

Artículo científico

Efecto de la inoculación con bacterias del género *Bacillus* sobre el crecimiento de *Megathyrsus maximus* Jacq, en condiciones de estrés hídrico**Effect of inoculation with bacteria of the genus *Bacillus* on the growth of *Megathyrsus maximus* Jacq, in conditions of water stress**J.L. Abril^{1,2}; B. Roncallo^{1,2}; R. Bonilla^{1,3*}¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica.² Centro de Investigación Motilonia. Km 5 vía Becerrill, Agustín Codazzi-Cesar, Colombia.³ Laboratorio de Microbiología de Suelos. Centro de Investigación Tibaitatá. Km 14 vía Mosquera, Cundinamarca, Mosquera, Colombia. *E-mail: rbonilla@corpoica.org.co**Resumen**

En el Caribe Seco Colombiano la producción de forraje es afectada, en términos de cantidad y calidad, por los períodos de sequía que se presentan sistemáticamente en algunas épocas del año, ocasionando déficit hídrico, perjuicios en la alimentación, en la productividad animal y en los ingresos de los productores. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal de los géneros *Bacillus* y *Azotobacter* sobre el desarrollo del pasto guinea *Megathyrsus maximus* en condiciones de sequía y riego controlado. El estudio se realizó en el Centro de Investigación Motilonia (CORPOICA) ubicado en Agustín Codazzi (Cesar, Colombia). Se implementaron dos experimentos simultáneos aplicando un diseño completamente aleatorizado con 12 tratamientos y 11 repeticiones en el experimento 1 y 9 tratamientos con 13 repeticiones en el experimento 2. Los resultados de las variables medidas en la planta, del análisis de la concentración de nitrógeno del tejido foliar y la turgencia, revelaron un aumento significativo ($p < 0,05$) en la longitud de las raíces, altura de la planta a los 62 días y el número de plantas turgentes en algunos tratamientos inoculados con las cepas de *Bacillus* en relación con el testigo con sequía y sin inoculación. Las cepas XT38, XT13, XT14 y *Azotobacter* contribuyeron a promover el crecimiento de *M. maximus*, y la inoculación y co-inoculación con *Bacillus* presentaron capacidad para contrarrestar los efectos negativos del estrés hídrico.

Palabras clave: Biofertilizante; Sequía; Poáceas; Turgencia.**Abstract**

In the Colombian dry Caribbean, the forage production is affected, in terms of quantity and quality, by the periods of droughts systematically presented in some periods of the year, causing water deficit, damages in the feeding, in animal productivity and in the producers income. The objective of the research was to evaluate the effect of inoculation with *Bacillus* and *Azotobacter* plant growth promoting bacteria on the development of guinea grass *Megathyrsus maximus* in drought conditions and controlled irrigation. The studies were performed at the Motilonia research center (CORPOICA) located in Agustín Codazzi (Cesar-Colombia). Two simultaneous experiments were implemented applying a completely randomized design with 12 treatments and 11 replicates in experiment 1 and 9 treatments with 13 replicates in experiment 2. Results of the morphological variables measured in the plant, and the analysis of the nitrogen concentration of the foliar tissue and turgidity, showed a significant increase ($p < 0.05$) in root length, plant height at 62 days, and turgidity among treatments inoculated with *Bacillus* strains in relation to drought control (without inoculation). The strains XT38, XT13, XT14 and *Azotobacter* contribute to promote the growth of *M. maximus* and inoculation and co-inoculation with *Bacillus* present an ability to counteract the negative effects of water stress.

Keywords: Bio-fertilizer; Drought; Grass; Turgency.**Introducción**

La ganadería es una de las actividades económicas de mayor importancia en el departamento del

Cesar, destacándose su inventario bovino como el segundo departamento ganadero del Caribe Colombiano, con un hato cercano a 1,43 millones de cabezas las cuales representan el 6,87 % del hato

Recibido 30/03/17; Aceptado 23/06/17.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

nacional y el 30,6 % del hato regional (DANE, 2016). La producción está basada en pastoreo de poáceas nativas e introducidas (1,64 millones de ha) (MADR y CCI, 2010), entre las cuales se destaca el pasto guinea (*Megathyrsus maximus*) con una producción de materia seca, de 24-26 t ha/año (Ojeda *et al.*, 2016).

Sin embargo, los suelos de esta región se encuentran enmarcados en un ambiente complejo, heterogéneo y frágil, que evidencia una alta susceptibilidad a la erosión y una baja fertilidad natural, y presentan deterioro físico, químico y biológico, lo que afecta severamente su capacidad productiva y compromete la viabilidad económica de los sistemas ganaderos (Pizarro y García, 2014). Además, las condiciones edafoclimáticas acompañadas del manejo inapropiado de los sistemas ganaderos de la zona, limitan la disponibilidad y calidad del forraje durante períodos prolongados del año, lo que provoca una baja productividad, expresada en menor carga animal, bajos índices de producción por animal y por hectárea (Murgueitio *et al.*, 2009).

La recuperación y mantenimiento de la fertilidad de los suelos sobre una base sostenible constituye un factor de gran importancia en el desarrollo de la producción agropecuaria mundial (Rueda-Puente *et al.*, 2015).

La sequía es un fenómeno ambiental, meteorológico, que se define como la falta de lluvias durante un período suficiente como para ocasionar el agotamiento parcial o total del agua disponible en el suelo y producir daños en las plantas. El tiempo para causar estos efectos depende de la especie vegetal, la capacidad de almacenamiento de agua del suelo y las condiciones atmosféricas que afectan la tasa de evaporación y transpiración. La sequía puede ser permanente, como en áreas desérticas; estacional, con estaciones húmedas y secas definidas; o bien ocasional como en muchas áreas húmedas (Coronel, 2013).

Es importante reconocer que aún en áreas y/o estaciones en las que el promedio de lluvias permite la siembra de cultivos anuales, puede haber patrones de escasez de agua particulares. Así, durante la estación de crecimiento potencial el patrón puede ser de sequía temprana, terminal o intermitente. Conocer cuál es el patrón de disponibilidad hídrica para un cultivo determinado es un elemento esencial en la búsqueda de mayor resistencia a la sequía para ese cultivo y en el diseño de sistemas de manejo que minimicen los efectos de la sequía (IDEAM y CORPOCESAR, 2007).

El departamento del Cesar presenta un área de 950.719 hectáreas en ecosistemas secos (42,04 % del departamento), destacándose las zonas norte y central con menores precipitaciones (IDEAM y CORPOCESAR, 2007).

En condiciones naturales la mayoría de las plantas tropicales adaptadas a diversos nichos ecológicos se encuentran asociadas con microorganismos del suelo los cuales juegan un papel clave en el ciclaje de nutrientes y en la protección de plantas contra el estrés ambiental al cual pueden estar sometidas (Lugtenberg *et al.*, 2013). Por lo anterior, reviste gran importancia la búsqueda de nuevas alternativas para reducir el estrés hídrico en pasturas, en época de escasas precipitaciones, con el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal, ya que éstos poseen múltiples atributos tales como la fijación biológica de nitrógeno, la producción de sustancias reguladoras de crecimiento vegetal como auxinas, y proteínas como poliaminas, el aumento del crecimiento radicular y el biocontrol de patógenos. Estas características en conjunto proporcionan un mejor desarrollo de las plantas bajo condiciones de estrés hídrico (Torriente, 2010). Las bacterias asociadas con la producción de poáceas que se han estudiado más, son las de los géneros: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. Algunas de ellas forman estructuras de resistencia para favorecer su supervivencia en condiciones de estrés, en especial sequía, la cual es común en las pasturas de zonas áridas (Loredo-Osti *et al.*, 2004).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación con bacterias del género *Bacillus* y *Azotobacter* sobre el crecimiento y desarrollo del pasto guinea *Megathyrsus maximus* cv. Tanzania (Jacq) B.K. Simon & S.W.L. Jacobs en condiciones de sequía y riego controlado.

Materiales y métodos

Localización y características del suelo

El experimento se realizó en el segundo semestre de 2014 en el Centro de Investigación Motilonia, ubicado en el municipio de Agustín Codazzi, departamento Cesar, en una zona con precipitación anual promedio de 1.561 mm y una temperatura promedio de 29°C, la evaporación media de 1.916 mm, bajo condición de bosque seco tropical Bs-T según la clasificación climatológica de zonas de

vida Holdrige (CORPOICA y Fondo Adaptación, 2015). La investigación se llevó a cabo en un umbráculo bajo condiciones semi-controladas.

