







# Cepas nativas de *Bacillus* spp. como una alternativa sostenible en el rendimiento de forraje de maíz

## Native *Bacillus* spp. strains as sustainable alternative in the yield of corn forage

Martha Georgina Rodríguez-Hernández<sup>1</sup> , Miguel Ángel Gallegos-Robles<sup>1‡</sup> ,  
Lucio Rodríguez-Sifuentes<sup>2</sup> , Manuel Fortis-Hernández<sup>3</sup> ,  
J. Guadalupe Luna-Ortega<sup>4</sup>  y Uriel González-Salas<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Facultad de Agricultura y Zootecnia. Universidad Juárez del Estado de Durango. Carretera Gómez Palacio-Tlahualilo km 32, Venecia. 35000 Gómez Palacio, Durango, México.

<sup>‡</sup> Autor para correspondencia (garoma64@hotmail.com)

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Carretera Torreón-Matamoros km 7.5, ejido el Águila. 27275 Torreón, Coahuila, México.

<sup>3</sup> Instituto tecnológico de Torreón. Carretera Torreón-San Pedro km 7.5, ejido Ana. 27170 Torreón, Coahuila, México.

<sup>4</sup> Universidad Politécnica de la Región Laguna. Carretera a antiguo internado en Santa Teresa. 27942 San Pedro de las Colonias, Coahuila, México.

### RESUMEN

El uso de microorganismos promotores del crecimiento, tiene grandes beneficios, los que ayudan a disminuir el uso excesivo de fertilizantes y pesticidas usados en la producción agrícola. Los objetivos fueron aislar, caracterizar y evaluar en campo cepas del género *Bacillus* spp., en el rendimiento de maíz forrajero. El estudio fue realizado en el campo experimental de la Facultad de Agricultura y Zootecnia en la Universidad Juárez del Estado de Durango en la región de la Comarca Lagunera, ubicada en el norte de México, durante 2018. Se aislaron y se identificaron cepas de *Bacillus* spp., a partir de raíces de plantas de zacate Johnson (*Sorghum halepense*), maíz (*Zea mays*) y sorgo (*Sorghum bicolor*), preseleccionadas de acuerdo a la capacidad para fijar nitrógeno y caracterizadas por secuenciación del gen 16S rDNA. Fueron identificadas dos cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* y tres más de *Bacillus subtilis*. Posteriormente, evaluadas en campo durante los ciclos primavera-verano (P-V) y otoño-invierno (O-I) del año 2018, en dos híbridos de maíz (Galáctico y AG 614). La inoculación con la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* favoreció un buen resultado para peso fresco de la planta, peso seco, diámetro de tallo, número de elotes, peso fresco de raíz

y en longitud de la raíz; mientras que *Bacillus subtilis*, mejor en peso fresco de raíz respecto al testigo. Con referencia al área foliar y porcentaje de proteína cruda, no se observó diferencia significativa entre los tratamientos con resultados similares al tratamiento químico. Finalmente, para diámetro de raíz, el resultado más favorable se presentó con el tratamiento químico. Los mejores resultados fueron encontrados durante el ciclo P-V.

**Palabras claves:** fijación de N<sub>2</sub>, gen 16S rDNA, secuenciación.

### SUMMARY

The use of growth-promoting microorganisms has great benefits, which help to reduce the excessive use of fertilizers and pesticides used in agricultural production. The objectives were to isolate, characterize and evaluate in the field strains of the genus *Bacillus* spp., in the yield of forage corn. The study was conducted in the experimental field of the Faculty of Agriculture and Zootechnics of the Juarez University of the state of Durango in the Lagunera Region, located in northern Mexico, during 2018. *Bacillus* spp., strains were isolated and identified, from roots of Johnson

#### Cita recomendada:

Rodríguez-Hernández, M. G., M. Á. Gallegos-Robles, L. Rodríguez-Sifuentes, M. Fortis-Hernández, J. G. Luna-Ortega y U. González-Salas. 2020. Cepas nativas de *Bacillus* spp. como una alternativa sostenible en el rendimiento de forraje de maíz. Terra Latinoamericana 38: 313-321.

DOI: <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.690>

Recibido: 22 de noviembre de 2019.

Aceptado: 27 febrero de 2020.

Publicado en Terra Latinoamericana 38: 313-321.

grass (*Sorghum halepense*), corn (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*), preselected according to the ability to fix nitrogen and characterized by sequencing of the 16S rDNA gene. Two strains of *Bacillus amyloliquefaciens* and three more of *Bacillus subtilis* were identified. Subsequently evaluated in the field during the spring-summer (S-S) and autumn-winter (A-W) cycles of the year 2018, in two corn hybrids (Galactic and AG 614). Inoculation with the strain *Bacillus amyloliquefaciens* favored a good result for the fresh weight of the plant, dry weight, stem diameter, number of ears per plant, fresh root weight and length of the root; while *Bacillus subtilis*, better in fresh root weight compared to the control. Regarding the leaf area and the percentage of crude protein, a significant difference was shown between the treatments, with results similar to chemical treatment. Finally, for root diameter, the most favorable result was presented in chemical treatment. The best results were found during the S-S cycle.

