

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

CARRERA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA

**INFORME DE TRABAJO DE TITULACIÓN
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO INGENIERO AGRÍCOLA**

MODALIDAD: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

**EVALUACIÓN *in vitro* DE CEPAS DE *Bacillus* sp, AISLADOS DE
LA ANTÁRTIDA, COMO PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN
Zea mays L**

AUTORA:

ÁNGELA BEATRIZ ZAMBRANO SOLÓRZANO

TUTOR:

ING. ÁNGEL GUZMÁN CEDEÑO, PhD

CALCETA, FEBRERO 2021

DERECHOS DE AUTORÍA

ÁNGELA BEATRIZ ZAMBRANO SOLÓRZANO, con cédula de ciudadanía **1312543489**, declaro bajo juramento que el trabajo de titulación: “**EVALUACIÓN *in vitro* DE CEPAS DE *Bacillus* sp, AISLADOS DE LA ANTÁRTIDA, COMO PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN *Zea mays* L.**” es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, concedo a favor de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, conservando a mi favor todos los derechos patrimoniales de autor sobre la obra, en conformidad con el Artículo 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los conocimientos, Creatividad e Innovación.



ÁNGELA BEATRIZ ZAMBRANO SOLÓRZANO

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

ÁNGEL MONSERRATE GUZMÁN CEDEÑO, certifica haber tutelado el proyecto “**EVALUACIÓN *in vitro* DE CEPAS DE *Bacillus* sp, AISLADOS DE LA ANTÁRTIDA, COMO PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN *Zea mays* L.**”, que ha sido propuesto, desarrollado y defendido por **ÁNGELA BEATRIZ ZAMBRANO SOLÓRZANO**, previo la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN DE LA UNIDAD DE TITULACIÓN ESPECIAL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



Firmado digitalmente por:
**ANGEL MONSERRATE
GUZMAN CEDENO**

ING. ÁNGEL MONSERRATE GUZMÁN CEDEÑO, PhD

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el trabajo de titulación “**EVALUACIÓN *in vitro* DE CEPAS DE *Bacillus* sp, AISLADOS DE LA ANTÁRTIDA, COMO PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN *Zea mays* L.**”, que ha sido propuesto, desarrollado y defendido por **ÁNGELA BEATRIZ ZAMBRANO SOLÓRZANO**, previa la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



ING. FREDDY WILBERTO MESÍAS GALLO, Mg
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



ING. LUÍS ENRIQUE PÁRRAGA MUÑOZ, Mg
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



ING. GONZALO BOLÍVAR CONSTANTE TUBAY, Mg
PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradecer a Dios por bendecir día a día mis pasos y darme fuerza, valor y valentía por superar todas las adversidades que se interpusieron en cada momento, a mis padres por inculcarme siempre el valor de la perseverancia, a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de una educación superior de calidad.

A mi tutor el Ing. Ángel Guzmán Cedeño y demás docentes por su dedicación al momento de impartir sus conocimientos innatos que sin duda alguna han sido parte fundamental para la realización de este trabajo de titulación.

A todos los que han contribuido de manera especial para que cumpla con mi objetivo, les agradezco por todo el aprecio que siempre me han demostrado.

ÁNGELA BEATRIZ ZAMBRANO SOLÓRZANO

DEDICATORIA

Dedico este logro a Dios por darme fortaleza, a mi padre Ángel José Zambrano Delgado, y mi abuelo que desde el cielo son la luz de esperanza que siempre han estado a mi lado iluminando mi camino y así poder cumplir con este logro tan anhelado, porque nunca desconfiaron de mis potencialidades; de igual forma a mi familia y amigos que desde un principio fundaron en mí el deseo de triunfar y ser una profesional que contribuya al desarrollo de la sociedad.

ÁNGELA BEATRIZ ZAMBRANO SOLÓRZANO

TABLA DE CONTENIDO

DERECHO DE AUTORÍA.....	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTOR.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
TABLA DE CONTENIDO.....	vii
TABLA DE CUADROS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1 Planteamiento y formulación del problema.....	1
1.2 Justificación	2
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
1.4 Hipótesis	5
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 Limitaciones en el desarrollo vegetativo.....	6
2.1.1 Requerimientos nutricionales de los cultivos de interés alimenticio	8
□ Maíz.....	8
□ Arroz	9
□ Otros cultivos	9
2.1.2 Efectación de los fertilizantes sintéticos.....	10
2.2 Alternativas de nutrición vegetal.....	11
2.2.1 Abonos orgánicos	11
2.2.2 Biofertilizantes	12
2.2.3 Producción de ácidos orgánicos:	15
2.2.4 Promotores de crecimiento	15
2.3 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	16
2.3.1 Aplicación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	17

2.3.2	Dónde se encuentran	19
2.3.3	Cómo se realiza el aislamiento de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	21
2.3.4	Referencias del uso de bacterias de crecimiento vegetal	23
2.4	Reseña del cepario utilizado en el estudio	24
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO.....		27
3.1	Ubicación	27
3.2	Características climáticas ¹	27
3.3	Duración del trabajo	27
3.4	Fase 1: evaluación de <i>bacillus</i> sp.....	28
3.5	Tinción de gram	28
3.6	Prueba de catalasa	28
3.7	Selección de <i>bacillus</i> sp de acuerdo a características deseables.....	29
3.7.1	Prueba de hemólisis	29
3.7.2	Solubilización de fosfato	29
3.7.3	Producción de sideróforo	30
3.7.4	Crecimiento en condiciones sin fuente de nitrógeno	30
3.7.5	Supervivencia a diferentes temperaturas.....	30
3.7.6	Supervivencia a diferentes condiciones de ph	31
3.7.7	Supervivencia a diferentes concentraciones de nacl	31
3.8	Evaluación de las bacterias <i>bacillus</i> sp seleccionadas.....	32
3.8.1	Delineamiento experimental	32
3.8.2	Unidad experimental.....	34
3.8.3	Manejo del experimento	34
3.8.4	Variables evaluadas	35
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		36
4.1	Evaluación de <i>bacillus</i> sp	36
4.2	Tinción de gram y prueba de catalasa.....	36
4.3	Solubilización de fosfato.....	38
4.4	Prueba de hemólisis.....	40
4.5	Producción de sideróforo	41
4.6	Crecimiento de <i>bacillus</i> sp en condiciones sin fuente de nitrógeno	42
4.7	Supervivencia a diferentes temperaturas y ph.....	43
4.8	Supervivencia en concentraciones de nacl	44

4.9	Evaluación de los <i>Bacillus</i> sp seleccionados	45
4.9.1	Altura de planta	45
4.9.2	Longitud de raíz.....	45
4.9.3	Diámetro del tallos	45
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		48
BIBLIOGRAFÍA		49
ANEXOS.....		56

TABLA DE CUADROS

Cuadros:

2.1.	Requerimiento maíz.	8
2.2.	Requerimiento arroz.....	9
2.3.	Requerimiento otros cultivos	9
2.4.	Tipos de biofertilizantes.....	16
2.5.	Descripción de cepas de <i>Bacillus</i> sp utilizadas.	25
3.1.	Niveles de los factores.	32
3.2.	Descripción de los tratamientos	32
3.3.	Análisis de varianza.	33
4.1.	Tinción de gram para cepas aisladas de suelos de la Antártida.	37
4.2.	Medición de halos de solubilización de fosfato a las 24 y 48 h.	40
4.3.	Prueba de hemólisis para cepas de <i>Bacillus</i> sp.	41
4.4.	Producción de sideróforo para cepas <i>Bacillus</i> sp.	42
4.5.	Fijación de nitrógeno sin fuente de nitrógeno.	42
4.6.	Evaluación a diferentes condiciones de temperatura	43
4.7.	Evaluación a diferentes condiciones de pH.	43
4.8.	Evaluación a diferentes condiciones de cloruro de sodio.	44
4.9.	Altura de planta, longitud de raíz y diámetro del tallo.	45

RESUMEN

Esta investigación se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular de la carrera de Medicina Veterinaria de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”, con el objetivo de evaluar *in vitro* la capacidad promotora de crecimiento vegetal de 83 cepas de *Bacillus* sp aisladas en la Estación Experimental ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado de la Antártida. A los aislados se les evaluó: tinción de Gram, prueba de catalasa y de hemólisis, solubilización de fosfato, producción de sideróforo, crecimiento sin fuente de N, y supervivencia a diferentes valores de temperatura, pH y NaCl. De acuerdo a las características deseables como promotoras de crecimiento vegetal se seleccionaron tres cepas *Bacillus* sp que se inocularon en dos tipos de sustratos (a. Arcilla y b. Compost + Arcilla) esterilizados y depositados en vasos de vidrio (200 cc), en cada vaso se colocó una semilla de maíz variedad Trueno, a los 15 días de germinadas se midió: altura de plántula (AT) longitud de raíz (LR) y diámetro del talluelo (DT). En la interacción de los factores en estudio y el efecto simple de las cepas de *Bacillus* sp no se encontró diferencias estadísticas en las variables evaluadas; los promedios generales fueron de 15,28 cm (AP), 12,84 cm (LR) y 2,26 cm (DT). El sustrato Compost + Arcilla incidió estadísticamente a favor de LR y DT con promedios de 14,44 y 2,38 cm, respectivamente. Se concluye que los resultados alcanzados son prometedores y resulta necesario continuar validando los microorganismos seleccionados, en ambientes productivos.

Palabras clave: Bioinoculantes, estimuladores de crecimiento, bacterias solubilizadoras, *Bacillus* sp.

ABSTRACT

This research was developed in the Molecular Biology laboratory of the Veterinary Medicine career at Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López", with the aim of evaluating in vitro the plant growth promoting capacity of 83 isolated *Bacillus* sp strains at the Ecuadorian Experimental Station Pedro Vicente Maldonado in Antarctica. The isolates were evaluated: Gram stain, catalase and hemolysis test, phosphate solubilization, siderophore production, growth without a N source, and survival at different values of temperature, pH and NaCl. According to the desirable characteristics as plant growth promoters, three *Bacillus* sp strains were selected that were inoculated in two types of substrates (a. Clay and b. Compost + Clay) sterilized and deposited in glass beakers (200 cc), in each A Trueno variety maize seed was placed in a glass; 15 days after germination, the seedling height (AT), root length (LR) and stem diameter (DT) were measured. In the interaction of the factors under study and the simple effect of the *Bacillus* sp strains, no statistical differences were found in the variables evaluated; the general averages were 15.28 cm (AP), 12.84 cm (LR) and 2.26 cm (SD). The Compost + Clay substrate statistically influenced in favor of LR and DT with averages of 14.44 and 2.38 cm, respectively. It is concluded that the results achieved are promising and it would be necessary to continue validating the selected microorganisms in productive environments.

KEYWORDS: Bioinoculants, growth stimulants, solubilizing bacteria, *Bacillus* sp.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Para la producción de alimentos a nivel mundial se necesita de la aplicación de nutrientes al suelo; sin embargo, cuando se utilizan fertilizantes de síntesis como los nitratos y fosfatos producen contaminación por la infiltración en las aguas subterráneas, provocando la eutrofización de lagos, embalses y estanques, lo cual induce a la proliferación de algas que suprimen la biodiversidad en los mantos acuáticos (García, 2012). También genera efectos negativos sobre el propio cultivo, como: fitotoxicidad, aumento de patógenos resistentes a los agentes aplicados, deterioro de la calidad de los suelos, debido a la pérdida de microorganismos nativos (Ramírez et al., 2008).

Las consecuencias del sistema de producción convencional, basado fundamentalmente en el uso de agroquímicos de síntesis, han motivado el surgimiento de sistemas agrícolas conservacionistas, que procuran reestablecer procesos dentro del agroecosistema, una opción de estos modelos es el empleo de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV), quienes desempeñan un papel clave en la absorción de nutrientes; por un lado, transforman sustancias nutritivas a formas asimilables y por otra, producen fitohormonas que promueven el crecimiento en las plantas, tal como lo mencionan (Rives et al., 2007; Pazmiño, 2016).

Se estima que la aplicación de las bacterias de vida libre o asociativas que habitan la rizosfera pueden estimular el crecimiento de las gramíneas a través de mecanismos, como: síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, fijación de nitrógeno, solubilización de nutrientes, producción de sideróforos y control de fitopatógenos del suelo (Loredo et al., 2004).

Retamales (2010) sostiene que los microorganismos extremófilos también tienen su uso como Biofertilizantes, que son sustancias que contienen microorganismos vivos que cuando son aplicados en semillas, superficie vegetal o al suelo colonizan la rizófora o interior de la planta y promueve el crecimiento a través del incremento en el suplemento o disponibilidad de los nutrientes por el hospedero vegetal, por ejemplo: aumentan la fijación de Nitrógeno y convierten al Fósforo insoluble disponible para las plantas. Las bacterias que actúan como fito estimuladores, tienen la habilidad de producir o cambiar la concentración de los reguladores de crecimiento tales como: ácido indolacético, ácido giberélico, citocininas y etileno (Rives et al., 2007; Pazmiño, 2016).

Al respecto, Bowen y Rovira (2014) señalan que el crecimiento y desarrollo del sistema radical de las plantas afecta significativamente a las poblaciones bacterianas del suelo por la disponibilidad de una fuente de carbono, derivada de compuestos orgánicos liberados por la raíz. Por lo expuesto se plantea la siguiente interrogante ¿Qué cepas de *Bacillus* sp aisladas en suelos de la Antártida son promotoras de crecimiento vegetal de la plántula de maíz a nivel *in vitro*?

1.2 JUSTIFICACIÓN

Durante las últimas décadas se ha incrementado considerablemente la investigación con microorganismos de ambientes extremos, en especial con bacterias y hongos que forman parte del microbiota del Ártico y la Antártica, que dadas sus características o las propiedades de sus enzimas tienen un gran potencial como bio-recursos de aplicación biotecnológica. Estas aplicaciones pueden ser en diversas áreas de desarrollo, como producción de alimentos, minería, procesamiento de basura, biorremediación ambiental, productos de interés para la agricultura, la medicina y el diagnóstico molecular (Retamales, 2010).