Las características físico-químicas de los suelos utilizados son las siguientes: pH neutro (6,78), conductividad eléctrica 0,32 no salino dS/m, bajo contenido de materia orgánica (1,46 %) (Walkley y Black), alto en fósforo (63,33 mg/kg), medio en potasio (0,28 cmol/kg) y textura arenosa.

Microorganismos

Se emplearon tres cepas xerotolerantes: XT-13 (*Bacillus subtilis*) con la siguientes características; producción de ácido indol acético (AIA) de 0,645 mg/mg proteína, solubilización de fosfatos de 0,192 PO₄ mg/mg proteína y una producción de exopolisacáridos (EPS) de 0,060 glucosa mg/mg proteína; XT-14 (*Bacillus aryabhattai*) con producción de ácido indol acético (AIA) de 0,639 mg/mg proteína, solubilización de fosfatos de 0,231 PO₄ mg/mg proteína y una producción de exopolisacáridos (EPS) de 0,142 glucosa mg/mg proteína y XT-38 (*Bacillus licheniformis*) con una producción de ácido indol acético (AIA) de 0,643 mg/mg proteína, solubilización de fosfatos de 0,189 PO₄ mg/mg proteína y una producción de exopolisacáridos (EPS) de 0,176 glucosa mg/mg proteína. Además, en el experimento 1 se utilizó una cepa de *Azotobacter chroococcum* (Monibac®). Todos los microorganismos fueron aislados de los suelos en estudio y pertenecen al banco de microorganismos del Laboratorio de Microbiología de Suelos de CORPOICA. Para *Bacillus* sp. se utilizó un medio de cultivo JM el cual estimula la esporulación, debido a que contiene nitrato de hierro, mezcla de sales y peróxido de hidrógeno (Díaz-García *et al.*, 2015). Respecto a la cepa de *Azotobacter* se usó el medio de cultivo líquido MBR (Moreno-Galván *et al.*, 2011). La concentración de trabajo fue de 1x10⁸ UFC/mL en todos los inoculantes.

Tratamientos evaluados

Se establecieron dos ensayos simultáneos, el primero con evaluación de los inoculantes más fertilización inorgánica nitrogenada (urea) y el segundo con los inoculantes sin fertilización, en los cuales se utilizó un diseño experimental completamente al azar con doce tratamientos y once repeticiones en el experimento 1 y con nueve tratamientos y trece repeticiones en el experimento

2. Los tratamientos con el 50 % de la capacidad de campo (CC) fueron sometidos a estrés hídrico (sequía), mientras que los del 100 % CC no lo fueron (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones experimentales para los ensayos de crecimiento de *Megathyrus maximus* Jacq.

| Tratamiento | Capacidad de campo | Fertilización | Inóculo |
|---------------|--------------------|---------------|--------------------|
| Experimento 1 | | | |
| T1 | 100 % | - | - |
| T2 | 100 % | Urea 50 % | - |
| T3 | 50 % | Urea 50 % | - |
| T4 | 50 % | Urea 50 % | XT14 |
| T5 | 50 % | Urea 50 % | XT13 |
| T6 | 50 % | Urea 50 % | XT38 |
| T7 | 50 % | Urea 50 % | XT14 + XT13 |
| T8 | 50 % | Urea 50 % | XT14 + XT38 |
| T9 | 50 % | Urea 50 % | XT13 + XT38 |
| T10 | 50 % | Urea 50 % | XT14 + XT13 + XT38 |
| T11 | 100 % | Urea 50 % | Monibac |
| T12 | 50 % | Urea 50 % | Monibac |
| Experimento 2 | | | |
| T1 | 100 % | - | - |
| T2 | 50 % | - | - |
| T3 | 50 % | - | XT14 |
| T4 | 50 % | - | XT13 |
| T5 | 50 % | - | XT38 |
| T6 | 50 % | - | XT14 + XT13 |
| T7 | 50 % | - | XT14 + XT38 |
| T8 | 50 % | - | XT13 + XT38 |
| T9 | 50 % | - | XT14 + XT13 + XT38 |

XT14: cepa de *Bacillus subtilis*; XT13: cepa de *B. aryabhattai*; XT38: cepa de *B. licheniformis*; Monibac: cepa de *Azotobacter chroococcum*.

Establecimiento e inoculaciones de los experimentos

El establecimiento de los experimentos se hizo en bolsas de polietileno negro con una capacidad de 2 kg, se llenaron con suelo proveniente del Centro de Investigación Motilonia de CORPOICA, Agustín Codazzi-Cesar, previamente analizado y desinfectado mediante el método de solarización por 30 días.

La siembra se realizó utilizando 0,15 g de semillas de pasto por unidad experimental, las cuales fueron inoculadas en cajas de Petri, mediante inmersión en 5 mL de inoculante a una concentración de 1x10⁸ UFC/mL durante una hora, de acuerdo con los respectivos tratamientos. Para el caso de las co-inoculaciones dobles y triples se mezclaron los inoculantes en proporciones iguales y se utilizó el mismo volumen (5 mL).

La siembra de los testigos absolutos y sequía se realizó utilizando semillas sin inocular. Después de la emergencia se realizaron tres raleos cada 4 días, dejando una planta por cada bolsa; durante ese periodo y hasta completar la fase de establecimiento (30 días post-emergencia), se efectuó un

riego diario y uniforme en todos los tratamientos con un volumen de agua de 50 mL por bolsa, la aplicación se realizó con una probeta.

Fertilización del experimento 1

La fertilización de los tratamientos se realizó 20 días después de emergencia utilizando 0,38 g de urea por planta que corresponde a una fertilización nitrogenada del 50 % acorde al análisis de suelo.

Aplicación de las láminas de agua y evaluaciones realizadas

Transcurrido el tiempo de establecimiento, se aplicaron tres láminas de agua con una frecuencia de riego de 13 días; los tratamientos bacterianos y el testigo de sequía, recibieron 50 % de la lámina de agua (97 mL) necesaria para llevar el sustrato (suelo) a capacidad de campo, mientras que el testigo absoluto recibió el 100 % de la lámina de agua calculada (194 mL).

Cálculo de las láminas de agua

Se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$L = (\emptyset/100) * h = (13,73/100) * 100 = 2,47 \text{ cm}$$

L = lámina de agua

\emptyset = % de agua volumétrica retenida en el suelo a 0,3 bares.

h = altura de la bolsa

Volumen de agua

El volumen de agua aplicado se calculó según la siguiente fórmula:

$$V = L * A$$

$$V = 2,47 \text{ cm} * 78,54 \text{ cm}^2 = 194 \text{ cm}^3$$

L = lámina de agua

A = área de la bolsa

Turgencia de las plantas

Se evaluó el número de plantas turgentes por tratamiento a los 7 y 13 días después del riego (DDR) (evaluaciones 1 y 2). A los 13 días se aplicó un segundo riego (láminas de agua) y se procedió a evaluar a los 7 y 13 DDR (evaluaciones 3 y 4), finalmente se realizó un tercer riego a los 13 días después del segundo y se evaluó el número de plantas turgentes por tratamiento a los 13 días después del tercer riego (evaluación 5).

Variables morfológicas

La variable altura de planta se evaluó a los 15, 22, 30 y 62 días después de emergencia, con el fin de estimar el efecto de las bacterias sobre el pasto guinea en condiciones de normalidad hídrica (15, 22, 30 días) y estrés hídrico (62 días). A los 64 días se realizó un muestreo destructivo y se evaluaron las siguientes variables: número de macollas, longitud de raíces, longitud de la parte aérea, peso fresco de raíces, peso seco de raíces, peso fresco y seco de la parte aérea. El porcentaje de peso seco se determinó mediante la introducción del material vegetal en una estufa de aire forzado a 60°C por un período de 48 h según el procedimiento descrito por Helrich (1990).

Contenido de nitrógeno foliar

El porcentaje de nitrógeno foliar fue determinado por el Laboratorio de Química de Suelos, Aguas y Plantas del Centro de Investigación Tibaitatá-CORPOICA mediante el método EPA 351,3 (NEMI, 1978).

Determinación de la retención de humedad del suelo

Para determinar el punto de marchitez permanente y la capacidad de campo del suelo, se utilizó el método de la placa de presión (o membrana de Richards) (Tabla 2); se determinó la lámina de agua necesaria para llevar el suelo al 100 % y 50 % de la capacidad de campo mediante la siguiente ecuación $L = (\emptyset/100) * h$, donde L es igual al porcentaje de agua retenida a 0,3 bares y h es la altura de la bolsa (Richards, 1947).