**Index words:** *N<sub>2</sub> fixation, 16S rDNA gene, sequencing.*

## INTRODUCCIÓN

México, es el país con la mayor cantidad de variedades de maíz en el mundo, debido a su importancia cultural, económica y alimenticia. La planta entera es utilizada en la alimentación del ganado como forraje, en forma de esquilmo, grano y como ensilaje. En México el cultivo de maíz forrajero por riego se ha incrementado de 23 586 ha establecidas durante el periodo P-V en el año 2017, hasta 35 395 ha durante el año 2018 (SIAP, 2018).

En algunas regiones del estado de Coahuila, principalmente la región de la Comarca Lagunera, el maíz forrajero es considerado uno de los alimentos básicos para la alimentación del ganado lechero por la aportación energética que hace a las raciones alimenticias y la ventaja que puede ser utilizado en el proceso de ensilado, logrando con ello una buena calidad durante la época crítica de escasez de forraje.

Actualmente se están buscando alternativas de fertilización que sean amigables con el medio ambiente como el uso de rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal (RPCV) como inoculantes microbianos (Nehra *et al.*, 2016). Estas bacterias son una opción sustentable para favorecer la disponibilidad de nutrimentos, mejorar el crecimiento

de las plantas e incrementar el rendimiento. Entre estos microorganismos benéficos se encuentran los géneros: *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Azoarcus* spp., *Burkholderia* spp., *Rhizobium* spp., *Azotobacter* spp., *Chromobacterium* spp., *Erwinia* spp., *Azospirillum* spp., *Klebsiella* spp., *Micrococcous* spp., *Arthrobacter* spp., *Pantoea* spp., *Pseudomonas* spp., *Caulobacter* spp., *Agrobacterium* spp., y *Serratia* spp. principalmente (Ahemad *et al.*, 2014). Es a través de mecanismos directos e indirectos que las RPCV ejercen su efecto en el crecimiento vegetal (Parray *et al.*, 2016). Los principales mecanismos de acción son a través de suministrar nutrimentos a los cultivos para estimular el crecimiento plantas; por ejemplo, mediante la producción de fitohormonas, controlar o inhibir la actividad de los fitopatógenos de las plantas y la bioacumulación o lixiviación microbiana de compuestos inorgánicos (Kundan *et al.*, 2015).

Las rizobacterias del género *Bacillus* spp., son muy abundantes en la rizosfera (Saharan *et al.*, 2011), y se han utilizado como modelo de estudio para comprender algunos procesos metabólicos, como producir compuestos orgánicos, solubilizar fosfatos y realizar la fijación biológica de nitrógeno (Corrales *et al.*, 2017). Poseen una amplia diversidad genética favoreciendo su adaptación a diferentes condiciones de ambiente (Niazi *et al.*, 2014). Son clasificadas como gram positivas, con capacidad para formar endosporas, lo que les permite resistir al calor, luz UV y diferentes pH en el suelo (Talebi *et al.*, 2013). Estas características permiten que las diferentes especies de *Bacillus*, sean candidatas adecuadas que permitan eliminar o disminuir el uso de pesticidas químicos que dañan el medio ambiente (Santoyo *et al.*, 2012). Los objetivos del presente trabajo fueron aislar cepas de *Bacillus* spp. y evaluar su efecto en la producción de maíz forrajero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de Muestras de Raíz

Raíces de plantas de zacate Johnson (*Sorghum halepense*) y del cultivo de maíz (*Zea mays*), fueron colectadas en la localidad Fresno del Norte, que se encuentra en la coordenadas geográficas 25° 46' 05.83" N y 103° 17' 09.76" O, en el municipio de Francisco I. Madero, en el estado de Coahuila, México; las raíces de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), colectadas en un terreno agrícola de la Facultad de Agricultura y

Zootecnia (FAZ), ubicada en la localidad de Venecia, en el municipio de Gómez Palacio, en el estado de Durango, México, en las coordenadas geográficas 25° 46' 59.96" N y 103° 21' 02.63" O. La colecta consistió en obtener dos muestras de raíces de plantas de zacate Johnson, tres de plantas de maíz y tres de plantas de sorgo.

### **Aislamiento y Selección de Colonias del Género *Bacillus* spp.**

Cortes transversales de raíz con 3 cm de largo, realizados en cada una de las muestras obtenidas de las plantas, se colocaron en tubos de ensayo y fueron lavadas con agua corriente para eliminar el suelo adherido; posteriormente llenados con agua destilada hasta cubrir el total de raíces. Se les llevó a 80 °C de temperatura en placa de calentamiento durante 20 min, con el fin de separar las bacterias del género *Bacillus* spp., quienes tienen la capacidad de producir esporas en diversas condiciones de estrés (Cortés-Sánchez *et al.*, 2017). Posteriormente se eliminó el agua y se realizaron tres cortes de raíces, los cuales fueron colocados en agar nutritivo (BD Bioxon), e incubadas a 37 °C durante 48 h. Una vez concluida la incubación, se seleccionaron las colonias con forma irregular, color crema, apariencia ondulada, además se consideraron características digitiformes, lobuladas o aserradas en los bordes y de consistencia cremosa (Calvo y Zuñiga, 2010).

