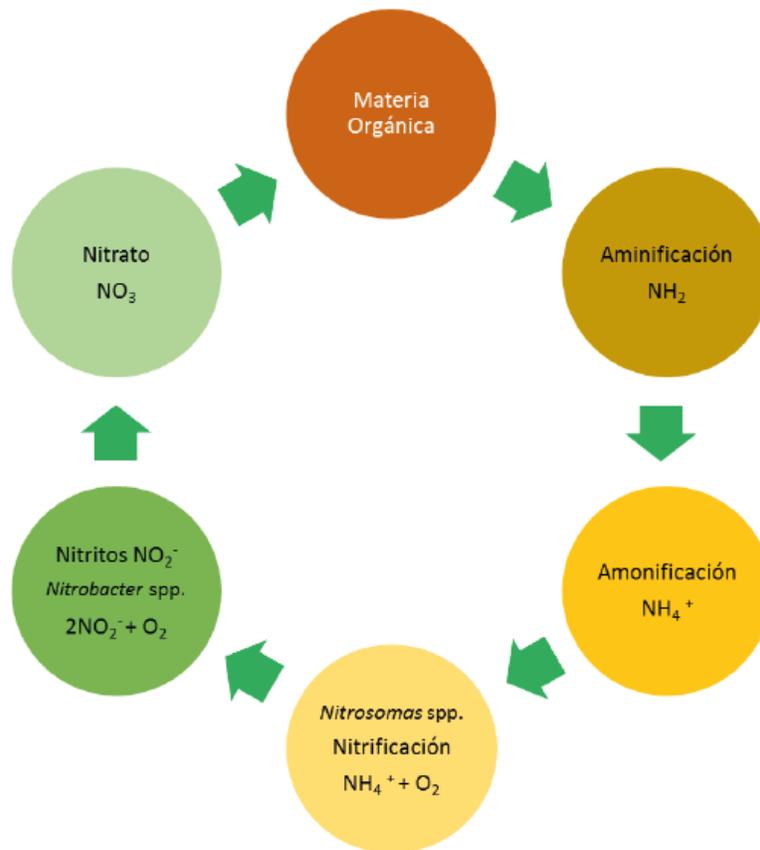


Figura 2. Transformaciones del nitrógeno en el suelo. (Corrales, 2016).

## Fósforo

El fósforo (P) es un nutriente esencial para las plantas. Después del nitrógeno (N), el fósforo (P) es el nutriente más limitante para el rendimiento de los cultivos y es esencial para el crecimiento y desarrollo del maíz (Wu *et al.*, 2005). Participa como componente estructural de los ácidos nucleicos, fosfolípidos y adenosina trifosfato (ATP), como elemento clave de las vías metabólicas y bioquímicas, particularmente importante para la FBN y la fotosíntesis. Las plantas absorben P en dos formas solubles: la monobásica ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y la dibásica ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ). Sin embargo, una gran proporción de P está presente en formas insolubles, de modo que no está disponible para la nutrición de las plantas. Los compuestos orgánicos (incorporados a la materia orgánica del suelo) y los compuestos inorgánicos,

principalmente en forma de complejos minerales insolubles, son fuentes importantes de P disponible en él. Por lo tanto, la disponibilidad de P depende de la solubilidad de este elemento, que podría estar influenciado por la actividad de las raíces de las plantas y microorganismos en el suelo. Las bacterias y hongos solubilizantes de fosfato constituyen aproximadamente el 1-50% y el 0,1-0,5%, respectivamente, de la población total de microorganismos cultivables. Las bacterias solubilizantes de fosfatos solubilizan fosfatos inorgánicos del suelo, tales como  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{FePO}_4$  y  $\text{AlPO}_4$ , a través de la producción de ácidos orgánicos, sideróforos e iones hidroxilo (Rocheli de Souza *et al.*, 2015)

El fósforo es absorbido por las plantas a través de su raíz y las capas externas de las células del sistema radicular. Se absorbe principalmente como ión de ortofosfato primario (Fosfato diácido -  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) o también por medio iones de fosfato secundario (Fosfato ácido -  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) Esta última forma incrementa los niveles de pH. Una vez fijado al sistema radicular, el fósforo tiende a distribuirse por toda la planta a través de reacciones químicas que le permiten incorporarse a compuestos orgánicos donde queda disponible para otros tipos de reacciones. No obstante, en el suelo más del 90% de éste pasa a forma insoluble, es decir no disponible, por eso es importante resaltar que la biodisponibilidad de este elemento es vital en reacciones energéticas, procesos fotosintéticos, transferencia genética y transporte de nutrientes en estos organismos (Corrales *et al.*, 2014).

El fósforo es abundante en los suelos, contribuye a la nutrición y desarrollo de los seres vivos debido a los procesos de hidrólisis y liberación de fosfatos libres (Condrón *et al.*, 2005). Las fosfatasas son enzimas catalizadas a medida que se van liberando de acuerdo a los procesos orgánicos naturales (Quiquampoix *et al.*, 2005). Los cambios netos en fósforo orgánico son generalmente pequeños en relación al tamaño de los reservorios totales, determinando que la variedad climática de los suelos influye sobre la actividad microbiana, ocasionando un aumento significativo de la mineralización neta del P orgánico (Turner *et al.*, 2002).

## Ciclo del fósforo

El ciclo del fósforo en el suelo, involucra tanto a la biomasa microbiana, como a la materia orgánica e inorgánica, incluyendo diferentes fuentes de fósforo, por eso este ciclo es catalogado como complejo y dinámico. Las fuentes de fósforo encontradas se dividen en fósforo inorgánico disponible (Pi), fósforo orgánico, fósforo absorbido, y fósforo mineral primario (Terry *et al.*, 2005).

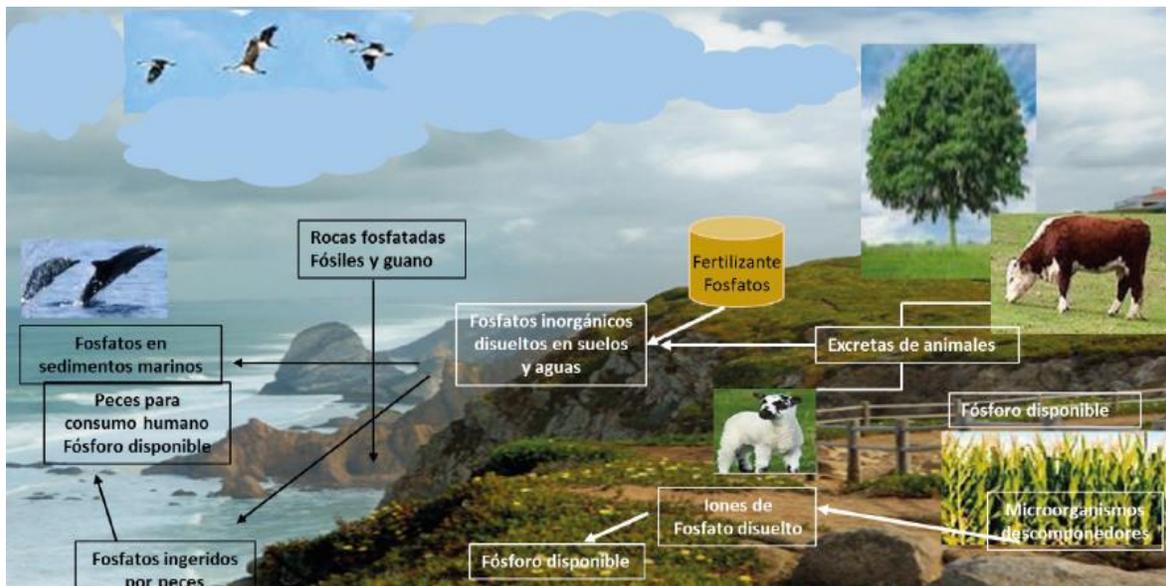


Figura 3. Ciclo del fósforo. Corrales, 2016.

El fósforo se mueve lentamente desde los depósitos de fosfato en la tierra y los sedimentos de los mares a los organismos vivos, para luego regresar a la tierra y al océano. El suelo contiene minerales ricos en fósforo, los cuales permanecen ahí por largos periodos de tiempo y lentamente el fósforo se hace disponible para las plantas, gracias a las variaciones en las constantes de solubilidad de los diferentes minerales. Cuando ocurre el fenómeno de precipitación, el fósforo se comporta como un nutriente no disponible; y la reacción ocurre entre el Pi y elementos metálicos tales como calcio, hierro y aluminio formando sales de fosfato (Rowell, 1994).