Tabla 2. Porcentaje de retención de humedad del suelo estimado con el método de membrana de Richards usando cámara de succión.

| Presión (bares) | Retención de humedad (%) |
|-----------------|--------------------------|
| 0,1 | 14,78 |
| 0,3 | 13,74 |
| 1 | 11,82 |
| 3 | 11,68 |
| 15 | 10,06 |

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y las medias se compararon mediante la prueba HSD de Tukey con una significación del 5 %.

En la variable turgencia de plantas se estimó el porcentaje de plantas turgentes por tratamiento en cada evaluación y se calculó el promedio de las cinco evaluaciones realizadas. El análisis de varianza incluyó las cinco observaciones y las medias se compararon mediante la prueba HSD de Tukey con una significación del 5 %. Se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS versión 22.0 (IBM Corporation, 2013).

Resultados

Experimento 1. Respuesta del pasto Megathyrsus maximus cv Tanzania inoculado con cepas de Bacillus y Azotobacter más aplicación de fertilización nitrogenada (50 % de N)

Altura de planta. A los 15 (F = 1,382; g.l. error = 120; p = 0,189), 22 (F = 1,372; g.l. error = 120; p = 0,194) y 30 (F = 1,395; g.l. error = 120; p = 0,183) días de evaluación no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos; entre tanto, en esta variable a los 62 días se presentaron diferencias significativas (F = 6,287; g.l. error = 120; p < 0,0001). La altura de las plantas en los tratamientos inoculados con Monibac, cepa XT38 con sus co-inoculaciones dobles y triples y las co-inoculaciones dobles y triple XT13 y XT14 fueron superiores (p < 0,05) en relación con el testigo en condiciones de sequía, mostrando un efecto positivo de la inoculación con microorganismos promotores del crecimiento vegetal en condiciones de déficit hídrico. En los tratamientos T12 y T8 se registraron incrementos en altura de 29 % y 32 % en relación con el tratamiento T3 (Tabla 3).

Número de macollas por planta. Esta variable

estuvo influenciada por el tratamiento (F = 6,561; g.l. error = 120; p < 0,0001). Los tratamientos que recibieron fertilización nitrogenada presentaron mayor altura que el T1, evidenciando el efecto positivo de la fertilización nitrogenada sobre esta variable (Tabla 4).

Longitud de raíz. La longitud de raíz presentó diferencias significativas (F = 3,247; g.l. error = 120; p < 0,0001) entre los tratamientos. Los valores superiores (p < 0,05) se obtuvieron en los tratamientos inoculados y los testigos con el 100 % CC con respecto al tratamiento T3. Los tratamientos T8 y T9 obtuvieron un aumento significativo del 21,6 % en relación con el T3, comprobando la respuesta del pasto guinea a la co-inoculación con las cepas XT13 + XT38 y XT13 + XT38 (Tabla 4).

Peso fresco y seco de las raíces. El peso fresco de las raíces presentó diferencias significativas entre tratamientos (F = 3,071; g.l. error = 120; p < 0,0001). El tratamiento T2 presentó valores mayores que los tratamientos T1, T5, T7, T8 y T9. Se observó una respuesta positiva a la fertilización nitrogenada y a la aplicación de un volumen mayor de agua. En el peso seco de las raíces se observaron diferencias significativas (F = 3,555; g.l. error = 120; p < 0,0001) entre el tratamiento T2 con respecto a los T1, T5, T8 y T12 (Tabla 4).

Peso fresco y seco de la parte aérea. El peso fresco de la parte aérea mostró diferencias entre los tratamientos (F = 3,870; g.l. error = 120; p < 0,0001). T11, T2, T12, T10 y T9 presentaron valores mayores al tratamiento T1. En el peso seco de la parte aérea también se observaron diferencias significativas (F = 4,030; g.l. = 120; p < 0,0001). Los tratamientos T2 y T11 difirieron de T1 y T3. El efecto observado se atribuye a la fertilización

Tabla 3. Valores medios y errores estándar de cuatro evaluaciones de altura de planta del pasto *Megathyrsus maximus* inoculado con cepas de *Bacillus* sp. o *Azotobacter chroococcum* más fertilización nitrogenada.

| Tratamiento | Altura de planta | | | |
|-------------|------------------|------------|------------|----------------|
| | 15 DDE | 22 DDE | 30 DDE | 62 DDE |
| T1 | 39,5 ± 2,7 | 63,1 ± 1,7 | 73,6 ± 2,4 | 92,8 ± 5,6 a |
| T2 | 35,4 ± 1,7 | 67,9 ± 1,5 | 74,9 ± 4,2 | 78,8 ± 3,7 abc |
| T3 | 38,8 ± 2,1 | 71,3 ± 2,7 | 76,9 ± 3,3 | 60,4 ± 2,9 d |
| T4 | 40,8 ± 2,6 | 77,9 ± 3,0 | 80,8 ± 3,8 | 68,4 ± 3,2 cd |
| T5 | 45,4 ± 2,5 | 69,4 ± 4,1 | 78,3 ± 3,8 | 69,2 ± 5,0 cd |
| T6 | 41,1 ± 2,1 | 76,3 ± 4,8 | 85,1 ± 4,7 | 79,0 ± 2,4 abc |
| T7 | 40,6 ± 2,3 | 71,3 ± 4,8 | 81,8 ± 3,4 | 74,3 ± 3,0 bcd |
| T8 | 43,7 ± 2,0 | 72,0 ± 2,9 | 77,3 ± 4,2 | 85,0 ± 4,3 abc |
| T9 | 43,8 ± 2,2 | 74,1 ± 4,1 | 86,8 ± 4,2 | 82,5 ± 2,7 abc |
| T10 | 42,2 ± 1,7 | 67,3 ± 3,1 | 75,7 ± 3,2 | 79,6 ± 2,5 abc |
| T11 | 37,4 ± 1,9 | 74,0 ± 3,3 | 80,6 ± 3,3 | 83,9 ± 3,0 abc |
| T12 | 42,4 ± 2,8 | 75,4 ± 2,6 | 84,1 ± 2,5 | 89,1 ± 3,3 ab |

Las columnas en las que no se indican letras corresponden a diferencias no significativas entre promedios de tratamientos. Promedios con letras iguales, en una misma columna, no difieren significativamente según la prueba de Tukey (p > 0,05). DDE: Días después de emergencia. Los tratamientos evaluados corresponden a los indicados en la Tabla 1 para el experimento 1.

Tabla 4. Valores medios y errores estándar de seis características morfológicas de *Megathyrsus maximus* inoculado con cepas de *Bacillus* sp. o *Azotobacter chroococcum* más fertilización nitrogenada.

| Tratamiento | Macollas/ Planta | Longitud de raíz (cm) | Peso fresco de raíz (g) | Peso seco de raíz (g) | Peso fresco de parte aérea (g) | Peso seco de parte aérea (g) |
|-------------|---------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| T1 | 0,9 ± 0,3 b | 30,5 ± 1,4 a | 5,4 ± 0,3 b | 2,9 ± 0,1 c | 19,4 ± 1,9 b | 5,1 ± 0,5 c |
| T2 | 2,2 ± 0,3 a | 28,7 ± 0,9 ab | 7,7 ± 0,4 a | 5,0 ± 0,4 a | 31,8 ± 1,6 a | 7,5 ± 0,5 ab |
| T3 | 2,6 ± 0,2 a | 23,7 ± 0,5 b | 6,6 ± 0,4 ab | 4,0 ± 0,4 abc | 25,1 ± 1,4 ab | 5,5 ± 0,4 c |
| T4 | 2,7 ± 0,2 a | 26,3 ± 0,8 ab | 5,8 ± 0,4 ab | 3,9 ± 0,3 abc | 26,8 ± 1,5 ab | 6,6 ± 0,4 abc |
| T5 | 2,7 ± 0,2 a | 28,5 ± 1,3 ab | 5,6 ± 0,3 b | 3,5 ± 0,2 bc | 27,5 ± 1,8 ab | 6,5 ± 0,4 abc |
| T6 | 2,7 ± 0,2 a | 26,5 ± 1,2 ab | 6,4 ± 0,6 ab | 4,4 ± 0,3 abc | 25,4 ± 2,0 ab | 5,6 ± 0,6 bc |
| T7 | 2,6 ± 0,3 a | 26,3 ± 0,8 ab | 5,6 ± 0,4 b | 3,6 ± 0,3 abc | 27,1 ± 2,0 ab | 6,4 ± 0,4 abc |
| T8 | 2,7 ± 0,2 a | 30,2 ± 1,5 a | 5,0 ± 0,4 b | 3,3 ± 0,3 bc | 25,6 ± 1,8 ab | 6,1 ± 0,4 bc |
| T9 | 2,8 ± 0,1 a | 30,3 ± 1,3 a | 5,6 ± 0,6 b | 3,8 ± 0,3 abc | 28,0 ± 1,7 a | 6,8 ± 0,3 abc |
| T10 | 2,8 ± 0,2 a | 28,6 ± 1,1 ab | 6,7 ± 0,4 ab | 4,0 ± 0,3 abc | 28,8 ± 1,4 a | 6,9 ± 0,4 abc |
| T11 | 2,4 ± 0,2 a | 28,9 ± 0,6 ab | 6,6 ± 0,4 ab | 4,0 ± 0,2 abc | 32,6 ± 1,8 a | 8,1 ± 0,5 a |
| T12 | 2,6 ± 0,2 a | 29,5 ± 1,7 a | 5,7 ± 0,4 ab | 3,2 ± 0,2 bc | 28,8 ± 1,7 a | 6,8 ± 0,3 abc |

Promedios con letras iguales, en una misma columna, no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p > 0,05$). Los tratamientos evaluados corresponden a los indicados en la Tabla 1 para el experimento 1.