### **Aislamiento y Selección de Cepas de *Bacillus* spp. Fijadoras de Nitrógeno**

La selección de cepas de *Bacillus* spp., con capacidad de fijar nitrógeno se hizo de las colonias previamente aisladas. Se purificaron utilizando agar nutritivo a 37 °C por 48 h; posteriormente se pasaron al medio NFb ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g L<sup>-1</sup>, ácido málico 5 g L<sup>-1</sup>, KOH 4 g L<sup>-1</sup>,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g L<sup>-1</sup>,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g L<sup>-1</sup>,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01 g L<sup>-1</sup>, NaCl 0.02 g L<sup>-1</sup>,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.01 g L<sup>-1</sup>,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.002 g L<sup>-1</sup>, azul de bromotimol al 0.5% -en etanol-, agar bacteriológico 16 g L<sup>-1</sup>), a 33 °C (Stanier *et al.*, 1996). Una vez obtenido crecimiento, se evaluó la morfología colonial en medio de cultivo sólido. Posteriormente se realizó la tinción de Gram (Madigan *et al.*, 2004). Posterior a la selección de las cepas de *Bacillus* spp., con capacidad de fijar N<sub>2</sub>, fueron colocadas en glicerol (Jalmek)

al 50% a temperatura de -20 °C, para su conservación. Del proceso de aislamiento de colonias, se recuperaron cinco aislados del género *Bacillus* spp., con capacidad de fijar N<sub>2</sub>.

### **Extracción de ADN**

Se reactivaron las bacterias seleccionadas en medio YPG (extracto de levadura-peptona-glucosa) [extracto de levadura 10 g L<sup>-1</sup>, peptona 10 g L<sup>-1</sup>, glucosa 10 g L<sup>-1</sup>] líquido y se colocaron en un agitador (LUZEREN) a 30 °C a 150 rpm por 18 h. A partir del medio YPG se hizo la extracción de ADN (Murray y Thompson, 1980).

### **PCR y Secuenciación del Gen Ribosomal 16S rDNA**

Se realizó el PCR punto final con los siguientes iniciadores para el gen 16S rDNA: (16F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG y 16RACGGCTACCTTGTACGACTT). Los productos de PCR se mandaron secuenciar al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., en S.L.P. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias reportadas en el GenBank para encontrar con que microorganismo alineaba y a la vez identificar el género y con posibilidades de determinar la especie.

### **Evaluación de Aislados en Campo en Maíz Forrajero**

La evaluación de los aislados se realizó en el área agrícola de la Facultad Agricultura y Zootecnia; se evaluaron dos ciclos agrícolas: primavera-verano (P-V) y otoño-invierno (O-I). El clima es del tipo seco desértico o estepario cálido, con lluvias en verano e inviernos frescos (García, 1981), precipitación pluvial de 258 mm, temperatura mínima media anual de 22.1 °C, con valores mínimos y máximos anuales promedio de 16.1 y 38.5 °C, respectivamente (Trejo *et al.*, 2013). Los suelos correspondientes a los sitios en los que se establecieron los experimentos de campo son del tipo aluvión, aridosol, con textura migajón limosa, contenido bajo de materia orgánica (0.99 %) y nitratos (15.17 mg kg<sup>-1</sup>), pH medianamente alcalino (8.33), y CE de 0.91 mS cm<sup>-1</sup>. Las cepas recuperadas se activaron en medio YGP líquido y se ajustó a concentración de 10<sup>7</sup> células mL<sup>-1</sup> (Bashan

*et al.*, 1989). A partir de este medio fueron inoculadas 110 semillas de maíz, utilizando bolsas de plástico con 15 mL de la suspensión bacteriana en cada tratamiento, se mezcló de forma homogénea, dejándose en remojo por 90 min. Pasado este tiempo, se sembró en campo. La siembra, para ambos ciclos, se realizó en seco el 26 de marzo y el 5 de julio de 2018, respectivamente. Cada tratamiento se conformó por cuatro surcos de 4 m de longitud, la distancia entre surcos fue de 0.75 m y entre plantas de 0.15 m. La dosis de fertilización empleada para el tratamiento químico fue 180-90-00 respectivamente para nitrógeno, fósforo y potasio; se utilizó urea (46-00-00) y fosfato monoamónico (11-52-00) como fuentes adicionales de nitrógeno y fósforo respectivamente. La aplicación del fertilizante se realizó con 50% al momento de la siembra y el resto previo a la floración. En los tratamientos donde se aplicó la rizobacteria *Bacillus* spp., solamente se aplicó la mitad de la dosis de la fertilización química aplicada al tratamiento correspondiente. El sistema de riego que se usó fue por cintilla (0.15 mm de espesor con emisores a cada 0.15 m) aplicando un primer riego después de la siembra; los posteriores aplicados cada tercer día con gasto (Q) de 3 L h<sup>-1</sup> m<sup>-1</sup> lineal con base a una tasa de evaporación de 60% medida con tanque evaporímetro tipo A.