## **Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV)**

Las bacterias que promueven el crecimiento vegetal (BPCV) son bacterias que pueden aumentar el crecimiento de las plantas y proteger a las plantas de las enfermedades y el estrés abióticos a través de una amplia variedad de mecanismos.

Varias características bacterianas importantes, como la fijación biológica del nitrógeno, la solubilización del fosfato, la actividad de la desaminasa ACC y la producción de sideróforos y fitohormonas, pueden evaluarse como rasgos de promoción del crecimiento de las plantas. Los inoculantes bacterianos pueden contribuir a aumentar la eficiencia agronómica reduciendo los costos de producción y la contaminación ambiental, una vez que el uso de fertilizantes químicos puede ser reducido o eliminado si los inoculantes son eficientes. (Rajeshwar *et al.*, 2014).

Pueden clasificarse en dos grupos:

(i) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas, donde la bacteria afecta a las plantas suprimiendo otros microorganismos. Los mecanismos que estas bacterias utilizan pueden ser a través de su propio metabolismo (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas o fijando nitrógeno), afectando directamente el metabolismo de la planta (incrementando la toma de agua y minerales), mejorando el desarrollo radicular, incrementando la actividad enzimática de la planta o “ayudando” a otros microorganismos benéficos para que actúen de mejor manera sobre las plantas.

(ii) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas con capacidad de control biológico, las cuales promueven el crecimiento de la planta al suprimir los fitopatógenos. (de-Bashan *et.al.*, 2007).

La rizósfera puede definirse como la región del suelo donde los procesos mediados por los microorganismos están específicamente influenciados por el sistema radicular. Esta área incluye el suelo conectado a las raíces de las plantas y a menudo se extiende unos pocos milímetros de la superficie de la raíz, siendo un entorno importante para las interacciones entre plantas y microorganismos. Las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas pertenecen a un grupo benéfico y heterogéneo de microorganismos que pueden encontrarse en la rizósfera, en la superficie de las raíces o asociadas a ella y son capaces de aumentar el crecimiento de las plantas y protegerlas de la enfermedad y estrés abiótico, de ahí que también se les conozca como rizobacterias. (Rajeshwar *et al.*, 2014)

Para lograr los máximos beneficios en términos de ahorro de fertilizantes y un mejor crecimiento, la tecnología de inoculación basada en BPCV debe ser utilizada junto con los niveles adecuados de fertilización. (Rajeshwar *et al.*, 2014).

Los microorganismos fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fosfato requieren fuentes químicas y naturales de energía. Éstos mediante sus procesos metabólicos generan enzimas que catalizan la ruptura de los enlaces del nitrógeno y del ácido fítico constituyéndose en precursores de reacciones químicas. Las bacterias intermediadoras de vida libre que participan en estos procesos son: *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Azotobacter* spp., y *Azospirillum* spp., las que han sido aisladas de la rizosfera, donde el número de microorganismos diazótrofos es generalmente mayor por la liberación y concentración disponible de nutrientes en forma de compuestos orgánicos (Terry *et al.*, 2005).

### **El género *Bacillus***

El género *Bacillus* fue descrito por primera vez por Ferdinand Julius Cohn entre 1870 y 1880, su heterogeneidad en la fisiología ecológica dificulta su clasificación genética o su generalización (Corrales *et al.*, 2012). Mediante técnicas

moleculares para el estudio del ADNr 16 S, se ha logrado subdividir en cuatro grupos: el primer grupo se conoce como *Bacillus senso stricto* donde encontramos el *Bacillus subtilis*, el segundo grupo *Bacillus sensu lato* que incluye principalmente *B. anthracis*, *B. thuringiensis* y *B. cereus*, finalmente se han descrito dos grupos más con nuevas especies, destacando a *B. horti*, *B. carboniphilus*, *B. chitinolyticus*, y *B. infernus*, entre otros (Restrepo *et al.*, 2015).

*Bacillus* es un género de interés, dado que aporta un amplio perfil de diversidad fisiológica (acidofilia, alcalofilia, psicofilia, termofilia y parasitismo), virtud que es otorgada por la formación de su spora, cualidad que le permite estar en diferentes hábitats tanto acuáticos como terrestres (Restrepo *et al.*, 2015).

El género *Bacillus* es secretor de proteínas y metabolitos eficientes para el control de plagas y enfermedades, promueve el crecimiento vegetal a través de la solubilización de fósforo y la producción de reguladores de crecimiento como el ácido indol acético; así mismo participa en la fijación de nitrógeno cuando hace parte de consorcios microbianos. Como biofertilizante es una opción amigable para el suelo y el ambiente que da respuesta a la necesidad de implementar la agricultura sostenible. (Corrales *et al.*, 2017)

Las bacterias del género *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas en los más diversos hábitats que incluyen ecosistemas de agua dulce, marinos y en suelo, y sus especies están muchas veces asociadas a plantas. En este último caso, se han demostrado las potencialidades de las especies del género *Bacillus* para la producción de antibióticos, enzimas, la solubilización de fosfatos y la fijación biológica del nitrógeno. En este sentido, se han realizado estudios de promoción del crecimiento vegetal y control biológico de patógenos, buscando estrategias que permitan la disminución del uso de fertilizantes químicos, que no solo encarecen la producción, sino también, traen consigo un impacto negativo sobre el medio ambiente.

## Principales características de *Bacillus*

Este género comprende una amplia diversidad de tipos fisiológicos, donde se destacan características como la degradación de la mayoría de los sustratos derivados de plantas y animales, incluyendo celulosa, almidón, pectina, proteínas, agar, hidrocarburos y otros; además su capacidad para la producción de antibióticos, la nitrificación, la desnitrificación, la fijación de nitrógeno, la litotrofia facultativa, la acidofilia, la alcalofilia, la psicofilia, la termofilia y el parasitismo, ejemplifican su capacidad de sobrevivir en diversos ambientes. Los miembros de este género se caracterizan por ser Gram positivos, de forma bacilar, catalasa positiva, aerobios estrictos o anaerobios facultativos y formadores de endosporas. Su ciclo de vida se divide en dos fases: crecimiento vegetativo y esporulación. Durante el primer estado, la bacteria crece de forma exponencial cuando se encuentra en un medio donde las condiciones son favorables. Cuando los nutrientes comienzan a escasear, la bacteria esporula, formando una endospora, la cual puede permanecer viable en el ambiente por largos períodos de tiempo hasta que las condiciones se tornen favorables para volver a su forma vegetativa. También se ha visto que existe una gran distribución de estas endosporas, estructura que les permite sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, desecación, pH entre otros.

El suelo constituye el sustrato en el que la mayor variedad de microorganismos se pueda encontrar. Esto se justifica por la presencia de elevadas concentraciones de nutrientes que existen en él. Los géneros más comunes encontrados en ecosistemas terrestres son *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum* y *Bacillus*, entre otros. Este último comprende una amplia variedad de especies que se encuentran en muchas ocasiones, asociadas a las plantas, ejerciendo un efecto positivo sobre el crecimiento a través de una serie de mecanismos que involucran la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de patógenos. Los miembros de este género, se han aislado de numerosos cultivos de interés económico como la caña de azúcar, el algodón, el trigo, el maíz, la papa y el arroz. Dentro de las especies que se pueden aislar de

forma más frecuente asociadas a las plantas, ya sea la rizósfera o los tejidos internos, se destacan *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. circulans* y *B. cereus*.

### **Mecanismos de acción del género *Bacillus* en beneficio de las plantas**

La capacidad del género para producir compuestos orgánicos, realizar fijación biológica de nitrógeno (FBN) y solubilizar fosfatos (SF), son actividades que efectúan mediante enzimas como nitrogenasas y fitasas, con un efecto positivo en la promoción del crecimiento vegetal y en el aumento del potencial productivo. (Corrales *et al.*, 2017)

La promoción del crecimiento vegetal por parte de las especies del género *Bacillus* puede ocurrir de forma directa o indirecta. Un efecto directo sobre la promoción del crecimiento vegetal se observa en bacterias rizosféricas que tienen la capacidad de llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno, la solubilización de minerales como el fósforo y la producción de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal. Por su parte, la forma indirecta de promoción del crecimiento vegetal está relacionada con la producción de sustancias que actúan como antagonistas de patógenos o induciendo resistencia en las plantas.

