

## CARACTERIZACIÓN DE RIZOBACTERIAS AISLADAS DE TOMATE Y SU EFECTO EN EL CRECIMIENTO DE TOMATE Y PIMIENTO

## CHARACTERIZATION OF RHIZOBACTERIA ISOLATED FROM TOMATO AND THEIR EFFECT ON TOMATO AND BELL PEPPER GROWTH

Laura Luna Martínez, Ramón A. Martínez Peniche, Montserrat Hernández Iturriaga, Sofía M. Arvizu Medrano y Juan R. Pacheco Aguilar\*

Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Universitario s/n, Colonia las Campanas, 76010. Querétaro, Qro. Tel. 01 (442) 192-1200 Ext. 5531; Fax 01 (442) 192-1304.

\*Autor para correspondencia (ramiro.pacheco@uaq.mx)

### RESUMEN

El empleo de biofertilizantes con base en rizobacterias promotoras del crecimiento, constituye una alternativa biotecnológica para mejorar la producción de especies de interés hortícola. En el presente trabajo se identificaron mediante análisis del gen *16S* rRNA, cuatro rizobacterias previamente aisladas de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), las que fueron caracterizadas por sus propiedades bioquímicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal y evaluadas por su efecto en la germinación y crecimiento de plántulas de tomate y pimiento (*Capsicum annuum* L.). Las cuatro cepas, denominadas MA04, MA06, MA12 y MA17, pertenecen al género *Bacillus*, producen ácido indolacético (0.9 a 2.3 mg L<sup>-1</sup>), solubilizan fósforo tricálcico (18.5 a 34.7 mg L<sup>-1</sup>) y poseen actividad ACC deaminasa. Además, MA04, MA06 y MA12 fueron capaces de crecer en ausencia de nitrógeno (potenciales fijadoras de nitrógeno atmosférico). Al evaluar el efecto de la inoculación de estas rizobacterias en semillas de tomate se encontró que MA04 y MA17 aumentaron el porcentaje de germinación en 5 y 6 % respectivamente, mientras que las cepas MA06 y MA12 incrementaron el peso de las plántulas en 17 y 20 % respectivamente. En semillas de pimiento, la cepa MA06 incrementó el porcentaje de germinación en 7 %, y MA12 y MA17 incrementaron la biomasa en 37 y 16 %, respectivamente. La cepa MA12 fue más versátil para promover el crecimiento de plántulas de tomate y pimiento, y podría recomendarse para la formulación de biofertilizantes destinados al tratamiento de tales cultivos.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, *Lycopersicon esculentum*, actividad ACC deaminasa, ácido indolacético, fijación biológica de nitrógeno, sideróforos, solubilización de fosfatos.

### SUMMARY

The use of microbial bio-fertilizers based on plant-growth-promoting rhizobacteria is a biotechnological alternative to improve production of horticultural crops seedlings. In this study, four bacterial strains previously isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) rhizosphere were identified by using *16S* rRNA gene sequence analysis and characterized according to their biochemical properties as plant growth promoters, and their effect on seed germination and seedling growth of tomato and bell pepper (*Capsicum annuum* L.) was also evaluated. The four strains isolated, named MA04, MA06, MA12 and MA17 and belonging to genus *Bacillus*, were able to produce indole acetic acid (0.9 to 2.3 mg L<sup>-1</sup>), to solubilize tricalcium phosphate (18.5 to 34.7 mg L<sup>-1</sup>), and possess ACC deaminase activity. Furthermore, MA04, MA06 and MA12 can grow in nitrogen free culture medium (with potential atmospheric nitrogen fixing ability). As far as their effect on tomato seeds, MA04 and MA17 improved germination by 5 and 6 % respectively, while MA06 and MA12 strains increased seedling weight by 17 and 20 %, respectively. On pepper seeds, only MA06 increased germination by 7 %, whereas MA12 and MA17 strains increased biomass by 37 and 16 % respectively. The MA12 strain proved to be the

most efficient for improving seedling growth of tomato and bell pepper and could be proposed to produce biofertilizers for both plant species.

**Index words:** *Capsicum annuum*, *Lycopersicon esculentum*, ACC deaminase activity, indole acetic acid, biological nitrogen fixation, siderophores, phosphate solubilization.

### INTRODUCCIÓN

La fertilidad de un suelo está basada en su capacidad para suministrar los nutrientes necesarios para el desarrollo de las plantas; en ello juega un papel importante la comunidad microbiana que participa activamente en la captación de nutrientes y en la mineralización de la materia orgánica. Numerosos reportes han descrito la asociación benéfica entre plantas y microorganismos en la que bacterias y hongos aplicados a la semilla, al suelo o a la planta, colonizan la raíz, la rizosfera o ambos, y promueven el crecimiento de las plantas e incrementan la absorción y disponibilidad de nutrientes del suelo. Estos microorganismos son conocidos como promotores del crecimiento vegetal (Kloepper y Schroth, 1978) y pueden ser empleados como biofertilizantes en cultivos (Vessey, 2003).