Los tratamientos estuvieron formados por la combinación de los aislados de *Bacillus* spp., y los híbridos de maíz; evaluados en campo bajo un diseño de bloques completos al azar con arreglo factorial 2 × 6 y tres repeticiones. Los niveles del factor A (cepas) fueron: BJ=*Bacillus* de zacate Johnson, B1M = *Bacillus* 1 de maíz, B2M = *Bacillus* 2 de maíz, B1S = *Bacillus* 1 de sorgo, B2S = *Bacillus* 2 de sorgo y el control químico sin *Bacillus* (SB = sin *Bacillus*); los niveles del factor B, fueron dos híbridos de maíz forrajero: H1 = Galáctico, H2 = AG 614, generando un total de 12 tratamientos.

En cada uno de los tratamientos de estudio se consideró en las mediciones un metro lineal para las variables evaluadas, como peso fresco (PF), peso seco (PS), diámetro de tallo (DT), número de elotes por planta (NEPP), peso fresco de raíz (PFR), peso seco raíz (PSR), longitud de raíz (LR), diámetro de raíz (DR), área foliar (AF) y contenido de proteína cruda (PC). Los datos fueron analizados con el paquete estadístico SAS® (V 9.2). Se obtuvo análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento y Selección de Bacterias del Género *Bacillus*

Se recuperaron 22 aislados bacterianos semejantes al género *Bacillus* a partir de muestras de raíces de zacate Johnson, maíz y sorgo; las colonias presentaron un centro elevado en forma de anillo, otros con consistencia seca y otros más con características cremosa y además de ligosas con tamaño variable. Las colonias de *Bacillus* spp. reportadas presentaron características de forma de anillo concéntrico y bordes irregulares en el centro (Wakita *et al.*, 2001). De los 22 aislados, fueron seleccionados 11; (tres obtenidos en plantas de zacate Johnson, cinco en plantas de maíz y tres en plantas de sorgo), con características gram positivo, en forma de cadena, con bordes redondeados, esporulados, esporas centrales y esféricas, típicas del género *Bacillus*, coincidiendo con otros resultados donde se encontraron aislados con características similares (Badía *et al.*, 2011). Se ha reportado que las esporas bacterianas presentan una estructura de resistencia, la cual puede permanecer viable por varios años hasta alcanzar las condiciones adecuadas para su desarrollo; estas características del género *Bacillus*, permiten encontrarlas en ambientes diversos (Tejera *et al.*, 2011).

### Aislamiento y Selección de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno

De los once aislados seleccionados, se encontró crecimiento utilizando el medio NFb, indicando la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. NFb es un medio selectivo que carece de nitrógeno combinado, permite recuperar microorganismos que poseen el complejo enzimático de la nitrogenasa (Corrales *et al.*, 2017) para reducir el nitrógeno atmosférico a nitratos o amonio, y aprovecharlo en su metabolismo (Döbereiner y Day, 1976). Otros estudios han utilizado el medio NFb, para aislar e identificar microorganismos fijadores de nitrógeno (Park *et al.*, 2005; Jha *et al.*, 2009). Utilizando este medio, se observaron colonias de forma irregular, color crema, con bordes entre lobulada, aserrada y ondulada. Posteriormente, se observó al microscopio que los aislados presentaron características en forma de cadena, con bordes redondeados, esporas esféricas y centrales, resultando la totalidad ser gram positivas.

A partir de este resultado fueron seleccionadas cinco cepas del género *Bacillus*, una obtenida en plantas de zacate Johnson, dos en plantas de maíz y dos más en plantas de sorgo para su evaluación en campo en el cultivo de maíz forrajero.

### PCR y Secuenciación del Gen Ribosomal 16S rDNA

El ADN de las cinco cepas seleccionadas del género *Bacillus* fue considerado óptimo para efectuar las pruebas PCR. La región amplificada por los iniciadores en las cinco cepas generó un único producto de 1500 pares de bases (pb) aproximadamente. Con frecuencia el gen 16S rDNA es utilizado en filogenia bacteriana, considerado altamente conservado y posee una región hipervariable que permite la identificación a nivel de especie (Wang *et al.*, 2015). En cuanto a la secuenciación del producto de PCR del gen 16S rDNA, utilizado como marcador molecular y su comparación con secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) por medio de la herramienta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para la determinación de la especie, permitió caracterizar el aislado de BJ (zacate Johnson) como *Bacillus amyloliquefaciens*, con similitud de 98%, B1M (maíz) como *Bacillus subtilis*, con similitud de 97%, B2M (maíz) como *Bacillus subtilis*, con similitud de 98%, B1S (sorgo) como *Bacillus subtilis*, con similitud de 97% y B2S (sorgo) como *Bacillus*

*amyloliquefaciens*, con similitud de 95%. Los valores de similitud encontrados en el presente estudio se encuentran dentro de los valores reportados por Ruiz-Sánchez *et al.* (2016) quienes reportaron valores de 95 hasta 100%.

### Evaluación de Aislados en Maíz Forrajero en Campo

Los valores medios obtenidos respecto al efecto de las cepas de *Bacillus* en las variables evaluadas se presentan en el Cuadro 1.