Tabla 5. Contenido de materia seca de la parte aérea, de raíces y contenido de nitrógeno foliar en plantas de *Megathyrsus maximus* inoculadas con cepas de *Bacillus* sp. o *Azotobacter chroococcum* más fertilización nitrogenada.

| Tratamiento | MSA (%) | MSR (%) | Nitrógeno (%) |
|-------------|---------------|---------------|-----------------|
| T1 | 26,4 ± 0,6 a | 54,5 ± 1,3 b | 0,59 ± 0,06 d |
| T2 | 23,7 ± 1,3 ab | 65,1 ± 4,2 ab | 0,76 ± 0,01 d |
| T3 | 21,8 ± 1,1 b | 60,5 ± 5,0 ab | 1,12 ± 0,00 c |
| T4 | 24,7 ± 0,7 ab | 67,9 ± 3,5 ab | 1,36 ± 0,01 abc |
| T5 | 23,9 ± 0,5 ab | 63,2 ± 2,2 ab | 1,31 ± 0,10 abc |
| T6 | 21,9 ± 1,1 b | 69,5 ± 4,3 a | 1,41 ± 0,14 ab |
| T7 | 23,7 ± 0,6 ab | 64,7 ± 1,8 ab | 1,45 ± 0,04 a |
| T8 | 24,0 ± 0,5 ab | 65,7 ± 1,4 ab | 1,24 ± 0,07 abc |
| T9 | 24,7 ± 1,2 ab | 69,4 ± 3,6 a | 1,22 ± 0,05 abc |
| T10 | 23,9 ± 0,5 ab | 59,8 ± 1,8 ab | 1,37 ± 0,10 abc |
| T11 | 25,0 ± 0,6 ab | 61,0 ± 0,9 ab | 1,15 ± 0,10 bc |
| T12 | 23,7 ± 0,7 ab | 56,9 ± 1,0 ab | 1,20 ± 0,17 abc |

Promedios con letras iguales, en una misma columna, no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p > 0,05$). MSA: porcentaje de materia seca de la parte aérea; MSR: porcentaje de materia seca de las raíces. Los tratamientos evaluados corresponden a los indicados en la Tabla 1 para el experimento 1.

nitrogenada y al mayor suministro de agua, evitando la presencia de estrés en la planta, y se expresó en una mayor acumulación de biomasa (Tabla 4).

Materia seca y contenido de nitrógeno (N). Los contenidos de materia seca de la parte aérea presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($F = 2,370$; g.l. = 120; $p = 0,011$). El testigo (T1) presentó valores mayores a los registrados en los tratamientos T3 y T6. En el contenido de materia seca de las raíces se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($F = 2,663$; g.l. error = 120; $p = 0,004$). Los tratamientos T6 y T9 mostraron valores mayores con respecto al

tratamiento T1 (Tabla 5). El contenido de nitrógeno también fue diferente entre tratamientos ($F = 8,303$; g.l. error = 24; $p < 0,0001$). Los tratamientos T4 a T12, que recibieron inoculación y co-inoculaciones dobles y triples en sequía, presentaron mayores concentraciones de nitrógeno (1,2 a 1,45 %) con respecto a los testigos de 100 % CC con y sin fertilización (T1 y T2), siendo 45% superior; en esta variable se presentaron diferencias significativas entre el tratamiento T7 con respecto a los tratamientos T1, T2 y T3, siendo superiores en 59, 48 y 22,8 % respectivamente (Tabla 5).

Porcentaje de plantas turgentes/tratamiento. Se observó que el porcentaje promedio de las cinco evaluaciones de plantas turgentes, fue mayor en los tratamientos T7, T8 y T10 inoculados con las cepas de *Bacillus* sp. en condiciones de estrés hídrico, que las plantas sin inoculación y sometidas al mismo estrés hídrico (T3). El T7 y T10 presentaron los porcentajes promedio más altos, superando al T3 en un 18,1 y 21,8 % respectivamente (Tabla 6 y Figura 1).

Experimento 2. Pasto *Megathyrsus maximus* cv *Tanzania* inoculado con cepas de *Bacillus* sp.

Altura de planta. Para esta variable, en las evaluaciones a los 15 ($F = 0,611$; g.l. error = 108; $p = 0,766$), 22 ($F = 1,530$; g.l. error = 108; $p = 0,155$) y 30 ($F = 1,599$; g.l. error = 108; $p = 0,133$) días después de la emergencia, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. A los 62 días de emergencia se evidenciaron diferencias ($F = 6,760$; g.l. error = 108; $p < 0,0001$). Los tratamientos inoculados (T3 a T9) presentaron mayor

Tabla 6. Porcentaje de plantas turgentes de *Megathyrsus maximus* en las diferentes evaluaciones.

| Tratamiento | Plantas turgentes (%) | | | | | Promedio de las cinco evaluaciones | |
|-------------|---------------------------|------|------|------|------|------------------------------------|-----------------|
| | Evaluación | 1 | 2 | 3 | 4 | | 5 |
| | Días después último riego | 7 | 13 | 7 | 13 | | 13 |
| T1 | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| T2 | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| T3 | | 0 | 0 | 18,2 | 0 | 9,1 | 5,5 ± 3,6 d |
| T4 | | 18,2 | 0 | 18,2 | 18,2 | 27,3 | 16,4 ± 4,5 abcd |
| T5 | | 27,3 | 0 | 18,2 | 9,1 | 18,2 | 14,6 ± 4,6 abcd |
| T6 | | 18,2 | 0 | 27,3 | 0 | 18,2 | 12,7 ± 5,5 bcd |
| T7 | | 36,4 | 9,1 | 27,3 | 9,1 | 36,4 | 23,6 ± 6,2 ab |
| T8 | | 27,3 | 18,2 | 27,3 | 18,2 | 18,2 | 21,8 ± 2,2 abc |
| T9 | | 18,2 | 0 | 27,3 | 9,1 | 18,2 | 14,6 ± 4,6 abcd |
| T10 | | 45,5 | 9,1 | 36,4 | 18,2 | 27,3 | 27,3 ± 6,4 a |
| T11 | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| T12 | | 9,1 | 0 | 9,1 | 9,1 | 18,2 | 9,1 ± 2,9 cd |

Promedios con letras iguales, en la última columna, no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p > 0,05$). Los tratamientos evaluados corresponden a los indicados en la Tabla 1 para el experimento 1; la secuencia de riego se explica en materiales y métodos.

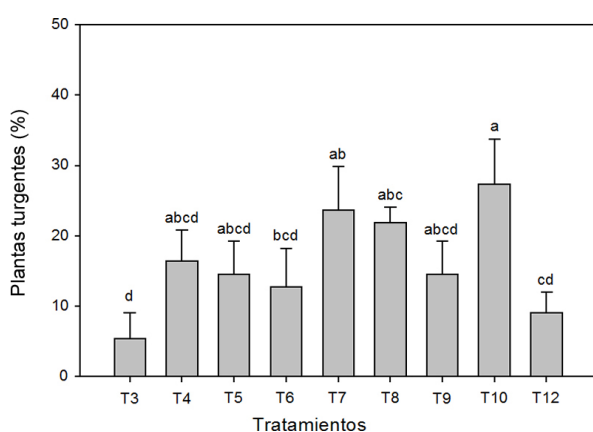


Figura 1. Porcentaje de plantas turgentes por tratamiento en cinco evaluaciones. Los valores corresponden a la media ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) obtenidos usando la prueba HSD-Tukey. Los tratamientos T1, T2 y T11 no se sometieron a estrés hídrico por ende no se tuvieron en cuenta en la prueba de comparación de medias. Los tratamientos evaluados corresponden a los indicados en la Tabla 1 para el experimento 1.

altura de planta que el tratamiento T2 (Tabla 7).

