

Efecto de enterobacterias en el desarrollo vegetativo de *Zea mays* en invernadero

The enterobacteriaceae effect in the vegetative development of corn (*Zea mays*) in greenhouse

Fiorella Hernández¹; Kattia Velásquez²; Carmen Carreño³; Herry Lloclla⁴; César Estela⁵; Carlos Altamirano⁶.

Universidad César Vallejo⁴ – Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo^{1,2,3,5,6}
Chiclayo-Perú

Recibido: 14 de noviembre de 2014

Aceptado: 08 de diciembre de 2014

Resumen

La presente investigación se desarrolló con el objetivo de determinar el efecto de enterobacterias nativas en el desarrollo vegetativo de *Zea mays* L. "maíz" amarillo duro híbrido, en condiciones de invernadero, como una alternativa para disminuir el uso de fertilizantes químicos. Se investigaron 100 enterobacterias previamente aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a cultivos de maíz y caracterizadas *in vitro* como promotoras del crecimiento de plantas. En laboratorio las enterobacterias nativas sintetizaron 0,62 – 52,90 ppm de ácido indolacético, fijaron nitrógeno, cuantificándose 1,03 – 30,21 ppm de amonio y solubilizaron 1,00 – 4,05 ppm de fosfato. Con las bacterias cultivadas en agar nutritivo a 30°C, por 24 horas, se obtuvo una suspensión en solución salina esterilizada NaCl 0,85% p/v, cuya concentración se estandarizó por espectrofotometría (600 nm) y placa vertida a $9,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ y se inoculó en semillas (307,69 mL Kg⁻¹) de maíz amarillo duro híbrido simple. A los 7 días se determinó el porcentaje de emergencia. A los 10, 30 y

50 días se midió la altura y a los 50 días se extrajeron las plantas y se determinó el peso de la biomasa seca radicular y aérea. Las enterobacterias incrementaron la altura (IE= 0,3 – 25,6%), el peso de la biomasa radicular (IE= 2,7 – 129,7%) y aérea (IE= 0,9 – 89,3%) de plantas de maíz, destacando *Enterobacter* spp.87, 62 y 11, *Klebsiella* sp.85, *Pantoea* sp.6 y *Serratia* spp.46 y 84. Se demostró el potencial de las bacterias para incrementar el desarrollo vegetativo de maíz en invernadero.

Palabras claves: Enterobacterias, inoculación, desarrollo vegetativo, *Zea mays*

Abstract

This research was developed with the aim of determining the effect of native enterobacteriaceae in the vegetative development of *Zea mays* L (corn). The yellow "corn", under greenhouse conditions as an alternative to reduce the use of chemical fertilizers. 100 enterobacteriaceae were investigated, they were isolated from the rhizosphere of weed associated with the corn crops and characterized *in vitro* as plants growth promoters. In the laboratory, the native enterobacteriaceae were quantified to

¹Lic. en Biología, Microbiología y Parasitología – U. N. Pedro Ruiz Gallo, fiorellanhp@hotmail.com

²Lic. en Biología, Microbiología y Parasitología – U. N. Pedro Ruiz Gallo, Analista de microbiología, catmi_29@hotmail.com

³M.Sc. Microbiología, Dra. Ciencias Biológicas, Docente Facultad Ciencias Biológicas. U.N. Pedro Ruiz Gallo, crcf1@hotmail.com

⁴M.Sc. Ing. Ambiental, Universidad César Vallejo, hllloclla@ucv.edu.pe

⁵Dr. Profesor principal-Departamento de Botánica. Facultad Biológicas. U.N. Pedro Ruiz Gallo, cebotanica@hotmail.com

⁶Lic. Biología. Investigador Laboratorio Microbiología y Parasitología. U.N. Pedro Ruiz Gallo, altamiranocham@hotmail.com

1,03 – 30,21 ppm of fixed nitrogen as ammonia; 1,03 – 30,21 ppm indole acetic acid and 1,00 – 4,05 ppm solubilized phosphorus. These enterobacteriaceae were grown with nutrient agar at 30° C for 24 hours, it obtained a dilution was made into sterile saline 0.85% NaCl w/v, which concentration was standardized by spectrophotometry (600 nm) and poured plate to $9,0 \times 10^8$ CFU mL⁻¹ and inoculated with seeds (307,69 mL Kg⁻¹) of simple yellow corn. The percentage of emergency was determined within 7 days. The 10, 30 and 50 days, height was measured and at 50 days the plants were extracted and the weight of dry root and aerial biomass was determined. Enterobacteriaceae increased height (IE = 0.3 - 25.6%), the weight of the root biomass (IE = 2.7 - 129,7%) and air (IE = 0.9 - 89,3%) of corn plants, emphasizing *Enterobacter* spp.87, 62, 11, *Klebsiella* sp.85, *Pantoea* sp.6 and *Serratia* spp.46 and 84. It showed the potential of bacteria to increase vegetative corn development in greenhouse.

Key words: Enterobacteriaceae, inoculation, vegetative development, corn.