Para Muñoz et al. (2010) los microorganismos que se encuentran sometidos a condiciones estresantes (bajas temperaturas, aridez, escasa disponibilidad de

nutrientes, alta salinidad y radiación UV) favorecen la selección de microorganismos con características bioquímicas únicas.

En este sentido, la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí ha participado en expediciones científicas para realizar bioprospección de microorganismos presentes en el continente blanco; por ello, cuenta con un cepario de bacterias que deben ser caracterizadas desde diferentes puntos de vista: morfocultural, bioquímico y molecular para determinar su utilidad en la producción agropecuaria, agroindustrial y ambiental. Entre estas aplicaciones es posible encontrar Microorganismos Promotores de Crecimiento Vegetal (MPCV); por lo cual, se debe evaluar la acción de estas bacterias en relación con el desarrollo de la raíz de los cultivos de interés, ya que el éxito en la introducción de Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) depende de su establecimiento y persistencia a lo largo de la estación de crecimiento radicular (Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”[ESPAM MFL], 2014).

La iniciativa de la Politécnica de Manabí está en consonancia con lo que contempla la Constitución del Ecuador, (2008) en el Art. 15, dentro de la segunda sección sobre el ambiente sano; donde se indica que se prohíbe el desarrollo, producción, tenencia, comercialización, importación, transporte, almacenamiento y uso de armas químicas, biológicas y nucleares, de contaminantes orgánicos persistentes altamente tóxicos, agroquímicos internacionalmente prohibidos.

Además, responde al Plan Estratégico de Biodiversidad, (2017-2021) respecto a la diversidad biológica, donde se señala que el carácter plurinacional del Estado ecuatoriano fortalece el respeto al derecho de las nacionalidades y pueblos indígenas, afro ecuatoriano y montubio a “Conservar y promover sus prácticas de manejo de la biodiversidad y de su entorno natural.” (Art. 57, numeral 8) y a “Mantener, proteger y desarrollar los conocimientos colectivos; sus ciencias, tecnologías y saberes ancestrales; los recursos genéticos que contienen la diversidad biológica y la agro biodiversidad; sus medicinas y prácticas de medicina tradicional, con inclusión del derecho a recuperar, promover y proteger

los lugares rituales y sagrados, así como plantas, animales, minerales y ecosistemas dentro de sus territorios; y el conocimiento de los recursos y propiedades de la fauna y la flora” (Art. 57, numeral 12) (Plan Estratégico de Biodiversidad, 2017-2021).

Para el aprovechamiento de estos microorganismos eficientes (EM) dentro de las prácticas agronómicas se requiere obtener los MPCV de los ambientes naturales y validar su efectividad, por lo tanto, hay que realizar los aislamientos y la caracterización de las cepas; ya que como indica la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2005) hay muchos factores que afectan la viabilidad, desarrollo, funcionamiento y conservación de los microorganismos en la naturaleza. Esos factores pueden estar relacionados con las características del alimento (intrínsecos) o con el ambiente en el cual dicho alimento se encuentra (extrínsecos). Los factores intrínsecos son la actividad de agua (A_w), acidez (pH), potencial de óxido reducción (Eh), composición química del alimento (nutrientes) y otros. Los factores extrínsecos más importantes son la humedad del medio y la temperatura (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2016).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar *in vitro* la capacidad promotora de las cepas de *Bacillus* sp aislados de la Antártida, en el crecimiento vegetal de plántulas de maíz.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las cepas de *Bacillus* sp que demuestren capacidad promotora de crecimiento vegetal en plántulas de maíz a nivel *in vitro*.
- Caracterizar morfo culturalmente las cepas de *Bacillus* sp promotoras de crecimiento vegetal en plántulas de maíz, *in vitro*.

1.4 HIPÓTESIS

Al menos una de las cepas de *Bacillus* sp aisladas de la Antártida es promotora de crecimiento vegetal de plántulas de maíz, *in vitro*.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 LIMITACIONES EN EL DESARROLLO VEGETATIVO

Existen diversos tipos de estrés ambiental, los cuales afectan los cultivos que son el sustento alimenticio del hombre. La sequía, salinidad y temperaturas extremas son los principales tipos de estrés que causan efectos adversos en el crecimiento y productividad de los cultivos. La sequía es mayor en las regiones secas y calientes, en donde la concentración de sales se incrementa en la capa superior del suelo debido a la evapotranspiración, que excede a la precipitación (Oliva et al., 2008).

El incremento de los suelos salinos en todo el mundo limita la producción de cultivos para la alimentación humana, estas áreas se consideran marginales, en un mundo donde el espacio y la alimentación constituye grandes limitaciones (Mesa, 2003).

García y Jauregui (2008) como se citó en Martínez y López (2011) la salinidad es uno de los principales factores abióticos que limitan la productividad agrícola, debido a que la inmensa mayoría de las plantas cultivadas son sensibles a esta condición. El efecto más común sobre las plantas es la reducción del desarrollo debido a una disminución potencial osmótico del medio de crecimiento y, en consecuencia, de su potencial hídrico; la toxicidad iónica normalmente es asociada con la absorción excesiva de Na y de Cl.

Actualmente, la agricultura se enfrenta al desafío de satisfacer una mayor y creciente demanda de alimentos inocuos y de calidad, incluido su valor nutricional; sin embargo, a este desafío se suma la exigencia de producir en un contexto de volatilidad de precios, presencia de diversas enfermedades y plagas que merman la productividad, la limitada vida útil de los productos agrícolas; así como la variabilidad climática (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2017).

El mismo autor manifiesta, que el escenario regulatorio mundial para plaguicidas de origen químico está imponiendo cada vez mayores requisitos al uso de este tipo de productos, tanto en aspectos relativos a su autorización, así como a los límites máximos de residuos permitidos en alimentos y piensos. Esto deriva de crecientes preocupaciones de salud pública, expresadas por organismos científicos, consumidores, y diversas agencias de evaluación y gestión de riesgos a nivel mundial.

La problemática actual que constituye para la agricultura el mal uso de agro insumos (anualmente se utilizan en el mundo más de 100 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados y más de 90 millones de potasio y fósforo para obtener cultivos con altos rendimientos. La utilización excesiva de fertilizantes resulta en mayores costos de producción y en la contaminación de suelos y aguas), han conducido a un proceso de deterioro de sus escasos recursos y una creciente dificultad para renovarlos, promoviendo realizar un uso integral y diversificado de los recursos naturales, en un ambiente fluctuante y restrictivo (Puente y Bashan, 2017).

Los autores antes mencionados, indican que el suelo como base de los recursos y de la producción se encuentra enmarcado en un ambiente complejo, heterogéneo y frágil, que evidencia una alta susceptibilidad a la erosión y una baja fertilidad natural, con efectos en la producción de los cultivos, en la productividad del trabajo y en la factibilidad del establecimiento de sistemas productivos.

La degradación del suelo es un problema importante para la humanidad, lo cual requiere de investigación y tecnologías innovadoras para su solución. El uso de fertilizantes y plaguicidas químicos no solamente contamina los recursos hídricos superficiales y subterráneos, sino que también puede tener un impacto negativo en el microbiota del suelo y, por ende, en la calidad del suelo. Las prácticas de riego excesivo e inadecuado provocan la salinización de los suelos

y las aguas subterráneas y, en consecuencia, degradan los suelos y limitan futuros usos sostenibles (Bianchi, 2018).

2.1.1 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LOS CULTIVOS DE INTERÉS ALIMENTICIO

Ciampiti y García (2017) establecen lo siguiente: los requerimientos y extracción en grano de nutrientes para producir una tonelada de grano de maíz se componen de algunos nutrientes tales como: nitrógeno con requerimiento nutricional de 42 kg y un índice de cosecha de 0,66; al igual del nutriente de fósforo con 4 kg y un índice de cosecha de 0,75. También el nutriente del potasio con 19 kg de requerimiento y un índice de cosecha de 0,21, tal como se muestra en el cuadro 2.1.

➤ MAÍZ

Cuadro 2.1. *Requerimiento nutricional del cultivo de maíz.*

Nutriente	Requerimiento Kg/t grano	Índice de cosecha
Nitrógeno	42	0,66
Fósforo	4	0,75
Potasio	19	0,21
Calcio	3	0,07
Magnesio	3	0,28
Azufre	4	0,45
Boro	0,020	0,25
Cloro	0,444	0,06
Cobre	0,013	0,29
Hierro	0,125	0,36
Manganeso	0,189	0,17
Molibdeno	0,001	0,63
Zinc	0,053	0,50

➤ ARROZ

Los mismos autores señalan (cuadro 2.2) los requerimientos y extracción en grano de nutrientes para producir una tonelada de grano de arroz, intervinieron los siguientes elementos, el nitrógeno compuesto por una demanda de 22,2 kg y un índice de cosecha de 0,66, al igual del fósforo con una exigencia de 3,1 Kg y un índice de 0,84; también el potasio con 26,2 kg y un índice de 0,10.

Cuadro 2.2. *Requerimiento nutricional del cultivo de arroz.*

Nutriente	Requerimiento kg/t grano	Índice de cosecha
Nitrógeno	22,2	0,66
Fósforo	3,1	0,84
Potasio	26,2	0,10
Calcio	2,8	0,04
Magnesio	2,4	0,42
Azufre	0,94	0,64
Boro	0,016	0,50
Cloro	9,700	0,43
Cobre	0,027	0,92
Hierro	0,350	0,57
Manganeso	0,370	0,16
Molibdeno	0,040	0,50
Zinc	51,700	0,19

➤ OTROS CULTIVOS

Finalmente, estos autores indican los requerimientos nutricionales para otros cultivos, tales como se muestra en el cuadro 2.3.

Cuadro 2.3. *Requerimiento nutricional de otros cultivos en kg/t/grano.*

Cultivo	Unidad	N Kg/t/g	P Kg/t/g	K Kg/t/g	Mg Kg/t/g	S Kg/t/g
Sorgo	Grano	30	4,4	20,8	4,5	3,75
Papa	Tubérculo	4,4	0,9	6,4	0,6	0,5
Colza	Grano	55	10,2	60,8	6,0	21,7
Caña de azúcar	MS	1,3	0,4	2,8	0,5	0,6
Tomate	Fruto	2,8	0,6	3,2	0,3	0,6

2.1.2 AFECTACIÓN DE LOS FERTILIZANTES SINTÉTICOS

Debido a la aplicación de los fertilizantes sintéticos y a la composición de sus compuestos, en ocasiones han causado la alteración en los suelos de los cultivos, donde presentan un reducido contenido de elementos nutritivos, por lo cual se requiere el empleo de grandes volúmenes para cubrir la demanda nutritiva durante el crecimiento de los mismos (Moreno et al., 2018).

Altieri (1999) como se citó en Martínez et al. (2010) las consecuencias de la quimización en la agricultura han sido nefastas para el ambiente, por la elevada contaminación causada por el uso irracional de fertilizantes y plaguicidas, que puede causar graves daños en la salud del hombre y los animales, el impacto causado por el uso excesivo de fertilizantes minerales puede resumirse de la siguiente manera:

- Su fabricación produce emisiones de CO_2 y NO_2 a la atmósfera, lo cual contribuye a incrementar los problemas con la capa de ozono.
- Su aplicación excesiva en el campo da lugar al lavado de nitratos y a emisiones de N_2O y NH_3 , especialmente a partir de urea, con la consiguiente contaminación de todos los factores del agroecosistema.

Los mismos autores indican que la abundancia de estos compuestos nitrogenados en los mantos acuíferos, como consecuencia del lavado, hace que en todos los reservorios donde van a desembocar estas corrientes subterráneas se produzca el efecto llamado eutroficación, que consiste en el crecimiento anormal de microorganismos.

Por último, alegan que son muy numerosos los informes que indican la presencia de altos niveles de nitratos en los productos agrícolas, lo que constituye una importante fuente de toxicidad para el hombre y ha obligado a un establecimiento más riguroso del control de los niveles críticos de estos compuestos en las actividades de comercialización de los alimentos.

Pero, además de la contaminación, el incremento en el uso de los fertilizantes nitrogenados ha estado acompañado por un aumento exponencial en el consumo de formas no renovables de energía, las cuales se han convertido en un factor limitante para lograr aumentos de los rendimientos agrícolas.

2.2 ALTERNATIVAS DE NUTRICIÓN VEGETAL

Vilches y Núñez (2000) como se citó en Sánchez y Hernández (2017) en las zonas tropicales del mundo se buscan alternativas para conservar los suelos, pues se ha confirmado que no es el clima cálido lo que impide una producción adecuada de la tierra, sino el manejo inadecuado de estos. De acuerdo con los datos del Instituto de Suelos, es importante adoptar alternativas agroecológicas para acometer de forma gradual acciones que minimicen y brinden soluciones a corto, mediano y largo plazo, ya que el 69,6% de los suelos tienen bajo contenido de MO y el 43,3% presentan una erosión de fuerte a mediana, lo cual limita su productividad.

En este sentido, son numerosos los trabajos realizados con el objetivo de mejorar o incrementar los rendimientos de los cultivos, que incluyen el aporte de fuentes de abonos orgánicos y la implementación de diferentes tipos de biofertilizantes, ambos con diversos usos.

2.2.1 ABONOS ORGÁNICOS

Según Ramos y Terry (2014) la agricultura orgánica es una forma de producir sosteniblemente, disminuyendo el uso de fertilizantes y plaguicidas. Resulta importante incrementar la eficiencia de utilización de los fertilizantes para evitar la degradación ambiental. Para ello, es necesario implementar tecnologías que permitan la aplicación de estos en el sitio y cultivo específico con el fin de cumplir la demanda del mismo.

