

***Bacillus licheniformis* M2-7 IMPROVES GROWTH, DEVELOPMENT AND YIELD OF *Capsicum annuum* L.**

***Bacillus licheniformis* M2-7 MEJORA CRECIMIENTO, DESARROLLO Y RENDIMIENTO DE *Capsicum annuum* L.**

Alejandro Bolaños-Dircio¹, Jeiry Toribio-Jiménez¹, Miguel Á. Rodríguez-Barrera¹, Giovanni Hernández-Flores², Erubiel Toledo-Hernández¹, Francisco Palemón-Alberto³, Yanet Romero-Ramírez^{1*}

¹Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero. Avenida Lázaro Cárdenas sin número, Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Guerrero, México, C. P. 39070. (yanetromero7@gmail.com). ²CONACYT-Escuela Superior de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Guerrero. Ex Hacienda San Juan Bautista S/N, Taxco el Viejo, Guerrero, México, C. P. 40323. ³Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Universidad Autónoma de Guerrero. Periférico Poniente s/n, Col. Villa de Guadalupe, Iguala de la Independencia, Guerrero, México, C.P. 40010.

ABSTRACT

Plant growth promoting bacteria are known to directly or indirectly influence the development and yield of plants. Studies that show the biotechnological potential of these bacteria as biofertilizers are thus important. The objective of this study was to evaluate the growth capacities of strains M2-7 and LYA12 and define whether their interactions with *Capsicum annuum* L. increases production. The hypothesis was that the *Bacillus licheniformis* strains have capacities to promote growth and yield of *Capsicum annuum* L. First, these strains were evaluated *in vitro* in selective culture media to detect those direct or indirect mechanisms for plant growth promotion. Then, the effect of both strains on seed germination and the effect of strain M2-7 were studied on the *in vivo* development of *C. annuum* L. The experimental design was completely randomized with 3 treatments and 3 repetitions. Data was analyzed with ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). Results showed that the bacterial strains were able to fix nitrogen, solubilize tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, produce gibberellins, lytic enzymes (amylases, proteases, lipases and esterases), biosurfactants, volatile compounds; and significantly inhibit growth ($p \leq 0.05$) of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum* sp. Likewise, the strains M2-7 and LYA12 increased ($p \leq 0.05$) by 89 and 78% the seed germination of *C.*

RESUMEN

De las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se sabe que influyen directa o indirectamente en el desarrollo y el rendimiento de las plantas. Por lo tanto, los estudios que demuestran el potencial biotecnológico de estas bacterias como biofertilizantes son importantes. El objetivo de este estudio fue evaluar las capacidades de crecimiento de las cepas M2-7 y LYA12 y definir si su interacción con *Capsicum annuum* L. aumenta la producción. La hipótesis fue que las cepas de *Bacillus licheniformis* cuentan con capacidades para promover el crecimiento y el rendimiento de *Capsicum annuum* L. En primer lugar, se evaluaron estas cepas *in vitro* en medios de cultivo selectivos para detectar mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal. Después, se estudió el efecto de ambas cepas en la germinación de semillas y el efecto de la cepa M2-7 en el desarrollo *in vivo* de *C. annuum* L. El diseño experimental fue completamente aleatorio con 3 tratamientos y 3 repeticiones. Los datos se analizaron con ANDEVA y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los resultados mostraron que las cepas bacterianas tuvieron la capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, producir giberelinas, enzimas líticas (amilasas, proteasas, lipasas y esterases), biosurfactantes, compuestos volátiles, e inhibir en forma significativa el crecimiento ($p \leq 0.05$) del hongo fitopatógeno *Colletotrichum* sp. Asimismo, las cepas M2-7 y LYA12 aumentaron ($p \leq 0.05$) la germinación de semillas de *C. annuum* L. en un 89 y 78%. M2-7 incrementó el peso fresco (235%), el diámetro del tallo (308%), el peso de la raíz, el número y el peso de los frutos (316%), en comparación con los tratamientos 1 (Nitrofoska) y 3 (testigo). Por lo tanto, la cepa *B. licheniformis* M2-7 es atractiva para desarrollar la formulación de biofertilizantes; en la búsqueda

* Author for correspondence ♦ Autor para correspondencia.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8383-4128>

Received: March, 2020. Approved: March, 2021.

Published in *Agrociencia* 55: 227-242. 2021.

annuum L. M2-7 enhanced fresh weight (235%), stem diameter (308%), root weight, number and weight of fruits (316%), as compared to treatment 1 (Nitrofoska) and 3 (Control). Therefore, *B. licheniformis* M2-7 strain is attractive to develop the formulation of biofertilizers; aiming to improve yield of some horticultural crops towards a sustainable and ecological agriculture.