Número de macollas por planta. El número de macollas por planta no mostró diferencias significativas ($F = 0,615$; g.l. error = 108; $p = 0,763$) entre los tratamientos (Tabla 8).

Longitud de raíz. Esta variable estuvo influenciada por los tratamientos ($F = 3,945$; g.l. error = 108; $p < 0,0001$). Los tratamientos inoculados y los testigos con el 100 % CC presentaron mayor longitud de las raíces que el tratamiento T2; las mayores expresiones se obtuvieron en los trata-

mientos T8 y T4 con aumentos del 25 y 22 % con relación al T2 (Tabla 8).

Peso fresco y seco de las raíces. Tanto el peso fresco ($F = 7,556$; g.l. error = 108; $p < 0,0001$) como el peso seco ($F = 7,873$; g.l. error = 108; $p < 0,0001$) de las raíces presentaron diferencias significativas entre tratamientos. El tratamiento T1 superó a los otros tratamientos en ambas variables (Tabla 8).

Peso fresco y seco de la parte aérea. En la variable peso fresco de la parte aérea se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($F = 3,129$; g.l. error = 108; $p = 0,003$); siendo el T1 superior a los tratamientos T2, T4, T8 y T9. El peso seco de la parte aérea también presentó diferencias significativas ($F = 6,324$; g.l. error = 108; $p < 0,0001$) siendo superior en el tratamiento T1 (Testigo 100 % CC) con respecto de los otros tratamientos (Tabla 8).

Porcentaje de materia seca y contenido de nitrógeno (N). Los porcentajes de materia seca de la parte aérea difirieron entre tratamientos ($F = 2,71$; g.l. error = 108; $p = 0,009$). Los tratamientos T6 y T9 presentaron valores inferiores a los otros tratamientos (Tabla 9). Por su parte, el porcentaje de materia seca de las raíces fue similar ($F = 0,934$; g.l. error = 108; $p = 0,490$) entre tratamientos (Tabla 9). El contenido de nitrógeno foliar difirió entre tratamientos ($F = 3,178$; g.l. error = 18; $p = 0,019$); siendo en el tratamiento T2 mayor que en los tratamientos T1, T4, T8 y T9.

Tabla 7. Valores medios y errores estándar de cuatro evaluaciones de altura de planta de *Megathyrsus maximus* inoculado con cepas de *Bacillus* sp. sin fertilización nitrogenada.

| Tratamiento | Altura de planta (cm) | | | |
|-------------|-----------------------|------------|------------|--------------|
| | 15 DDE | 22 DDE | 30 DDE | 62 DDE |
| T1 | 30,9 ± 1,2 | 48,3 ± 2,1 | 70,0 ± 1,5 | 82,4 ± 3,3 a |
| T2 | 29,3 ± 1,3 | 47,8 ± 2,4 | 67,0 ± 2,7 | 50,8 ± 3,2 b |
| T3 | 31,0 ± 1,6 | 52,3 ± 2,2 | 78,9 ± 2,3 | 71,1 ± 3,2 a |
| T4 | 31,3 ± 1,5 | 50,8 ± 1,7 | 75,0 ± 3,1 | 78,3 ± 4,2 a |
| T5 | 31,7 ± 1,8 | 50,4 ± 2,0 | 72,8 ± 3,4 | 69,7 ± 3,3 a |
| T6 | 30,4 ± 0,9 | 52,8 ± 1,2 | 77,0 ± 2,9 | 75,7 ± 3,0 a |
| T7 | 31,5 ± 0,7 | 53,9 ± 1,7 | 74,3 ± 2,2 | 69,0 ± 3,4 a |
| T8 | 33,1 ± 1,5 | 53,3 ± 1,7 | 77,0 ± 3,7 | 68,3 ± 4,0 a |
| T9 | 30,4 ± 1,6 | 55,3 ± 1,9 | 75,2 ± 1,9 | 78,3 ± 3,0 a |

Las columnas en las que no se indican letras corresponden a diferencias no significativas entre promedios de tratamientos. Promedios con letras iguales, en una misma columna, no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p > 0,05$). Los tratamientos evaluados corresponden a los indicados en la Tabla 1 para el experimento 2.

Tabla 8. Valores medios y errores estándar de seis características morfológicas de *Megathyrsus maximus* inoculado con cepas de *Bacillus* sp. sin fertilización nitrogenada.

| Tratamiento | Macollas/Planta | Longitud de raíz (cm) | Peso fresco de raíz (g) | Peso seco de raíz (g) | Peso fresco de parte aérea (g) | Peso seco de parte aérea (g) |
|-------------|-----------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------------|------------------------------|
| T1 | 1,6 ± 0,3 a | 28,6 ± 1,1 a | 9,5 ± 0,6 a | 5,4 ± 0,3 a | 23,5 ± 1,4 a | 6,5 ± 0,4 a |
| T2 | 1,5 ± 0,2 a | 23,5 ± 0,8 b | 5,5 ± 0,7 b | 3,4 ± 0,4 b | 18,2 ± 1,4 b | 4,5 ± 0,3 b |
| T3 | 1,9 ± 0,2 a | 29,0 ± 1,1 a | 4,5 ± 0,3 b | 2,7 ± 0,2 b | 19,4 ± 1,0 ab | 5,0 ± 0,3 b |
| T4 | 1,6 ± 0,3 a | 30,1 ± 1,4 a | 4,9 ± 1,0 b | 2,7 ± 0,4 b | 16,5 ± 0,8 b | 4,2 ± 0,2 b |
| T5 | 2,0 ± 0,3 a | 28,9 ± 0,8 a | 5,5 ± 0,5 b | 3,3 ± 0,3 b | 18,6 ± 1,2 ab | 4,7 ± 0,3 b |
| T6 | 1,8 ± 0,3 a | 28,9 ± 0,8 a | 4,6 ± 0,4 b | 2,8 ± 0,3 b | 18,8 ± 1,1 ab | 4,5 ± 0,3 b |
| T7 | 1,8 ± 0,2 a | 29,9 ± 0,7 a | 4,8 ± 0,4 b | 2,9 ± 0,2 b | 19,3 ± 1,1 ab | 4,8 ± 0,3 b |
| T8 | 1,8 ± 0,2 a | 31,5 ± 1,7 a | 5,0 ± 0,4 b | 2,9 ± 0,3 b | 17,2 ± 1,1 b | 4,3 ± 0,3 b |
| T9 | 1,7 ± 0,3 a | 29,2 ± 1,2 a | 4,6 ± 0,3 b | 2,7 ± 0,2 b | 18,5 ± 0,9 b | 4,5 ± 0,2 b |

Promedios con letras iguales, en una misma columna, no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p > 0,05$). Los tratamientos evaluados corresponden a los indicados en la Tabla 1 para el experimento 2.

Tabla 9. Porcentajes de materia seca de la parte aérea, de raíces y nitrógeno foliar en plantas de *Megathyrsus maximus* inoculadas con cepas de *Bacillus* sp. sin fertilización nitrogenada.