Los abonos orgánicos constituyen un elemento crucial para la regulación de muchos procesos relacionados con la productividad agrícola; son bien

conocidas sus principales funciones, como sustrato o medio de cultivo, cobertura, mantenimiento de los niveles originales de materia orgánica del suelo y complemento o reemplazo de los fertilizantes de síntesis; este último aspecto reviste gran importancia, debido al auge de su implementación en sistemas de producción limpia y ecológica (Félix, 2018).

El mismo autor atribuye que las plantas fertilizadas orgánicamente no pueden infectarse con bacterias patógenas, porque el calor y la micro flora benéfica controlan esas poblaciones patógenas. Además, los ácidos húmicos contenidos en la materia orgánica húmificada aumentan la capacidad de retención de agua y la aireación del suelo, mejoran la agregación del suelo y evita su encostramiento. En la planta los ácidos húmicos estimulan el desarrollo de raíces, tallos y mejoran la absorción de nutrientes.

Por último, asegura que la aplicación de materia orgánica húmificada aporta nutrientes y funciona como base para la formación de múltiples compuestos que mantienen la actividad microbiana, como son: las sustancias húmicas (ácidos húmicos, fúlvicos, y húmicas). Que al incorporarla ejercerá distintas reacciones en el suelo como son: A) mejora la estructura del suelo, facilitando la formación de agregados estables con lo que mejora la permeabilidad de éstos, aumenta la fuerza de cohesión a suelos arenosos y disminuye en suelos arcillosos.

2.2.2 BIOFERTILIZANTES

Vessey (2003) como se citó en Afanador (2017) define a los biofertilizantes como un producto que contiene microorganismos del suelo aplicados a plantas para promover su crecimiento. Sin embargo, a menudo se ha utilizado erróneamente como sinónimo de una amplia gama de productos tales como fertilizantes orgánicos, compost, estiércol de animales, entre otros.

Además, este autor menciona que las cepas individuales o los consorcios microbianos son conocidos como bioinoculantes, que pueden ser el sinónimo más preciso para los biofertilizantes. A partir del conocimiento sobre la función

de los microorganismos, se pueden crear bioinoculantes para diversos tipos de suelo y sistemas de cultivo. Aquellos microorganismos con atributos específicos para la movilización de fósforo en el suelo se denominan microorganismos movilizadores de fósforo.

Además, Patiño (2010) indica que la técnica de agar en placa y medición de halos es un método adecuado cuando se pretende aislar y caracterizar un elevado número de cepas con capacidad de solubilización de fosfato. De acuerdo a Chen et al. (2006) las bacterias que crecen en un medio y forman un halo alrededor de la colonia debido a la solubilización de fosfato llevan un intercambio catiónico que convierte el fosfato insoluble a formas soluble, por lo que el mismo podría estar disponible para la planta.

El desarrollo de nuevos productos para la protección y nutrición vegetal elaborados a base de microorganismos como bacterias, algas, protozoos, virus y hongos, sustancias naturales como feromonas o semi-químicos, macro organismos e invertebrados como insectos y nematodos, así como extractos botánicos. Este tipo de productos, a veces denominados bioplaguicidas o biofertilizantes, o bioestimulantes según su funcionalidad, están siendo cada vez más utilizados en la agricultura mundial como complemento o alternativa al uso de los plaguicidas tradicionales (FAO, 2017).

La fuente antes citada atribuye que de prever un incremento significativo en la utilización a nivel mundial de bioplaguicidas, biofertilizantes y otros insumos agrícolas de origen natural en la producción de alimentos, piensos y productos agrícolas, más allá del uso actual de estos productos en producción orgánica, que son objeto de comercio internacional. El uso de estos productos constituye una práctica que es cada vez más recurrente en la producción agrícola orgánica, pero también de manera creciente, en la agricultura tradicional, tanto a nivel de grandes productores, como de productores medianos y pequeños.

Acuña (2016) establece los siguientes grupos de biofertilizantes:

- **FIJADORES DE NITRÓGENOS**

Estos microorganismos tienen la capacidad de transformar el N atmosférico a amonio y suministrarlo a los cultivos mediante varios procesos:

- **Las simbiosis más conocidas**

- Leguminosas y *Rhizobium*
- Plantas actinorrízicas y Frankia
- Helecho *Azolla* y *Anabaena*
- Líquen y cianobacterias

- **Fijación simbiótica de N**

- Se presenta una relación mutualista entre el microorganismo (huésped) y la planta (hospedero).
- El proceso se realiza en estructuras especializadas (nódulos).
- Relación leguminosa y *Rhizobium*.
- Puede suplir de 40 a más de 300 kg de N/ha/año, dependiendo del cultivo.

- **Fijación no simbiótica de N**

- Este proceso se presenta sin necesidad de una relación mutualista.
- La asociación se encuentra en una amplia gama de cultivos de interés agrícola.
- Dentro de los microorganismos que tienen esta capacidad se encuentran:
 - Bacterias de vida libre (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*)
 - Algas azul verdosas (*Anabaena*, *Nostoc*).

2.2.3 PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS:

Los microorganismos producen y liberan algunos ácidos orgánicos que reaccionan con aniones de fosfatos fijados, lo que permite su solubilización.

Algunos ejemplos de este proceso son:

- Ácido Nítrico (Nitrosomonas).
- Ácido carbónico (todos los productores de CO₂).

➤ Captación de fósforo

Otro grupo de microorganismos, ampliamente conocidos y estudiados, tienen la capacidad de aumentar el área de captación y absorción de nutrientes, principalmente fósforo, a través de las raíces.

➤ Micorrizas

Asociación simbiótica donde la micorriza aumenta la velocidad de captación de P y otros nutrientes (N, Fe y Cu). Tipos:

- Ectotróficas (árboles de zonas templadas).
- Endotróficas (cultivos de interés económico).

2.2.4 PROMOTORES DE CRECIMIENTO

Estos son microorganismos que, durante su actividad metabólica, son capaces de producir y liberar sustancias reguladoras de crecimiento para las plantas.

- *Gibberella (Fusarium moniliforme)* giberelina.
- *Anabaena, Nostoc* ácido indolacético.
- *Diplodia macrospora* auxinas.
- *Phomopsis* auxinas.
- *Trichoderma giberelina*.

(Bhattacharjee y Mahanty, 2014) señalan un sinnúmero de microorganismos asociados a la condición de biofertilizantes, tal como se muestra en el cuadro 2.4.

Cuadro 2.4. Tipos de biofertilizantes.

Fijadores de N₂ Vida libre	Microorganismos solubilizadoras de fosfato	Rizobacterias promotora del crecimiento vegetal (PGPR)	Movilizadores de fosfato (micorrizas)	Movilizadores de zinc y potasio
- <i>Achromobacter</i> - <i>Acetobacter</i> - <i>Alcaligenes</i> - <i>Arthrobacter</i> - <i>Azotobacter</i> - <i>Cyanobacteria</i> - <i>Azospirillum</i> Simbióticos: - <i>Rhizobium</i> sp. - <i>Bradyrhizobium</i> sp. - <i>Azolla</i>	- <i>Aspergillus niger</i> (no virulento) - <i>Trichoderma</i> sp. - <i>Paecilomyces</i> sp. - <i>Bacillus circulans</i> - <i>Bacillus</i> - <i>Coagulans</i> - <i>Torulospora</i> - <i>Globasa</i> - <i>Pseudomonas fluorescens</i> - <i>Thiobacillus</i> (SOM)	- <i>Azotobacter</i> - <i>Bacillus</i> - <i>Agrobacterium</i> - <i>Erwinia</i> - <i>Alcaligenes</i> - <i>Arthrobacter</i> - <i>Pseudomonas</i> - <i>Rhizobium</i> - <i>Streptomyces</i> - <i>Xanthomonas</i>	- <i>Glomus</i> sp. <i>Entrophospora</i> sp. - <i>Acaulospora</i> sp. - <i>Escutellasporea</i> sp	Zinc: - <i>Pseudomonas</i> spp. - <i>Bacillus</i> spp. - <i>Rhizobium</i> sp. Potasio: - <i>Bacillus</i> spp. - <i>Pseudomonas</i> spp

2.3 BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL

Para Ezpinoza (2016) la promoción del crecimiento vegetal directa por las Rizobacterias Promotora del Crecimiento Vegetal (PGPR) se puede derivar de la solubilización del fósforo, producción de reguladores de crecimiento, tales como auxinas, giberelinas (Gas), citoquininas e inhibidores de etileno, mediante la obtención de las actividades metabólicas de las raíces y/o mediante el suministro de nitrógeno fijado biológicamente. La promoción indirecta del crecimiento de las plantas se efectúa cuando las RPCV producen sideróforo los cuales pueden solubilizar y quelar el hierro de la rizósfera y así de este modo inhiben el crecimiento de uno o más microorganismos fitopatógenos.

El mismo autor menciona que las actividades positivas que ejercen las RPCV en las plantas pueden incluir aquellas que son de interés agrícola, logrando incrementos en la producción y reducción de costos y no causan daños al ambiente o la salud humana, además algunas RPCV tienen, también una función en la degradación de contaminantes orgánicos.

Las RPCV interactúan en el suelo al establecer relaciones variables y complejas que se traducen en la participación en los ciclos geoquímicos de nutrientes, los cuales determinan su disponibilidad para las plantas, comunidades microbianas del suelo y estimulan el desarrollo de las plantas de manera directa e indirecta, mediante relaciones benéficas. Estos microorganismos se encuentran en el suelo y pueden colonizar los espacios intercelulares de los tejidos radicales e incluso algunos alcanzan el tejido vascular (Achari y Ramesh, 2014).

Después del nitrógeno, el fósforo es el elemento más crítico para la producción agropecuaria; pero su disponibilidad es cada vez más limitada debido a la progresiva insuficiencia de sus fuentes naturales, su relativa escasez edáfica, elevada retención por parte de la matriz del suelo, la falta de reposición natural y su baja movilidad comparada con la de otros nutrientes (Rubio, 2002). Mientras que, (Gyaneshwar, et al., 2002) indica que el suelo, las bacterias solubilizadoras de fosfato constituyen de 1% a 50%.

Entre los diversos mecanismos usados por las RPCV, que estimulan el desarrollo vegetal, se destacan la fijación del nitrógeno atmosférico, producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas, etileno, ácido abscísico y citoquinas), solubilización de fosfatos, síntesis de antibióticos y/o compuestos fúngicos y producción de sideróforos, mecanismos que generan un efecto benéfico y desempeñan un papel clave en la toma de nutrientes y mantenimiento de la salud radicular, que favorecen el rendimiento de los cultivos (Sánchez y Pérez, 2018).

2.3.1 APLICACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL

Para Benjumeda (2017) la aplicación de las RPCV ofrece una alternativa para disminuir el suministro de fertilizantes sintéticos, pesticidas y suplementos ya que la mayoría de los aislamientos han realizado incrementos significativos en el crecimiento de las plantas, tanto en raíces y/o parte aérea. Algunas RPCV cuando son inoculante en las semillas antes de la siembra, son capaces de establecer en las raíces de los cultivos. En los sistemas de producción

sostenible, donde se minimizan las aplicaciones de agroquímicos, las RPCV podrían ser un componente fundamental para lograr obtener plántulas más vigorosas que serían tolerantes a nematodos y otras enfermedades en al menos un par de semanas después del trasplante.

También menciona que RPCV mejoran la salud de las plantas el proceso denominado Resistencia Sistemática Introducida (RSI), mecanismo de defensa a un amplio rango de agentes Fito patógenos e insectos herbívoros. Las RPCV logran RSI a través de la fortificación de la fuerza física y mecánica de la pared celular, así como el cambio de la reacción fisiológica y bioquímica de la planta que conduce a la síntesis de productos químicos de defensa contra patógenos. La inducción de la RSI es a través de las vías de señalización del ácido jasmónico y del etileno. Los mecanismos de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal son:

➤ **MECANISMO DE PROMOCIÓN DIRECTA**

Los mecanismos directos ocurren cuando las bacterias sintetizan metabolitos que facilitan a las plantas, o bien cuando éstas incrementan la disponibilidad de diferentes elementos nutritivos, requeridos para su metabolismo y para mejorar su proceso de nutrición (Gómez et al., 2012).

Entre los mecanismos directos destacan: la fijación de nitrógeno (N); la síntesis de fitohormonas, vitaminas y enzimas, la solubilización de fósforo (P) inorgánico y la mineralización de fosfato orgánico, la oxidación de sulfuros, el incremento en la permeabilidad de la raíz, la producción de nitritos, la acumulación de nitratos, la reducción de la toxicidad por metales pesados y de la actividad de la enzima ACC desaminasa, la secreción de sideróforos, la reducción de los niveles de etileno en los suelos, y el incremento de la permeabilidad de las raíces (Esquivel et al., 2013).

➤ MECANISMO DE PROMOCIÓN INDIRECTA

Siguen mencionando que los mecanismos indirectos se caracterizan porque las Rizobacterias Promotora del Crecimiento Vegetal (PGPR) ocasionan:

- La disminución o eliminación de microorganismos fitopatógenos, ya sea a través de la producción de sustancias antimicrobianas o de antibióticos, de enzimas líticas o una combinación de éstas; por competencia de nutrientes o de espacio en el nicho ecológico, así como por estimulación de las defensas naturales de la planta mediante mecanismos de biocontrol.
- La IRS a un amplio espectro de organismos patógenos y la producción de sideróforos, como mecanismo para secuestrar el Fe disponible en los suelos y con esto limitar el desarrollo y la presencia de dichos fitopatógenos.
- Producción de antibióticos y cianuros de hidrógeno que impactan sobre los fitopatógenos.
- Hidrólisis de moléculas como el ácido fusárico generado por éstos para liberar 1-3-glucanasa, con la cual se inhibe el desarrollo de la pared fúngica de hongos como *Phytium ultimum* y *Rhizoctonia solani*.