Key words: rhizosphere, bacteria, *Bacillus licheniformis*, biofertilizers, *Capsicum annuum* L.

INTRODUCTION

Chemical fertilizers are essential compounds in agriculture, since they provide those nutrients that plants need for growth and yield. However, the excessive use of these fertilizers causes damage to the environment, and human chronic health damage that may manifest as cancer, degenerative lesions in the liver and kidneys, or even mutations (Torres *et al.*, 2014). Chemical fertilizers also lead to deterioration of soil quality, making management unsustainable; and, they are too expensive in terms of energy, as their production requires fossil fuels that emit greenhouse gases. Thus, the use of microorganisms selected as bio fertilizers, that contribute to plant nutrition reducing the use of chemicals, has gained great interest.

Plant growth promoting bacteria (PGPB) are a group of bacteria that inhabit the rhizosphere and are able to stimulate plant growth and health (Zhou *et al.*, 2015). Effects of these bacteria promoting plant growth can occur directly through the production of phyto-stimulatory compounds (auxins, gibberellins and cytokinins), nitrogen fixation, phosphate solubilization, and iron reduction. Also, indirectly through the synthesis of compounds with antibiotic or antifungal activity that inhibit the growth of phytopathogens allowing better development of host plants (Tabassum *et al.*, 2017). Because of these versatile metabolic characteristics, PGPBs have a biotechnological potential for the formulation of inoculants; among which the bio fertilizers stand out (Myresiotis *et al.*, 2015).

A large variety of bacteria with the ability to induce plant growth are described and reported. Azoton AA Plus is a biofertilizer formulated with nitrogen fixing bacteria such as *Azospirillum brasilensis*, *Azotobacter* sp. and *Bacillus* sp. Forzasil BS was formulated on

de mejorar el rendimiento de cultivos hortícolas y de avanzar hacia una agricultura sostenible y ecológica.

Palabras clave: rizósfera, bacteria, *Bacillus licheniformis*, biofertilizantes, *Capsicum annuum* L.

INTRODUCCIÓN

Los fertilizantes químicos son compuestos esenciales en la agricultura, ya que aportan aquellos nutrientes que las plantas necesitan para su crecimiento y rendimiento. Sin embargo, el uso excesivo de estos fertilizantes provoca daños al ambiente, y daños crónicos a la salud humana que pueden manifestarse como cáncer, lesiones degenerativas en hígado y riñones, o incluso mutaciones (Torres *et al.*, 2014). Los fertilizantes químicos también conducen al deterioro de la calidad del suelo, hacen su manejo insostenible, y son demasiado costosos en términos de energía, ya que su producción requiere de combustibles fósiles que emiten gases de efecto invernadero. Por ello, ha adquirido gran interés el uso de microorganismos seleccionados como biofertilizantes que contribuyen a la nutrición de las plantas al reducir el uso de productos químicos.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) son un grupo de bacterias que habitan en la rizósfera y tienen la capacidad de estimular el crecimiento y la salud de las plantas (Zhou *et al.*, 2015). Los efectos de estas bacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden ocurrir directamente a través de la producción de compuestos fitoestimulantes (auxinas, giberelinas y citoquininas), la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y la reducción de hierro. También indirectamente a través de la síntesis de compuestos con actividad antibiótica o antifúngica que inhiben el crecimiento de fitopatógenos y permiten un desarrollo mejor de las plantas anfitrión (Tabassum *et al.*, 2017). Debido a estas características metabólicas versátiles, las PGPB tienen un potencial biotecnológico para la formulación de inoculantes; entre los que destacan los biofertilizantes (Myresiotis *et al.*, 2015).

Una gran variedad de bacterias con capacidad para inducir el crecimiento vegetal ya se han descrito y presentado. Azoton AA Plus es un biofertilizante formulado con bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azospirillum brasilensis*, *Azotobacter* sp. y *Bacillus* sp. Forzasil BS se formuló con la base de *Bacillus subtilis*,

the basis of *Bacillus subtilis* and is used to control foliar and root diseases caused by bacteria and fungi in horticultural crops. Forzasil BC, formulated on *Bacillus cereus*, is used to induce germination in vegetable seeds as *Solanum lycopersicum* L.; and BACS, a bacterial complex developed on the bacteria consortium *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* and *B. amyloliquefaciens*, which is used mainly to suppress diseases and soil pests, and is able to improve horticultural crop yields (<http://cosustenta.com/catalogo.html>).

Chili (*Capsicum annuum* L.) is one of the most important agricultural crops in Mexico whose profitability and nutrient content are high, as well as its consumption and planted area are extensive. Besides, it is one of the products with greater economic value worldwide (García-Gaytán *et al.*, 2017). Mexico ranks as the main exporter of green chili on an international scale, and is the second largest producer in the world (Santoyo *et al.*, 2012).