### **Solubilización de fosfatos**

El fósforo es uno de los nutrientes limitantes del crecimiento de las plantas. Dentro de las funciones que se le han atribuido, se encuentran la captación, almacenamiento y transferencia de energía, además de formar parte de macromoléculas tales como, ácidos nucleicos y fosfolípidos presentes en la membrana citoplasmática. Una gran cantidad de fosfatos inorgánicos aplicados al suelo como fertilizantes son inmovilizados después de su aplicación, permaneciendo de forma inaccesible para la planta. Esto permite predecir que aquellos microorganismos que colonicen la raíz de estas plantas y que tengan la capacidad de solubilizar este fósforo, como por ejemplo, bacterias de los géneros *Bacillus* y *Enterobacter*, actúen como promotores del crecimiento vegetal. El

género *Bacillus* es uno de los más estudiados respecto a esta capacidad y dentro de él se destacan las especies *B. megaterium* y *B. subtilis* debido a que excretan al medio ácidos orgánicos como principal mecanismo de solubilización, aunque también pueden actuar enzimas como las fitasas.

Los microorganismos solubilizantes de fosfatos (PSM) incluyen una amplia gama de organismos simbióticos y no simbióticos, tales como especies de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Rhizobium*; *Actinomicetos* y varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium* similares a hongos. Las bacterias solubilizantes de fosfato ya se han aplicado en las prácticas agronómicas como potenciales bioinoculantes para aumentar la productividad. Por ejemplo, en la Unión Soviética, se preparó y comercializó un producto biofertilizante bajo la marca comercial "fosfobacterina" para aplicaciones agrícolas. La fosfobacterina contenía *Bacillus megaterium* var. *Phosphaticum* y posteriormente se introdujo también en otros países, como Europa del Este y la India. (Kumar *et al.*, 2011)

Las bacterias solubilizadoras de fosfato son protagonistas del aumento de la disponibilidad del fósforo (P) en el suelo, ya que tienen la capacidad de intervenir en los procesos de fijación de éste, demostrando que su empleo en diversos cultivos favorece el rendimiento de las cosechas y mejora la fertilidad del suelo. Estudios realizados por Khan y colaboradores en 2007 (32) y Zaidi y colaboradores en 2009 (33), en los cuales ensayan con *Bacillus*, *Pseudomonas*, *E.coli* y *Aspergillus*, ponen en evidencia la capacidad solubilizadora de fosfatos.

### **Fijación biológica del nitrógeno**

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico constituye, después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la biosfera. Curiosamente, este proceso crucial solo pueden llevarlo a cabo unos pocos grupos de seres vivos, todos ellos procariotas, los cuales están distribuidos prácticamente en todas las ramas de bacterias y archeas. La fijación biológica del nitrógeno es un proceso microbiano en el que el nitrógeno atmosférico se reduce a

amonio y se incorpora a la biomasa, con lo que pasa a constituir la fuente principal de nitrógeno para las plantas. Este proceso se lleva a cabo por la enzima nitrogenasa, presente en todos los microorganismos fijadores del nitrógeno. Se estima que 175 millones de toneladas de nitrógeno por año se adicionan al suelo a través de la fijación biológica del nitrógeno y se calcula que el 60 % del nitrógeno usado por las plantas proviene de la fijación biológica. Teniendo en cuenta esto, se podría reducir considerablemente el uso de fertilizantes nitrogenados en la agricultura si se emplearan los microorganismos que puedan llevar a cabo esta función. El género *Bacillus* presenta una gran versatilidad metabólica y se ha demostrado su capacidad de llevar a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno. Se ha informado que algunas especies como *Bacillus fusiformis*, aislada de maíz, trigo y arroz, presentan una gran actividad nitrogenasa, lo que implica que sean buenos fijadores de dinitrógeno. Se ha demostrado que la especie *Bacillus firmus* potencia la actividad nitrogenasa del diazotrofo *Klebsiella terrigena* E6, microorganismos aislados de la planta *Dactylus glomerata*. *B. firmus* podría proteger la nitrogenasa de *K. terrigena* del dioxígeno, ya que esta enzima se inactiva con las tensiones de dioxígeno que normalmente existen en la atmósfera, todo esto se puede traducir en un aumento de la cantidad de nitrógeno fijado por la planta por lo que se reduciría considerablemente el uso de fertilizantes nitrogenados de origen químico.

### **Efecto en la rizósfera**

Se ha encontrado a *B. megaterium* como la especie más abundante, pero es improbable que una sola especie dominará numéricamente en la mayoría de los suelos. Las especies del grupo *B. polymyxa* (recientemente renombrado *Paenibacillus*) son autótrofos, comúnmente asociados con materiales vegetales podridos, compost y rizósfera. Algunos de ellos son capaces de fijar nitrógeno y contribuyen significativamente a la adquisición de nitrógeno por cultivos. Los miembros del grupo de *B. brevis*, rebautizado *Brevibacillus*, se encuentran tanto en hábitats de tierra como de agua. La especie *B. sphaericus* es más conocida

como un patógeno de insectos y se encuentra en los sedimentos de piscinas, lagos y zanjas de drenaje donde las larvas de insectos prosperan. (Kumar *et al.*, 2011)

Bajo ciertas condiciones, muchos compuestos presentes en los exudados radiculares (azúcar, aminoácidos u ácidos orgánicos) estimulan una respuesta quimiotáctica positiva en las bacterias. Siendo una de las principales fuerzas motrices para la colonización de raíces microbianas, la exudación de la raíz de la planta podría ser diseñada precisamente para estimular la colonización microbiana específica en las raíces. Sin embargo, las prácticas de cultivo seguidas también han sido reconocidas como un determinante importante de la microbiota rizosférica. Las estrategias de manejo de la agricultura pueden inducir cambios claros en las estructuras de las comunidades microbianas asociadas a las plantas. (Kumar *et al.*, 2011)

### **Fitoestimulación**

Se conoce bien el aumento del crecimiento de las plantas por las especies colonizadoras de *Bacillus* y *Paenibacillus*, También es muy probable que los efectos promotores del crecimiento de varias BPCV se deban a la producción bacteriana de reguladores del crecimiento de las plantas tales como el ácido indol-3-acético (IAA), las giberelinas y las citoquininas. El 80% de las bacterias que colonizan la rizósfera han sido reportadas positivas para la producción de IAA, pero los informes que representan la producción de IAA por bacterias Gram positivas son pocos. El triptófano ha sido identificado como molécula precursora principal para la biosíntesis de IAA en bacterias. El IAA controla una diversidad de funciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas y actúa como un componente clave en la configuración de la arquitectura de las raíces de las plantas, como la diferenciación de los tejidos vasculares radiculares, la regulación de la iniciación de las raíces laterales y el gravitropismo radicular. (Kumar *et al.*, 2011)

### **Nitrogenasas de *Bacillus***

Estas enzimas reducen la molécula de N<sub>2</sub> y constan de dos componentes:

a) Componente I o dinitrogenasa: posee un cofactor que es una asociación entre hierro y molibdeno (FeMo) también llamado heterotetrámero, el cual forma parte del centro activo. La proteína Fe-M, donde el metal (M) puede ser molibdeno, vanadio o hierro, es un tetrámero  $\alpha_2 \beta_2$  constituido por 30 átomos de hierro y dos del metal correspondiente, distribuidos en dos tipos de cúmulos: los empaques cúbicos o tipo "P" (8 Fe, 7 S<sub>2</sub>) y el cofactor Fe-M (63). Esta proteína es inactivada por el oxígeno.

b) Componente II o dinitrogenasa reductasa, la cual pasa los electrones al componente I, con consumo de ATP y el componente I cede posteriormente los electrones al sustrato. De la enzima hace parte el cofactor, que es donde se lleva a cabo la reacción con el sustrato. Puede estar asociado de manera permanente a la enzima, conociéndose entonces como grupos prostéticos, o de forma transitoria, denominándose co-sustratos. (63). Como resultado, las nitrogenasas, simultáneo a la reducción de nitrógeno molecular, efectúan procesos de fijación de nitrógeno convirtiéndolo en amoníaco fácilmente asimilable por las plantas.

Para formar la enzima activa nitrogenasa se requiere una molécula del componente I y dos moléculas del componente II.