2.3.2 DÓNDE SE ENCUENTRAN

Los microorganismos endófitos son definidos como aquellos presentes en la superficie de tejidos vegetales desinfectada o en su interior, que no producen efectos nocivos para la planta. Estos se pueden encontrar en espacios intracelulares y en tejidos vasculares de tallos y raíces. Esta asociación endófito-planta, forma un sistema en el cual el microorganismo comunica información de la planta hospedera a ellos y viceversa (Pérez, 2016).

➤ FÓTORREMEDIACIÓN

La fitorremediación es un proceso de biodegradación *in situ* que utilizan las plantas verdes y los microorganismos asociados con ellas para extraer, secuestrar o desintoxicar contaminantes. Las plantas tienen la capacidad de absorber, acumular, degradar o eliminar metales, pesticidas, disolventes, petróleo crudo y muchos contaminantes industriales. La fitorremediación es una tecnología limpia, rentable y respetuosa con el medio ambiente, especialmente para el tratamiento de áreas grandes y difusas que están contaminadas. Hay muchos ejemplos exitosos en los que se ha empleado la fitorremediación y donde se ha documentado que funcionan bien para remediar ambientes industriales contaminados (Vangronsveld et al., 2012).

Beltrán (2014); Oliveros et al. (2009) señalan que la mayor parte de las cepas que reportaron índices de solubilización elevados 88,89% se aisló del sitio cultivado de la parcela de muestreo. Esto se puede atribuir a que las BSF (bacterias solubilizadoras de fosfato) resultan más eficaces fisiológicamente cuando están provistas de una mayor cantidad de fuentes de energía. Una mayor concentración de compuestos energéticos en el suelo se encuentra en la rizósfera de las plantas. La liberación de materiales carbonados, por parte de los vegetales, en forma de exudados radicales estimula las actividades fisiológicas de los microorganismos del suelo, tal como lo aseguran en sus trabajos.

➤ LA RIZOREMEDIACIÓN

Es el proceso que implica la eliminación de agentes contaminantes de sitios contaminados por interacción mutua de raíces de plantas y poblaciones microbianas adecuadas que ocurren en la rizosfera, y es considerada como el proceso de biorremediación más evolucionado (Kuiper, *et al.*, 2014). Las rizobacterias pueden ayudar directamente a la rizo remediación mediante la producción de IAA, fijación biológica del nitrógeno, solubilización de P y secreción de sideróforos (Bashan et al., 2014).

Además, las investigaciones sobre la aplicación de cepas de RPCV en la disminución de la biodisponibilidad de la toxicidad que resulta en un mejor crecimiento y desarrollo en suelos contaminados con metales pesados a través del reciclaje de nutrientes, el mantenimiento de la estructura del suelo, la desintoxicación de los productos químicos y el control de las plagas también han sido bien estudiados (Denton, 2007).

Los sideróforos son producidos por bacterias, hongos y plantas para facilitar la absorción de hierro (Chu, *et al*, 2010; Hider y Kong, 2010). La producción de sideróforos por bacterias constituye una de las características promotoras del crecimiento, debido a su capacidad para estimular el desarrollo de las plantas a través de diferentes mecanismos.

Por otro lado, los sideróforos bacterianos pueden mejorar el estado nutricional de las plantas, ya que en ambientes donde la disponibilidad de hierro es baja, algunas plantas son capaces de liberar el ión férrico (Fe^{3+}) del sideróforo bacteriano y utilizarlo para su crecimiento (Bashan *et al.*, 2014). Sin embargo, los sideróforos pueden estimular el crecimiento de las plantas indirectamente, limitando el daño causado por microorganismos fitopatógenos (Miethke y Marahiel, 2007; Chaiharn y Col, 2009).

2.3.3 CÓMO SE REALIZA EL AISLADO DE LAS BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL

Según Pérez *et al.* (2016) la capacidad de las rizobacterias aisladas para promover el crecimiento vegetal fue evaluada atendiendo a varias propiedades como: capacidad para producir ácidos orgánicos, la auxina ácido indolacético (IAA) y acetoína. Además, se determinó el potencial para fijar el nitrógeno y solubilizar el fosfato.

- **La producción de ácidos orgánicos** se evaluó acorde al método colorimétrico adicionando el indicador Alizarina roja al 0,1% luego de inocular

las bacterias en medio sacarosa-triptona (ST). El indicador cambia de rosa al amarillo por la acumulación de los ácidos orgánicos en el medio.

- **La producción de ácido indolacético (IAA)** esta producción se ensayó inoculando las bacterias en medio rico suplementado con $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de triptófano. Después de la incubación se añadió 1 mL del reactivo. La positividad del ensayo se observó mediante el cambio de amarillo a rosa producto de la unión de las moléculas de IAA al hierro del reactivo.

Los mismos autores mencionan que las cepas que utilizan la vía del butilenglicol para producir acetoina fueron detectadas inoculando las mismas. Luego de 48 h de incubación se indujo una respuesta colorimétrica, para observar las colonias positivas mediante la cual la sintaxis producida se transforma en diacetil dando una coloración rosa-rojiza al combinarse con α -naftol y KOH.

Continúan señalando que la capacidad de fijar el nitrógeno fue ensayada por el método descrito. Las bacterias fueron cultivadas en medio N con bromotimol azul como indicador del cambio de pH ocurrido. El medio fue preparado con y sin NH_4Cl como fuente de nitrógeno mineral e incubado 336 h a 30°C . Se evaluó el cambio de color. Solo las bacterias que poseen la enzima nitrogenasa, que catalizan la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio, provocan el cambio de color en el medio sin NH_4Cl .

Por último, afirma que el ensayo para detectar las bacterias que solubilizan el fosfato fue desarrollado acorde a las cepas crecidas en un medio rico, estas fueron inoculadas en placas con medio NBRIP que contiene el fosfato en una forma insoluble ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e incubadas a 28°C durante 12 días. Se evaluó el halo (zona de solubilización) alrededor de las colonias reportando su diámetro en cm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los aislados bacterianos fueron extraídos del rizoplaneo esta es la zona del suelo más cercana a las raíces de las plantas, donde se albergan consorcios de microorganismos capaces

también de degradar plaguicidas, provee un hábitat para un amplio rango de microorganismos.

2.3.4 REFERENCIAS DEL USO DE BACTERIAS DE CRECIMIENTO VEGETAL

Varios autores han mostrado que las características de promover el crecimiento vegetal son típico de bacterias que crecen en las raíces de las plantas o en la zona de la rizosfera; explicando, además, que se desarrolla una interacción entre la planta y las bacterias que la rodean, donde las bacterias se benefician de muchos compuestos que la planta exuda. Los resultados obtenidos en la determinación de las características de promotoras del crecimiento vegetal permitieron apreciar que *C. rotundus* y *Cassia* sp fueron las que menos aislados mostraron con estas características, mientras que *Cynodon dactylon* fue la que más aportó (Pérez et al., 2016).

Para Kloepper (2014) algunos agentes biocontroladores inducen un cambio sostenido en las plantas e incrementan su tolerancia a la infección contra patógenos bacterianos y fúngicos, un fenómeno conocido como Resistencia Sistémica Inducida. Varias rizobacterias patógenas tienen la habilidad de inducir este estado de resistencia en las plantas. Estudiaron este mecanismo en un *Bacillus* spp promotor del crecimiento vegetal, encontrando que la bacteria activó la resistencia sistémica inducida en *Arabidopsis* mediante la producción de 2,3-butanodiol. Otra molécula que al igual que el 2,3-butanodiol induce esta resistencia es su derivado, la 3-hidroxibutanona, más conocida como acetoína. En este trabajo se encontraron 5 aislados capaces de producir acetoína.

De igual manera en una investigación realizada sobre la caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*, se aislaron bacterias rizosféricas y endófitas a partir de rizósfera y tejidos de raíz de árboles de *Eucalyptus nitens* con el objetivo de evaluar su capacidad de

promover el crecimiento en plántulas de la misma especie en condiciones de invernadero. Los resultados obtenidos indican el potencial de las rizobacterias estudiadas como promotoras de emergencia y crecimiento de plántulas de *Eucalyptus nitens* y su posible uso como inoculantes, ya que presentan más de un mecanismo de acción asociado a la promoción del crecimiento (Violeta et al .,2014).

Moreno et al. (2018) atribuyen que, para mejorar la producción sin el uso de fertilizantes de origen sintético, las investigaciones se han orientado hacia el desarrollo de nuevas biotecnologías: provocando que exista un interés creciente en los microorganismos benéficos del suelo ya que éstos pueden promover el crecimiento de las plantas y, en algunos casos, evitar infecciones del tejido vegetal por patógenos. Las interacciones de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) con el medio biótico – plantas y microorganismos – son muy complejas y utilizan diferentes mecanismos de acción para promover el crecimiento de las plantas, estos mecanismos se agrupan en:

- Biofertilización
- Fito-estimulación
- Biocontrol

Inocular los cultivos con RPCV reduce sustancialmente el uso de fertilizantes sintéticos y los impactos negativos al suelo, aumenta el rendimiento de los cultivos, contribuyendo a la economía del productor y a la alimentación de la población. Esta revisión describe aspectos básicos inherentes a la interacción entre las RPCV y las especies vegetales, centrándose en los beneficios que aportan en la actividad agrícola.

2.4 RESEÑA DEL CEPARIO UTILIZADO EN EL ESTUDIO

Las bacterias *Bacillus* sp fueron aisladas a partir de muestras de suelo provenientes de cuatro islas de la Antártida (Dee, Barrientos, Greenwich y

Torres) en el año 2014. En cada una de las islas se tomaron muestras de suelos y se llevaron al laboratorio que se encuentra en la estación “Pedro Vicente Maldonado” para realizar el aislamiento de las bacterias. Posteriormente fueron colocadas en tubos de microcentrifugas con glicerol como protector para su respectivo traslado hasta la ciudad de Calceta (Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López” [ESPAM MFL], 2014).

Esta institución, además, informa que se obtuvieron un total de 150 aislamientos, los cuales se seleccionaron por sus características morfológicas y bioquímicas quedando un cepario de 83 cepas bacterianas (Cuadro 2.5). Las bacterias fueron evaluadas a nivel *in vitro* por su capacidad de degradar residuos en medios de cultivos suplementados con celulosa, donde se comprobó su capacidad para producir enzimas. Sin embargo, es necesario realizar otros estudios para potenciar los procesos agropecuarios y agroindustriales. Los géneros para este estudio se detallan a continuación.

Cuadro 2.5. Descripción de cepas de *Bacillus* sp tomadas de diferentes islas de la Antártida.

ISLA BARRIENTOS		ISLA GRENWICH	
COD: B		COD: GA, GB, GC	
B-2	B-13	GA-1	GB-11
B-3	B-20	GA-3	GB-17
B-4	B-21	GA-4	GB-70
B-6	B-22	GA-6	GB-71
B-7	B-23	GA-9	GB-76
B-8	B-24	GA-34	GB-77
B-9	B-25	GA-42	GB-81
B-10	B-60	GA-43	GC-1
		GA-44	GC-2
		GA-46	GC-3
		GA-47	GC-9
		GA-49	GC-80
		GA-50	GC-83
		GA-52	GC-84
		GA-53	GC-85
		GA-55	GC-86
		GA-56	GC-87
		GA-57	GC-89
		GA-60	GC-90
		GA-82	GB-4
ISLA DEE		ISLA TORRES	
COD: D		COD: T	
DEE- 1	DEE-16	T-1	T-21
DEE- 2	DEE-23		
DEE-6	DEE-24		
DEE-8	DEE-36		
DEE-9	DEE-71		
DEE-10	DEE-88		
DEE-11	DEE-92		
DEE-15	DEE-115		

T-3	T-22
T-4	T-25
T-5	T-29
T-10	T-30
T-11	

Fuente: ESPAM MFL (2014).

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1 UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular de la carrera de Medicina Veterinaria de la ESPAM MFL (Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”), ubicada en el sitio El Limón, del cantón Bolívar, de la provincia de Manabí, situada a una altitud de 15 msnm y geográficamente entre las coordenadas 00°49'23” Latitud Sur, 80°11'01” Longitud Oeste¹.

3.2 CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS¹

- Precipitación anual: 1058 mm
- Temperatura máxima: 30°C
- Temperatura mínima: 22°C
- Humedad relativa: 84%
- Heliofanía: 1082 horas/sol/año

3.3 DURACIÓN DEL TRABAJO

El presente trabajo de investigación tuvo una duración de nueve meses. El cual inició desde mes de octubre del 2019 y finalizó en junio del 2020. La primera fase consistió en la evaluación de las 83 cepas de *Bacillus* sp en diferentes condiciones para seleccionar las promisoras como promotoras de crecimiento en maíz.

En la segunda fase las cepas seleccionadas se inocularon en sustrato, y se evaluaron características deseables para el crecimiento del maíz

¹ Datos tomados en la estación meteorológica del INANMI, situada en la ESPAM MFL correspondiente al periodo; enero 2012 a junio 2019.

3.4 FASE 1: EVALUACIÓN DE *Bacillus* sp

Se realizó la tinción de Gram para comprobar pureza de las 83 cepas de *Bacillus* sp que se encuentran en conservación en el laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM MFL, además se realizó la prueba de catalasa de cada uno de los aislados.

3.5 TINCIÓN DE GRAM

Se colocó una gota de agua sobre un porta objetos, se extendió con la ayuda de un asa la colonia de *Bacillus* sp, mezclándola uniformemente con el agua. Se fijó la muestra a la flama hasta que se seque. Luego se adicionó una solución de cristal violeta, dejándola reaccionar por un minuto, se eliminó el exceso para añadirle Lugol durante un minuto posteriormente se adicionó alcohol-acetona durante 30 segundos a continuación, se lavó con agua y se añadió safranina por un minuto para luego eliminar el exceso con agua, secando finalmente la muestra al aire. Se observó al microscopio características tales como tipo de tinción y morfología siguiendo el protocolo de Mora y García (2007).