Introducción

El cultivo de *Zea mays* L. “maíz”, originario de América representa uno de los aportes más valiosos a la seguridad alimentaria mundial. En el Perú, el rendimiento promedio es 4,200 tha⁻¹ (Minagri, 2014, p.4) y como en otros países, depende fundamentalmente de la aplicación de insumos químicos. Los fertilizantes químicos representan 20 – 30% de los costos de producción de los cultivos y cuando son correctamente utilizados incrementan la productividad y rentabilidad; sin embargo, cada año aumenta la cantidad de fertilizantes por aplicar, debido a la menor eficiencia de absorción en el suelo y absorción por la planta (García et al., 2007, p.309; Nicolalde & Quintana, 2010, p.1). Asimismo, la eficiencia de recuperación o porcentaje del nutriente aplicado que es absorbido por la planta es en promedio 50,30 y 60% para el N, P, K (Sagarpa, 2010, p.3). El resto, se pierde e inclusive contamina el ambiente (Pedraza et al., 2010, p.156).

En la búsqueda de soluciones a la problemática expuesta, se realizan investigaciones con las denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (Plant Growth Promoting

Rhizobacteria, PGPR). Estas bacterias de vida libre, asociadas a las raíces o en el interior de los tejidos, estimulan los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, fijan nitrógeno atmosférico de una manera no simbiótica, solubilizan fosfatos, producen reguladores del crecimiento y sideróforos, así como también, reducen el ataque de microorganismos patógenos e insectos. Las PGPR a menudo incrementan la superficie de la raíz, con el consecuente aumento de la absorción de nutrientes y la producción de la planta (Loredo et al., 2004, p.231; Carmelo et al., 2011; p.160).

Los ejemplos por excelencia de las PGPR incluyen *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y enterobacterias como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* y *Serratia* (Loredo et al., 2004, p.225; Martínez, et al., 2010, p.305; Beracohea, 2011, p.35). Ensayos realizados en maíz, en diferentes suelos y regiones climáticas demostraron hasta 70% de incremento en el rendimiento (Nezarat & Gholami, 2009, p.28) y 50% de disminución en la dosis del fertilizante químico (Aguado & Moreno, 2008, p.46); sin embargo, también se han reportado resultados contradictorios, en los que no se obtuvo la respuesta positiva esperada, por la ineficiencia de las bacterias para colonizar consistentemente la rizósfera (Loredo et al., 2004; p.229), porque no se adaptaron a las condiciones del suelo, muy diferentes a las de su procedencia, no compitieron exitosamente con la biota nativa o no fueron capaces de sobrevivir en condiciones desfavorables (Díaz et al., 2001, p. 331; Gonzáles et al., 2003, p. 12; García et al., 2007, p.308).

Las enterobacterias son bacilos ubicuos, presentes en la mayoría de suelos y aguas, crecen rápidamente en medios de cultivo y en diferentes sustratos orgánicos de bajo costo (Farro & Graus, 2013, p.103). La inoculación de enterobacterias se relaciona con incremento en la germinación (Torres et al., 2003, p.57; Rani et al., 2011, p.2093; Ogbo & Okonkwo, 2012, p.368), número de pelos absorbentes, (Schoebitz, 2006, p.42), número de raíces laterales (Torres et al., 2003, p.58), altura (Schoebitz, 2006, p.46; Schoebitz et al., 2009, p.1771; Rani et al., 2011, p.2093), biomasa radical (Koo & Cho, 2009, p.1434; Criollo et al., 2012, p.193; Ogbo & Okonkwo, 2012, p. 372; Sánchez et al., 2012, p. 1410;), biomasa

aérea (Schoebitz et al., 2009, p.1771; Criollo et al., 2012, p. 193; Sánchez et al., 2012, p. 1410) y rendimiento (Morales et al., 2011, p.290; Sánchez et al., 2012, p. 1411), así como también, aumento en la concentración de fósforo (Cordero et al., 2008, p. 117) y nitrógeno (Beracochea, 2011, p.35) en los tejidos vegetales. En maíz, se ha reportado incremento en el desarrollo vegetativo y rendimiento (Beracochea, 2011, p. 35; Morales et al., 2011, p. 290; Ogbo & Okonkwo, 2012, p.368), por lo que constituyen una alternativa para la obtención de biofertilizantes. La investigación de estas bacterias requiere en un inicio el aislamiento y caracterización *in vitro*, para después determinar el efecto de su inoculación en los cultivos agrícolas, tanto en condiciones de invernadero, como de campo.

En el laboratorio de Microbiología y Parasitología, de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo se han realizado estudios para aislar enterobacterias en la rizósfera de malezas asociadas a maíz en Lambayeque y se ha demostrado en laboratorio, que tienen potencial como rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas; sin embargo, no se ha investigado el efecto de estas bacterias nativas en el desarrollo vegetativo del maíz en condiciones de invernadero, requisito indispensable para la siguiente fase de aplicación en los campos agrícolas comerciales. Por lo expuesto, se planteó la siguiente investigación, cuyo objetivo fue verificar la producción de ácido indolacético, fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato por 100 cultivos de enterobacterias, así como también determinar el efecto de su inoculación en la emergencia, altura, biomasa radicular y aérea de maíz, en condiciones de invernadero. La hipótesis planteada fue: Las enterobacterias nativas producen ácido indolacético, fijan nitrógeno, solubilizan fosfato e incrementan el desarrollo vegetativo del maíz en condiciones de invernadero.

Método

El material biológico estuvo constituido por 100 cultivos de enterobacterias de los géneros *Pantoea* (49), *Enterobacter* (23), *Klebsiella* (17) y *Serratia* (11). Estas bacterias fueron aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a cultivos de maíz, caracterizadas *in vitro* como rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) y proporcionadas por la sección

de Biotecnología Microbiana del Laboratorio de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Variable independiente: Enterobacterias nativas.