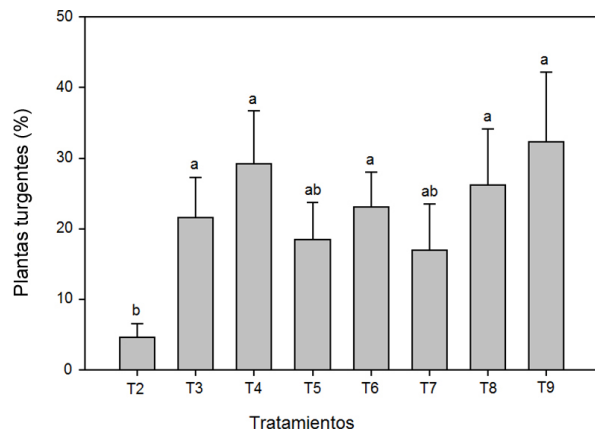
| Tratamiento | MSA (%) | MSR (%) | Nitrógeno (%) |
|-------------|---------------|--------------|----------------|
| T1 | 27,9 ± 0,5 a | 57,2 ± 1,2 a | 0,74 ± 0,02 cd |
| T2 | 25,4 ± 1,0 ab | 61,0 ± 1,4 a | 1,07 ± 0,16 a |
| T3 | 25,9 ± 0,5 a | 61,2 ± 2,1 a | 0,96 ± 0,08 ab |
| T4 | 25,9 ± 0,7 a | 57,6 ± 2,0 a | 0,90 ± 0,05 bc |
| T5 | 25,2 ± 0,5 a | 58,7 ± 1,3 a | 0,96 ± 0,03 ab |
| T6 | 23,9 ± 1,0 b | 60,9 ± 3,6 a | 1,01 ± 0,02 ab |
| T7 | 24,8 ± 0,6 a | 59,5 ± 1,0 a | 0,90 ± 0,06 ab |
| T8 | 25,0 ± 0,5 a | 57,2 ± 1,1 a | 0,77 ± 0,09 bc |
| T9 | 24,4 ± 0,6 b | 58,7 ± 1,1 a | 0,71 ± 0,04 d |

Promedios con letras iguales, en una misma columna, no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p > 0,05$). MSA: porcentaje de materia seca de la parte aérea; MSR: porcentaje de materia seca de las raíces. Los tratamientos evaluados corresponden a los indicados en la Tabla 1 para el experimento 2.

Porcentaje de plantas turgentes/tratamiento.

El porcentaje de plantas turgentes, fue mayor ($p < 0,05$) en los tratamientos T3, T4, T6, T8 y T9 inoculados con las cepas de *Bacillus* sp. en con-

diciones de estrés hídrico que en plantas sin inoculación y sometidas al mismo estrés (T2). Los tratamientos T4 y T9 presentaron los porcentajes más altos, superando al T2 en un 24,6 y 27,7 % respectivamente (Figura 2 y Tabla 10).

**Figura 2.** Porcentaje de plantas turgentes por tratamiento en cinco evaluaciones. Los valores corresponden a la media ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) obtenidos usando la prueba HSD-Tukey. El tratamiento T1 no se sometió a estrés hídrico por ende no se tuvo en cuenta en

la prueba de comparación de medias. Los tratamientos evaluados corresponden a los indicados en la Tabla 1 para el experimento 2.

Discusión y conclusiones

Diversas especies de *Bacillus* han sido reconocidas por su capacidad para mejorar la disponibilidad de nutrientes en diferentes cultivos agrícolas y forestales (Umashankar *et al.*, 2012). Además, su habilidad para colonizar la rizósfera 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 y 10^6 UFC/g de suelo (Kumar *et al.*, 2011).

En el experimento 1 y 2, en la variable altura de planta no se observaron diferencias significativas, a los 15, 22 y 30 días después de la emergencia, pero sí se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos a los 62 días. Estos resultados son similares a los reportados por Kavamura *et al.* (2013) en plantas de maíz inoculadas con cepas de *Bacillus* obteniendo un aumento de 17 % en la longitud del tallo. En esta misma variable, Nautiyal *et al.* (2013) encontraron un incremento de 27 % en la altura de las plantas de arroz inoculadas con el mismo microorganismo. Probablemente como lo mencionan Van de Poel y Van der Straeten (2014), la producción de ACC desaminasa de origen bacteriano, puede incorporarse en la ruta de producción de etileno, captar el aminoácido ACC (precursor del etileno) y disminuir

los niveles de esta hormona, lo cual propicia una mayor tolerancia en las plantas a estas condiciones adversas como lo es el estrés hídrico. Esto mismo lo confirma Ali *et al.* (2014). Las bacterias pueden afectar el crecimiento y desarrollo vegetal a través de la síntesis de sustancias fitoestimuladoras (auxinas, citocininas, ácido indolacético, etc.) y excreción de compuestos orgánicos volátiles (acetoina, compuestos azufrados, etc.) (Hernández-León *et al.*, 2015). Kizilkaya (2008) encontró que la inoculación con *A. chroococcum* RK49 en trigo da lugar a una mejora en el rendimiento del grano comparado con el control.

La longitud de las raíces se vio favorecida en los dos ensayos por la inoculación de cepas de *Bacillus* sp. en condiciones de estrés hídrico. De la misma forma que en altura de planta, el efecto promotor se puede atribuir a la producción de fitohormonas por parte de las cepas inoculadas (Mangmang *et al.*, 2015). La promoción de crecimiento es uno de los principales factores por los cuales se evalúa el efecto benéfico de las distintas PGPR. En este sentido, la producción bacteriana de AIA y la alta sensibilidad de las raíces a dicha hormona sería fundamental en la respuesta a la inoculación. Bacterias que secretan bajos niveles de AIA (10^{-9} a 10^{-12} M) estimularían la elongación de raíces, mientras que bacterias altamente productoras de auxinas promoverían la formación de raíces laterales o el desarrollo de pelos absorbentes (Glick *et al.*, 1999).

La longitud de las raíces de las plantas inoculadas con las cepas de *Bacillus* fue mayor en un 23 % con respecto a las plantas no inoculadas, estos resultados son similares a los obtenidos por Nautiyal *et al.* (2013) quienes registraron un aumento

Tabla 10. Porcentaje de plantas turgentes en los diferentes periodos de evaluación.

| | Evaluación | Plantas turgentes (%) | | | | | Promedio de las cinco evaluaciones |
|--------------------|---------------------------|-----------------------|------|------|------|------|------------------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| | Días después último riego | 7 | 13 | 7 | 13 | 13 | |
| Tratamiento | | | | | | | |
| T1 | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| T2 | | 7,7 | 0 | 7,7 | 0 | 7,7 | 4,6 ± 1,9 b |
| T3 | | 38,5 | 15,4 | 30,8 | 15,4 | 7,7 | 21,6 ± 5,7 a |
| T4 | | 53,8 | 23,1 | 30,8 | 30,8 | 7,7 | 29,2 ± 7,4 a |
| T5 | | 30,8 | 0 | 23,1 | 15,4 | 23,1 | 18,5 ± 5,1 ab |
| T6 | | 38,5 | 15,4 | 30,8 | 15,4 | 15,4 | 23,1 ± 4,9 a |
| T7 | | 38,5 | 0 | 23,1 | 15,4 | 7,7 | 16,9 ± 6,6 ab |
| T8 | | 53,8 | 23,1 | 30,8 | 15,4 | 7,7 | 26,2 ± 7,9 a |
| T9 | | 69,2 | 30,8 | 30,8 | 15,4 | 15,4 | 32,3 ± 9,8 a |

Promedios con letras iguales, en la última columna, no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($p > 0,05$). Los tratamientos evaluados corresponden a los indicados en la Tabla 1 para el experimento 2; la secuencia de riego se explica en materiales y métodos.

del 73 % en la longitud de las raíces en plantas de arroz inoculadas con cepas de *Bacillus* bajo condiciones de salinidad. Goswami *et al.* (2014) también encontraron incrementos en el desarrollo de las plantas bajo condiciones de salinidad al emplear una cepa de *B. licheniformis* como inoculante, pero en un menor porcentaje, con un 24 % de incremento en la longitud total de la planta, y un 17 % en la longitud de raíces. Lim y Kim (2013) reportaron en plantas de pimiento inoculadas con *B. licheniformis* y bajo estrés por sequía, mayor longitud de las raíces, y tasa de supervivencia de aproximadamente 80 % a los 15 días después de la inoculación en condiciones de estrés por sequía, mientras que ninguna de las plantas testigos sobrevivieron.

En el experimento 1 en las variables peso fresco y seco de las raíces hubo una respuesta a la aplicación de nitrógeno mas no a la inoculación con las bacterias, debido posiblemente al suministro adecuado de agua, con el cual las plantas mantuvieron una mayor asimilación de nutrientes.

El contenido de nitrógeno en el experimento 1 fue mayor en los tratamientos con inoculación más la fertilización nitrogenada, posiblemente por la capacidad de las bacterias de mejorar la absorción de nutrientes por parte de la planta. Caso contrario se observó en el experimento 2 (sin fertilización) donde el contenido de nitrógeno no se vio afectado por la inoculación de las plantas con las cepas de *Bacillus*. Sánchez *et al.* (2016) reportaron que no hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido foliar de N, P, K, Ca y Na en plantas *Pennisetum clandestinum* inoculadas con cepas de *Bacillus* en condiciones de estrés salino. Según Guzmán *et al.* (2012) *Azotobacter* sp. es una bacteria fijadora de N_2 de vida libre que ha demostrado tener efectos beneficiosos en el rendimiento de diversos cultivos.