Entre los mecanismos bioquímicos descritos en los microorganismos promotores del crecimiento de plantas se encuentra la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBN), que es llevada a cabo por rizobacterias simbióticas como *Rhizobium* sp. u otras de vida libre como *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp. que han sido empleadas extensivamente como biofertilizantes para mejorar la disponibilidad de nitrógeno en hortalizas como tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Santillana *et al.*, 2005), cebolla (*Allium cepa* L.) (Balemi *et al.*, 2007) y maíz (*Zea mays* L.) (Biari *et al.*, 2008). Peña y Reyes (2007) reportaron que ciertas cepas de *Rhizobium* inoculadas en plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) aumentaron su crecimiento debido a la producción de ácido indolacético (AIA), hormona vegetal que promueve el desarrollo radical o vegetativo (García *et al.*, 2010) y la producción de frutos (Gravel *et al.*, 2007).

Otra de las propiedades de tales microorganismos se relaciona con la capacidad de aumentar la disponibilidad de nutrientes en el suelo, como el fósforo, mediante la producción de ácidos orgánicos capaces de solubilizar los fosfatos que forman complejos insolubles con las bases del suelo (Goldstein, 2007). Según Datta *et al.* (2011), la inoculación de plantas de chile (*Capsicum annum* L.) con cepas de *Bacillus* sp. productoras de AIA y solubilizadoras de fosfatos, aumentó el peso y el número de frutos. Los ácidos orgánicos producidos por las bacterias promotoras del crecimiento incrementan también la disponibilidad de micronutrientes como el hierro (Fe) en la zona de la rizosfera. El hierro a su vez puede ser captado por sideróforos, moléculas orgánicas secretadas por estas bacterias, con las que forman quelatos que pueden ser asimilados por las plantas (Crowley, 2006).

Las bacterias productoras de sideróforos y AIA frecuentemente poseen la enzima aminociclopropano carboxilato (ACC) deaminasa (E.C.4.1.99.4), la cual degrada al ACC, precursor del etileno (Glick *et al.*, 2007). Etileno es una hormona vegetal producida bajo estrés, que en altas concentraciones inhibe el crecimiento vegetal. Se ha reportado que la reducción en los niveles de etileno por acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento, podría resultar en un mayor desarrollo de las plantas inoculadas (Husen *et al.*, 2011).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal tienen un gran potencial en la agricultura moderna, porque en la actualidad el cultivo de la mayoría de las hortalizas como tomate y pimiento requiere de la producción de plántulas vigorosas, factor importante para la producción del fruto. El presente trabajo tuvo por objetivo identificar bacterias aisladas de la rizosfera del tomate, caracterizarlas en función de sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal, y evaluar su efecto por inoculación en el desarrollo de plántulas de tomate y pimiento crecidas en condiciones de cultivo controladas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamientos bacterianos

Las cepas empleadas en el presente trabajo, designadas como MA04, MA06, MA12 y MA17, pertenecen a una colección de rizobacterias aisladas de plantas de tomate cultivado en el Rancho "Sta María de Guadalupe" en Tequisquiapan, Querétaro, México. Fueron aisladas mediante el método de dilución y siembra en placas con agar nutritivo. Tales cepas fueron seleccionadas por encontrarse dentro de las poblaciones bacterianas cultivables más abundantes ( $9.8 \times 10^4$  ufc g<sup>-1</sup>), y por tener la capacidad para solubilizar fosfatos según evaluaciones hechas mediante el ensayo propuesto por Ramachandran *et al.* (2007). Tales aislados bac-

terianos fueron sembrados en placas que contenían fosfato tricálcico insoluble como única fuente de fósforo, y en tales condiciones se encontró crecimiento de la cepa y formación de un halo. El método de coloración de Gram positivo y la formación de esporas fue otra característica considerada para su selección, en el que la tinción de endosporas se hizo con la técnica modificada de Schaeffer-Fulton (Mormak y Casida, 1985). Estas últimas características podrían asegurar su supervivencia en el suelo después de ser inoculadas. Las cepas fueron cultivadas en caldo nutritivo y conservadas en glicerol al 20 %, a -20 °C.

### Identificación molecular

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen que codifica para la subunidad 16S del ARNr, en las condiciones y con los oligonucleótidos universales para bacterias fD1 y rD1 propuestos por Weisburg *et al.* (1991). El producto de amplificación (1600 pb) fue secuenciado completamente y comparado con el banco de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante el programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), para buscar homología con secuencias de bacterias antes reportadas.