Variable dependiente: Desarrollo vegetativo de maíz.

El trabajo de investigación se ejecutó en dos fases: en la primera fase descriptiva, con el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt, se verificaron las características de 100 enterobacterias nativas, en lo correspondiente a la producción de ácido indolacético, fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato, así como también se determinó el efecto de las bacterias nativas en la emergencia del maíz, utilizando un diseño no experimental transeccional descriptivo (Hernández et al., 2003, p.182). En la segunda fase, con una investigación explicativa se determinó el efecto de la inoculación bacteriana en el desarrollo vegetativo de maíz, utilizando el diseño experimental completamente aleatorio (DCA) con 101 tratamientos y tres repeticiones por tratamiento. Las bacterias fueron 100 y se incluyó un control, donde se aplicó agua destilada.

Para la cuantificación de ácido indolacético según la reacción colorimétrica de Salkowski descrita por Mantilla (2007, p.51), cada bacteria nativa cultivada en agar nutritivo por 24 horas, fue inoculada por triplicado en caldo tripticasa soya suplementado con triptófano. Después de la incubación a 30°C, por 72 horas, con agitación constante, a 150 rpm, los cultivos fueron centrifugados a 3000 rpm, durante 5 minutos. Se tomaron 0,4 mL de cada sobrenadante, se depositaron en tubos, se agregaron 1,6 mL de reactivo de Salkowski modificado, se mezclaron y se dejaron en reposo durante 30 minutos, en oscuridad. La positividad a la producción de ácido indolacético *in vitro* estuvo dada por una coloración grosella y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible, a 530 nm. Las concentraciones se calcularon en una recta patrón obtenida con diluciones sucesivas de una solución 100 ppm de ácido indolacético.

Para la cuantificación del nitrógeno fijado *in vitro*, según el método colorimétrico del

fenolhipoclorito, descrito por Lara et al. (2007, p. 9), las bacterias cultivadas en agar nutritivo por 24 horas, se inocularon por triplicado, en 3 mL de caldo extracto de suelo, se incubaron a 30°C, por 72 horas, en agitación constante, a 150 rpm, se agregaron 9 mL de KCl 2M, se agitaron a 150 rpm durante 1 hora y se dejaron en reposo 1 hora adicional, para después tomar 10 mL del sobrenadante y centrifugarlo a 2000 rpm, durante 5 minutos. Los sobrenadantes se vertieron en tubos de dilución, se añadieron 0,4 mL de solución alcohólica de fenol al 10%; 0,4 mL de nitroprusiato de sodio al 0,5% y 1 mL de solución oxidante. Se agitaron para mezclar y después se dejaron en reposo durante 1 hora. La positividad a la fijación de nitrógeno in vitro estuvo dada por una coloración azul y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro de luz visible a 632,9 nm.

Para la cuantificación del fosfato solubilizado según Vazquez et al. (2000, p.462), se obtuvo el inóculo de cada bacteria cultivada en 1 mL de caldo Sundara, Rao y Sinha medium, SRSM, a 30°C, durante 20 horas en agitación constante, a 150 rpm. A continuación; 0,6 mL de cada cultivo bacteriano fueron inoculados por triplicado, en frascos con 20 mL de caldo SRSM, e incubados a 30 °C, con agitación constante, por 96 horas. Después, los caldos SRSM fueron centrifugados a 3000 rpm, por 5 minutos y en el sobrenadante se cuantificó el fósforo soluble mediante el método colorimétrico del molibdato, según Rodier & Rodi (2005, p.187).

El cultivo de maíz amarillo duro híbrido simple AGRI – 144 y la inoculación de 100 enterobacterias nativas, previamente caracterizadas se realizó entre el 5 de abril al 1 de junio de 2013, en condiciones de invernadero. El suelo experimental estuvo constituido por 454,5 kg de una mezcla de suelo agrícola, arena y compost en la proporción 2,5:2,0:0,5, solarizada durante 30 días. La mezcla de suelo experimental se distribuyó en bolsas de polietileno negro de 16,5 x 23,5 cm, a razón de 1,5 kg por bolsa, totalizando 303 bolsas. En simultáneo, se tomó una muestra representativa de 1 kg de suelo para realizar el análisis físico-químico en el Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria, estación experimental vista Florida de Chiclayo. El análisis físico - químico, demostró una reacción ligeramente ácida (pH 6,20), con moderada salinidad (CE= 6,20 dSm⁻¹), bajo

contenido de materia orgánica (1,32%), fósforo (6,80 ppm) y calcáreo (0,75%), así como alto contenido de potasio (327 ppm).

Para determinar el porcentaje de germinación de las semillas, en cinco bandejas de 20 x 14 cm, en cuyo fondo se colocaron cuatro capas de papel toalla esterilizado, humedecido con agua destilada esterilizada y con ayuda de pinzas esterilizadas se depositaron 20 semillas de maíz por bandeja, distribuidas en dos hileras, a razón de diez por hilera. Las bandejas se taparon y se mantuvieron a temperatura ambiente (28°C), humedeciéndolas cada 24 horas, hasta observar el máximo de germinación que fue 90%, después de 7 días.