La inoculación con *Bacillus amyloliquefaciens*, mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en peso fresco, peso seco, diámetro de tallo, número de elotes por planta, peso seco de raíz y longitud de raíz; mientras que con *Bacillus subtilis*, diferencias significativas se observaron ( $P \leq 0.05$ ) en peso fresco de raíz y longitud de raíz respecto al testigo químico. En el área foliar y el porcentaje de proteína cruda, no se obtuvo diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos inoculados, encontrando resultados semejantes al tratamiento químico. El mayor diámetro de raíz se observó en el tratamiento químico ( $P \leq 0.05$ ). Los resultados obtenidos señalan que *Bacillus amyloliquefaciens*, tiene la facultad de promover el crecimiento y desarrollo de plantas de maíz a través de su capacidad fijadora de nitrógeno. Estudios realizados refieren que *Bacillus amyloliquefaciens*, ha sido empleado como biocontrol

**Cuadro 1. Comparación de los valores medios obtenidos en las variables evaluadas en maíz forrajero por efecto de las cepas de *Bacillus*. Table 1. Comparison of the mean values obtained in the evaluated variables in forage corn due to the effect of *Bacillus* strains.**

Cepas	PF	PS	DT	NEPP	PFR	PSR	LR	DR	AF	PC
	- - - Mg ha <sup>-1</sup>	- - -	cm		- - - - kg	- - - -	- - - - cm	- - - -	cm <sup>2</sup>	%
BJ	25.12 bc <sup>†</sup>	14.45 ab	2.53 a	1.11 b	0.23 b	0.18 a	29.17 a	59.33 b	4488.7 a	7.8393 a
B1M	26.93 ab	12.17 dc	2.40 b	1.28 a	0.31 a	0.16 ab	20.83 b	62.67 ab	3685.2 a	7.5200 a
B2M	23.20 dc	10.27 d	2.34 b	1.11 b	0.19 b	0.12 b	28.75 a	64.00 ab	4019.4 a	7.4408 a
B1S	21.48 d	13.41 bc	2.37 b	1.06 b	0.21 b	0.16 ab	26.00 ab	65.00 ab	4035.5 a	7.5173 a
B2S	30.31 a	16.17 a	2.35 b	1.39 a	0.23 b	0.14 ab	22.83 b	63.00 ab	4534.9 a	7.3587 a
SB	22.81 dc	12.88 bc	2.22 c	1.06 b	0.20 b	0.11 b	24.75 ab	69.67 a	4119.4 a	8.0447 a
DHS <sup>‡</sup>	3.5868	2.186	0.1049	0.1533	0.0482	0.0521	5.2322	9.3973	1157.2	1.5609

<sup>†</sup> Letras diferentes dentro de columnas indican valores estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). BJ = *Bacillus* zacate Johnson; B1M = *Bacillus* 1 de maíz; B2M = *Bacillus* 2 de maíz; B1S = *Bacillus* 1 sorgo; B2S = *Bacillus* 2 sorgo; SB = sin *Bacillus*; PSR = peso seco de raíz; LR = longitud de raíz; DR = diámetro de raíz; AF = área foliar; PC = proteína cruda. <sup>‡</sup> DHS = diferencia significativa honesta de Tukey.

<sup>†</sup> Different letters within columns indicate statistically different values (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). BJ = *Bacillus* zacate Johnson; B1M = Corn *Bacillus* 1; B2M = *Bacillus* 2 corn; B1S = *Bacillus* 1 sorghum; B2S = *Bacillus* 2 sorghum; SB = without *Bacillus*; PSR = root dry weight; LR = root length; DR = root diameter; AF = leaf area; PC = crude protein. <sup>‡</sup> DHS = Tukey's honest significant difference.

de innumerables enfermedades de plantas causadas por microorganismos transmitidos por el suelo (Islam *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2016). Otros estudios del genoma de *Bacillus amyloliquefaciens*, muestran un notable aumento en los nuevos grupos de metabolitos secundarios específicos como lipopéptidos (surfactina, iturina, fenacina, entre otros) de la cepa que participan en el desarrollo de las plantas y supresión de patógenos (Belbahri *et al.*, 2017). Existen investigaciones que prueban que *Bacillus amyloliquefaciens*, produce fitohormonas, fija nitrógeno y solubiliza fosfatos (ZeXun y Wei, 2000). Las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*, asociadas a las plantas, tienen la capacidad colonizar la rizosfera promover crecimiento y eliminar fitopatógenos competidores; por lo que se han utilizado como bioplaguicidas y biofertilizantes (Wu *et al.*, 2015). Se ha mencionado que los microorganismos que llevan a cabo el proceso de fijación del nitrógeno atmosférico (González-Andrés y James, 2016) representan alrededor de 5% de la población total bacteriana (Orozco y Martínez, 2009). Otros estudios caracterizaron e identificaron bacterias endofíticas de raíces de maíz como *Bacillus* sp., y *Enterobacter* sp., mediante la caracterización del gen 16S rDNA, donde cuatro cepas presentaron características positivas en la capacidad de fijación de nitrógeno (Szilagyi-Zecchin *et al.*, 2014).