### Actividad de ACC deaminasa

Las cepas se sembraron por estría en placas con medio mínimo Dworkin y Foster (DF) (Penrose y Glick, 2003), el cual contenía 0.3 g L<sup>-1</sup> de 1-aminociclopropano 1-carboxilato (ACC) como única fuente de nitrógeno. Las placas se incubaron por 3 d a 30 °C, después de lo cual se registró como positivo para la actividad ACC deaminasa, aquellas placas en las cuales se observó crecimiento bacteriano (Sgroy *et al.*, 2009).

### Fijación biológica de nitrógeno

Para determinar la probable fijación biológica de nitrógeno (FBN), las cepas fueron sembradas por punción y por triplicado en medio semisólido FBN (Naher *et al.*, 2009) libre de nitrógeno. Este medio indica la capacidad de los microorganismos inoculados para crecer en ausencia de nitrógeno mineral y en presencia de ácido málico como única fuente de carbono. En el caso de bacterias microaerófilas como *Azospirillum* sp., la fijación de nitrógeno ocurre mediante la formación de una película sub-superficial después de dos semanas de incubación a 30 °C (Döbereiner, 1995).

### Producción de sideróforos

Las cepas se inocularon por triplicado en tubos que contenían medio líquido con ácido succínico, fructosa y triptófano (SFS) (composición en g L<sup>-1</sup>: 6.0 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,

3.0 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 NH<sub>4</sub>Cl, 0.5 NaCl, 2.0 glucosa, 1.0 ácido succínico, 5.0 fructosa, y 1.0 triptófano); al final el pH se ajustó a 7.2. Las cepas así sembradas se incubaron a 30 °C por 120 h en agitación constante a 180 rpm. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados a 8000 Xg durante 10 min; el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0.22 µm de diámetro de poro (Millipore), y luego 1 mL del filtrado se mezcló con 1 mL del reactivo cromo azurol-S (CAS) modificado (Alexander y Zuberer, 1991), y la mezcla se dejó reaccionar durante 30 min. El cambio en el color del reactivo CAS, de azul a naranja, fue registrado como positivo para la producción de sideróforos.

### Producción de ácido indol-3-acético (AIA) e indoles

Las cepas se inocularon por triplicado en 25 mL de caldo nutritivo suplementado con triptófano (1 g L<sup>-1</sup>), y los cultivos se incubaron a 30 °C por 72 h en agitación constante a 180 rpm. Después se obtuvo el sobrenadante por centrifugación a 8000 Xg por 10 min. El AIA contenido en esta fracción fue extraído tres veces con 9 mL de acetato de etilo, el cual fue evaporado y el AIA fue resuspendido en 4 mL de metanol. Para la determinación de AIA se mezcló 1 mL de la solución metanólica-AIA con 2 mL del reactivo de Salkowski, y la mezcla se dejó reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente; después se cuantificó el complejo colorido a 530 nm en un espectrofotómetro (Spectronic unicam®, Helios). Para determinar la concentración se elaboró una curva estándar de 3.6 a 25.2 mg L<sup>-1</sup> de AIA, cuyo control negativo fue el mismo medio de cultivo sin inocular (Thakuria *et al.*, 2004).

### Solubilización de fosfatos de calcio

Las cepas se cultivaron por triplicado en 25 mL de medio Pikovskaya (Nautiyal, 1999), el cual contiene fosfato tricálcico Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> insoluble como única fuente de fósforo, y se incubaron a 30 °C por 120 h en agitación constante a 180 rpm. Al término, los cultivos fueron centrifugados a 8000 Xg por 10 min. Para cuantificar el fósforo soluble (P-PO<sub>4</sub>) en el sobrenadante, se empleó el método de azul de molibdeno (Ben *et al.*, 2009), y la lectura del complejo formado se hizo en el espectrofotómetro a 882 nm. Para la cuantificación se elaboró una curva estándar de 0.13 a 0.67 mg L<sup>-1</sup> de P-PO<sub>4</sub>.

### Ensayo de inoculación en plántulas

Para evaluar el efecto de la inoculación sobre la germinación y desarrollo de plántulas, las cepas fueron cultivadas en 500 mL de caldo nutritivo en agitación constante a 180 rpm por 16 h a 30 °C. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 8000 Xg por 10 min para obtener las células, que fueron lavadas dos veces con solución salina estéril a 0.8 % y disueltas en 2 mL de solución salina para su recuento en

cámara de Neubauer (Márquez *et al.*, 2003). La concentración celular se ajustó a 10<sup>7</sup> células mL<sup>-1</sup>.