### **Fitasas de *Bacillus***

Con relación a las fitasas, se puede establecer que son enzimas pertenecientes a la subfamilia de las fosfatasas. Las fitasas (myo-inositol hexafosfato hidrolasas) se encuentran de forma común en la naturaleza y pueden ser de origen microbiano, vegetal o animal. Existen evidencias de que las fitasas pueden incrementar significativamente la utilización y la disponibilidad de fósforo proveniente del ácido fítico y supone una reducción en la excreción de fósforo (Nolan *et al.*, 1987)

Estructuralmente las fitasas son enzimas que se clasifican como fosfohidrolasas, las cuales intervienen en la hidrólisis del ácido fítico (hexafosfato de inositol) o fitatos. Las fitasas bacterianas de acuerdo con los mecanismos catalíticos y la especificidad de hidrólisis se pueden categorizar en dos clases principales: (a) fitasas ácidas histidinas HAP y (b) fitasas alcalinas.

El género *Bacillus* produce fitasas alcalinas, es decir actúan a un pH que va de neutro a básico y a una temperatura de 70°C, lo que le confiere termo-resistencia. La capacidad hidrolítica que posee *B. subtilis* permite la reducción del ácido fítico impidiendo que se presente quelación de los minerales que se encuentran en la biomasa y así se evita que el fósforo y las diferentes trazas de elementos se vuelvan insolubles y se precipiten. En esto radica la importancia de la acción de estas bacterias frente al ciclo del fósforo y su función de beneficio a la biodiversidad de la flora y los suelos. (Haefner *et al.*, 2005).

## **Descripción varietal de los híbridos**

### 1) Tiburón (Syngenta, 2016)

#### Características

- N° Hileras promedio: 14-16
- N° de Granos por Hilera: 35
- N° Aproximado de Granos por Mazorca: 534
- Color de grano: Blanco
- Tipo de grano: semi dentado
- Excelente adaptación a las principales zonas maiceras del trópico.
- Tolerante a las principales enfermedades foliares de origen fungoso.
- Ciclo vegetativo intermedio.
- Excelente calidad de mazorca.
- Tolerancia al acame.
- Tolerancia a plagas y enfermedades.

2) 91-50W (ABT, 2016)

- Híbrido blanco
- Ciclo precoz
- Tolerante al acame
- Hojas semierectas
- Buen sistema radicular
- Alto potencial de rendimiento
- Soporta altas densidades de siembra
- Días a floración: 58-59
- Días a madurez fisiológica: 128
- Madurez relativa: 128
- Altura de la planta en m: 2.30

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Localización del sitio experimental**

El experimento se realizó en el Campo Agrícola Experimental de la Facultad de Agricultura y Zootecnia (FAZ) de la Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), el cual se localiza en el Km 32 de la Carretera Gómez Palacio-Tlahualilo en el Ejido Venecia, Municipio de Gómez Palacio, Durango, en el paralelo 25°46'50" de latitud norte y en el meridiano 103°21'02" de longitud oeste y a una altura de 1,110 msnm.

#### **Preparación del área de trabajo**

Se realizó la preparación del terreno con rastreo, seguido del trazo de las parcelas experimentales, y posteriormente la instalación del sistema de riego, el cual fue por cintilla con emisiones cada 0.15 m.

#### **Siembra**

Se utilizaron dos híbridos de maíz (H1: Tiburón-Syngenta; H2: 9150W-ABT) los cuales se inocularon con cuatro cepas de *Bacillus* y combinaciones entre ellas. La siembra fue de manera manual.

#### **Labores culturales**

Se realizaron de forma manual aclareos y aporques, al igual que deshierbes para el control de maleza y prevenir el establecimiento de plagas.

#### **Factores de estudio y tratamientos**

Las semillas se inocularon con dos cepas de *Bacillus subtilis*, una de *Bacillus velezensis* y una más de *Bacillus cereus*, a una concentración de  $10^7$  UFC/ml. Se

inocularon las semillas con las BPCV de manera individual y en combinaciones, quedando los tratamientos de la siguiente manera:

**Cuadro 1. Híbridos y cepas de *Bacillus* y combinaciones entre ellas**

Híbrido	Biofertilizantes
Tiburón (H1) Syngenta	T1- <i>Bacillus subtilis</i> 1
	T2 - <i>Bacillus subtilis</i> 2
	T3 – <i>Bacillus velezensis</i>
	T4 – <i>Bacillus cereus</i>
	T5 – <i>Bacillus subtilis</i> 1 y <i>Bacillus velezensis</i>
	T6 - <i>Bacillus subtilis</i> 1 y <i>Bacillus cereus</i>
	T7 – <i>Bacillus subtilis</i> 2 y <i>Bacillus velezensis</i>
	T8 – <i>Bacillus subtilis</i> 2 y <i>Bacillus cereus</i>
	T9 - Testigo (fertilización química normal, sin inóculo)
9150W (H2) ABT	T1- <i>Bacillus subtilis</i> 1
	T2 - <i>Bacillus subtilis</i> 2
	T3 – <i>Bacillus velezensis</i>
	T4 – <i>Bacillus cereus</i>
	T5 – <i>Bacillus subtilis</i> 1 y <i>Bacillus velezensis</i>
	T6 - <i>Bacillus subtilis</i> 1 y <i>Bacillus cereus</i>
	T7 – <i>Bacillus subtilis</i> 2 y <i>Bacillus velezensis</i>
	T8 – <i>Bacillus subtilis</i> 2 y <i>Bacillus cereus</i>
	T9 - Testigo (fertilización química normal, sin inóculo)

## **Diseño experimental**

La distribución de los tratamientos en campo se estableció bajo un diseño de bloques al azar con arreglo factorial 2x9, siendo el factor A los híbridos con dos niveles, el factor B los biofertilizantes con nueve niveles, y tres repeticiones.

## **Modelo estadístico**

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + H_j + B_k + (HB)_{jk} + E_{ijk}$$

Donde:

i= R = Repeticiones

j= H = Híbridos

k= B = Bacterias

El análisis de varianza y comparación de medias (Tukey 0.05) se realizó en el programa estadístico SAS.

## **Fertilización**

A las parcelas testigo se les aplicó 120 kg de N ha<sup>-1</sup> y 80 kg de P ha<sup>-1</sup> a base de UREA y MAP, respectivamente, aplicando la mitad del nitrógeno y todo el fósforo al momento de la siembra, y la otra mitad del nitrógeno al inicio de la etapa de floración.

A las parcelas donde se inocularon bacterias se les aplicó 60 kg de N ha<sup>-1</sup> y 40 kg de P ha<sup>-1</sup>, aplicando la mitad del nitrógeno y todo el fósforo al momento de la siembra, y la otra mitad del nitrógeno al inicio de la etapa de floración.

## **Cosecha**

La cosecha se realizó en junio del 2017. Se tomó como indicador que el grano estuviera a 2/3 de la línea de leche. Se tomaron los datos de las variables evaluadas.

## **VARIABLES EVALUADAS**

**Nitratos en savia.** Previo a la cosecha, se tomaron valores de nitratos en savia. Esto se hizo cortando la planta entre los dos primeros nudos basales, extrayendo la savia de manera directa al presionar en tallo con unas pinzas y depositando la muestra en un ionómetro portátil.

**Peso verde.** Para las muestras se cortaron 5 plantas consecutivas en el mismo surco, se trituraron con tijeras y pesaron en una báscula de reloj con capacidad de 5 kilogramos. Se calculó el rendimiento sacando el promedio de las 5 plantas y multiplicándolas por la cantidad de plantas por hectárea.

**Altura de planta.** Se midieron las plantas con un flexómetro para tomar los valores de altura.

**Peso de hojas, caña y elote.** Las plantas tomadas para muestras se separaron en sus componentes (hojas, caña y elote) y se pesaron de manera individual. Al finalizar, se trituraron con tijeras y se depositaron en bolsas de papel.

**Peso, largo y ancho de raíz.** Se extrajo la raíz del cultivo para su análisis en el laboratorio. Esto fue con una pala; sacudiendo un poco la raíz para quitar el exceso de suelo. Se midió su peso en una báscula de reloj, y los valores de largo y ancho con un flexómetro. Posterior a esto, se colocaron en bolsas ziploc individualmente, y se transportaron en una hielera al laboratorio, para su análisis.