Las bacterias fueron cultivadas en caldo nutritivo a 30°C, 150 rpm, durante 24 horas. A continuación, fueron sembradas mediante la técnica de estría en agar nutritivo, se seleccionaron cinco colonias características y se sembraron en agar nutritivo, durante 24 horas, constituyendo los cultivos de trabajo, que se incrementaron según los requerimientos y se guardaron en refrigeración (8°C). Para el inóculo, cada bacteria fue cultivada en 5 mL de agar nutritivo a 30°C por 24 horas y se obtuvo una suspensión de células en solución salina esterilizada NaCl 0,85% p/v, cuya concentración se estandarizó por espectrofotometría (600 nm) y placa vertida a 9 x 10⁸ UFC mL⁻¹.

Previo a la inoculación, las semillas de maíz se depositaron en una bolsa de polietileno, donde se agregó el insecticida en polvo soluble Acephato O, S-dimethyl acetylphoramidothiotate, en la dosis de 4,8 g kg⁻¹ de semillas. A continuación, en 101 bolsas de polietileno transparente en 2,5 x 8,0 cm se depositaron diez semillas de maíz amarillo AGRI – 144 por bolsa. En 100 bolsas, se inoculó 1 mL de la suspensión bacteriana correspondiente por bolsa, equivalente a 307,69 mL kg⁻¹ semilla y en una bolsa se aplicó agua destilada. El contenido fue homogenizado para que las bacterias se distribuyan uniformemente en las semillas y después, éstas fueron extendidas en la bolsa y llevadas en una bandeja hacia la estufa a 30°C, para disminuir el exceso de humedad. Posteriormente, con una pinza, las semillas de maíz previamente inoculadas se sembraron por triplicado en el suelo experimental

contenido en bolsas plásticas de polietileno negro, a razón de tres semillas por bolsa y se realizaron los riegos correspondientes según los requerimientos de las plantas. A los 7 días después de la inoculación, se contaron las plántulas emergidas, para calcular el porcentaje de emergencia. Después de 10 días de la siembra, se eliminaron las plántulas menos vigorosas, quedando dos por bolsa y seis por tratamiento.

A los 10, 20, 30 y 50 días se midió la altura de las plantas. A los 50 días se extrajeron las plantas y se determinó el peso de la biomasa seca de la parte aérea y radicular. La altura de las plantas se expresó en cm, considerándose desde la base hasta el extremo final de la hoja bandera. A continuación, se cortó la parte aérea de cada una de las plántulas a ras del suelo y la raíz y suelo adherido se depositaron en bandejas de plástico. Para determinar el peso de la materia seca, la raíz previamente lavada y la biomasa aérea se deshidrataron a temperatura ambiente durante 7 días y luego en el horno a 70°C, hasta alcanzar peso constante. Con los valores obtenidos se calcularon los índices de efectividad de la inoculación (IEI) en porcentaje, mediante la fórmula mencionada por Carreño (2009, p. 37):

$$IEI\% = \frac{\text{Tratamiento con inoculación} - \text{control sin inoculación} \times 100}{\text{Control sin inoculación}}$$

Con los tratamientos que superaron al testigo en altura, biomasa radicular y aérea de las plantas de maíz a los 50 días, se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas, que son las asunciones principales del análisis de varianza en la aplicación de la estadística paramétrica, tal que los resultados tengan validez estadística y se pueda llevar a cabo el proceso de inferencia a partir de la muestra.

Para el diseño completamente aleatorio, el modelo aditivo lineal fue:

$$Y_{ij} = u + t_i + E_{ij}, \text{ donde:}$$

Y_{ij} = Observación del i-ésimo tratamiento, j-ésima repetición

u = Media general de la variable respuesta

t_i = Efecto del i-ésimo tratamiento, siendo $i = 1, 2, 3, 4, 5, \dots, 101$

E_{ij} = Error experimental en el i-ésimo tratamiento, j-ésima repetición

$$H_0 = u_1 = u_2 = u_3 = u_4 = u_5 = \dots = 101$$

H_a = Al menos una media es diferente

Se realizó el análisis de varianza para determinar las diferencias entre los tratamientos y la prueba múltiple de Tukey ($\alpha = 0,05$) para comparar las medias entre ellos (Hernández *et al.*, 2003). Se utilizó el software estadístico SPSS versión 15,0.

Resultados

Las enterobacterias *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* y *Serratia* spp. sintetizaron ácido indolacético, fijaron nitrógeno y solubilizaron fosfato (Tabla N° 1). Transcurridos 7 días después de la inoculación en semillas de maíz, 42% de las bacterias nativas incrementó la emergencia, alcanzando 100%, superior al testigo con 90% (Tabla N° 2, figura N° 1). A su vez, 22% de las bacterias no afectó y 36% disminuyó la emergencia.

Las bacterias nativas afectaron diferencialmente el desarrollo vegetativo de maíz, observándose que 14, 47 y 65% incrementaron la altura de las plantas, en comparación con el testigo, a los 10 días (IE= 0,5 – 22,3%), 30 días (IE= 0,3 – 16,2%) y 50 días (IE= 0,3 – 25,6 %) después de la inoculación en las semillas, respectivamente (Tabla N° 3, figura N° 2). Asimismo, a los 50 días, 77% de las bacterias incrementó la biomasa seca de las raíces (IE= 2,71 – 29,7%) y 59% la biomasa seca de la parte aérea (IE= 0,9 – 89,3%).