En la comparación de medias para los ciclos (Cuadro 2), diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) se observaron en el ciclo primavera-verano en las variables peso fresco, peso seco, diámetro de tallo, peso fresco de raíz, peso seco de raíz, área foliar y por ciento de proteína cruda. En el número de elotes

por planta, longitud de raíz y diámetro de raíz, no se encontró diferencia significativa ( $P > 0.05$ ).

Las diferencias que existen entre los ciclos se deben en gran parte a que las siembras en verano en la región de la Comarca Lagunera, no son tan productivas como en primavera, debido a que las primeras fases del desarrollo de la planta sucede a temperaturas altas las que afectan el crecimiento y el área foliar de la planta (Reta *et al.*, 2000).

En la comparación de los híbridos de maíz (Cuadro 3), se puede observar que en las variables peso fresco, peso seco, diámetro de tallo, número de elotes por planta, diámetro de raíz y área foliar se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en el híbrido Galáctico; no así en las variables peso fresco de raíz, peso seco de raíz, longitud de raíz y proteína cruda, donde no se encontró significancia estadística ( $P > 0.05$ ).

Si bien los híbridos son opción en la producción de maíz forrajero, existe información que sustenta las interacciones específicas entre material vegetal y cepas de PGPR, lo cual determina que estas asociaciones puedan ser o no exitosas (Turner *et al.*, 2013; Chaparro *et al.*, 2014; Lebeis, 2014; Bulgarelli *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2015), por lo que en la selección y evaluación de cepas de PGPR en su interacción por especie vegetal o cultivar es importante utilizar cepas que sean eficientes.

Otro aspecto que se debe de tomar en cuenta en la producción agrícola al hacer uso de rizobacterias, es la utilización de cepas nativas adaptadas a la región para garantizar una alta probabilidad de la interacción cepa-cultivar (Abraham *et al.*, 2018).

**Cuadro 2. Comparación de los valores medios obtenidos en las variables evaluadas en maíz forrajero por efecto de los ciclos agrícolas.**  
**Table 2. Comparison of the mean values obtained in the evaluated variables in forage corn due to the effect of agricultural cycles.**

Ciclos	PF	PS	DT	NEPP	PFR	PSR	LR	DR	AF	PC
	- - - Mg ha <sup>-1</sup> - - -		cm		- - - - kg - - - -		- - - - cm - - - -		cm <sup>2</sup>	%
P-V	30.09 a <sup>†</sup>	15.06 a	2.42 a	1.17 a	0.26 a	0.17 a	26.50 a	64.94 a	4506.8 a	8.44 a
O-I	19.86 b	11.40 b	2.32 b	1.17 a	0.20 b	0.12 b	24.28 a	62.94 a	3787.5 b	6.80 b
DHS <sup>‡</sup>	2.0708	1.2621	0.0606	0.0885	0.0278	0.0301	3.0208	5.4256	668.14	0.9012

<sup>†</sup> Letras diferentes dentro de columnas indican valores estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). P-V = ciclo primavera-verano; O-I = ciclo otoño-invierno. PF = peso fresco; PS = peso seco; DT = diámetro de tallo; NEPP = número de elote por planta; PFR = peso fresco de raíz; PSR = peso seco de raíz; LR = longitud de raíz; DR = diámetro de raíz; AF = área foliar; PC = proteína cruda. <sup>‡</sup> DHS = diferencia significativa honesta de Tukey.

<sup>†</sup> Different letters within columns indicate statistically different values (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). P-V = spring-summer cycle; O-I = autumn-winter cycle. PF = fresh weight; PS = dry weight; DT = stem diameter; NEPP = number of corn per plant; PFR = fresh root weight; PSR = root dry weight; LR = root length; DR = root diameter; AF = leaf area; PC = crude protein. <sup>‡</sup> DHS = Tukey's honest significant difference.

**Cuadro 3. Comparación de los valores medios obtenidos en las variables evaluadas en maíz forrajero por efecto de los híbridos.**  
**Table 3. Comparison of the mean values obtained in the evaluated variables in forage corn due to the effect of hybrids.**

Híbridos	PF	PS	DT	NEPP	PFR	PSR	LR	DR	AF	PC
	- - - Mg ha <sup>-1</sup>	- - -	cm		- - - - kg	- - - -	- - - - cm	- - - -	cm <sup>2</sup>	%
Galáctico	27.40 a <sup>†</sup>	14.80 a	2.44 a	1.24 a	0.23 a	0.16 a	26.33 a	67.11 a	4873.0 a	7.79 a
AG 614	22.60 b	11.70 b	2.30 b	1.09 b	0.23 a	0.14 a	24.44 a	60.78 b	3421.3 b	7.45 a
DHS <sup>‡</sup>	2.0708	1.2621	0.0606	0.0885	0.0278	0.0301	3.0208	5.4256	668.14	0.9012

<sup>†</sup> Letras diferentes dentro de columnas indican valores estadísticamente diferentes. (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). PF = peso fresco; PS = peso seco; DT = diámetro de tallo; NEPP = número de elotes por planta; PFR = peso fresco de raíz; PSR = peso seco de raíz; LR = longitud de la raíz; DR = diámetro de raíz; AF = área foliar; PC = proteína cruda. <sup>‡</sup> DHS = diferencia significativa honesta de Tukey.