**Diámetro de tallo.** Se midió con un vernier, de la parte media de la caña.

**Número de hojas.** Se contabilizó el número de hojas de cada planta que se muestreó.

**Número, largo y diámetro de elote.** Se contabilizaron los elotes por planta, y se tomó valores de largo con un flexómetro y diámetro con un vernier, de la parte media del elote.

**Peso seco.** Para determinar el peso seco se secaron las muestras un mes a temperatura ambiente a la sombra. Posterior a este, se pesaron las muestras en una báscula de reloj para tomar el valor de peso.

**Proteína cruda.** Los valores de proteína cruda se determinaron en laboratorio mediante el método de Kjeldahl, a partir de las muestras secas.

### **Aislamiento de *Bacillus* en las parcelas experimentales**

De cada parcela experimental se extrajo el sistema radicular de una planta para buscar la presencia de bacterias del género *Bacillus*. En el laboratorio, las muestras de raíz se lavaron con agua peptonada para recuperar la rizósfera. La solución resultante se sembró en cajas para su purificación. Las muestras se incubaron en medio semi-selectivo NFb-rojo congo (Holguin *et al.*, 1996) y en YEPG (Yeast Extract-Peptide) para determinar la presencia de colonias de bacterias, para después identificarlas de acuerdo a su morfología.

### **Análisis molecular**

Las diferentes colonias identificadas se volvieron a sembrar por separado en medio NFb-rojo congo y YPEG para su purificación y proceder a la extracción de ADN por el método CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) fenol-cloroformo. Una vez teniendo éste, se procedió a la realización del método de PCR para buscar la presencia del género inoculado.

### **Caracterización de las cepas aisladas**

Se seleccionaron los medios de cultivo con crecimiento positivo y se desarrolló un protocolo de amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa de una región del gen 16 S rDNA para *Bacillus*, el cual genera un producto de 287 pb. Los

iniciadores usados fueron F 5'-ACCGGATGGTTGTCTTGAAC-3' y R 5'-CCGTCAGACTTTCGTCCATT-3'.

La mezcla de reacción constó de 2 µL de DNA genómico, 2.5 µL de Buffer enzimático 10X, 3 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 2.5 µL de mezcla de dNTPs, 1 µL de cada iniciador, 0.5 µL de *Taq* polimerasa y agua libre de DNAsas hasta un volumen de 25 µL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador programado de la siguiente manera: Desnaturalización inicial 95 °C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos con un paso de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento 58 °C por 30 segundos, Extensión de 72 °C por 30 segundos, con una Extensión final a 72 °C de 10 min. Todos los amplificados fueron corridos en geles de agarosa al 1.5% teñidos con Gel Red® y visualizados bajo un sistema UV de documentación de geles.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ANOVA (cuadro 2) muestra que hubo diferencia significativa en peso en verde y peso de elote entre los tratamientos, y diferencias altamente significativas en ancho de raíz entre tratamientos; se observaron diferencias significativas entre los híbridos para peso de hojas y peso de raíz, y diferencias altamente significativas en contenido de nitratos en savia, peso de caña, ancho de raíz y número de elotes entre los híbridos. En la interacción tratamiento-híbrido hubo diferencias significativas en peso de hojas y peso de caña, y diferencias altamente significativas en peso de elote, ancho de raíz y número de hojas.

CUADRO 2. Análisis de varianza

Fuente de variación	PV	PS	AP	NS	ProtC
Repetición	6.96	3.96	0.02	52.57	0.27
Tratamiento	705.66*	28.51*	0.05	57.71	1.50*
Híbrido	517.93	6.82	3	63.15**	0.01
Trat*Híb	84.44	21.02	0.05	25.1	0.81
Error	307.16	15.34	1670.67	805897.1	41.65

RV (Rendimiento Verde) y RS (Rendimiento Seco) están expresados en ton ha<sup>-1</sup>, AP (Altura de Planta) en metros, NS (nitratos en savia) en mg L<sup>-1</sup> y ProtC (proteína cruda) en porcentaje.

CUADRO 2. Continuación...

<b>Fuente de variación</b>	<b>PH</b>	<b>PC</b>	<b>PE</b>	<b>PR</b>	<b>LR</b>	<b>AR</b>
<b>Repetición</b>	2.49	11.37	12.81	0.62	0.67	0.36
<b>Tratamiento</b>	10.6	289.58	33.92*	0.242	0.52	0.008**
<b>Híbrido</b>	34.88*	91.6*	127.02	0.04*	0.1	0.063**
<b>Trat*híb</b>	2.32*	49.99	4.08**	0.05	0.14	<.001**
<b>Error</b>	0.002	3.23	0.003	0.071	13.6	4.41

PH (Peso de Hojas), PC (Peso de Caña), PE (Peso de Elote) y PR (Peso de Raíz) están expresados en kg y LR (Largo de Raíz) y AR (Ancho de Raíz) en metros.

CUADRO 2. Continuación...

<b>Fuente de variación</b>	<b>DT</b>	<b>NH</b>	<b>NE</b>	<b>LE</b>	<b>DE</b>
<b>Repetición</b>	3.60	2.90	0.01	37.5	0.45
<b>Tratamiento</b>	1.50	3.11	0.19	16.91	0.64
<b>Híbrido</b>	0.05	0.01	0.9**	0.37	0.07
<b>Trat*Híb</b>	9.62	2.06**	0.19	14.05	0.92
<b>Error</b>	0.45	0.69	0.19	13.74	0.54

DT (Diámetro de Tallo), LE (Largo de Elote) y DE (Diámetro de Elote) están expresados en cm, NH (Número de Hojas) y NE (Número de Elotes).

Ortiz y Velasteguí (2010) realizaron inoculación de maíz con cepas de *Azospirillum*, encontrando diferencias significativas en la producción de nitrógeno en la rizósfera. Sin embargo, estas diferencias no se vieron reflejadas en el rendimiento entre los tratamientos.

En este trabajo, en cuanto al peso seco, no hubo diferencias entre los tratamientos, lo cual indica que si bien no se incrementaron los valores de rendimiento, los tratamientos con bacterias promotoras del crecimiento vegetal son

una opción viable para mantener la producción, con una menor dosis de fertilizantes químicos.

Espinosa *et al.*, en el 2017 realizaron una inoculación con distintas bacterias promotoras del crecimiento en tomate, demostrando que *Bacillus* spp., fue el mejor tratamiento en cuanto a peso del fruto y rendimiento, mostrando un incremento en el rendimiento del 25.06% en comparación con los otros tratamientos. Esto mismo supondríamos al explicar la diferencia significativa en cuanto a la variable de peso verde, que fue estadísticamente mayor entre tratamientos.

Rodríguez *et al.*, en 2013 mencionan que *Bacillus cereus* es una cepa que demostró incrementar la altura de planta en un 50.4%, al igual que incrementó el rendimiento y producción de frutos, esto en el cultivo de melón, por lo que es una alternativa para la producción de alimentos.

Una variable que resultó con una diferencia altamente significativa fue el ancho de raíz, que resultó altamente significativa en la interacción tratamiento-híbrido. Esto coincide con lo reportado por García *et al.*, en 2015, quienes demostraron que *Bacillus subtilis* fue uno de los tratamientos que mejor respondió en la variable de longitud de raíz, esto al compararla con otras bacterias promotoras del crecimiento en maíz. Sánchez-Yáñez *et al.* (2014) también mencionan que el largo y ancho de raíz fue mayor con bacterias promotoras del crecimiento que al compararlo con el testigo, lo cual demuestra que el uso de estas bacterias tiene un efecto positivo en la producción del cultivo.

En cuanto a la comparación de medias, hubo diferencias entre los tratamientos. Los mayores rendimientos, tanto en verde como en seco, estuvieron dados por los tratamientos 2 y 5, que incluyen la combinación de una cepa de *Bacillus subtilis* y *Bacillus velezensis*. También el tratamiento 7 demostró ser superior a los demás en el valor de Proteína Cruda.