Para cada cepa, 150 semillas del tomate cv. 'Río Grande' y 150 semillas del pimiento morrón cv. 'California Wonder' fueron inoculadas por inmersión en 10 mL de la suspensión bacteriana, y puestas en agitación a 140 rpm por 1 h. Como testigo se emplearon semillas sin inocular inmersas en solución salina. Después, las semillas fueron sembradas en bandejas de germinación de 200 cavidades llenadas con turba humedecida a capacidad de campo.

Diez días después de la siembra (dds) se registró el porcentaje de germinación para las semillas de tomate, mientras que para el pimiento éste se registró 15 dds. Después, las plántulas fueron llevadas a condiciones de invernáculo (Abril de 2011 con 12 h de luz diurna y una temperatura promedio de 28 °C) donde fueron fertilizadas diariamente con una solución nutritiva con la siguiente composición (g L<sup>-1</sup>): 0.75 KNO<sub>3</sub>, 0.175 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.675 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.3 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 0.05 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Las plántulas de tomate se cultivaron por 30 d y las de pimiento por 60 d; al término de cada periodo, en cada plántula se midió altura, diámetro, peso fresco y seco del vástago y raíz, como variables de crecimiento.

### Análisis de datos

El diseño experimental fue completamente aleatorio y consistió de cinco tratamientos y seis repeticiones. Los tratamientos correspondieron a la inoculación de cada una de las cuatro cepas, más un testigo sin inocular. La unidad experimental estuvo constituida por 25 plantas, de las cuales diez constituyeron la parcela útil. Los datos obtenidos fueron sujetos a análisis de varianza y prueba de medias de Tukey (P ≤ 0.05) (Castaño y Domínguez, 2010).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación del género bacteriano

La comparación de las secuencias obtenidas del gen 16S ARNr de las cuatro cepas aisladas contra la base de datos del NCBI, indicó que todas ellas pertenecen al género *Bacillus*; una cepa presentó un alto porcentaje de similitud con especies de *B. subtilis* y dos cepas con *B. megaterium*. La afiliación genética de las cepas se muestra en el Cuadro 1. Diversas cepas de *Bacillus* han sido reconocidas por su capacidad para mejorar la disponibilidad de nutrientes en diferentes cultivos agrícolas y forestales (Gül *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010; Umashankar *et al.*, 2012). Además, su habilidad para colonizar la rizosfera y tolerar condiciones ambientales extremas son características consideradas para la producción comercial de biofertilizantes (Saharan y

Nehra, 2011). Estudios de diversidad microbiana identifican a *B. subtilis* y *B. megaterium* dentro de las poblaciones cultivables de suelos agrícolas, cuya abundancia oscila entre  $10^3$  a  $10^6$  ufc  $g^{-1}$  de suelo (Kumar *et al.*, 2011).

**Cuadro 1. Afiliación genética de las cepas de estudio según el análisis comparativo del gen 16S ARNr**

Cepa	Organismo reportado	Similitud (%)
MA04	<i>Bacillus</i> sp. 9B_1	98
MA06	<i>Bacillus megaterium</i> Jz11	98
MA12	<i>Bacillus subtilis</i> AU55	99
MA17	<i>Bacillus megaterium</i> EJH-7	99

### Características bioquímicas en la promoción del crecimiento vegetal

Diversas propiedades bioquímicas típicas de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se identificaron en las cepas aquí estudiadas. Se detectó la presencia de la actividad ACC deaminasa en todas las cepas evaluadas (Cuadro 2). Según Saleem *et al.* (2007), las plantas inoculadas con bacterias que presentan esta actividad toleran ciertos niveles de estrés provocados por sequía, anegación, salinidad y presencia de metales pesados, debido a que la enzima ACC deaminasa disminuye la síntesis de altas concentraciones de etileno, y así reduce el estrés de manera transitoria.

La capacidad de las bacterias para crecer en medio carente de nitrógeno (presumiblemente por fijación biológica de nitrógeno) fue registrada en tres de las cuatro cepas estudiadas. Esta actividad se ha estudiado ampliamente en el género *Bacillus*. En tal sentido, Kifle y Laing (2011) reportaron que la inoculación de cepas de *Bacillus* en lechuga incrementó el contenido de nitrógeno en las plantas.

La producción de sideróforos sólo fue comprobada en las cepas MA06 y MA17. La secreción de estas moléculas por bacterias promotoras del crecimiento vegetal ejercería un efecto de biocontrol, al disminuir la biodisponibilidad de Fe para los microorganismos patógenos de la rizosfera y reducir su colonización (Crowley, 2006), y además modificar el estado nutricional en este elemento en las plantas colonizadas (Loper y Buyer, 1991; Bar *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2009).