El 18 % de las bacterias incrementaron todos los parámetros investigados (Tablas N° 4,5). El análisis de varianza demostró alta significancia y según la prueba múltiple de Tukey, la mayor altura, se alcanzó con *Serratia* sp.46, *Pantoea* sp.6, *Enterobacter* spp.87, 62 y 11. La mayor biomasa radicular correspondió a las plantas de maíz inoculadas con *Enterobacter* sp.62 y la mayor biomasa aérea con *Klebsiella* sp.85 y *Serratia* sp.84, en todos los casos, con diferencias significativas frente al testigo no inoculado. Los IE fueron de 1,5 – 25,6% en la altura; 5,4 – 129,7% en la biomasa radicular y 1,8 – 89,3% en la biomasa aérea.

El 18% de las bacterias incrementaron todos los parámetros investigados (Tablas N° 4 y 5). El análisis de varianza demostró alta significancia y según la prueba múltiple de Tukey, la mayor altura, se alcanzó con *Serratia* sp.46, *Pantoea* sp.6, *Enterobacter* spp.87, 62 y 11.

La mayor biomasa radicular correspondió a las plantas de maíz inoculadas con *Enterobacter* sp.62 y la mayor biomasa aérea con *Klebsiella* sp.85 y *Serratia* sp.84, en todos los casos, con diferencias significativas frente al testigo no inoculado. Los IE fueron de 1,5 – 25,6% en la altura; 5,4 – 129,7% en la biomasa radicular y 1,8 – 89,3% en la biomasa aérea.

Tabla N° 1. Rango de valores del ácido indolacético producido, nitrógeno fijado y fosfato solubilizado por 100 enterobacterias nativas

Características	Rango de valores*
Ácido indolacético (ppm)	0,62 – 52,90
Nitrógeno fijado como amonio (ppm)	1,03 – 30,21
Fosfato solubilizado (ppm)	1,00 – 4,05

*Promedio de tres repeticiones por enterobacteria

Tabla N° 2. Número de cultivos de enterobacterias según emergencia (%) de *Zea mays* L., 7 días después de la inoculación en las semillas

N° de cultivos enterobacterias	Emergencia (%)
62	100
22	90
7	80
1	70
3	60
3	50
1	40
1	30

Fuente. Tratamiento estadístico de los resultados de la investigación.



Figura N° 1. Incremento de la emergencia de *Zea mays* L., 7 días después de la inoculación de *Enterobacter* sp.87 en las semillas.

Tabla 3. Rango de índices de efectividad (IE) de 100 enterobacterias nativas inoculadas en semillas de *Zea mays* L., maíz amarillo duro híbrido.

Parámetro	Tiempo (días)	Enterobacterias (%)	Rango IE (%)
Altura	10	14	0,5 – 22,3
Altura	30	47	0,3 – 16,2
Altura	50	65	0,3 – 25,6
Raíces*	50	77	2,7 – 129,7
Parte aérea*	50	59	0,9 – 89,3

* Biomasa seca



Figura N° 2. Altura de *Zea mays* L., 50 días después de la inoculación de enterobacterias nativas.

Tabla N° 4. Prueba de Tukey ($\alpha=0,05$) de la altura, biomasa seca radicular y aérea de *Zea mays* L., 50 días después de la inoculación de enterobacterias nativas en las semillas.

Tratamientos enterobacterias	Altura (cm)	Biomasa seca (g)	
		Radicular	Aérea
UNPRG			
<i>Pantoea</i> sp.6	108,0 a	5,7 cdef	11,4 e
<i>Enterobacter</i> sp. 11	101,3 abc	6,0 bcde	12,0 de
<i>Pantoea</i> sp. 14	98,0 bcd	4,9 efg	15,9 bc
<i>Pantoea</i> sp. 27	92,0 de	5,5 defg	12,0 de
<i>Pantoea</i> sp. 29	90,3 de	5,0 efg	13,1 de
<i>Serratia</i> sp. 30	88,0 e	5,7 cdef	14,1 cd
<i>Serratia</i> sp. 31	93,0 cde	7,5 abc	12,1 de
<i>Klebsiella</i> sp.35	89,7 de	7,1 abcd	14,0 cd
<i>Serratia</i> sp. 46	108,5 a	4,1 fg	11,4 e
<i>Pantoea</i> sp. 58	94,7 bcde	4,6 efg	11,5 e
<i>Enterobacter</i> sp. 62	101,3 abc	8,5 a	17,0 b
<i>Serratia</i> sp.75	92,2 cde	5,7 cdef	13,5 de
<i>Pantoea</i> sp. 77	94,0 bcde	5,3 defg	11,3 e
<i>Serratia</i> sp. 84	94,3 bcde	3,9 fg	20,9 a
<i>Klebsiella</i> sp.85	87,7 e	6,0 bcde	21,2 a
<i>Enterobacter</i> sp.87	102,7 ab	7,6 ab	16,1 bc
<i>Klebsiella</i> sp. 91	101,3 abc	6,9 abcd	16,6 bc
<i>Klebsiella</i> sp. 94	97,7 bcd	7,4 a	16,0 bc
Testigo	86,4 e	3,7 e	11,2 e

Fuente: Resultado del análisis tratamiento estadístico.

Tabla N° 5. Índices de efectividad (%) en la altura, biomasa seca radicular y aérea de *Zea mays* L., por enterobacterias nativas inoculadas en las semillas.