CUADRO 3. Tabla de comparación de medias entre los tratamientos

Tratamiento	PV	PS	AP	NS	PROTC
T1- <i>Bacillus subtilis</i> 1	65.1 B	15.4 AB	2.83 A	2666.6 A	6.45 ABC
T2 - <i>Bacillus subtilis</i> 2	89.17 A	18.39 A	2.75 A	2966.6 A	7.35 AB
T3- <i>Bacillus velezensis</i>	61.27 B	14.23 AB	2.70 A	3500 A	6.3 BC
T4 – <i>Bacillus cereus</i>	66.34 B	15.02 AB	2.61 A	3016 A	6.21 BC
T5 – <i>Bacillus subtilis</i> 1 y <i>Bacillus velezensis</i>	89.11 A	18.42 A	2.75 A	2966 A	6.77 ABC
T6 - <i>Bacillus subtilis</i> 1 y <i>Bacillus cereus</i>	74.04 AB	17.92 A	2.71 A	3366 A	6.45 ABC
T7 – <i>Bacillus subtilis</i> 2 y <i>Bacillus velezensis</i>	59.72 B	11.97 B	2.80 A	2883 A	7.55 A
T8 – <i>Bacillus subtilis</i> 2 y <i>Bacillus cereus</i>	70.12 AB	16.95 A	2.07 A	2716 A	5.83 C
T9 - Testigo	72.49 AB	17.18 A	2.77 A	3183 A	6.42 ABC

PV (Peso verde) y PS (Peso Seco) están expresados en ton ha<sup>-1</sup>, NS (nitratos en savia) en mg L<sup>-1</sup> y ProtC (proteína cruda) en porcentaje.

CUADRO 3. Continuación...

Tratamiento	PH	PC	PE	PR	LR	AR
T1- <i>Bacillus subtilis</i> 1	0.22 A	0.67 A	0.31 A	0.25 A	32.83 A	20.83 B
T2 - <i>Bacillus subtilis</i> 2	0.27 A	0.63 A	0.28 AB	0.24 A	36.33 A	21.83 AB
T3 – <i>Bacillus velezensis</i>	0.24 A	0.57 A	0.28 AB	0.35 A	33.16 A	23.83 AB
T4 – <i>Bacillus cereus</i>	0.21 A	0.57 A	0.18 B	0.30 A	34.50 A	22.66 AB
T5 – <i>Bacillus subtilis</i> 1 y <i>Bacillus velezensis</i>	0.26 A	0.73 A	0.26 AB	0.25 A	34.16 A	25.50 A
T6 - <i>Bacillus subtilis</i> 1 y <i>Bacillus cereus</i>	0.25 A	0.68 A	0.25 AB	0.25 A	32.50 A	21.16 B
T7 – <i>Bacillus subtilis</i> 2 y <i>Bacillus velezensis</i>	0.28 A	0.65 A	0.28 AB	0.25 A	33.16 A	25.50 A
T8 – <i>Bacillus subtilis</i> 2 y <i>Bacillus cereus</i>	0.25 A	0.75 A	0.24 AB	0.23 A	33.00 A	22.00 AB
T9 - Testigo	0.24 A	0.60 A	0.21 AB	0.23 A	36.16 A	24.83 AB

PH (Peso de Hojas), PC (Peso de Caña), Peso de Elote (PE) y PR (Peso de Raíz) están expresados en kilogramos, LR (Largo de Raíz) y AR (Ancho de Raíz) están expresados en centímetros.

Cuadro 3. Continuación...

Tratamiento	DT	NH	NE	LE	DE
T1- <i>Bacillus subtilis</i> 1	4.08 A	17.16 A	1.83 A	22.83 A	5.25 A
T2 - <i>Bacillus subtilis</i> 2	3.86 A	17.33 A	1.33 A	23.16 A	5.48 A
T3 – <i>Bacillus velezensis</i>	4.08 A	17.66 A	1.50 A	23.66 A	5.80 A
T4 – <i>Bacillus cereus</i>	3.50 A	17.66 A	1.50 A	22.66 A	4.83 A
T5 – <i>Bacillus subtilis</i> 1 y <i>Bacillus velezensis</i>	4.60 A	18.16 A	1.50 A	23.50 A	5.50 A
T6 - <i>Bacillus subtilis</i> 1 y <i>Bacillus cereus</i>	3.83 A	17.66 A	1.00 A	21.50 A	5.41 A
T7 – <i>Bacillus subtilis</i> 2 y <i>Bacillus velezensis</i>	3.91 A	16.83 A	1.50 A	19.00 A	5.16 A
T8 – <i>Bacillus subtilis</i> 2 y <i>Bacillus cereus</i>	4.00 A	17.33 A	1.16 A	23.00 A	5.66 A
T9 - Testigo	3.58 A	17.66 A	1.16 A	22.66 A	5.33 A

DT (Diámetro de Tallo), LE (Largo de Elote) y DE (Diámetro de Elote) están expresados en centímetros, NH (Número de Hojas) y NE (Número de Elotes)

Jarak *et.al.* (2012) realizaron la inoculación de maíz con cepas de *Bacillus*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* de manera individual y en combinaciones, encontrando diferencias significativas entre los tratamientos que consistieron en la cepa de manera individual que cuando se combina con otra bacteria: el rendimiento en peso seco se incrementa de manera significativa al usar combinaciones. Leungvutiviroj *et al.* (2010) encontraron efectos similares sobre el crecimiento de plantas de maíz (*Zea mays* L.) y col común (*Brassica oleracea* L.) al aplicar una cepa solubilizadora de fosfatos de *Burkholderia unamae* en mezcla con *Bacillus subtilis*.

El incremento en el rendimiento también es mencionado por García-Olivares *et al.* (2012). Aunque estadísticamente no se obtuvo una diferencia significativa, sí se

demonstró que el rendimiento de maíz fue mayor en los tratamientos con bacterias inoculadas en comparación con el testigo químico.

Núñez *et.al.* (2009) mencionan que el porcentaje de proteína cruda para maíz forrajero debe estar en un rango de 8-9% para considerarse de buena calidad. Sin embargo, estos valores varían de acuerdo al híbrido o variedad de maíz que se esté utilizando.

Se conoce que la cantidad de nitratos en savia está directamente relacionada con el contenido de nitratos en base seca, como lo mencionan Echeverría *et al.* (2001). Esto se comprueba al comparar los resultados obtenidos por el tratamiento 7 (*Bacillus subtilis* 2 y *Bacillus velezensis*) el cual presenta una alta concentración de nitratos en savia, pero también es el más alto en cuanto al contenido de proteína cruda, la cual refleja el contenido de nitrógeno en base seca.

Los híbridos tuvieron una diferencia altamente significativa en cuanto al contenido de nitratos en savia, lo cual se refleja en el siguiente cuadro.

CUADRO 4. Tabla de comparación de medias entre los híbridos.

Híbrido	PV	PS	AP	NS	PROTC
<b>Tiburón (Syngenta)</b>	68.83 A	16.52 A	2.74 A	4081.48 A	6.58 A
<b>9150W (ABT)</b>	75.03 A	15.81 A	2.74 A	1977.7 B	6.6 A

PV (Peso verde) y PS (Peso Seco) están expresados en ton ha<sup>-1</sup>, AP (Altura de Planta) en metros, NS (nitratos en savia) en mg L<sup>-1</sup> y ProtC (proteína cruda) en porcentaje.

CUADRO 4. Continuación...

Híbrido	PH	PC	PE	PR	LR	AR
<b>Tiburón (Syngenta)</b>	0.26 A	0.58 B	0.25 A	0.29 A	34.81 A	22.29 B
<b>9150W (ABT)</b>	0.23 B	0.72 A	0.26 A	0.24 B	33.14 A	23.96 A

PH (Peso de Hojas), PC (Peso de Caña), Peso de Elote (PE) y PR (Peso de Raíz) están expresados en kilogramos, LR (Largo de Raíz) y AR (Ancho de Raíz) están expresados en centímetros.

CUADRO 4. Continuación...

Híbrido	DT	NH	NE	LE	DE
<b>Tiburón (Syngenta)</b>	4.00 A	17.55 A	1.59 A	22.14 A	5.42 A
<b>9150W (ABT)</b>	3.88 A	17.44 A	1.18 B	22.74 A	5.34 A

DT (Diámetro de Tallo), LE (Largo de Elote) y DE (Diámetro de Elote) están expresados en centímetros, NH (Número de Hojas) y NE (Número de Elotes)

Cadahia (2002) menciona que el índice de nitratos de encuentra entre 1000-1200 ppm. Sin embargo, éste varía de acuerdo a los híbridos que se utilizan, ya que cada material genético tiene diferentes capacidades para absorber los nitratos del suelo.

### **Confirmación del género por PCR**

Se realizó la prueba de PCR para la confirmar la presencia de los géneros inoculados, resultando positivos para los tratamientos de acuerdo al tamaño del producto esperado (287 pb). Esto supone que las cepas inoculadas sobrevivieron, debido a la resistencia de las endosporas de este género (Lisboa, 2003).