La producción de AIA e indoles por las cepas aisladas fue del orden de 2.3 a 6.8  $mg L^{-1}$ . Valores similares fueron previamente reportados por Wahyudi *et al.* (2011), quienes caracterizaron seis aislados rizosféricos del género *Bacillus*, por su capacidad para promover el crecimiento de plántulas de soya (*Glycine max* Merr.); tales microorganismos producían AIA en concentraciones desde 3.02 hasta 5.45  $mg L^{-1}$ .

En el ensayo de solubilización de fosfatos las cepas con mayor capacidad fueron MA06 y MA17, en cuyos medios de cultivo se detectó 56.0 y 34.8  $mg L^{-1}$  de fósforo soluble ( $P-PO_4$ ) respectivamente. Dicha capacidad es comparable a la obtenida por otras bacterias rizosféricas aisladas de maíz por Alam *et al.* (2002) y de arroz (*Oryza sativa* L.) por Thakuria *et al.* (2004).

### Efecto de los inoculantes sobre la germinación y crecimiento de plántulas

Los resultados obtenidos por la inoculación de semillas de tomate mostraron que las cepas MA04 y MA17 aumentaron la germinación en 5.0 y 6.0 %, respectivamente (Cuadro 3). La germinación depende de la viabilidad del embrión y de la ruptura del letargo generado por las condiciones ambientales, en el caso del tipo de semillas con tales características. En este último caso es en el que pueden incidir las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, pues

**Cuadro 2. Propiedades bioquímicas y fisiológicas bacterianas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal.**

Ensayo	Aislado			
	MA04	MA06	MA12	MA17
Actividad ACC deaminasa	+ <sup>§</sup>	+	+	+
Crecimiento en medio FBN	+	+	+	-
Producción de sideróforos	-	+	-	+
Producción de AIA e indoles	2.3 ( $\pm$ 0.1) b <sup>†</sup>	4.2 ( $\pm$ 0.4) ab	6.8 ( $\pm$ 2.0) a	6.60 ( $\pm$ 1.7) a
Solubilización de fosfatos	22.0 ( $\pm$ 1.8) c <sup>††</sup>	56.0 ( $\pm$ 2.0) a	18.5 ( $\pm$ 0.7) c	34.8 ( $\pm$ 1.7) b

<sup>†</sup> Valores de la producción de AIA y de solubilización de fosfatos, en promedio de tres repeticiones y en  $mg L^{-1}$ ;  $\pm$  = desviación estándar.

<sup>††</sup> Medias con letras iguales dentro de cada hilera no son estadísticamente diferentes (Tukey,0.05); <sup>§</sup>+ = actividad o crecimiento; - = sin actividad o crecimiento; FBN = fijación biológica de nitrógeno.

se ha reportado que la reducción en los niveles de etileno por efecto de la actividad ACC deaminasa en la semilla, aumentaría su germinación, junto con la producción de AIA que estimularía la división celular, para así favorecer el inicio del crecimiento del embrión (Jalili *et al.*, 2009). En semillas de tomate, Lagunas *et al.* (2001) reportaron que la inoculación con *Bacillus firmus* aumentó su germinación en 6.0 %, efecto de magnitud similar al encontrado en este ensayo.

En cuanto al crecimiento de las plántulas, se encontró que a los 30 d de haberse iniciado el ensayo, cada una de las cepas había tenido un efecto positivo en al menos una de las variables evaluadas. Las cepas MA06 y MA12 aumentaron de manera significativa ( $P \leq 0.05$ ) el diámetro del tallo y el peso fresco y seco del vástago, lo que se reflejó en aumentos de biomasa de 17.0 y 20.0 % en tallo y vástago, respectivamente. La cepa MA17 solo mejoró ( $P \leq 0.05$ ) el peso seco del vástago y la biomasa en 12.0 %. Pero ninguna cepa tuvo efecto significativo en el peso de la raíz (Cuadro 4).

Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores que inocularon plántulas de tomate con diferentes

cepas de *Bacillus* (Lagunas *et al.*, 2001), *Rhizobium* (Santillana *et al.*, 2005) y *Ralstonia* (Baston *et al.*, 2008). En tales experimentos se mejoró de manera significativa el peso seco del vástago, pero también en el peso seco de la raíz. En nuestro estudio, la altura de las plántulas se incrementó en 14.0 % sólo con la inoculación de la cepa MA06. Para esta misma variable, Ribaudó *et al.* (2006) encontraron efectos similares en plántulas de tomate inoculadas con una cepa de *Azospirillum brasilense*, al registrar un incremento de 20 %.