La mayor absorción de N y asimilación por parte de las PGPR no sólo se debe a su capacidad de fijación de nitrógeno; Parra-Cota *et al.* (2014) encontraron que, además de la fijación de N_2 , las cepas de *Burkholderia* aumentaron la expresión del transportador de nitrato NRT1 en plantas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.).

La mayor concentración de N foliar puede explicarse por el hecho de que algunas especies de *Bacillus*, por ejemplo, *B. sphaericus*, son bacterias diazotróficas capaces de aumentar la absorción de N derivado de la fijación biológica de N_2 (Zakry *et al.*, 2012), aunque, en el experimento 2, las ce-

pas sin adición de fertilización inorgánica (urea) no aumentaron el contenido de nitrógeno en las plantas.

El aumento de N en el experimento 1 se puede atribuir a la actividad de la enzima ureasa, que está implicado en el ciclo del nitrógeno. Las bacterias del género *Bacillus* son reportadas por tener una mayor capacidad de producir este tipo de enzima. Según Mengual *et al.* (2014) la concentración de ureasa en la rizósfera de *Levandula dentata* mostró un aumento al inocular con *Bacillus* sp. combinado con fertilización orgánica, superando al testigo sin inoculación en un 43 % y en un 28 % al tratamiento inoculado sin fertilización.

Según Ramírez-Elías *et al.* (2014) bajo ciertas circunstancias, la cantidad de nitrógeno fijado por estos microorganismos puede ser significativa, pero no explica por si misma el incremento del crecimiento de las plantas.

Porcentaje de plantas turgentes/tratamiento. El efecto de *Bacillus* en la prolongación de la turgencia de la planta, fue evidente en los dos experimentos, si bien los valores de plantas turgentes en el ensayo 2 (sin fertilización nitrogenada) fueron mayores que en el experimento 1. Probablemente como lo reporta Salomón *et al.* (2014) en condiciones de escasez de agua, algunas PGPR pueden aumentar el contenido de ABA de las plantas hospedera y por lo tanto reducir la pérdida de agua. Más recientemente, Fan *et al.* (2015) encontraron que *Burkholderia* sp. LD-11 puede aumentar la sensibilidad de las plantas de maíz (*Zea mays* L.) al ABA. Sin embargo el papel del ABA en la acción PGPR todavía no se entiende bien, por lo que son necesarias más investigaciones. Liu *et al.* (2013) encontraron que una cepa de *B. subtilis* que producen citoquinina disminuye el contenido de ABA de la planta hospedera en condiciones óptimas de riego, para aumentar la apertura de las estomas y la tasa de fotosíntesis. Sin embargo, bajo condiciones de escasez de agua, los niveles de ABA aumentan y la conductancia estomática es menor que la de las plantas no inoculadas, previniendo la pérdida de agua.

Otro efecto importante de las PGPR en la inoculación de las plantas en condiciones de estrés abiótico es la mejora del estado hídrico de las hojas, especialmente en condiciones de sequía y estrés salino (Naveed *et al.*, 2014). Para mantener un estado constante de agua bajo condiciones de estrés, las plantas necesitan equilibrar la pérdida de agua por las hojas (que está regulado principalmente

por la apertura de los estomas) y el agua absorbida por las raíces. En otros estudios, la tasa de transpiración de las hojas apenas cambió después de la inoculación con PGPR, pero se incrementó el crecimiento (Stefan *et al.*, 2013). Por lo tanto, las plantas inoculadas con PGPR tienden a tener valores más altos de eficiencia en el uso de agua, es decir en la relación entre la ganancia en peso en seco y el agua consumida (Stefan *et al.*, 2013; Naveed *et al.*, 2014). Este rasgo interesante podría ser explotado para hacer más eficientes los sistemas de producción ganaderos.

Se sabe que todos los microorganismos necesitan agua para mantener sus actividades fisiológicas y hasta la fecha ningún organismo tiene desarrollado la capacidad de sobrevivir sin agua (Potts, 1994). El valor de la actividad de agua (A_w) que inhibe cualquier actividad celular depende de cada organismo (Connon *et al.*, 2007). Para las bacterias, los valores mínimos de A_w , donde se puede observar el crecimiento, se definen: $0.900A_w$ (para un gran porcentaje de bacterias) y algunas archaeobacterias puede crecer hasta $0.750A_w$ (Grant, 2004).

Así, en el presente estudio, las bacterias inoculadas con una reducción de la disponibilidad de agua pueden ser consideradas como xerotolerantes, debido a la capacidad de las cepas de *Bacillus* de mantener la turgencia en las plantas por mayor tiempo. Por lo tanto, una inicial selección de microorganismos sobre la base de su capacidad para crecer en medio con una reducción de la disponibilidad de agua, es muy relevante, específicamente para zonas secas como la Región Caribe Colombiana.

Las cepas de *Bacillus* sp. mostraron un efecto positivo en la reducción del estrés hídrico en la planta. Lo cual puede atribuirse a la capacidad de este género de bacterias de formar endospora, que permiten que las bacterias prosperen en condiciones ambientales desfavorables tales como calor, radiación, deshidratación e inanición (Nicholson *et al.*, 2000).

Sarma y Saikia (2014) demostraron que una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* mejoró el crecimiento de plantas *Vigna radiata* en condiciones de sequía y también aumentó la actividad de varias enzimas antioxidantes.

Otro factor que regula el estado hídrico de la planta es la capacidad de absorber agua por las raíces. Marulanda *et al.* (2010) demostraron que la inoculación con una cepa de *B. megaterium*

aumentó la capacidad de las raíces de plantas de maíz para absorber el agua en condiciones de estrés salino. Este aumento en la capacidad de absorción se asoció con la mayor abundancia de algunas acuaporinas plasma-membrana (proteínas de membrana implicados en el transporte de agua a través de las membranas celulares) producto de la expresión de genes y proteínas (Li *et al.*, 2014). Más recientemente, Gond *et al.* (2015) también observaron un aumento en la expresión de los genes de acuaporina en las raíces de las plantas de maíz inoculadas con *Pantoea agglomerans* en condiciones de salinidad.

Otros mecanismos han sido descritos en los apartados anteriores, tales como la regulación de los cambios hormonales o mejoras en la adquisición de nutrientes. Debe tenerse en cuenta que todos los mecanismos están interconectados, y todos participan en cierta medida, en la promoción del crecimiento y la tolerancia al estrés abiótico conferida por las PGPR (Zhu y Gong, 2014).

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que las cepas de *Bacillus* XT13, XT14 y XT38 pueden tolerar condiciones de estrés por sequía y a su vez promover el crecimiento de la parte aérea y radicular al aumentar la tolerancia de las plantas de *M. maximus* en condiciones de estrés hídrico. Es por ello que resulta recomendable realizar evaluaciones en condiciones de campo, con el fin de comprobar el efecto positivo bajo estas condiciones. La inoculación con *A. chroococcum* (Monibac®) ejerció acción benéfica sobre el crecimiento del pasto guinea incrementando significativamente la longitud de la parte aérea y de las raíces, con respecto al testigo no inoculado, lo que le confiere al inoculante un potencial de uso en el pasto guinea.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Colombia (MADR) y hace parte de la red de ganadería y especies menores de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-CORPOICA.

Referencias bibliográficas

Ali S., Charles T.C., Glick B.R. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry* 80:160-167.