As it was aforementioned, the genus *Bacillus* contains bacterial species that promote plant growth. In addition, their ability to produce spores allows them to survive for long periods until they find optimal conditions in the environment. They are then suitable candidates to produce bio inoculants that can decrease or eliminate the use of chemical fertilizers (Santoyo *et al.*, 2012). The *B. licheniformis* strain M2-7 was isolated from the state of Guerrero, due to its capacity as a hydrocarbon degrader. Also, it was found antagonist to some phytopathogens, thus becoming an industrially important bacterial species (Guevara-Luna *et al.*, 2018; Rojas-Aparicio *et al.*, 2018).

Selected strains were the M2-7 strain, and the LYA12 strain, derived from the M2-7 with a genetic modification in the *csrA* gene. In order to corroborate whether M2-7 and LYA12 can be used in industrial formulations to obtain optimal and effective biological products that allow improving the horticultural production of food, in this study we evaluated M2-7 and LYA12 strain direct and indirect mechanisms that stimulate plant growth under *in vitro* conditions, along with their effect in germination of *C. annuum* seeds, and the capacity of M2-7 strain to stimulate chili growth and yield under greenhouse conditions.

y se utiliza para el control de enfermedades foliares y radicales causadas por bacterias y hongos en cultivos hortícolas. Forzasil BC, formulado a partir de *Bacillus cereus*, se utiliza para inducir la germinación de semillas de hortalizas como *Solanum lycopersicum* L.; y BACS, un complejo bacteriano desarrollado con el consorcio de bacterias *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. amyloliquefaciens*, que se utiliza principalmente para suprimir las enfermedades y plagas del suelo, y logra mejorar el rendimiento de los cultivos hortícolas (<http://cosustenta.com/catalogo.html>).

El chile (*Capsicum annuum* L.) es uno de los cultivos agrícolas más importantes en México porque su rentabilidad y contenido de nutrientes son altos; así como su consumo y superficie sembrada son extensos. Además, es uno de los productos con valor económico mayor a nivel mundial (García-Gaytán *et al.*, 2017). México se ubica como el exportador principal de chile verde a nivel internacional, y es el segundo productor mundial (Santoyo *et al.*, 2012).

Como se mencionó antes, el género *Bacillus* contiene especies bacterianas que favorecen el crecimiento vegetal. Adicionalmente, su capacidad de producir esporas les permite sobrevivir durante largos períodos hasta encontrar las condiciones óptimas en el ambiente. Entonces son candidatos adecuados para producir bioinoculantes que pueden disminuir o eliminar el uso de fertilizantes químicos (Santoyo *et al.*, 2012). La cepa M2-7 de *B. licheniformis* se aisló en el estado de Guerrero, debido a su capacidad como degradador de hidrocarburos. También porque se encontró como antagonista de fitopatógenos y se convirtió en una especie bacteriana de importancia industrial (Guevara-Luna *et al.*, 2018; Rojas-Aparicio *et al.*, 2018).

Las cepas seleccionadas fueron la cepa M2-7 y la cepa LYA12, derivada de la M2-7 con una modificación genética en el gen *csrA*. Con el fin de corroborar si M2-7 y LYA12 se pueden usar en formulaciones industriales para obtener productos biológicos óptimos y eficaces que permitan mejorar la producción hortícola de alimentos, en este estudio se evaluaron los mecanismos directos e indirectos de las cepas M2-7 y LYA12 que estimulan el crecimiento de las plantas en condiciones *in vitro*, junto con su efecto en la germinación de semillas de *C. annuum*, y la

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions

Strains M2-7 and LYA12 (derived from M2-7 with a genetic modification in the *csrA* gene), were obtained from Colección del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental (Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Univ. Autón. de Guerrero; Chilpancingo, Guerrero, México) and were used in this study. The strains were grown on Luria Bertani (LB) broth, with the following composition (g L⁻¹): 10.0 casein peptone, 5.0 yeast extract, 10.0 NaCl, with a final 7.3 pH, and incubated at 180 rpm for 24 h at 37 °C. Spectinomycin was used for the modified strain (100 mgL⁻¹). Once the incubation time had finished, they were centrifuged 10 min at 16 543 x g RCF (Relative Centrifugal Force), the supernatants were collected and homogenized with 3 mL of saline at a concentration of 0.9%. Each solution was compared with a McFarland standard (DO₆₀₀=0.5) and subsequently used in the detection of plant promotion mechanisms.