En las semillas de pimiento se encontró que la inoculación con la cepa MA06 mejoró su germinación en 7.0 % (Cuadro 4), porcentaje similar al obtenido por Reyes *et al.* (2008) quienes mediante inoculación con cepas de los géneros *Azospirillum* y *Rhizobium*, mejoraron la germinación de la especie en 5.0 y 11.0 %, respectivamente.

En el crecimiento de las plántulas de pimiento, la cepa MA12 indujo incrementos en todas las variables consideradas, que se reflejaron en un aumento de 37.0 % en la biomasa de la planta. En cambio, la cepa MA17 mejoró solamente el peso fresco del vástago de modo que la biomasa aumentó en 16.0 %. Existen pocos trabajos sobre la aplicación de

**Cuadro 3. Efecto de la inoculación de las cepas de estudio sobre la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de tomate.**

Tratamiento	Germinación (%) <sup>†</sup>	Altura (cm)	DT (mm)	PFV (g)	PSV (mg)	PFR (mg)	PSR (mg)
MA04	96.18 a <sup>††</sup>	10.66 b	3.54 ab	2.24 b	175 b	796 a	50.6 a
MA06	93.75 ab	12.21 a	3.62 a	2.54 a	205 a	937 a	57.3 a
MA12	95.67 ab	11.14 b	3.72 a	2.56 a	208 a	967 a	59.8 a
MA17	97.27 a	10.68 b	3.56 ab	2.45 ab	196 a	876 a	54.3 a
TESTIGO	91.17 b	10.74 b	3.40 b	2.24 b	174 b	796 a	49.6 a
DMS <sub>0.05</sub>	5.62	0.7	0.21	0.27	20	177	13.7
CV (%)	4.32	3.74	3.49	6.81	6.26	11.97	14.9

DT = diámetro de tallo; PFV = peso fresco del vástago; PSV = peso seco del vástago; PFR = peso fresco de la raíz; PSR = peso seco de la raíz. DMS = diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05); CV = coeficiente de variación. <sup>†</sup>Previo al análisis estadístico, los porcentajes de germinación fueron transformados a grados angulares. <sup>††</sup>Medias (n = 6) con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

**Cuadro 4. Efecto de la inoculación de las cepas de estudio sobre la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de pimiento.**

Tratamiento	Germinación (%) <sup>†</sup>	Altura (cm)	DT (mm)	PFV (g)	PSV (mg)	PFR (mg)	PSR (mg)
MA04	95.67 ab <sup>††</sup>	11.51 b	3.14 c	2.56 b	281 c	949 b	88.4 b
MA06	96.83 a	12.18 b	3.28 bc	2.73 b	299 bc	1003 b	93.2 b
MA12	93.82 ab	13.43 a	3.79 a	3.40 a	387 a	1449 a	124.6 a
MA17	91.59 ab	12.76 ab	3.44 b	3.09 a	335 b	1120 b	99.3 b
TESTIGO	89.02 b	11.07 b	3.3 bc	2.58 b	282 c	994 b	92.4 b
DMS <sub>0.05</sub>	8.8	1.15	0.22	0.33	47	242	24.4
CV (%)	6.87	5.58	3.81	6.85	8.67	12.94	14.45

DT = diámetro de tallo; PFV = peso fresco del vástago; PSV = peso seco del vástago; PFR = peso fresco de la raíz; PSR = peso seco de la raíz. DMS = diferencia mínima significativa (Tukey, 0.05); CV = coeficiente de variación. <sup>†</sup>Previo al análisis estadístico, los porcentajes de germinación fueron transformados a grados angulares. <sup>††</sup>Medias (n = 6) con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

bacterias promotoras del crecimiento en pimiento. Reyes *et al.* (2008) inocularon pimiento con cepas de *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Rhizobium* y en tres meses lograron un aumento de 100 % en el peso seco del vástago, lo cual no es comparable con el ensayo aquí reportado que duró solo dos meses.

Varios autores coinciden que el AIA producido por las cepas inoculadas es el principal metabolito que induce el crecimiento de las plantas, al aumentar la división celular y la diferenciación de los tejidos, efectos que se ven reflejados en un mayor contenido de biomasa (Lagunas *et al.*, 2001; Santillana *et al.*, 2005). Esto fue corroborado por Ribaud *et al.* (2006), quienes encontraron un mayor contenido de AIA en los tejidos de plantas inoculadas con *Azospirillum* sp. con respecto a las plantas no inoculadas.