- Connon SA., Lester ED., Shafaat HS., Obenhuber DC., Ponce A. (2007). Bacterial diversity in hyperarid Atacama Desert soils. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 112: 1-9.
- Coronel A. (2013). Sequía: concepto e índices de monitoreo. Propuesta de un nuevo índice. *Revista Agromensajes* 37: 1-4.
- CORPOICA y Fondo Adaptación. (2015). Producto 1: Caracterización de la variabilidad climática y zonificación de la susceptibilidad territorial a los eventos climáticos extremos. Departamento del Cesar. En: Sistema experto, <http://www.corpoica.org.co/site-mapa/>, consulta: febrero 2017.
- DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas. (2016). Boletín Técnico. Encuesta Nacional Agropecuaria ENA 2016. En: <http://www.dane.gov.co/index.php/agropecuario/encuesta-nacional-agropecuaria>, consulta: julio 2016.
- Díaz-García A., García-Riaño J., Zapata-Narvaez J. (2015). Improvement of sporulation conditions of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* in liquid fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 6: 302-310.
- Fan X.W., Hu H.Y., Huang G.Y., Huang F.Y., Li Y.Z., Palta J. (2015). Soil inoculation with *Burkholderia* sp. LD-11 has positive effect on water-use efficiency in inbred lines of maize. *Plant and Soil* 390: 337-349.
- Glick B.R., Patten C.L., Holguin G., Penrose D.M. (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial. College press, Gran Bretaña.
- Gond S.K., Torres M.S., Bergen M.S., Hessel Z., White J.F. (2015). Induction of salt tolerance and up-regulation of aquaporin genes in tropical corn by rhizobacterium *Pantoea agglomerans*. *Journal of Applied Microbiology* 60: 392-399.
- Goswami D., Dhandhukia P., Patel P., Thakker J. (2014). Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiological Research* 169 (1): 66-75.
- Grant WD. (2004). Life at low water activity. *Philosophical Transactions. The Royal Society B: Biological Sciences* 359: 1249-1267.
- Guzmán A., Obando D., Rivera D. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Revista Colombiana de Biotecnología* 14 (1): 182-190.
- Helrich K. (1990). Official methods of analysis. Association of Official Agricultural Chemistry (AOAC). Arlington, VA Washington, EE.UU.
- Hernández-León R., Rojas-Solís D., Contreras-Pérez M., Orozco-Mosqueda M.C., Macías-Rodríguez L. I., Reyes-de la Cruz H., Valencia-Cantero E., Santoyo G. (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control* 81: 83-92.
- IBM Corporation (2013). IBM SPSS Statistics for Windows, versión 22.0. En: <https://www.ibm.com/analytics/co/es/technology/spss/>.
- IDEAM y CORPOCESAR. (2007). Plan de acción regional (par) para la lucha contra la desertificación y la sequía en el departamento del Cesar, con énfasis en la región del río Cesar. Convenio 172 de 2004. En: <https://es.scribd.com/document/49865134/260510-Plan-accion-desertif-Cesar>, consulta: octubre 2016.
- Kavamura V., Nobre S., Da Silva J., Parma M., Aparecida L., Visconi A., Domingues T., Gouvea R., Dini F., Soares I. (2013). Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological Research* 168: 183-191.
- Kizilkaya R. (2008). Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *Ecological Engineering* 33 (2): 150-156.
- Kumar A., Prakash A., Johri B.N. (2011). *Bacillus* as PGPR in crop Ecosystem. En: *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Maheshwari D.K. (Ed.). Springer. Alemania. Pp. 37-59.
- Li G.W., Santoni V., Maurel C. (2014). Plant aquaporins: roles in plant physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840: 1574-1582.
- Lim J.H., Kim S.D. (2013). Induction of drought stress resistance by multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in pepper plant. *The Plant Pathology Journal* 29: 201-208.
- Liu F.C., Xing S.J., Ma H.L., Du Z.Y., Ma B.Y. (2013). Cytokinin-producing, plantgrowth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platyclusus orientalis* container seedlings. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 9155-9164.
- Loredo-Osti C., López-Reyes L., Espinosa-Victoria D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. *Terra Latinoamericana* 22 (2): 225-239.
- Lugtenberg B.J.J., Malfanova N., Kamilova F., Berg G. (2013). Plant growth promotion by microbes. En: *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*. De Bruijin F.J. (Ed.) Wiley Blackwell, EE.UU. Pp. 561-573.
- MADR y CCI. (2010). Sistema de información de la oferta agropecuaria, forestal, pesquera y acuícola. En: Encuesta Nacional Agropecuaria-ENA-2010, https://formularios.dane.gov.co/Anda_4_1/index.php/catalog/133, consulta: octubre 2016.
- Mangmang J.S., Deaker R., Rogers G. (2015). Germination characteristics of cucumber influenced by plant growth promoting Rhizobacteria. *International Journal of Vegetable Science* 22: 66-75.
- Marulanda A., Azcón R., Chaumont F., Ruiz-Lozano J.M., Aroca R. (2010). Regulation of plasma mem-

- brane aquaporins by inoculation with a *Bacillus megaterium* strain in maize (*Zea mays* L.) plants under unstressed and salt-stressed conditions. *Planta* 232: 533-543.
- Mengual C., Schoebitz M., Azcón R., Roldán A. (2014). Microbial inoculants and organic amendment improves plant establishment and soil rehabilitation under semiarid conditions. *Journal of Environmental Management* 134: 1-7.
- Moreno-Galván A., Rojas-Tapias D., Bonilla R. (2011). Sequential statistical design application in identification of *Azotobacter chroococcum* AC1 nutritional sources. *Revista CORPOICA* 11: 151-158.
- Murgueitio E., Cuartas C., Naranjo J. (2009). Ganadería del futuro investigación para el desarrollo. CIPAV, Colombia.
- NEMI. National Environmental Methods Index. (1978). Nitrogen, Kjeldahl Total (Colorimetric; Titrimetric; Potentiometric). En: https://www.nemi.gov/methods/method_summary/5401/, consulta: octubre de 2014.
- Nautiyal C., Srivastava S., Singh P., Seem K., Mishra A., Kumar S. (2013). Plant growth promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 66: 1-9.
- Naveed M., Hussain M.B., Zahir Z.A., Mitter B., Sessitsch A. (2014). Drought stress amelioration in wheat through inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Plant Growth Regulation* 73: 121-131.
- Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G., Melosh H.J., Setlow P. (2000). Resistance of bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (3): 548-572.
- Ojeda L., Toledo L., Hernández C., Machado Y., Furrzola E. (2016). Influencia de la aplicación de *Azospirillum lipoferum* en *Megathyrsus maximus* vc. guinea tobiatá en un suelo Pardo Grisáceo. *Pastos y Forrajes* 39: 27-32.
- Parra-Cota J.J., Peña-Cabriales S.S., Santos-Villalobos N.A., Martínez-Gallardo J.P., Délano-Frier J.P. (2014). *Burkholderia ambifaria* and *B. caribensis* promote growth and increase yield in grain amaranth (*Amaranthus cruentus* and *A. hypochondriacus*) by improving plant nitrogen uptake. *PloS One* 9 (2): 88-94.
- Pizarro C., García H. (2014). El Bosque Seco Tropical en Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt (IAvH), Colombia.
- Potts F.M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews* 58 (4): 755-805.
- Ramírez-Elías M.A., Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Almaráz J.J., Ramírez-Valverde G., de-Bashan Luz E. (2014). Identification of culturable microbial functional groups isolated from the rhizosphere of four species of mangroves and their biotechnological potential. *Applied Soil Ecology* 82 (1): 1-10.
- Richards L.A. (1947). Pressure membrane apparatus, construction and use. *Agricultural Engineering* 28: 451-454.
- Rueda-Puente E.O., Ortega-García J., Barrón-Hoyos J.M., López-Elías J., Murillo-Amador B., Hernández-Montiel L.G. (2015). Los fertilizantes biológicos en la agricultura. *Invumus* 10 (1): 10-17.
- Saharan B.S., Nehra V. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research* 21 (1): 1-30.
- Salomón M.V., Bottini R., de Souza G.A., Cohen A.C., Moreno D., Gil M., Piccoli P. (2014). Bacterial isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in vitro cultured grapevine. *Physiologia Plantarum* 151: 359-374.
- Sánchez D., Pérez J., David H. (2016). Efecto de las PGPB sobre el crecimiento de *Pennisetum clandestinum* bajo condiciones de estrés salino. *Revista Colombiana de Biotecnología* 18: 65-72.
- Sarma R.K., Saikia R.R. (2014). Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21. *Plant and Soil* 377: 111-126.
- Stefan M., Munteanu N., Stoleru V., Mihasan M., Hritcu L. (2013). Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Scientia Horticulturae* 151: 22-29.
- Torriente D. (2010). Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. *Perspectivas de su uso en Cuba. Cultivos Tropicales* 31 (1): 1-19.
- Umashankar N., Venkatesha M.P., Krishnamurthy R., Raveendra H.R., Satish K.M. (2012). Effect of microbial inoculants on the growth of silver Oak (*Grevellea robusta*) in nursery condition. *International Journal of Environmental Science and Development* 3 (1): 72-76.
- Van de Poel B., Van der Straeten D. (2014). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! *Frontiers in Plant Science* 5: 1-11.
- Zakry F.A.A., Shamsuddin Z.H., Rahim K.A., Zakaria Z.Z., Rahim A.A. (2012). Inoculation of *Bacillus sphaericus* UPMB-10 to young oil palm and measurement of its uptake of fixed nitrogen using the N-15 isotope Dilution Technique. *Microbes and Environment* 27: 257-262.
- Zhu Y.X., Gong H.J. (2014). Beneficial effects of silicon on salt and drought tolerance in plants. *Agro-nomy for Sustainable Development* 34: 455-472.