Tratamientos enterobacterias UNPRG	Altura (IE%)	Biomasa seca (IE%)	
		Radicular	Aérea
Pantoea sp.6	25,0	54,1	1,8
Enterobacter sp. 11	17,2	62,2	7,1
Pantoea sp. 14	13,4	32,4	42,0
Pantoea sp. 27	6,5	48,6	7,1
Pantoea sp. 29	4,5	35,1	17,0
Serratia sp. 30	1,9	54,1	25,5
Serratia sp. 31	7,6	102,7	8,0
Klebsiella sp.35	3,8	91,0	25,0
Serratia sp. 46	25,6	10,8	1,8
Pantoea sp. 58	9,6	24,3	2,7
Enterobacter sp. 62	17,2	129,7	51,0
Serratia sp.75	6,7	54,1	20,5
Pantoea sp. 77	8,8	43,2	0,9
Serratia sp. 84	9,1	5,4	86,6
Klebsiella sp.85	1,5	62,2	89,3
Enterobacter sp.87	18,9	105,4	43,8
Klebsiella sp. 91	17,2	86,5	48,2
Klebsiella sp. 94	13,1	100,0	42,9

Fuente. Resultado del análisis tratamiento estadístico.

Discusión

Las enterobacterias sintetizaron ácido indolacético, AIA, fijaron nitrógeno y solubilizaron fosfato, verificándose en laboratorio su potencial como promotoras del crecimiento de plantas. En cuanto al AIA se coincide con Carcaño et al. (2006, p. 498), Schoebitz, (2006, p.33), Koo & Cho (2009, p. 1433) y Schoebitz et al. (2009, p.1770), quienes demostraron la producción de AIA por *Klebsiella*, *Pantoea*, *Serratia* y *Enterobacter*, respectivamente. De igual manera, se encuentran reportes de enterobacterias diazótrofes, mencionándose *Klebsiella* (Gyaneshwar et al., 2001, p.2635; Carcaño, 2006, p.498), *Pantoea* (Schoebitz, 2006, p.32), *Serratia* (Gyaneshwar et al., 2001, p.2635) y *Enterobacter* (Schoebitz et al., 2009, p.1770; Rani et al., 2011, p.2093; Sanchez, et al., 2012, p. 1408). A su vez, la solubilización de fosfato también fue demostrada con *Enterobacter* (Sanchez et al., 2012, p.1406), *Pantoea* (Cordero et al., 2008, p.111), *Serratia* (Farro & Graus, 2013, p.92) y *Klebsiella* (Clavijo et al., 2012, p.99).

El efecto de las bacterias en la emergencia de maíz fue diferente, observándose incremento, disminución y ningún efecto, respecto al testigo, coincidiendo con Farro & Graus (2013, p.95). El 62% de las bacterias

nativas incrementó la emergencia de maíz, resultado explicado por la activación de procesos metabólicos en las semillas, producto de la secreción bacteriana de giberelinas o sustancias estimuladoras de la síntesis de enzimas hidrolíticas en el endospermo (Torres et al., 2003, p.57). En este contexto, las α amilasas promueven la germinación, porque incrementan la disponibilidad del almidón (Bharathi et al., 2004, p.836.).

El 16% de las rizobacterias disminuyó la emergencia de maíz. El efecto negativo de las PGPR también fue mencionado por Stefan et al. (2008, p.108), quienes demostraron que la actividad de la enzima alanina amino determinó 58 – 62% de reducción en la longitud de radículas de semillas de maíz, inoculadas con *Enterobacter* y *Pantoea agglomerans*; no obstante, también demostró 21,6% de incremento con *Pseudomonas fluorescens*. En este contexto, Alarcón & Cerrato (2000, p.194) concluyeron que el efecto de las rizobacterias – transferasa, involucrada en el metabolismo proteico, fue mayor a las 120 horas en semillas de *Glycine max* no inoculadas, sugiriendo que debido a la competencia por nutrientes entre semillas y bacterias, la germinación disminuye. Por su parte, Beracochea (2011, p.25) en la germinación es independiente de su capacidad para promover el crecimiento de las plántulas.

El 22% de las bacterias nativas no afectó la emergencia de maíz. Al respecto, Díaz et al. (2001, p.331), concluyeron que el efecto de las PGPR no es evidente, cuando no encuentran el hábitat adecuado y no se asocian con la rizósfera para escapar de los mecanismos de defensa de la planta y encontrar las condiciones nutritivas propicias para su establecimiento y crecimiento. El éxito en la promoción del crecimiento, cuando se inoculan bacterias beneficiosas, depende en gran medida de su establecimiento oportuno y persistencia en el período de crecimiento de la raíz (Loredo et al., 2004, p.230). También es posible, que las bacterias pierdan viabilidad por efecto inhibitorio de las semillas, tal como se demostró con extractos solubles de maíz, que durante la germinación disminuyeron la multiplicación y establecimiento de *B. cepacia* (Velázquez et al., 1999, p.19).

Las enterobacterias nativas productoras de AIA, fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras

de fosfato afectaron diferencialmente el desarrollo vegetativo de maíz, observándose incremento, disminución y ningún efecto en la altura, así como en la biomasa aérea y radicular, variabilidad que puede ser explicada por la diversidad genética de cada bacteria y que a su vez se traduce en diversos grados en el potencial biológico (Obando et al., 2010, p.115). La capacidad de las bacterias para afectar el crecimiento de las plantas depende de la cantidad y calidad de los exudados radiculares y propiedades del suelo, así como también, del número de bacterias y colonización de la rizósfera (Loredo et al., 2004, p.236).