3.6 PRUEBA DE CATALASA

Referente a esta prueba, se procedió aplicar el protocolo de Márquez (2007) el cual consistió en tomar un porta objeto y se depositó un inóculo de las bacterias a examinar, sobre éstas se colocó una gota de agua oxigenada, la reacción será positiva si existe liberación de burbujas. Es importante señalar, que generalmente esta prueba es positiva para el género *Bacillus*.

3.7 SELECCIÓN DE *Bacillus* sp DE ACUERDO A CARACTERÍSTICAS DESEABLES

En los experimentos de laboratorio se empleó el modelo estadístico del Diseño Completamente al Azar para el análisis de las variables respuestas.

3.7.1 PRUEBA DE HEMÓLISIS

Para conocer el potencial patógeno de las cepas bacterianas aisladas se procedió a cultivarlas en medio sólido agar nutriente durante 18 horas a 37°C. Posteriormente las cepas se inocularon en agar nutriente suplementando con 5% de sangre de carnero, seguidamente se incubó durante 24 horas a 37°C. Con esta prueba se determinó si las bacterias producen la B-Hemolisina (responsable de la lisis de las células sanguíneas).

3.7.2 SOLUBILIZACIÓN DE FOSFATO

Esta prueba se desarrolló implementando el protocolo propuesto por Niklitschek (2008), el cual consistió a partir de un cultivo puro de *Bacillus* sp, se extrajo una muestra y se sembró en agar Pikovskaya (TM MEDIA), posteriormente se procedió a incubar en estufa (SalvisLab Thermocenter) a 37°C durante 2 días. Durante este proceso, se pudo observar que las bacterias desarrollaron un halo de hidrolisis alrededor de la colonia, los mismos que fueron seleccionados y con los datos obtenidos del diámetro de la colonia y del halo de hidrolisis se calculó el índice de solubilización (I.S.).

$$I.S = \frac{\text{diámetro} * \text{colonia} + \text{diámetro} * \text{halo}}{\text{diámetro} * \text{colonia}}$$

3.7.3 PRODUCCIÓN DE SIDERÓFORO

A partir de un cultivo puro de *Bacillus* sp se extrajo parte de una colonia y se sembró en punción en placas Petri que contuvo Agar Cromo Azurol-5 (CA5), siguiendo los procedimientos establecidos por (Hernandez et al. 2015). Posteriormente se incubaron las placas a 37°C durante 72 horas, siguiendo la propuesta de Aguado et al. (2012), con el propósito de observar y seleccionar cepas de *Bacillus* sp que tengan la capacidad provocar un cambio en la coloración del medio azul a halos de coloración naranja formados alrededor del crecimiento microbiano.

3.7.4 CRECIMIENTO EN CONDICIONES SIN FUENTE DE NITRÓGENO

Para este ensayo se evaluó las cepas que solubilizaron fosfato y sideróforo; basándonos en el protocolo de Cadena y Martínez (2011), con la finalidad para la detección de nitrógeno fijado *in vitro* de cada cultivo puro de *Bacillus* sp. A continuación, se sembró en punción en agar Ashby (HIMEDIA), precisando que este medio no posee fuente de nitrógeno. La incubación se realizó en aerobiosis, a 37°C, hasta por 1 semana y se consideraron como bacterias fijadoras de nitrógeno, aquellas donde se observó una película gruesa blanquecina 3–5 mm bajo la superficie del medio de cultivo y el viraje del indicador.

3.7.5 SUPERVIVENCIA A DIFERENTES TEMPERATURAS

En este ensayo se evaluó las cepas que fueron capaces de crecer en condiciones sin fuente de nitrógeno. Para lo cual se preparó caldo nutriente, se esterilizó y se ubicó en una relación 1000 uL de inóculo bacteriano en 10 mL de caldo nutriente (1/10). Seguidamente se incubaron a 37, 40, 50 y 60°C. Cada evaluación se realizó a las 0, 4, 16 y 24 horas.

A continuación se realizaron las diluciones seriadas hasta 10^{-8} , posteriormente se sembraron en agar nutritivo para el crecimiento de bacterias de *Bacillus* sp y se efectuó la diseminación con espátula de Drigalsky en caja Petri. Luego se

incubaron durante 18 horas a 37°C y 180 rpm. Culminado el tiempo de incubación se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC).

3.7.6 SUPERVIVENCIA A DIFERENTES CONDICIONES DE pH

En este ensayo se evaluó las cepas que fueron capaces de crecer en condiciones sin fuente de nitrógeno. Para lo cual se procedió a preparar caldo nutriente, modificando el pH a 3, 5, 7 y 9, luego se esterilizó en autoclave, seguidamente se inocularon 5 mL de bacterias seleccionadas en 45 mL de caldo nutriente y a continuación se dejaron en incubación durante 18 horas. A partir de las bacterias inoculadas e incubadas se efectuó diluciones seriadas hasta 10^{-8} , posteriormente se sembró en medio de cultivo agar nutriente y se incubó durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se contó las unidades formadoras de colonia (UFC).

3.7.7 SUPERVIVENCIA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl

En este ensayo se evaluó las cepas que fueron capaces de crecer en condiciones sin fuente de nitrógeno. Para lo cual se procedió a preparar caldo nutriente, modificando las concentraciones de NaCl 0, 8,5, 10, 15 y 20% y el testigo 0%, luego se esterilizó en autoclave, seguidamente se inocularon 5 mL de bacterias seleccionadas en 45 mL de caldo nutriente y a continuación se dejó en incubación durante 18 horas. A partir de las bacterias inoculadas e incubadas se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-8} , y por último se sembró en medio de cultivo agar nutriente y se incubó durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC).

FASE CAMPO

3.8 EVALUACIÓN DE LAS BACTERIAS *Bacillus* sp SELECCIONADAS

Se trabajó con aquellas tres bacterias que respondieron positivamente a la tinción de Gram, prueba de catalasa (positiva) prueba de hemólisis, solubilización de fosfato, producción de sideróforos y a su capacidad de supervivencia a diferentes concentraciones de pH, temperatura y concentraciones de NaCl.

3.8.1 DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL

- **Factores en estudio**

Factor A: Sustratos

Factor B: *Bacillus* sp

- **Niveles de los factores**

Cuadro 3.1. Niveles de los factores.

Factor A	Factor B
A1: Sustrato arcilla	B1 = AE-1
A2: Sustrato arcilla + compost.	B2= AE-2
	B3= AE-3
	B4= AE-4
	B5= AE-5

AE= Aislados endófitos.

- **Tratamientos**

Cuadro 3.2. Descripción de los tratamientos

CODIGO	SUSTRATO	<i>Bacillus</i> sp
---------------	-----------------	---------------------------

a1b1	Arcilla	AE-1
a1b2	Arcilla	AE-2
a1b3	Arcilla	AE-3
a1b4	Arcilla	AE-4
a1b5	Arcilla	AE-5
a2b1	Arcilla + Compost	AE-1
a2b2	Arcilla + Compost	AE-2
a2b3	Arcilla + Compost	AE-3
a2b4	Arcilla + Compost	AE-4
a2b5	Arcilla + Compost	AE-5

- **Diseño experimental**

El trabajo se realizó a través de un Diseño Completamente al Azar. Cada tratamiento se repitió tres veces.

- **Análisis estadístico**

Se ejecutó el análisis de varianza y la prueba Tukey $p < 0,05$ para las fuentes de variación que tuvieron significación estadística en las variables evaluadas. Para el análisis de los datos se utilizó el programa INFOSTAT (Di Rienzo, et al., 2010). A continuación, se presenta el esquema de ADEVA:

Cuadro 3.3. Análisis de varianza.

Fuente de variación	G. L
Total	29
Tratamientos	9
Error	20
F. A	1
F. B	4
A X B	4

3.8.2 UNIDAD EXPERIMENTAL

La unidad experimental estuvo constituida por vasos de vidrio debidamente esterilizadas, en cada vaso se colocó una semilla de maíz variedad (Trueno) y se la cubrió con fundas plásticas.

3.8.3 MANEJO DEL EXPERIMENTO

- **Multiplicación de cepas bacterianas**

A partir de un cultivo puro se procedió a la siembra en caldo nutritivo, posteriormente se incubó a 37°C durante 18 horas. Para esta multiplicación se empleó cepas bacterianas seleccionadas por su capacidad de producir compuestos que promueven el crecimiento vegetal.

- **Esterilización del sustrato**

Para la esterilización de los sustratos seleccionados como la arcilla y arcilla + compost estos fueron llevados a la autoclave (Yamato SM510) para eliminar todos los microorganismos del sustrato y favorecer la acción de las bacterias *Bacillus* sp seleccionadas.

- **Inoculación**

La inoculación se realizó a partir de las cepas seleccionadas y multiplicadas. A cada unidad experimental se le aplicó 3 mL de inóculo.

- **Siembra de semilla de maíz**

En cada unidad experimental se colocó una semilla de maíz.

3.8.4 VARIABLES EVALUADAS

- **Altura de planta (AT)**

En base al protocolo de Peña (2011), a los 15 días después de sembrado (dds) se realizó la medición de la altura de la plántula de maíz, midiendo desde el cuello de la planta hasta el punto apical más alto, con una regla graduada, los valores se expresaron en centímetro.

- **DIÁMETRO DE TALLOS (DT)**

Siguiendo el protocolo de Masaquiza (2016), se tomó la planta de maíz y se midió el diámetro del tallo en cm con un calibrador Vernier a 5 cm del suelo a los 15 días.

- **LONGITUD DE RAÍZ (LR)**

La longitud de la raíz se registró utilizando una hoja A4 milimétrica para obtener el promedio en cm de cada raíz a los 15 días.

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EVALUACIÓN DE *Bacillus* sp

La viabilidad de las 83 cepas bacterianas provenientes de suelos de la Antártida se determinó a partir de su reactivación en medio caldo nutriente (CN). Se tomó una pequeña cantidad de la cepa conservada a 4°C, se inoculó en el medio de cultivo agar nutriente y se dejó en incubación durante 24 horas a 37°C, para luego realizar pruebas y seleccionar las promisoras como promotoras de crecimiento en maíz.

4.2 TINCIÓN DE GRAM Y PRUEBA DE CATALASA

El cuadro 4.1 muestra las 83 cepas evaluadas de *Bacillus* sp, en las que se identificaron la morfología, catalasa y el tipo de tinción mediante la observación microscópica de acuerdo a la metodología realizada por Mora y García (2007). Según las pruebas bioquímicas realizadas, se observó que todas las bacterias en estudio mostraron morfología de *Bacillus*; además, presentaron tinción de Gram positivas, endospora central y con forma elipsoidal. Por otra parte, para la prueba de catalasa efectuada a todas las cepas mostraron ser indicadores de actividades de organismos aerobios.

Estos resultados coinciden con el estudio de Ratón et al. (2005), quienes reportaron que todas las cepas aisladas en su trabajo fueron Gram positivas y catalasa positivos, a pesar que se trata de ambientes distintos, lo cual indica que las bacterias inocuas tienen distribución cosmopolita. Esta condición es muy importante al momento de aislar microorganismos para su uso seguro en actividades agro productivas; en este sentido Gyaneshwar et al. (2002) indican que la catalasa actúa sobre el H₂O₂ tóxico producido por la cadena de transporte electrónico mitocondrial y en varias reacciones de oxidación e hidroxilación, de

manera que evita sus efectos tóxicos sobre los organismos y lo descompone para formar oxígeno y agua.

En el mismo sentido, Rodríguez (2018) indica que las bacterias Gram positivas tienen una pared gruesa compuesta de peptidoglucanos y polímeros, e impermeable, que hace que resista la decoloración. También, la pared celular de las bacterias Gram positivas contienen ácidos teicoicos, que están compuestos principalmente por alcohol (por ejemplo: glicerol o ribitol) y fosfato que actúan como estimuladores de crecimiento vegetal (Tortora et al. 2007).

La cualidad de los aislados expuesto en cuadro 4.1 da la posibilidad de seleccionar microorganismos con capacidad promotora de crecimiento vegetal, según García (2020) las bacterias Gram positivas son microorganismos que se encuentran en diferentes hábitats como en el suelo, estos hacen que la tierra se beneficie y aproveche los nutrientes que aportan al suelo o que ayuden a degradarlos para que la planta los pueda absorber de acuerdo a sus necesidades; además estas bacterias pueden generar un impacto positivo al brindar beneficios en la fertilidad del suelo y a la vez se obtiene un mejor aprovechamiento de los nutrientes por parte de las plantas.

Cuadro 4.1. Tinción de Gram para cepas aisladas de suelos de la Antártida.

ISLA BARRIENTOS		Morfología	Gram y catalasa	ISLA GRENWICH		Morfología	Gram y catalasa
COD: B				COD: GA, GB, GC			
B-2	B-13	<i>Bacillus</i>	Positivo	GA-1	GB-11	<i>Bacillus</i>	Positivo
B-3	B-20			GA-3	GB-17		
B-4	B-21			GA-4	GB-70		
B-6	B-22			GA-6	GB-71		
B-7	B-23			GA-9	GB-76		
B-8	B-24			GA-34	GB-77		
B-9	B-25			GA-42	GB-81		
B-10	B-60			GA-43	GC-1		
				GA-44	GC-2		

de tamaño y la colonia se conserva, obteniéndose de esta manera buenos índices de solubilización.

Los halos de hidrólisis encontrados en el presente estudio se ubican en los valores mínimos reportados por Scattareggia (2016) quien evaluó 83 cepas bacterianas, de las cuales 18 presentaron índice de solubilización de fosfato en un rango de 2,02 a 4,98 mm.

Para Chen et al. (2006) los sitios de aislamiento y el ambiente donde se encuentran las bacterias influyen en su capacidad solubilizadora, ya que existen mecanismos inductores o de represión genética reguladas por la disponibilidad de fósforo, es decir, los genes se expresan de acuerdo a las condiciones en las que el organismo se encuentre. Lo cual respalda que a pesar que todos los microorganismos aislados en este estudio comparten características genéticas y se encuentren en las mismas condiciones nutricionales, son independientes en cuanto a su actividad solubilizadora de fosfato.