El AIA absorbido por las semillas y las raíces de las plantas también podría estimular la actividad de la enzima ACC sintetasa, la cual está involucrada en la síntesis del etileno. Se ha encontrado que bajas concentraciones de etileno promueven el crecimiento de los pelos radicales de las plantas inoculadas, y así aumentan el área superficial de la raíz para una mayor absorción de nutrientes. Las bacterias promotoras del crecimiento evitan las altas concentraciones de etileno, las cuales tienen efectos inhibitorios en el desarrollo de las plantas. La concentración de etileno en plantas inoculadas puede ser el resultado del balance entre la síntesis estimulada por los altos niveles de AIA y la actividad ACC deaminasa (Ribaud *et al.*, 2006; Saleem *et al.*, 2007).

Los resultados aquí obtenidos demuestran también que el efecto promotor del crecimiento de algunas cepas varía con el tipo de hospedante, debido probablemente a la competencia por la colonización de la rizosfera y a la quimioatracción que ejercen los distintos exudados radicales producidos por las plantas que además promoverían la interacción planta-microorganismo (Kumar *et al.*, 2011). La magnitud del efecto positivo de la cepa MA04 sobre la germinación de semillas, fue diferente en el tomate que en el pimiento. Lo mismo ocurrió con MA06 que produjo plantas más vigorosas de tomate, pero no promovió de igual manera en pimiento. Caso contrario sucedió con las cepas MA12 y MA17, las que fueron más versátiles para promover el crecimiento de plántulas tanto de tomate como de pimiento, al incidir de manera similar en sus variables de crecimiento, lo cual pudiera estar asociado con una mayor actividad ACC deaminasa (Saleem *et al.*, 2007). Además, cabe destacar que solamente la cepa MA12 tuvo un efecto positivo en el desarrollo de la raíz de las plántulas de pimiento.

La obtención y caracterización de nuevas cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal adaptadas a las condiciones ambientales de la región en estudio representa una alternativa tecnológica para su uso como biofertilizantes en la producción de cultivos de interés hortícola, como tomate y pimiento.

## CONCLUSIONES

Las cepas estudiadas pertenecen al género *Bacillus* y presentan propiedades bioquímicas y fisiológicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal. Las cepas MA04 y MA17 mejoraron la germinación de semillas de tomate, mientras que en las plántulas de esta especie las cepas MA06 y MA12 incrementaron la biomasa. En las semillas de pimiento MA06 aumentó la germinación, y en las plántulas las cepas MA12 y MA17 mejoraron la biomasa. La inoculación de la cepa MA12 fue la que presentó el mejor efecto sobre el vigor de las plántulas tanto de tomate como de pimiento. Es necesario hacer estudios posteriores de campo para determinar el efecto de estas cepas sobre la producción y calidad de frutos de tomate y pimiento.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alexander D B, D A Zuberer (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 12:39-45.
- Alam S, S Khalil, N Ayub, M Rashid (2002) *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. *Int. J. Agric. Biol.* 4:454-458.
- Balemi T, N Pal, A K Saxena (2007) Response of onion (*Allium cepa* L.) to combined application of biological and chemical nitrogenous fertilizers. *Acta Agric. Slovenica* 89:107-114.
- Bar N E, Y Hadar, Y Chen, A Shanzer, J Libman (1992) Iron uptake by plants from microbial siderophores. *Plant Physiol.* 99:1329-1335.
- Baston B P, S R Magela, P E Ampélio (2008) Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibicao *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. *Cien. Agrotecnol.* 32:731-739.
- Ben M A S, H S Elferjani, F A Haroun, F F Abdelnabi (2009) Determination of available nitrate, phosphate and sulfate in soil samples. *Int. J. PharmTech Res.* 1:598-604.
- Biari A, A Gholami, H A Rahmani (2008) Growth promotion and enhanced nutrient uptake of maize (*Zea mays* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria in arid region of Iran. *J. Biol. Sci.* 8:1015-1020.
- Castaño T E, D J Domínguez (2010) Diseño de Experimentos: Estrategias y Análisis en Ciencia y Tecnología. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. 418 p.
- Crowley D E (2006) Microbial siderophores in the plant rhizosphere. *In: Iron, Nutrition in Plants and Rhizosphere Microorganisms*. L. L Barton, J Abadia (eds). Springer. Riverside, USA. pp:169-198.
- Datta M, R Palit, C Sengupta, P M Kumar, S Banerjee (2011) Plant growth promoting rhizobacteria enhance growth and yield of chilli (*Capsicum annum* L.) under field conditions. *Aust. J. Crop Sci.* 5:531-536.
- Döbereiner J (1995) Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. *In: Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. K Alef, P Nannipieri (eds). Academic Press. London, UK. pp:134-141.