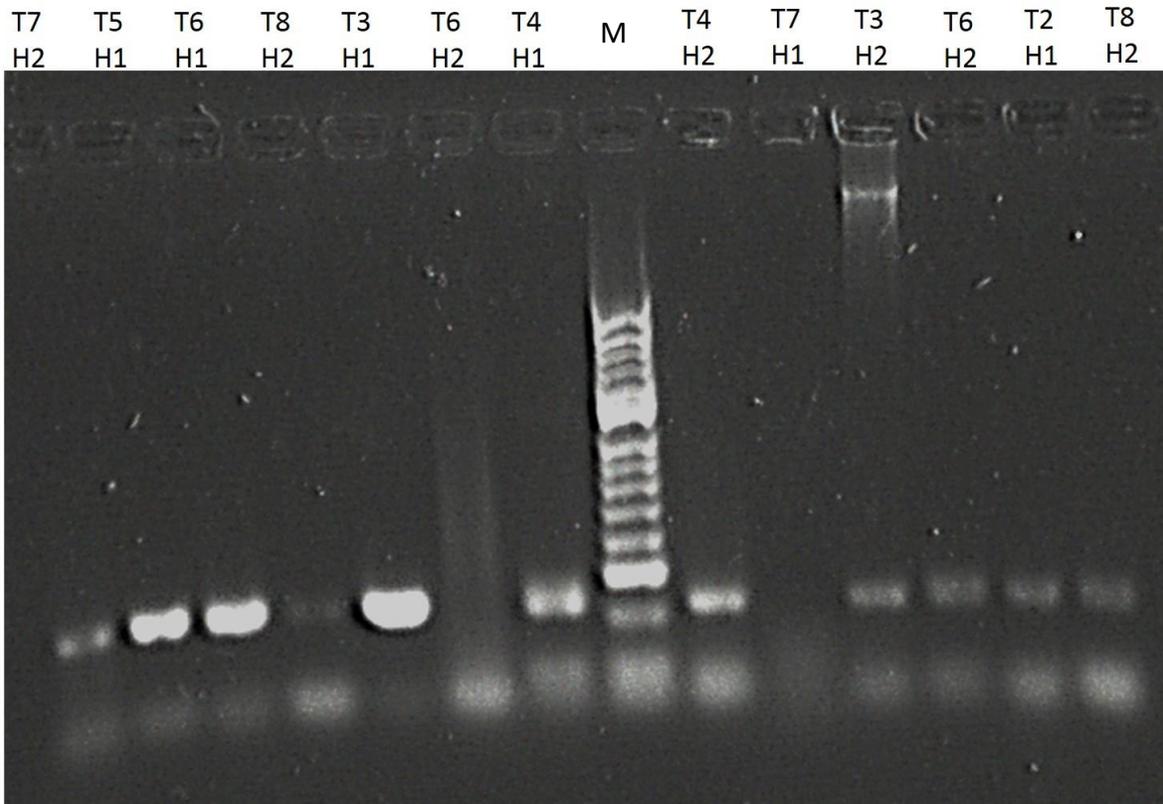


Figura 4. Distintos tratamientos e híbridos, señalados como T para tratamiento y H para híbrido. M es el marcador molecular

Como se puede observar en las figuras 1 y 2, todos los tratamientos que consistieron en la inoculación con bacterias resultaron positivos, a diferencia de tratamiento 9 que fue el testigo químico (figura 2).

T3 T1 T4 T5 T4 T2 T5 T7 T4 T1 M T8 T8 T9 T5 T2 T7 T1 T7 T9  
H1 H1 H1 H2 H2 H2 H1 H1 H2 H2 H1 H1 H2 H1 H2 H1 H2 H2 H2

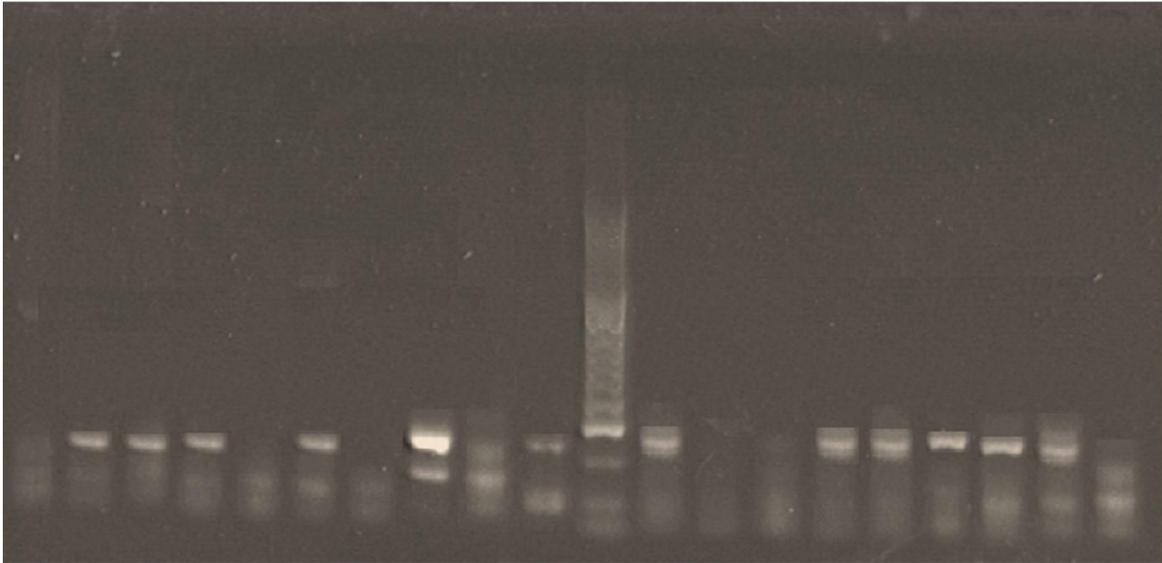


Figura 5. Distintos tratamientos e híbridos, señalados como T para tratamiento y H para híbrido. M es el marcador molecular

## V. CONCLUSIONES

1. El tratamiento que demostró mejores resultados fue el 7 (*Bacillus subtilis* 2 y *Bacillus velezensis*) para proteína cruda y tratamiento 2 (*Bacillus subtilis* 2) y 5 (*Bacillus subtilis* 1 y *Bacillus velezensis*) para rendimiento en verde y seco.
2. Esto da una muestra de que hacer combinaciones entre distintos tipos de bacterias eficientiza el rendimiento del cultivo, además de proporcionarle los elementos necesarios para que éste sea de buena calidad.
3. Se observó respuesta diferencial entre las cepas de *Bacillus* y combinaciones de ellas con los genotipos de maíz, lo que señala interacciones específicas benéficas dependiendo del genotipo del híbrido de maíz.

## VI. LITERATURA CITADA

- Álvarez Reyna Vicente de Paul, Sáenz Mata Jorge, Sánchez Galván Homero y González Rodríguez Gabriela. 2017. Inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. afroditá en invernadero. Terra latinoamericana volumen 35 número 2, 2017.
- Cadahia, Carlos. 2002. La savia como índice de fertilización.
- Condrón, L; Turner, B; Cade-Menun, B.. Chemistry and dynamics of soil organic phosphorus. In J.T. Sims T, and A.N. Sharpley (eds.), Phosphorus. Agriculture and the Environment. American Society of Agronomy Monograph American Society of Agronomy. 2005; 46: 87-122.
- Corrales LC, Arévalo ZY. Moreno VE. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. NOVA. 2014; 12(21):67-79.
- Corrales Ramírez Lucía Constanza, Caycedo Lozano Liliana, Gómez Méndez María, Ramos Rojas Sonia Julieth, Rodríguez Torres Jessica Natalia. *Bacillus spp*: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. NOVA. 2017; 15 (27): 45-65
- Corrales, L. (2016). Figura: Ciclo del fósforo. Adaptada de: [https://www.google.com/search?q=ciclo+del+f%C3%B3sforo&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjunMbMI9vSAhXHwIQKHUFcDckQ\\_AUIC-CgB&biw=1440&bih=760](https://www.google.com/search?q=ciclo+del+f%C3%B3sforo&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjunMbMI9vSAhXHwIQKHUFcDckQ_AUIC-CgB&biw=1440&bih=760).
- Corrales, L. C., Sánchez, L. C., Cuervo, J., Joya, J. A. & Marquez, K. (2012). Efecto biocontrolador de *Bacillus spp.*, frente a *Fusarium sp.* bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). NOVA, 10(17):64 – 82.