Los resultados, tras la evaluación del Índice de Solubilización (I.S.), alcanzaron valores a las 24 h entre 1,05-2,07 mm y a las 48 h de 1,05-1,69 mm que se muestran en el Cuadro 4.2. Valores de I.S ligeramente superiores reportaron (Ramírez et al., 2008) en su estudio sobre *Bacillus*, donde determinaron que este género bacteriano resulta ser un importante solubilizador de fosfato, observando que las 11 cepas del estudio en el medio Pikovskaya durante las 24 y 48 horas de incubación presentaron índice de Solubilización con promedio entre 2 y 3 mm. Sin embargo en un estudio realizado por Bobadilla y Rincón (2008) en aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras del genero *Bacillus* los valores de índices de solubilización varían desde 3,3 hasta 5 mm de diámetro.

De acuerdo a Beltrán et al. (2005) los índices de solubilización dependen del tipo de microorganismos aislados. Esto concuerda con lo mencionado por Panhwar et al. (2012) quienes sostienen que las bacterias pueden tener capacidad de hacer uso de diferentes mecanismos para solubilizar el P, la estimulación puede depender de la procedencia de los aislamientos, y las poblaciones alcanzadas,

entre otros. Paralelamente, el mecanismo de solubilización de P, puede estar influenciado por el género, la especie o medio de cultivo en el cual se realice la evaluación.

Cuadro 4.2. Resultados de la medición de halos de solubilización de fosfato a las 24 h y 48 h de incubación.

Códigos	I.S. 24 H	I.S. 48 H
T-1	1,1 mm	1,18 mm
GB-70	1,19 mm	1,18 mm
T-5	1,12 mm	1,13 mm
GC-3	1,29 mm	1,42 mm
GB-77	2,07 mm	1,69 mm
B-6	1,05 mm	1,05 mm

4.4 PRUEBA DE HEMÓLISIS

Para esta prueba se seleccionó las bacterias que tuvieron la capacidad de solubilizar fosfato, obteniéndose como resultados que de las seis cepas seleccionadas solo tres cepas (T5, GB-70, B-6) mostraron hemólisis gamma (sin actividad hemolítica, no produce la destrucción de los glóbulos rojos para los humanos); mientras que T-1, GB-77 y GC-3 presentaron hemólisis beta (produce un halo transparente por la destrucción total de los glóbulos rojos) por lo que estas bacterias no pueden ser utilizadas como inoculante porque son portadoras de patógenos (Cuadro 4.3).

El porcentaje de cepas con hemólisis gamma encontradas en el presente estudio es similar al 47% reportado por Forbes et al. (2007), quienes sostienen que este parámetro es muy necesario determinar para el uso comercial de microorganismos vivos, debido a que permite identificar bacterias potencialmente patógenas. También Estrada (2017) informa que cepas bacterianas asociadas a *Opuntia* spp mostraron que, de ocho bacterias seleccionadas por su capacidad de producir AIA y solubilización de fosfato, tres de ellas presentaron β -hemolisis a diferencia de las otras cinco que no presentaron halos hemolíticos del tipo Beta alrededor de su crecimiento.

Cuadro 4.3. Prueba de hemólisis para cepas de *Bacillus* sp.

Prueba de hemólisis	
Hemólisis Gamma	Hemólisis Beta
T-5	T-1
GB-70	GB-77
B-6	GC-3

4.5 PRODUCCIÓN DE SIDERÓFORO

Para esta prueba se seleccionó aquellas cepas bacterianas que solubilizaron fosfato y tuvieron hemólisis gama, obteniéndose como resultado que las tres cepas produjeron sideróforo con valores desde 1,21 a 1,60 mm, demostrando que tienen capacidad fijadora del hierro que potencia la promoción del crecimiento vegetal, tal como se muestra en el cuadro 4.4.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Villarreal et al. (2018) que en sus investigaciones observó cepas con capacidad de control biológico pertenecientes al género *Bacillus* que han demostrado la capacidad de sintetizar el sideróforo, regulando la concentración de hierro a través de su quelación (Fe^{3+} -sideróforo). Además Fgaier y Eberl (2011) mencionan que las especies de género *Bacillus* han sido reportadas por su capacidad para controlar enfermedades de plantas mediante la secreción de sideróforos, limitando el crecimiento y colonización de microorganismos fitopatógenos dependientes de hierro.

La selección de microorganismos con capacidad de producir sideróforos posibilita su uso en las prácticas de biofertilización, tal como lo indican Aguado et al. (2012) quienes afirman que los sideróforos bacterianos han despertado gran interés en los últimos años debido al potencial que tienen para el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas y por constituir un mecanismo de promoción de crecimiento en rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Los análogos de estas moléculas en las plantas, conocidos como fitosideróforos, también juegan un papel fundamental en la nutrición del hierro en las plantas.

Cuadro 4.4. Producción de sideróforo para cepas *Bacillus* sp.

Producción de sideróforo	
Códigos	Halo sideróforo
T-5	1,21 mm
GB-70	1,27 mm
B-6	1,60 mm

4.6 CRECIMIENTO DE *Bacillus* sp EN CONDICIONES SIN FUENTE DE NITRÓGENO

Para esta prueba se seleccionó cepas que tuvieron la capacidad de solubilizar fosfato, hemólisis gama y producir sideróforo, obteniendo como resultados que todas las cepas crecieron en condiciones sin fuente de nitrógeno debido a que se observó una película gruesa blanquecina entre los 3 y 5 mm. La medición de los halos arrojó valores en el día uno de 17,95 a 58,23 mm, y al día cinco de 48,38 a 68 mm en agar semisólido ASHBY (Cuadro 4.5), utilizando el protocolo descrito por Cadena y Martínez, (2011).

Los resultados del presente estudio son superiores a los reportados por Jaramillo (2012) en su estudio sobre "Aislamiento y selección de rizobacterias del género *Azotobacter* y *Bacillus* con potencial aplicación como bioinoculantes en el cultivo de *Mangifera indica* L" ya que todas las cepas crecieron en condiciones sin fuente de nitrógeno y a los 15 días obtuvo diámetros de las colonias entre 15 y 30 mm para *Bacillus* y entre 14 y 28 mm para el género *Azotobacter*.

Cuadro 4.5. Diámetros sobre fijación de nitrógeno sin fuente de nitrógeno en cepas de la Antártida.

Códigos	Día 1	Día 5
T-5	58,23 mm	68 mm
GB-70	36,61 mm	48,38 mm
B-6	17,95 mm	58,4 mm

4.7 SUPERVIVENCIA A DIFERENTES TEMPERATURAS Y pH

Para esta prueba se seleccionó las cepas que solubilizaron fosfato, hemolisis gama, produjeron sideróforo y crecer sin fuente de nitrógeno, obteniéndose como resultado que todas las cepas de *Bacillus* sp crecieron a diferentes condiciones de temperatura (20, 37, 50 Y 60°C) presentándose en la mayoría de cepas un crecimiento incontable debido a que hay aglomeraciones de colonias, sin embargo a temperatura de 37°C la cepa B-6 fue donde mayor presencia de unidades formadoras de colonia (UFC) hubo con 35×10^{-9} UFC en comparación a la hora 0 con crecimiento incontable (Cuadro 4.6).

Cuadro 4.6. Evaluación de las cepas *Bacillus* a diferentes condiciones de temperatura

Códigos	20°C	37°C	50°C	60°C
T-5	IN	IN	IN	IN
GB-70	IN	IN	19×10^{-3}	IN
B-6	IN	35×10^{-9}	IN	IN

IN (Incontable)

Para la prueba de los aislados de *Bacillus* sp a diferentes condiciones de pH (3, 5, 7 y 9) se evidencia que todas las cepas presentaron una buena adaptación a pH ácidos, neutros y alcalinos. Los resultados tras la evaluación de las unidades formadoras de colonias (UFC) demuestran que la mayor presencia de colonias se dio en la cepa GB-70 a pH 7 con 4.1×10^{-10} UFC a las 18 h de evaluación a diferencia de la 0 hora que obtuvo un crecimiento incontable y la de menor presencia de colonias fue la misma cepa GB-70 a pH 3 con $1,0 \times 10^{-10}$ a las 18 horas de evaluación (Cuadro 4.7).

Cuadro 4.7. Evaluación de las cepas *Bacillus* a diferentes condiciones de pH.

Códigos	0 hora	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
		18 h	18 h	18 h	18 h
T-5	IN	IN	$2,0 \times 10^{-11}$	$1,6 \times 10^{-10}$	IN

GB-70	IN	1,0X10 ⁻¹⁰	2,0X10 ⁻¹¹	4,1X10 ⁻¹⁰	2,0X10 ⁻¹¹
B-6	IN	IN	IN	4,1X10 ⁻¹⁰	IN

IN (Incontable)

La plasticidad ecológica de los aislados bacterianos del presente estudio coincide con la caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* sp realizada por Calvo y Zuñiga (2010), quienes encontraron que el 98% de cepas creció a 10°C y todas crecieron a temperaturas 15 y 20°C. Por otro lado, respecto al pH, se observó que 100% de las cepas, crecieron bien en ambos pH (4 y 5.5), lo que indica una buena adaptación del crecimiento de las cepas.

4.8 SUPERVIVENCIA EN CONCENTRACIONES DE NaCl

Para la prueba de los aislados de *Bacillus* sp a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0, 8,5, 10, 15 y 20%) se evidencia que todas las cepas presentaron una buena adaptación. Los resultados tras la evaluación de las unidades formadoras de colonias (UFC) demuestran que la mayor presencia de colonias se dio en la concentración al 20% con 7,4x10⁻⁸ en comparación al 0% de NaCl que obtuvo 1,12x10⁻³ UFC (Cuadro 4.8).

Cuadro 4.8. Evaluación de las cepas *Bacillus* a diferentes condiciones de cloruro de sodio.

Códigos	Concentración cloruro de sodio				
	0%	8,5%	10%	15%	20%
T-5	1,12X10 ⁻³	6,4x10 ⁻³	1,4x10 ⁻⁵	1,4x10 ⁻⁶	7,4x10 ⁻⁸
B-6	2,0x10 ⁻³	7,0x10 ⁻³	7,0x10 ⁻⁴	7,5x10 ⁻⁶	1,57x10 ⁻⁶
GB-70	5,9x10 ⁻³	6,6x10 ⁻³	7,9x10 ⁻⁵	5,9x10 ⁻⁶	6,2x10 ⁻⁸

Con respecto a estos resultados, Tejera et al. (2011) señalan que las especies del género *Bacillus* sp presentan ventajas para su utilización en la Biotecnología

Agrícola como son la presencia de endosporas, la motilidad que le facilita la colonización de la planta, la capacidad de producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal, sideróforos, solubilización de fosfatos y de sustancias responsables de su actividad antagónica e inhibidora, todo lo cual abre las perspectivas de su utilización en la agricultura sostenible con la consecuente preservación del medio ambiente.

Por lo consiguiente, los resultados tras la evaluación y selección de las cepas de *Bacillus* sp aisladas de suelos de la antártica en la fase de laboratorio, permitió obtener tres cepas bacterianas como bioinoculantes con potencial promotor de crecimiento vegetal para ser probadas en plantas de maíz.

4.9 EVALUACIÓN DE LOS *Bacillus* sp SELECCIONADOS

4.9.1 ALTURA DE PLANTA

Los resultados del análisis de varianza para altura de planta no demostraron diferencias significativas para el Factor A (tipos de sustratos), Interacciones y Factor B (*Bacillus* sp) (Cuadro 4.9).

4.9.2 LONGITUD DE RAÍZ

Para esta variable se encontró diferencias significativas en el Factor A (tipos de sustratos), mientras que el Factor B (*Bacillus* sp) e Interacción no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 4.9).

4.9.3 DIÁMETRO DEL TALLOS

El análisis estadístico determinó diferencias significativas para el Factor A (tipos de sustrato), mientras que el Factor B (*Bacillus* sp) e Interacción no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 4.9).

Cuadro 4.9. Análisis de las variables evaluadas altura de planta, longitud de raíz y diámetro del tallo según la prueba de Tukey al 0,05 % de probabilidad.

Tratamientos	Descripción	Altura de planta	Longitud de raíz	Diámetro del tallo
	Factor A	Ns	*	*
A1	Arcilla	16,00	11,22 ^b	2,14 ^b
A2	Arcilla + Compost	14,00	14,44 ^a	2,38 ^a
	Media	15,00	12,83	4,52
	Factor B	Ns	Ns	Ns
B1	AE-1	14,33	13,67	2,38
B2	AE-2	16,83	13,00	1,92
B3	AE-3	14,67	11,83	2,48
	Media	15,28	12,83	2,26
	Factor B*Factor A	Ns	Ns	Ns
A1B1	Arcilla + AE-1	15,67	13,67	2,00
A1B2	Arcilla + AE-2	17,00	10,33	1,90
A1B3	Arcilla + AE-3	15,33	9,67	2,53
A2B1	Arcilla + Compost + AE-1	13,00	13,67	2,77
A2B2	Arcilla + Compost + AE-2	16,67	15,67	1,93
A2B3	Arcilla + Compost + AE-3	14,00	14,00	2,43
	Media	15,28	12,84	2,26
CV %		31,9	27,3	26,17

Los resultados obtenidos, en este ensayo permiten determinar que los aislados seleccionados como promotores de crecimiento en plántulas de maíz no influyeron estadísticamente sobre las variables agronómicas evaluadas; sin embargo, en la fuente de variación sustratos hubo diferencias estadísticas significativas, la variante (arcilla + compost) tuvo un comportamiento más eficaz en las variables longitud de raíz y diámetro del tallo. Posiblemente el abono orgánico contribuyó con elementos nutritivos para el vigor germinativo de la semilla. Se estima que estos resultados son promisorios y resulta interesante continuar realizando estudios para conocer la respuesta de la planta de maíz a estos microorganismos en ambientes productivos.