<sup>†</sup> Different letters within columns indicate statistically different values. (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). PF = fresh weight; PS = dry weight; DT = stem diameter; NEPP = number of corn per plant; PFR = fresh root weight; PSR = root dry weight; LR = root length; DR = root diameter; AF = leaf area; PC = crude protein. <sup>‡</sup> DHS = Tukey's honest significant difference.

## CONCLUSIONES

La secuenciación del producto de PCR del gen ribosomal 16S rDNA, permitió identificar a *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, señalando que existe poca diversidad de especies de *Bacillus* asociadas al zacate Johnson, maíz y sorgo en las áreas donde se realizaron los muestreos. De acuerdo a los resultados obtenidos, las cepas aisladas mostraron capacidad para fijar nitrógeno *in vitro* y estimularon el crecimiento de las plantas en campo de los híbridos de maíz utilizados. Desde un punto de vista sustentable, con los aislados recuperados y reduciendo la dosis de fertilización química a la mitad de la dosis recomendada, se alcanzaron rendimientos similares al tratamiento químico.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para estudio de Doctorado, a la Universidad Juárez del Estado de Durango por el apoyo interno para la realización del proyecto y al Dr. Lucio Rodríguez Sifuentes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UA de Coahuila por el apoyo en los análisis microbiológicos.

## LITERATURA CITADA

Abraham-Juárez, Ma. del R., I. Espitia-Vázquez, R. Guzmán-Mendoza, V. Olralde-Portugal, G. Ruíz-Aguilar, J. L. García-Hernández, L. Herrera-Isidró, and H. G. Núñez-Palenius. 2018. Development, yield, and quality of melon fruit (*Cucumis melo* L.) inoculated with Mexican native strains of *Bacillus subtilis* (EHRENBERG). *Agrociencia* 52: 91-102.

- Ahemad, M. and M. Kibret. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ.-Sci.* 26: 1-20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.
- Badía, M., B. Hernández, J. Murrel, J. Mahillon y M. Peréz. 2011. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev. Bras. Agroecol.* 6: 90-99.
- Bashan, Y., Y. Ream, H. Levanony, and A. Sade. 1989. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Bot.* 67: 1317-1324. doi: <https://doi.org/10.1139/b89-175>.
- Belbahri, L., A. Chenari B., I. Rekik, F. N. Alenezi, A. Vallat, L. Luptakova, E. Petrovova, T. Oszako, S. Cherrad, S. Vacher, and M. E. Rateb. 2017. Comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* strains reveals a core genome with traits for habitat adaptation and a secondary metabolites rich accessory genome. *Front. Microbiol.* 8: 1438. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01438>.
- Bulgarelli, D., R. Garrido-Oter, P. C. Munch, A. Weiman, J. Dröge, Y. Pan, A. C. McHardy, and P. Schulze-Lefert. 2015. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host Microbe* 17: 392-403. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011>.
- Calvo, P. y D. Zúñiga. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecol. Apl.* 9: 31-39.
- Chaparro, J. M., D. V. Badri, and J. M. Vivanco. 2014. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *The ISME J.* 8: 790-803. doi: <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.196>.
- Corrales Ramírez, L. C., L. Caycedo Lozano, M. A. Gómez Méndez, S. J. Ramos Rojas, and J. N. Rodríguez Torres. 2017. *Bacillus* spp: Una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *NOVA* 15: 45-65. doi: <https://doi.org/10.22490/24629448.1958>.
- Cortés-Sánchez, A. de J., M. Díaz-Ramírez y M. P. Salgado-Cruz. 2017. *Bacillus cereus*: Alimentos, salud y biotecnología. *Agroproductividad* 10: 3-9.