- García F, H Muñoz, C Carreño, G Mendoza (2010) Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. "arroz" en Lambayeque. Sci. Agropec. 1:107-116.
- Glick B R, Z Cheng, J Czarny, J Duan (2007) Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. Eur. J. Plant Pathol. 119:329-339.
- Goldstein A H (2007) Future trends in research on microbial phosphate solubilization: one hundred years of insolubility. In: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. E Velázquez, B C Rodriguez (eds). Springer. New York, USA. pp:91-96.
- Gravel V, H Antoun, R J Tweddell (2007) Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biol. Biochem. 39:1968-1977.
- Gül A, F Kidoglu, Y Tüzel, H Tüzel (2008) Effects of nutrition and *Bacillus amyloliquefaciens* on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) growing in perlite. Spanish J. Agric. Res. 6:422-429.
- Husen E, A T Wahyudi, A S Gianto (2011) Soybean response to 1-aminocyclopropano-1-carboxylate deaminase-producing *Pseudomonas* under field soil conditions. Amer. J. Agric. Biol. Sci. 6:273-278.
- Jalili F, K Khavazi, E Pazira, A Nejati, H A Rahmani, H R Sadaghiani, M Miransari (2009) Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. J. Plant Physiol. 166:667-674.
- Kifle M H, M D Laing (2011) Determination of optimum dose and frequency of application of free-living diazotrophs (FLD) on lettuce. African J. Agric. Res. 6:671-675.
- Kloepper J W, M N Schroth (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In Proc. of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. G Clarey (ed). Station de pathologie vegetale et phyto-bacteriologie. Angers, France. pp:879-882.
- Kumar A, A Prakash, B N Johri (2011) *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In: Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems. D K Maheshwari (ed). Springer. Heidelberg, Germany. pp:37-59.
- Lagunas L J, M E Zavaleta, K S Osada, O S Aranda, R I Luna, H H Vaquera (2001) *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Rev. Mex. Fitopat. 19:57-65.
- Loper J E, J S Buyer (1991) Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. Mol. Plant-Microbe Interact. 4:5-13.
- Martínez V O, M A Jorquera, D E Crowley, G Gajardo, M L Mora (2010) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. J. Soil Sci. Plant Nutr. 10:293-319.
- Márquez G M E, S L A Torres, H M Escobar (2003) Evaluación del efecto nematocida de cepas de *Bacillus* spp. Fitosanidad 7:55-58.
- Mormak D A, J L E Casida (1985) Study of *Bacillus subtilis* endospores in soil by use of a modified endospore stain. Appl. Environ. Microbiol. 49:1356-1360.
- Naher U A, O Radziah, Z H Shamsuddin, M S Halimi, M Razi (2009) Isolation of diazotrophs from different soils of Tanjong Karang rice growing area in Malaysia. Int. J. Agric. Biol. 11:547-552.
- Nautiyal C S (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol. Lett. 170:265-270.
- Penrose D M, B R Glick (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol. Plant. 118:10-15.
- Peña H B, I Reyes (2007) Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). Interciencia 32:560-565.
- Ramachandran K, V Srinivasan, S Hamza, M Anandaraj (2007) Phosphate solubilizing bacteria isolated from rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L.) cuttings. In: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization E. Velazquez, C. Rodriguez-Barrueco (eds). Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp:325-331.
- Reyes I, L Alvarez, H E Ayoubi, A Valery (2008) Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. Bioagro 20:37-48.
- Ribaudo C M, E M Krumpholz, F D Cassán, R Bottini, M L Cantore, J A Curá (2006) *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. J. Plant Growth Reg. 24:175-185.
- Saleem M, M Arshad, S Hussain, A S Bhatti (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 34:635-648.
- Saharan B S, V Nehra (2011) Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. Life Sci. Med. Res. 21:1-30.
- Santillana N, C Arellano, D Zúñiga (2005) Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). Ecol. Aplic. 4:47-51.
- Sgroy V, F Cassán, O Masciarelli, M F Del Papa, A Lagares, V Luna (2009) Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85:371-381.
- Thakuria D, N C Talukdar, C Goswami, S Hazarika, R C Boro, M R Khan (2004) Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. Curr. Sci. 86:978-985.
- Umashankar N, M P Venkatesha, R Krishnamurthy, H R Raveendra, K M Satish (2012) Effect of microbial inoculants on the growth of silver Oak (*Grevillea robusta*) in nursery condition. Int. J. Environ. Sci. Develop. 3:72-76.
- Vessey J K (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255:571-586.
- Wahyudi A T, R P Astuti, A Widyawati, A Meryandini, A A Nawangsih (2011) Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. J. Microbiol. Antimicrobials 3:34-40.
- Weisburg W G, S M Barns, D A Pelletier, D J Lane (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173:697-703.
- Zhang H, Y Sun, X Xie, M S Kim, S E Dowd, P W Paré (2009) A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. Plant J. 58:568-577.