Respecto al efecto positivo en el desarrollo de maíz, se coincide con Aguado & Moreno (2008, p.39), Koo & Cho (2009, p.1434), Morales et al. (2011, p. 290) y Ogbo & Okonkwo (2012, p.368), quienes reportaron resultados similares con *Klebsiella*, *Pantoea*, *Serratia* y *Enterobacter*. La promoción del crecimiento vegetal por diversas enterobacterias también se ha demostrado en otros cultivos agrícolas, mencionándose *Pantoea agglomerans* y *Enterobacter ludwigii* en *Lolium perenne* (Schoebitz, 2006, p.61; Schoebitz et al., 2009, p.1768), *Enterobacter cancerogenus* en *Cajanus cajan* (Rani et al., 2011, p.2093), *Stenotrophomonas* en *Pennisetum clandestinum* (Criollo et al., 2012, p.193), *Enterobacter*, *klebsiella* y *Hafnia* en *Lactuca sativa* (Díaz et al., 2001, p. 332), *Enterobacter* en tomate (Sánchez et al., 2012, p. 1410) y *klebsiella* en *Salicornia bigelovii* (Rueda et al., 2009, p.351).

Con las enterobacterias nativas, la altura de las plantas de maíz se incrementó hasta 25,6% superando 20% registrado por Schoebitz et al. (2009, p. 1771) en *Lolium perenne* inoculado con *Enterobacter ludwigii*. La biomasa de las raíces se incrementó hasta 129,7%, superando 30 – 44% alcanzado en maíz inoculado con *Enterobacter asburiae* (Ogbo & Okonkwo, 2012, p.372) y *Pantoea* sp. (Beracochea, 2011, p.1172), así como 50% en *Lonium perenne* con *E. ludwigii* (Schoebitz et al., 2009, p.1772). El desarrollo de las raíces generalmente es asociado a la síntesis de las auxinas, particularmente el ácido indolacético, que promueve el crecimiento de las raíces y la proliferación de pelos radicales, mejorando la absorción de agua y minerales del suelo y con ello el desarrollo de la planta (Caballero, 2006, p. 154). Por su parte, la biomasa aérea se incrementó hasta 89,3%, valor que se

encuentra en el rango 49 – 110% registrado en maíz con *Pantoea* sp. (Beracochea, 2011, p.35) y *Enterobacter* sp. (Morales et al., 2011, p.290). Este incremento se atribuye al nitrógeno fijado y fosfato solubilizado por las rizobacterias nativas y según la hipótesis aditiva (Bashan et al., 1996, p.165; Loredo et al., 2004., p.231), a la interacción de mecanismos directos e indirectos de las PGPR, que ejerce efecto benéfico multiparamétrico en las plantas, incrementando el desarrollo vegetativo y rendimiento.

Conclusiones

Las enterobacterias nativas sintetizaron 0,62 – 52,90 ppm de ácido indolacético, fijaron 1,03 – 30,21 ppm de nitrógeno como amonio, solubilizaron 1,00 – 4,05 ppm de fosfato y en condiciones de invernadero incrementaron la altura (IE= 0,3 – 25,6%), el peso de la biomasa radicular (IE= 2,7 – 129,7%) y aérea (IE= 0,9 – 89,3%) de plantas de maíz amarillo duro híbrido simple. El 18% de las bacterias nativas incrementó en conjunto, la altura y el peso de la biomasa seca radicular y aérea de las plantas de maíz, por lo que son consideradas rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, cuyo efecto en el desarrollo vegetativo y rendimiento de maíz debe ser investigado en campo, con la perspectiva de obtener un inoculante comercial.

Referencias bibliográficas

- Aguado, A. & Moreno, B. (2008). Potencial de bioinoculantes microbianos como una alternativa para reducir costos de fertilización en maíz de temporal. México: Memorias Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, INIFAP.
- Alarcón, A. & Cerrato, R. (2000). "Biofertilizantes: Importancia y utilización en la agricultura". *Agricultura Técnica en México*, 26 (2),191-203.
- Bashan, Y., Holguin, G. & Ferrera, R. (1996). "Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. I. *Azospirillum*". *Terra*, 14(2), 159-194.
- Beracochea, M. (2011). *Respuesta de variedades comerciales de maíz (Zea mays L.) a la inoculación con bacterias endófitas-diazótrofas nativas*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.