Por otra parte, Bacon y Hinton, (2011) expresan que no hay que descartar que el género *Bacillus* es potencialmente un microorganismo que le brinda protección a la planta y funcionalmente podría considerarse un controlador biológico porque produce sustancias antibióticas, solubilizadoras de fosfato que le facilita a la planta disponibilidad de nutrientes y porque ejerce funciones como sideróforo. Al respecto, autores como Patten y Glick (2002) reportan que varias especies de bacterias de los géneros *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cerratia*, entre otros, pueden afectar positivamente las raíces y el follaje de diferentes cultivos en condiciones controladas.

En ese contexto Gutiérrez (2019) manifiesta que cualquiera que sea la función que tenga el género *Bacillus* es positiva y por lo tanto este género es promisorio y debe ser investigado por especies para determinar genéticamente su funcionalidad, así como conocer su cinética para finalmente obtener productos que ayuden a la promoción del crecimiento vegetal

CAPITULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se concluye que:

- La caracterización morfo cultural de las 83 cepas de *Bacillus* sp obtenidas de suelos de la Antártida, permitieron seleccionar tres cepas (T-5, B-6 y GB-70) como bioinoculantes con potencial para promover el crecimiento en plantas de maíz.
- La evaluación de las cepas T-5, B-6 y GB-70 como promotoras de crecimiento en plantas de maíz no ejercieron efecto estadístico significativo sobre las variables agronómicas evaluadas.
- La combinación de los sustratos arcilla + compost tuvo mayor eficacia en el desarrollo de la longitud de la raíz y el tallo de la plántula de maíz.

RECOMENDACIONES

- Realizar la caracterización molecular de las cepas T-5, B-6 y GB-70 para su identificación a nivel de especie.
- Evaluar la promoción del crecimiento vegetal del biofertilizante a base de las cepas T-5, B-6 y GB-70 en condiciones de campo y con diferentes cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguado, G., Moreno, B., y Jimenez. (2012). Impacto de los sederóforos microbianos en la asimilación del hierro por las plantas. *Fitotec*, 35(1), 9-21. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/scielo>.
- Achari, G., y Ramesh, R. (2014). La diversidad, el biocontrol y la capacidad de promover el crecimiento de las plantas de las bacterias residentes en el xilema de cultivos solanáceos. *Revista de microbiología*, 1(14), 1-14.
- Afanador, N. (2017). Biofertilizantes: conceptos. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/331454557_Biofertilizantes_conceptos_beneficios_y_aplicacion_en_Colombia
- Bacon, C., y Hinton, D. (2011). In planta reduction of maize seedling stalk lesions by the bacterial endophyte *Bacillus mojavensis*. *Canadian journal of microbiology*, 57(6), 485-492.
- Bashan, E., Prabhu, R., y Hernández, J. (2014). Avances en la tecnología de inoculantes bacterianos que promueven el crecimiento de plantas, formulaciones y perspectivas prácticas. *Plant soil*, 378(12), 1-33.
- Bashan, Y.; Holguín, G.; Bashan, L.E. (2004). Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 521–577.
- Bhattacharjee, R., y Mahanty, U. (2014). El fertilizante un camino para la vida ecológica. *African Journal of Microbiology Research*, 8 (24), 2332-2343.
- Benjumeda, D. (2017). Bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Recuperado de: <https://idus.us.es/xmlui/handle/11441/65140>
- Beltran, S., Torrado, Y., Martínez, M., Matiz, A. (2005). Aislamiento de bacterias con actividad solubilizadora de fosfato de un inoculo mixto en fermentación. Tesis de Ing Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá- Colombia.
- Beltrán, E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Artículo de revisión de la Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria, Vol. 15, No. 1, 101-113.
- Bianchi, E. (2018). Oportunidades y desafíos para la investigación en agricultura, y en seguridad alimentaria y nutricional en las Américas. Recuperado de: www.ianas.org
- Bowen, G., y Rovira, A. (2014). La rizosfera y su gestión para mejorar el crecimiento de las plantas. *Adv. Agron.* 66: 1-102.
- Bobadilla, C., y Rincón, S. (2008). Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost. Recuperado de:

<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8433/tesis130.pdf?sequence=1>

- Cadena, S., y Martínez, B. (2011). Caracterización de cepas de *Pseudomonas* spp. y su efecto en la germinación y emergencia de *Zea mays* L “maíz” en Lambayeque. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Calvo, P., y Zúñiga, D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. Aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología aplicada*, 9(1), 31-39.
- Ciampiti, I., y García, O. (2017). Requerimientos nutricionales de los cultivos. Recuperado de: <http://www.laboratoriomarasas.com.ar/sites/www.laboratoriomarasas.com.ar/files/REQUERIMIENTOS%20NUTRICIONALES%20Y%20EXTRACCIONES.pdf>
- Constitución del Ecuador. (2008). La importancia del ambiente. Recuperado de https://www.oas.org/juridico/mla/sp/ecu/sp_ecu-int-text-const.pdf
- Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S., Lumyong, S. (2009). Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 1919-1928.
- Chen, Y., Rekha, P., Arun, A., Shen, F., Lai, W., & Young, C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34:33-41.
- Chu, C., Garcia, A, Johanson, H., Krewulak, K, Lau, K., Peacock, R. S.(2010) Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals* 23: 601–611.
- Denton, B. (2007). Avances de la fotorremediación en metales pesados utilizando bacterias y hongos que promueven el crecimiento en las plantas. *Biotechnol*, 12(3), 1–5.
- Di Rienzo, J., Balzarini, M., Gonzales, L., Casanoves, F., Tablada, M., y Robledo, C. (2010). InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- ESPAM MFL. (Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”). (2014). Cepas de *Bacillus* sp tomadas de diferentes islas de la Antártida. Laboratorio de Biología Molecular.
- Espinoza, B. (2016). Inoculación de Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de tomate (*Solanun lycopersicum*) bajo condiciones de invernadero. (Tesis de grado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-México.

- Esquivel, R., Gavilanes, M., Cruz, R., y Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias. *Fitotecnia Mexicana*, 36(3), 251-258.
- Estrada, J. (2017). Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias asociadas a *Opuntia* spp. y su efecto en la germinación y crecimiento de *Arabidopsis thaliana* L (Master's thesis).
- FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2005). Cultivos de referencia. (En línea). Consultado el 23 de May. 2019. Formato PDF. Disponible en: http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/comagric/co dex/rla3013/pdf/aseg4.pdf.
- FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2017). Fundamento de la necesidad de fertilizantes (aumento de la producción y aumento del ingreso de los agricultores). En: *Los fertilizantes y su uso*. 4a. ed. Roma: FAO, IFA.
- Fgaier H., & Eberl H. (2011). Antagonistic control of microbial pathogens under iron limitations by siderophore producing bacteria in a chemostat setup. *Journal of Theoretical Biology*. 273:103-114.
- Félix, L. (2018). Importancia de los abonos orgánicos. *Ra Ximhai*. 4(1), 57-67. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/28211184_Importancia_de_los_abonos_organicos/download
- Forbes, B., Sahm, D., and Weissfeld, A. (2007). *Bailey & Scott's. Diagnostic microbiology*. 12th edition, Mosby Elsevier.
- Gómez, L., Hernández, A., Herrera, C., Arroyo, G., Vargas, L., y Olalde, V. (2012). Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento de la rizósfera de plantas de guayaba (*Psidium guajava*). *Ra Ximhai*, 8(3), 97-102.
- García, L. (2012). Perspectivas para el medio ambiente agricultura medio ambiente. (En línea). Consultado el 23 de May. 2019. Formato PDF. Disponible en: <http://www.fao.org/3/y3557s/y3557s11.htm>
- García, J. (2020). Importancia de las bacterias Gram positivas en la agricultura. Tesis Ing Agropecuaria. Universidad Técnica de Babahoyo. Babahoyo, Los Ríos, Ecuador
- Gyaneshwar P, Naresh G, Kumar L, Parekh J, Poole P. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil* 245: 83–93.

- Guangming, Z., Xuechen, W., Xiuping, S., Hongbo, Y., Jingsong, W. (2017). Soil enzymes as indicators of saline soil fertility under various soil amendments. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 237: 274-279.
- Gutiérrez, A. (2019). Evaluación del efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción del crecimiento en maíz (*Zea mays* L.) (Doctoral dissertation, Instituto de Ciencias Biológicas-Maestría en Ciencias Biológicas-UNICACH).
- Hernández, I., Nápoles, M., y Morales, B. (2015). Caracterización de aislados de rizobios. *Cultivos Tropicales*, 36(1), 65-72. Recuperado de file:///C:/Users/CompuStore/3D%20Objects/ctr08115.pdf
- Hernández, R. (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de Agave Lechuguilla Torrey. Universidad de Guadalajara México. Red de revistas científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Vol3 art. 11. 9 p.
- Hider, R.C., Kong, X. (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports* 27: 637–657
- Jaramillo, L. (2012). Aislamiento y selección de rizobacterias del género *Azotobacter* y *Bacillus* con potencial aplicación como bioinoculante en el ADDIN ZOTERO_BIBL {"uncited":[],"omitted":[],"custom":[]} CSL_BIBLIOGRAPHY cultivo de *Mangifera indica* L (mango).
- Kloepper, J. (2014). Induciendo un sistema de resistencia y promoción de las plantas por *Bacillus* spp". *Revista Phytopathology*. 94(11).
- Kuiper, E., Mendoza, A., y García, E. (2014). La rizoremediación. recuperado de:
<https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/65140/BENJUMEA%20MUC3%91OZ%2C%20DANIEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Loredo, C., López, L., y Espinoza, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas, 22(2), 1. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57322211>.
- López, A., Álvarez, V., Torres, D y Romero, L. (2011). Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 15(1), 39-44.
- Mantilla, L. C., Avila, L. E., & Peña, J. N. (2011). Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba Colombia. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 9(2), 114-120.

- Márquez, F. (2007). Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo. Tesis. Licenciado en Ciencias Agronómicas. Universidad Austral de Chile. Valdivia. CH. p 16.
- Martínez R., Dibut, B., y Ríos. (2010). Efecto de la integración de aplicaciones agrícolas de biofertilizantes y fertilizantes minerales sobre las relaciones suelo-planta. *Cultivos Tropicales*. (31), 27-31. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v31n3/ctr09310.pdf>
- Martínez, N., y López, C. (2011). Efectos para salinidad en el desarrollo vegetativo. *Revista TECNOCENCIA*. 5(3), 156-157. Recuperado de: http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v5n3/data/Efectos_por_salinidad_en_el_desarrollo_vegetativo.pdf
- Masaquiza, J. (2016). Valoración del rendimiento de maíz (*Zea mays*) en relación con la aplicación de biodegradantes en el sector la isla, cantón Cumandá. Tesis. Ingeniero Agropecuario. UTA. Ambato. EC. p 33.
- Mesa, D. (2003). Obtención de plantas resistentes a la salinidad para los suelos salinos cubanos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 37(3), 217-226.
- Miethke, M., Marahiel, M.A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71: 413-451.
- Mora, N., y García, A. (2007). Supervivencia de a diferentes temperaturas. Tesis. Lcdo. En química de alimentos. UAEH. Pachuca, MEX. p 61.
- Moreno, A., Carda, V., Reyes, J., Vásquez J., y Cano, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68-83.
- Muñoz, G., Domínguez, M., Hernández., y González, G. (2010). Biodiversidad bacteriana antártica un desafío actual. *Boletín Antártico Chileno*, 29(2).
- Niklitschek, M. (2008). Evaluación del rendimiento del trigo (*Triticum aestivum*), inoculado con bacterias solubilizadoras de fosfato y una cepa fijadora de nitrógeno, aisladas de la rizosfera de especies en bacterias. (Tesis de pregrado). Universidad central de Chile. Valdivia-Chile
- Oliva, M., Rincón, R., Zenteno, E., Pinto, A., y Gutiérrez, F. (2008). Rol del vermicompost frente al estrés por cloruro de sodio en el crecimiento y fotosíntesis en plántulas de tamarindo (*Tamarindus india* L.). *Gayana Bótanica*. 65(1); 10-17.
- Oliveros, A. (2009). Exudados de la Raíz y su Relevancia Actual en las Interacciones Alelopáticas. *Revista Química Nova*, Vol. 32, No. 1, 198-213.

- OPS (Organización Panamericana de Salud). (2016). Peligros biológicos. Recuperado de: HYPERLINK <https://www.paho.org/>
- Patten, C., & Glick, B. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microb* 68: 3795-3801.
- Pazmiño, E. (2016). Las bacterias que actúan como fitoestimuladores. Recuperado de: http://www.canna.es/reguladores_del_crecimiento_vegetal
- Patiño, O. (2010). Solubilización de fosfatos por poblaciones bacterianas aisladas de un suelo del Valle del Cauca. Estudio de Biodiversidad y Eficiencia. Tesis en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia.
- Panhwar, Q., Othman, R., Rahman, Z. A., Meon, S., y Ismail, M. (2012). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from aerobic rice. *African Journal of Biotechnology*, 11, 2711-2727
- Peña, J. 2011. Evaluación de la producción de chilote en el cultivo de maíz (*Zea mays*, L) variedad HS-5G utilizando sustratos mejorados y determinación de los coeficientes "Kc" y "Ky", bajo riego. Tesis. Ingeniería Agrícola. UNA. Managua. NI. p 15.
- Pérez, A., Tuberquia, A., y Amell, D. (2014). Actividad in vitro de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos. *Agron. Mesoam.* 25(2), 213-223.
- Pérez, I., Meriño, L., Abalos, A., y Perez, R. (2016). Características promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Cuabana Quím*, 29(1), 73-88.
- Puente, A., y Bashan, E. (2017). Los fertilizantes biológicos en la agricultura. *INVERNUS*, 10(1), 10-17.
- Plan Estratégico de Biodiversidad. (2017). Lineamientos sobre el derecho de seguridad, biodiversidad. (En línea). Consultado el 23 de May. 2019. Formato PDF.
- Ratón, T., Portuondo, I., Salas, D., Ramos, N., y Giro, Z. (2005). Aislamiento de cepas del género *Bacillus* sp. con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal. *Revista Cubana de Química*, 17(1), 189-195.
- Ramírez, M., Roveda, G., Bonilla, R., Cabra, L., Peñaranda, A., López, M y Díaz, C. A. (2008). Uso y manejo de biofertilizantes en el cultivo de la uchuva (No. Doc. 22362) CO-BAC, Bogotá).
- Ramos, D., y Terry, E. (2014). Generalidades de los abonos orgánicos: Importancia del Bocashi como alternativa nutricional para suelos y plantas. *Cultivos tropicales*, 35(4), 52-59.