Corrales. L.C., (2016). Figura: Ciclo del Nitrógeno. Adaptada de:  
<https://www.google.com.co/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#q=ciclo+del+nitr%C3%B3geno&..>

Corrales. L.C., (2016). Figura: Transformaciones del nitrógeno en el suelo.  
Adaptada: [https://www.google.com.co/search?q=transformaciones+del+nitrogeno+en+el+suelo&espv=2&site=webhp&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwHij86qHitvSAhUJ7SYKHeLUCCEQ\\_AUIBi-gB&biw=1270&bih=719#imgsrc=T6Dk7\\_qKUCEA5M](https://www.google.com.co/search?q=transformaciones+del+nitrogeno+en+el+suelo&espv=2&site=webhp&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwHij86qHitvSAhUJ7SYKHeLUCCEQ_AUIBi-gB&biw=1270&bih=719#imgsrc=T6Dk7_qKUCEA5M).

Cueto Wong José Antonio, Reta Sánchez David Guadalupe, Barrientos Ríos José Luis, González Cervantes Guillermo, Salazar Sosa Enrique. 2006. Rendimiento de maíz forrajero en respuesta a fertilización nitrogenada y densidad de población. *Revista fitotecnia mexicana* 29(2):97-101.

de-Bashan, L.E., Holguin, G., Glick, B.R. and Bashan, Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *In: Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo.* (Eds.) Ferrera-Cerrato, R., and Alarcon, A. Chapter 8. Published by: Editorial Trillas, Mexico City, Mexico. pp. 170-224.

Disponibile en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33929617006>

Echeverría HE, H Sainz Rozas, E Herfurt, SA Uhart. 2001. Nitrato en la base del tallo del maíz: I cambios durante la estación de crecimiento. *Ciencia del Suelo* 19 (2) 2001.

Espinosa Palomeque Bernardo, Moreno Reséndez Alejandro, Cano Ríos Pedro, Figueroa M. J. Fijación biológica del nitrógeno. *Revista UDO Agrícola* 2004; 4(1): 105 - 107

García R.A.; N.C. Lovaisa; E.L. Ulla. 2015. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos del Noroeste Argentino y su efecto en la promoción de crecimiento en maíz (*Zea mays* L.). *Rev. Agron. Noroeste Argent.* (2015) 35 (1): 19-28. ISSN 2314-369X (en línea).

- García, E. 2004. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Quinta edición. Instituto de Geografía. UNAM. México, D. F. 217 p.
- García-Olivares JC, A Mendoza-Herrera, N Mayek-Pérez. 2012. Efecto de *Azospirillum brasilense* en el rendimiento del maíz en el norte de Tamaulipas, México. Universidad y Ciencia. Trópico Húmedo. 28(1):79-84.
- Haefner S., Knietsch A., Scholten E., Braun J., Lohscheidt M., Zelder O. Biotechnological production and applications of phytases. Appl Microbiol Biotechnol, 2005; 68: 588-597.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 2006. Maíz forrajero de alto rendimiento y calidad nutricional. Centro de Investigación Regional Norte Centro. Campo Experimental La Laguna.
- Jarak Mirjana, Mrkovački Nastasija, Bjelić Dragana, Jošić Dragana, Hajnal-Jafari Timea and Stamenov Dragana. 2012. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on maize in greenhouse and field trial. African Journal of Microbiology Research Vol. 6(27), pp. 5683-5690, 19 July, 2012. DOI: 10.5897/AJMR12.759
- Khan, M. S.; Zaidi, A. and Wani, P. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. Agron. Sustain. Dev. 2007. Ch. 27, pp. 29-43.
- Kumar Ankit, Prakash Anil, and Johri B.N. 2011. Bacillus as PGPR in Crop Ecosystem, DOI 10.1007/978-3-642-18357-7\_2,
- Leaungvutiviroj C, Ruangphisarn P, Hansanimitkul P, Shinkawa H, Sasaki K. Development of a new biofertilizer with a high capacity for N<sub>2</sub> fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. Biosci Biotechnol Biochem. 2010; 74(5):1098-101.
- Lisboa M., 2003. Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris (*Botrytis cinérea*) en ved vinífera. Universidad de Talca Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de agronomía. Chile.

- Menezes A. Aislamiento y caracterización de bacterias diazotrofas asociadas a maíz (*Zea mays*) variedad PAU 871". [Trabajo de Grado]. Laboratorio de Microbiología, Facultad de Agronomía. UDELAR, Montevideo, Uruguay, 2009.
- Nolan, K.B., Duffin, P.A. y McWeeny, D.J. Effects of phytate on mineral bioavailability. *In vitro* studies on Mg, Ca, Fe, Cu, Zn, Cd. Solubilities in presence of phytate. *J. Sci. Food Agric*, 1987; 40: 79 -85.
- Núñez Hernández Gregorio, Díaz Aparicio Efrén, Espinosa García José Antonio, Ortega Reyes Luis. Producción de leche de bovino en el sistema intensivo. Libro técnico número 23. Diciembre de 2009.
- Paredes, M. 2010. Aislamiento y caracterización bioquímica de metabolitos producidos por rizobacterias que solubilizan el fosfato.
- Pedraza Raúl O., Teixeira Kátia R.S, Ana Fernández Scavino, Inés García de Salamone, Beatriz E. Baca, Rosario Azcón, Vera L.D. Baldani, Ruth Bonilla. 2010. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* (2010) 11(2), 155-164
- Quiquampoix, H., Mousain, D. Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. In: Turner BL, Frossard E, Baldwin DS, editors. *Organic phosphorus in the Environment*. Wallingford, 2005.
- Rajeshwar Reddy T, Prasad VR, Vemaraju. 2014. PGPR- a potential tool for sustainable agriculture: a review. *Journal of Science / Vol 4 / Issue 2 / 2014 / 117-122*
- Restrepo-Franco Gloria María, Marulanda-Moreno Sandra, de la Fe-Pérez Yeised, Díaz-de la Osa Acela, Baldani Vera Lucia, Hernández-Rodríguez Annia. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC* 2015; 46(1): 63-76.

- Rocheli de Souza, Adriana Ambrosini and Luciane M.P. Passaglia. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4):401-419 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Rodríguez Cáceres, E. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 990-991.
- Rodríguez Mendoza, Ma. de las Nieves; Chávez, Rubén San Miguel; García Cué, José Luis; Benavides Mendoza, Adalberto. 2013. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en el cultivo de melón (*Cucumis melo*) *Interciencia*, vol. 38, núm. 12, diciembre, 2013, pp. 857-862. Asociación Interciencia Caracas, Venezuela.
- Rowell, D.L. *Soil Science Methods & Applications*. Department of Soil Science, 1994. University of Reading
- SAGARPA, 2012. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario estadístico de producción agrícola.
- Sánchez-Yáñez Juan Manuel, Irma Yatziri López Ayala<sup>1</sup>, Javier Villegas Moreno<sup>2</sup>, Noé Manuel Montaña Arias. 2014. Respuesta del maíz (*Zea mays* L) a la inoculación con *Azotobacter* sp y *Burkholderia* sp a dosis reducida de fertilizante nitrogenado. *Revista Scientia Agropecuaria* 5 (2014) 17 – 23
- SIAP, 2012. Estadística de uso tecnológico y de servicios en la superficie agrícola.
- Terry E, Leyva A, Hernández A. (2005). Beneficios de los Microorganismos como biofertilizantes eficientes para el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2005; 7 (7): 47-54.
- Turner Benjamin L., Michael J. Papházy, Philip M. Haygarth, Ian D. Mckelvie. Inositol Phosphates. *Biological Sciences*. 2002; 357:1420.
- Wu SC, Caob ZH, Lib ZG, Cheunga KC, Wonga MH. 2005. Effects of biofertilizer containing N–fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125:155–166.
- Zaidi, A.; Khan, M. S.; Ahemad, M.; Oves, M. and Wani, P. A. (Editors). Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. En:

Mohammad Saghir Khan; Almas Zaidi and Javed Musarrat (Editors).  
Microbial strategies for crop improvement. Springer-Verlag, Berlin. 2009. 23-  
50.