- Bharathi, R., Vivekananthan, R., Harish, S., Ramanathan, A. & Samiyappan, R. (2004). "Rhizobacteria-based bioformulations for the management of fruit rot infection in chillies". *Crop Protection*, 23, 835-843.
- Caballero, J. (2006). "Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas". *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 154-161.
- Carcaño, M., Ferrera, R., Pérez, J., Molina, J. & Bashan, Y. (2006). "Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle". *TERRA Latinoamericana*, 24 (4), 493-502.
- Carmelo, M., Vera, S. & Bonilla, R. (2011). "Mecanismo de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal". *Revista Corpoica-Ciencias y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 159-166.
- Carreño, C. (2009). *Efecto de la inoculación de bacterias nativas solubilizadoras de fósforo en el desarrollo y rendimiento de tres cultivos agrícolas en Mochumí, Lambayeque, Perú. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.*
- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D. & Guillén, C. (2012). "Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea*, olivo en Tacna, Perú". *Ecología Aplicada*, 11(2), 89-102.
- Cordero, J., Ortega, P. & Ortega, E. (2008). "La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares". *Revista Colombiana de Biotecnología*, X (1), 111 - 121.
- Criollo, P., Obando, M., Sánchez, L. & Bonilla, R. (2012). "Efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense". *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 189-195.
- Díaz, P., Ferrera, R., Almaraz, J. & Alcantar, G. (2001). "Inoculación de bacterias promotoras del crecimiento en lechuga". *Terra*, 19, 327-335.
- Farro, O & Graus, R. (2013). *Potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las enterobacterias aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a *Zea mays* L. "maíz", en Lambayeque, 2013. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.*
- García, J., Moreno, V., Rodríguez, I., Mendoza, A. & Mayek, N. (2007). "Efecto de cepas de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento y rendimiento de grano de maíz". *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(3), 305-310.
- González, M., Martínez, R., Corrales, I., Pérez, D., Gandarilla, J., Alonso, R., Curvelo, R. & Méndez, V. (2003). "Efectividad de un bioestimulador en la calidad de las hortalizas como sostenibilidad de las producciones en la agricultura urbana". *Centro Agrícola*, 4 (30), 10-15.
- Gyaneshwar, P., James, E., Mathan, N., Reddy, P., Reinhold, B. & Ladha, J. (2001). "Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*". *Journal of Bacteriology*, 183(8), 2634-2645.
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2003). *Metodología de la Investigación*. 3ra ed. México: Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A.
- Koo, S. & Cho, K. (2009). "Isolation and characterization of a plant growth-promoting rhizobacterium, *Serratia* sp. SY5". *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(11), 1431-1438.
- Lara, C., Villalba, M. & Oviedo, L. (2007). "Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno en la zona agrícola de San Carlos". *Revista Colombiana de Biotecnología*, IX(2), 6-14.
- Loredo, C.; López, L & Espinosa, D. (2004). "Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión". *Terra Latinoamericana*, 22(2), 225-239.
- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. *yoko ono*) en periodo de enraizamiento. (Tesis de Grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.*
- Martínez, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G. & Mora, M. (2010). "Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria". *Journal Soil Science Plant Nutrition* 10(3), 293-319.
- Ministerio de Agricultura y Riego, MINAGRI. (2014). *Sector Agrario. Cultivos de importancia Nacional. Maíz. Producción*. Recuperado de <http://www.minag.gob.pe/portal/>

- sector-agrario/agricola/cultivos-de-importancia-nacional/ma%C3%ADz/producci%C3%B3n33?start=3
- Morales, Y., Juárez, D., Aragón, C., Mascarua, M., Bustillos, M., Fuentes, L., Martínez, R. & Muñoz, J. (2011). "Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture". *Revista Argentina de Microbiología*, 43, 287-293.
- Nezarat, S. & Gholami, A. (2009). "Screening Plant Growth Promoting Rhizobacteria for improving seed germination, seedling growth and yield of maize". *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(1), 26-32.
- Nicolalde, A. & Quintana, D. (2010). *Utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno (Azotobacter) y solubilizadoras de fósforo en el cultivo de brócoli (Brassica oleraceae var. Legacy) en Otavalo*. Universidad Técnica del Norte, Ecuador.
- Obando, D., Burgos, L., Rivera, D., Rubiano, M., Divan, V. & Bonilla, R. (2010). "Caracterización de bacteria diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus sp.*) en Codazzi, César (Colombia)". *Acta Biología Colombiana*, 15 (3), 107-120.
- Pedraza, O., Teixeira, K., Fernández, A., García, I., Baca, B., Azcón, R., Baldani, V. & Bonilla, R. (2010). "Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos". Revisión. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2), 155-164.
- Rani, M., Arundhathi, & Reddy, G. (2011). "*Bacillus cereus* and *Enterobacter cancerogenus* screened for their efficient plant growth promoting traits rhizobacteria (PGPR) and antagonistic traits among sixteen bacterial isolates from rhizospheric soils of Pigeon pea". *African Journal of Microbiology Research*, 5 (15), 2090-2094.
- Rodier, J. & Rodi, L. (2005). *Análisis de Aguas*. España: Ediciones Omega.
- Rueda, E., Villegas, J., Gerlach, L., Tarazón, M., Murillo, B., García, J., Troyo, E. & Preciado, P. (2009). "Efecto de la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre la germinación de *Salicornia bigelovii*". *Terra Latinoamericana*, 27, 345-354.
- Sánchez, O., Gómez, R., Garrido, M. & Bonilla, R. (2012). "Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero". *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(7), 1401-1415.
- Schoebitz, M. (2006). *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.)*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Austral de Chile.
- Schoebitz, M., Ribaudó, C., Pardo, M., Cantore, M., Ciampi, L. & Curá, J. (2009). "Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere". *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 1768-1774.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Sagarpa. (2010). *Uso de Fertilizantes*. Recuperado de <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Uso%20de%20Fertilizantes>.
- Stefan, M., Mihasan, M. & Dunca, S. (2008). "Plant growth promoting Rhizobacteria can inhibit the *in vitro* germination of *Glycine max* L. seeds". *Analele Stiintifice ale Universitatii Alexandru Ion Cuza, Sectiunea Genetica si Biologie Moleculara IX*, 105-110.
- Torres, R., Pérez, C. & Suárez, N. (2003). "Influencia de la inoculación de rizobacterias sobre la germinación de semillas de frejol común (*Phaseolus vulgaris* L.)". *Centro Agrícola*, 30(2), 56-60.
- Vázquez, P., Holguin, G., Puente, M., López, A. & Bashan, Y. (2000). "Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon". *Biology and Fertility of Soils*, 30(1), 460-468.
- Velázquez, M., Ventura, E., Hernández, A., Aguilar, S. & Hernández, A. N. (1999). "Estudio de la interacción maíz-*Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*". *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41, 17-23.