- Ramírez, C., Leal, C., Galvez, Y., y Burbano, E. (2014). *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *Nova*, 12(22), 165-177.
- Retamales, J. (2010). Biodiversidad y georrificación en las aguas. *Boletín Antártico Chileno*, 29(2), 65-70.
- Rives, N., Acevo, Y., y Hernández, A. (2007). Bacterias de crecimiento vegetal. *Revista cultivos tropicales*, 28(2), 28-38.
- Rodríguez, P. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. Recuperado de: medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf
- Rodas Junco, B. A., Quero Bautista, M., Magaña Sevilla, H. F., y Reyes Ramírez, A. (2009). Selección de cepas nativas con actividad Quitino-Proteolítica de *Bacillus* sp. aisladas de suelos tropicales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 107-113.
- Rubio G. (2002). Conectando el fósforo del suelo con la planta. *Informaciones agronómicas del cono sur* 16: 19:23.
- Sánchez, M., y Hernández, S. (2017). Alternativas de manejo de la fertilidad del suelo en ecosistemas. *Pastos y Forrajes*, 34(4), 375-392. Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v34n4/pyf01411.pdf>
- Sánchez, A., y Pérez, I. (2018). Caracterización y evaluación de pgprs sobre el crecimiento. *Agronomía Costarricense*, 42(2), 75-91.
- Scattareggia, P. (2016). Aislamiento y selección de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo de un suelo cultivado con tomate para industria (*Solanum lycopersicum* L.). Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Cuyo Almirante Brown 500, Chacras de Coria.
- Tortora, J., Funke, B., Case, L. (2007). *Introducción a la microbiología*. s.l., Ed. Médica Panamericana.
- Tejera, B., Rojas, M., y Heydrich, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138.
- Vangronsveld, D., Sanfuentes, L., y Rodríguez, D. (2012). Promoción de crecimiento en trigo (*Triticum turgidum* L. subsp. durum) por la co-inoculación de cepas nativas de *Bacillus* aisladas del Valle del Yaqui, México. *Revista Scielo*. 12(24), 4-23.
- Violeta, C., Sanfuentes, A., y Rodríguez, F. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento. *Revista Argentina*, 46(4), 338-347.
- Villarreal, M., Villa, E., Cira, L., Estrada, M., Parra, F., y Santos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130.

ANEXOS

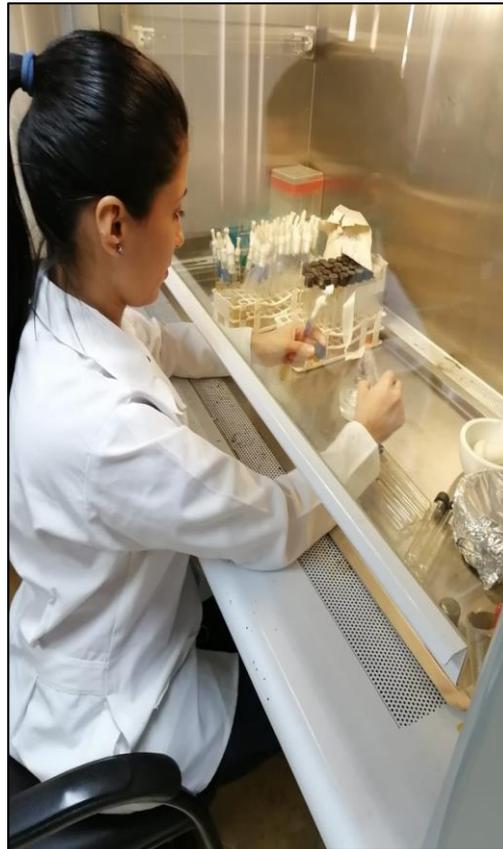
Anexo 1

Foto 1. Preparación caldo nutriente. **Foto 2.** Inoculación de cepas en caldo nutriente.

Anexo 2

Foto 3. Tinción de Gram.

Anexo 3



Foto 4. Prueba de catalasa. **Foto 5.** Presencia de burbujas como indicador positivo para prueba de catalasa.

Anexo 4

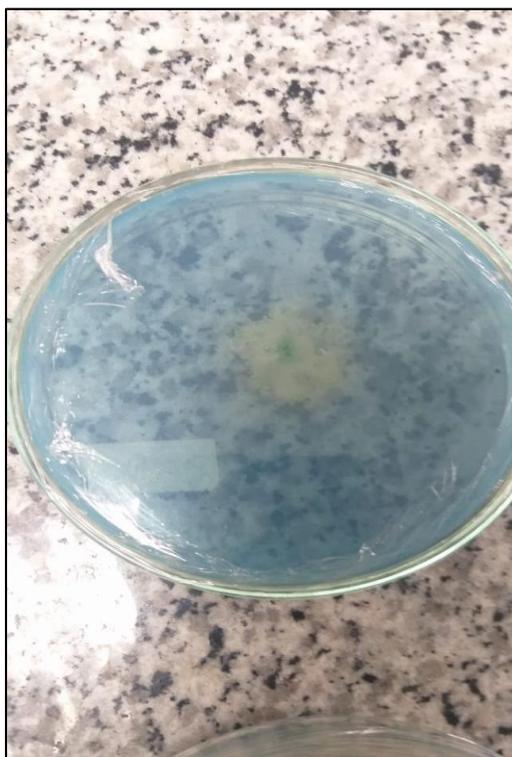
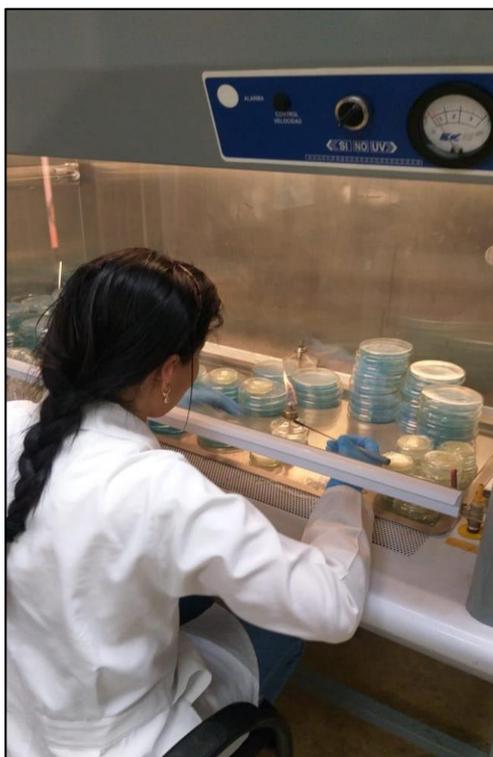
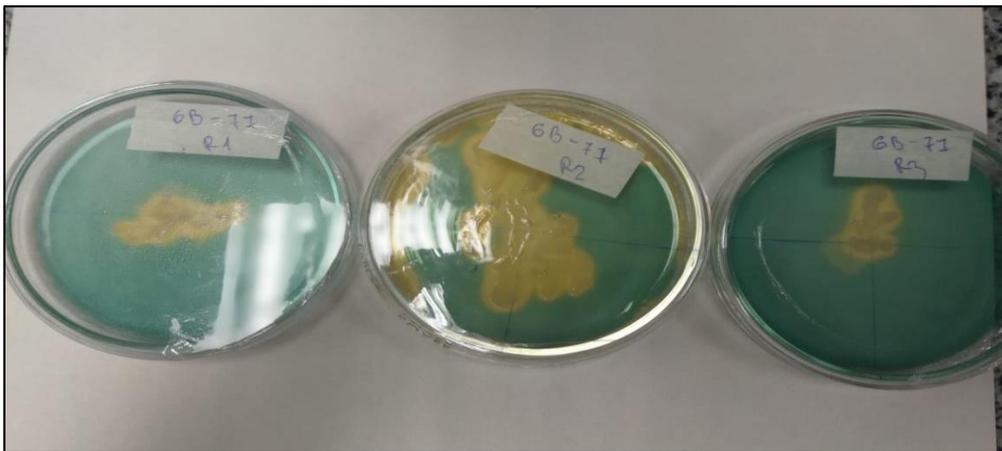
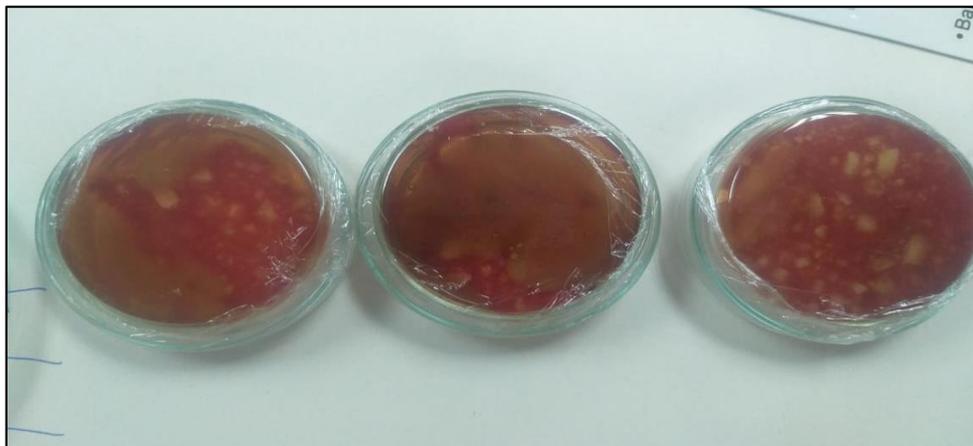
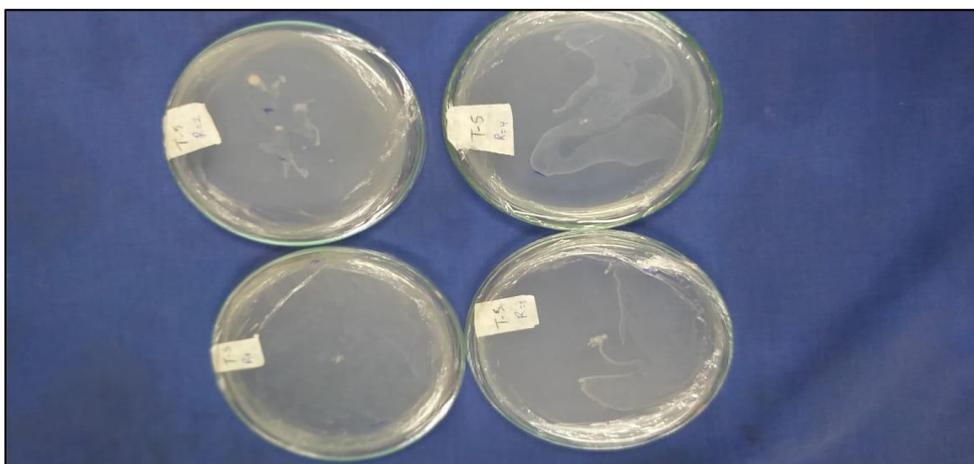


Foto 6. Solubilización de fosfato. **Foto 7.** Presencia de halos en cepas de *Bacillus* sp.

Anexo 5**Foto 8.** Producción de sideróforo.**Anexo 6****Foto 9.** Hemolisis en cepas de *Bacillus* sp.**Anexo 7****Foto 10.** Crecimiento de cepas de *Bacillus* sp en condiciones sin fuente de nitrógeno.

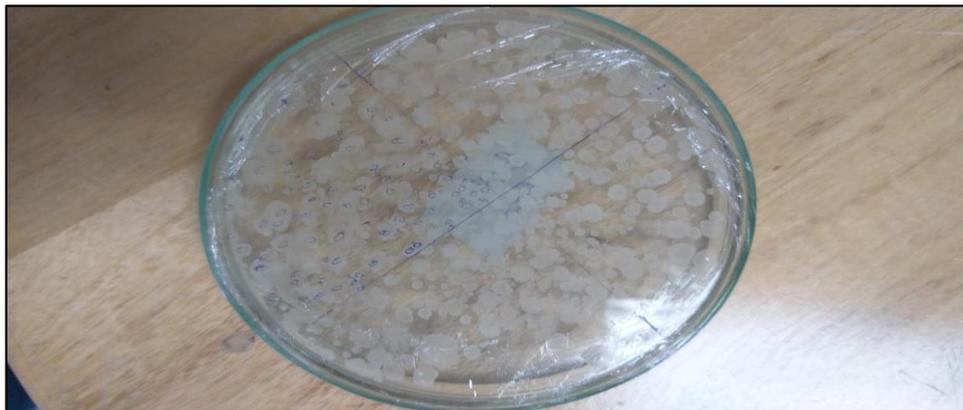
Anexo 8

Foto 11. Conteo de las Unidades formadoras de colonias (UFC) para pruebas de temperatura, pH y cloruro de sodio.

Anexo 9

Foto 12. Cepas de *Bacillus* sp en caldo nutriente.

Anexo 10. Fase de campo

Foto 13 y 14. Crecimiento del maíz inoculado



Foto 15. Desarrollo de plántulas de maíz.



Foto 16 y 17. Plántulas de maíz a nivel de laboratorio.