- Döbereiner, J. and J. M. Day. 1976. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. pp. 518-538. In: W. E. Newton and C. J. Nyman (eds.). Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Nitrogen Fixation. Washington State University Press. Pullman, WA, USA.
- García, E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, UNAM. México, D. F., México.
- González-Andrés, F. and E. James. 2016. Biological nitrogen fixation and beneficial plant-microbe interactions. Springer. Suiza.
- Islam, S., A. M. Akanda, A. Prova, Md. T. Islam, and Md. M. Hossain. 2016. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. *Front. Microbiol.* 6: 1360. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01360>.
- Jha, B., M. C. Thakur, I. Gontia, V. Albrecht, M. Stoffels, M. Schmid, and A. Hartmann. 2009. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. *Eur. J. Soil Biol.* 45: 62-72. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.06.007>.
- Kundan, R., G. Pant, N. Jadon, and P. K. Agrawal. 2015. Plant growth promoting Rhizobacteria: Mechanism and current prospective. *J. Fertil. Pestic.* 6: 1-9. doi: 10.4172/2471-2728.1000155.
- Lebeis, S. L. 2014. The potential for give and take in plant-microbiome relationships. *Front. Plant Sci.* 5: 287. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00287>.
- Madigan, M., J. Martinko, and J. Parker. 2004. Brock, biology of microorganisms. Prentice Hall Iberia. Madrid, España. ISBN: 032164963X.
- Murray, M. G. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4326. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>.
- Nehra, V., B. S. Saharan, and M. Choudhary. 2016. Evaluation of *Brevibacillus brevis* as a potential plant growth promoting rhizobacteria for cotton (*Gossypium hirsutum*) crop. *Springerplus* 5: 948. doi: 10.1186/s40064-016-2584-8.
- Niazi, A., S. Manzoor, S. Asari, S. Bejai, J. Meijer, and E. Bongcam-Rudloff. 2014. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* Subsp. plantarum UCMB5113: a rhizobacterium that improves plant growth and stress management. *PLoS One.* 9: e104651. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104651>.
- Orozco Jaramillo, C. y P. Martínez Nieto. 2009. Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticosaisladosde la rizosfera de *Pinuspatula* en Colombia. *Bosque (Valdivia).* 30: 70-77. doi: <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002009000200002>.
- Park, M., C. Kim, J. Yang, H. Lee, W. Shin, S. Kim, and T. Sa. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol. Res.* 160: 127-133. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.10.003>.
- Parray, J. A., S. Jan, A. N. Kamili, and R. A. Qadri. 2016. Egamberdieva, D. Ahmad, P. Current Perspectives on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *J. Plant Growth Regulat.* 35: 877-902. doi: <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9583-4>.
- Reta S., D. G., A. Gaytán Mascorro y J. S. Carrillo Amaya. 2000. Respuesta del maíz para ensilaje a métodos de siembra y densidades de población. *Rev. Fitotec. Mex.* 23: 37-48.
- Ruiz-Sánchez, E., M. A. Mejía-Bautista, A. Serrato-Díaz, A. Reyes-Ramírez, Y. Estrada-Girón, and A. J. Valencia-Botín. 2016. Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. *Agrociencia* 50: 133-148.
- Saharan, B. S. and V. Nehra. 2011. Plant growth promoting Rhizobacteria: A critical review. *Life Sci. Med. Res.* 21: 1-30.
- Santoyo G., M. Orozco Mosqueda, and M. Govindappa. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: A review. *Biocontrol Sci. Technol.* 22: 855-872. doi: <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. Anuario estadístico de la producción agrícola <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Consulta: octubre 29, 2018).
- Smith, D. L., S. Subramanian, J. R. Lamont, and M. Bywater-Ekegård. 2015. Signaling in the phytomicrobiome: breadth and potential. *Front. Plant Sci.* 6: 709. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00709>.
- Stanier, R. Y., J. L. Ingraham, M. L. Wheelis y P. R. Painter. 1996. Microbiología. Reverté. Barcelona, España. ISBN: 84-291-1868-3.
- Szilagyi-Zecchin, V. J., A. C. Ikeda, M. Hungria, D. Adamoski, V. Kava-Cordeiro, C. Glienke, and L. V. Galli-Terasawa. 2014. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Expr.* 4: 1-9. doi: <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0026-y>.
- Talebi, M., G. Emtiazi, A. A. Sepahy, and S. Zaghian. 2013. Zymogram analysis of alkaline keratinase produced by nitrogen fixing *Bacillus pumilus* ZED17 exhibiting multiprotease enzyme activities. *Jundishapur J. Microbiol.* 6: e7974. doi: <https://doi.org/10.5812/jjm.7974>.
- Tan, S., Y. Gu, C. Yang, Y. Dong, X. Mei, Q. Shen, and Y. Xu. 2016. *Bacillus amyloliquefaciens* T-5 may prevent *Ralstonia solanacearum* infection through competitive exclusion. *Biol. Fertil. Soils* 52: 341-351. doi: <https://doi.org/10.1007/s00374-015-1079-z>.
- Tejera Hernández, B., M. M. Rojas Badía y M. Heydrich Pérez. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Rev. CENIC Cienc. Biol.* 42: 131-138.
- Trejo Escareño, H. I., E. Salazar Sosa, J. D. López Martínez y C. Vázquez Vázquez. 2013. Impacto del estiércol bovino en el suelo y producción de forraje de maíz. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 4: 727-738.
- Turner, T. R., E. K. James, and P. S. Poole. 2013. The plant microbiome. *Genome Biol.* 14: 209. doi: <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209>.



- 
- 
- Wakita, J., H. Shimada, H. Itoh, T. Matsuyama, and M. Matsushita. 2001. Periodic colony formation by bacterial species *Bacillus subtilis*. *J. Phys. Soc. Jpn.* 70: 911-919. doi: <https://doi.org/10.1143/JPSJ.70.911>.
- Wang, X., I. K. Jordan, and L. W. Mayer. 2015. Phylogenetic Perspective on molecular epidemiology. Chapter 29, pp. 517-536. *In*: Y. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, and J. Schwartzman (eds.). *Molecular medical microbiology*. Academic Press. Amsterdam, Netherlands. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00029-9>.
- Wu, L., H. J. Wu, J. Qiao, X. Gao, and R. Borriss. 2015. Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. *Front. Microbiol.* 6: 1395. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01395>.
- ZeXun, L. and S. Wei. 2000. Effect of cultural conditions on IAA biosynthesis by *Klebsiella oxytoca* SG-11. *Chinese J. Appl. Environ. Biol.* 6: 66-69.