Biological nitrogen fixation

Strains M2-7 and LYA12 were grown and triplicated in modified Rennie medium (Rennie, 1980) with the following composition: solution A 0.25 NaMoO₄•2H₂O, 0.8 K₂HPO₄, 0.2 KH₂PO₄, 0.1 NaCl, 5.0 mannitol, 5.0 sucrose, 0.5 mL sodium lactate (60% v/v), 800 mL distilled water; solution B: 0.2 MgSO₄•7H₂O, 0.06 CaCl₂, 100 mL distilled water; solution C: 20.0 agarose and 100 mL distilled water. Plates were incubated 24 h at 30 °C. *Azotobacter vinelandii* was the positive control, and the negative control was the strain *Escherichia coli* omega 2.

Production of gibberellins

The bacterial strains were cultivated in tryptic soy glucose broth (composition, gL⁻¹: 17.0 peptone of casein, 3.0 peptone of soybean meal, 5.0 NaCl, 2.5 K₂HPO₄, 2.5 glucose and 20.0 dexterosus anhydrous) and incubated 96 h at 30 °C at 180 rpm. Afterwards, on an ELISA plate, 75 µL of the bacterial culture and 150 µL of Folling-Wu reagent were added; this test was carried out in triplicate. *Bacillus subtilis* was used as a positive control, and the *Escherichia coli* omega 2 strain was the negative control.

Phosphate solubilization

Qualitative determination of the solubilization of inorganic phosphate was carried out in triplicate by solid NBRIP culture medium with the following composition (g L⁻¹): 10.0 glucose,

capacidad de la cepa M2-7 para estimular el crecimiento y el rendimiento del chile en condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas M2-7 y LYA12 (derivada de M2-7 con una modificación genética en el gen *csrA*) utilizadas en este estudio se obtuvieron de la Colección del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental (Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Univ. Autón. de Guerrero; Chilpancingo, Guerrero, México). Las cepas se cultivaron en caldo Luria Bertani (LB), con la siguiente composición (g L⁻¹): 10.0 de peptona de caseína, 5.0 de extracto de levadura, 10.0 de NaCl, con un pH final de 7.3, y se incubaron a 180 rpm durante 24 h a 37 °C. La espectinomicina se utilizó para la cepa modificada (100 mgL⁻¹). Una vez finalizado el tiempo de incubación, se centrifugaron por 10 min a 16 543 x g RCF (Relative Centrifugal Force), se recogieron los sobrenadantes y se homogeneizaron con 3 mL de solución salina con una concentración del 0.9%. Cada solución se comparó con un estándar McFarland (DO₆₀₀=0.5) y después se utilizó en la detección de los mecanismos de promoción de las plantas.

Fijación biológica de nitrógeno

Las cepas M2-7 y LYA12 se cultivaron y triplicaron en medio Rennie modificado (Rennie, 1980) con la siguiente composición: solución A 0.25 NaMoO₄•2H₂O, 0.8 de K₂HPO₄, 0.2 de KH₂PO₄, 0.1 de NaCl, 5.0 de manitol, 5.0 de sacarosa, 0.5 mL de lactato de sodio (60% v/v), 800 mL de agua destilada; solución B: 0.2 de MgSO₄•7H₂O, 0.06 de CaCl₂, 100 mL de agua destilada; solución C: 20.0 de agarosa y 100 mL de agua destilada. Las placas se incubaron 24 h a 30 °C. *Azotobacter vinelandii* fue el testigo positivo, y el testigo negativo fue la cepa *Escherichia coli* omega 2.

Producción de giberelinas

Las cepas bacterianas se cultivaron en caldo de glucosa de soya trípica (composición, gL⁻¹: 17.0 de peptona de caseína, 3.0 de peptona de harina de soya, 5.0 de NaCl, 2.5 de K₂HPO₄, 2.5 de glucosa y 20.0 de dextrosa anhidra) y se incubaron 96 h a 30 °C a 180 rpm. Después, en una placa ELISA, se añadieron 75 µl del cultivo bacteriano y 150 µl del reactivo de Folling-Wu; esta prueba se realizó por triplicado. *Bacillus subtilis* se utilizó como testigo positivo, y la cepa *Escherichia coli* omega 2 como testigo negativo.

5.0 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5.0 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 KCl, 0.1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.025 bromophenol blue, 17.0 bacteriological agar with a final pH 7.0; strains were grown by stinging and incubated at 30 °C for 72 h. *Azotobacter vinelandii* was the positive control, and *Escherichia coli* omega 2 was the negative control. To determine the Phosphate Solubilizer Efficacy (PSE) of bacterial strains the formula proposed by Gonzalez-Mancilla *et al.* (2016) was used. To record the corresponding diameters a conventional Vernier was used.

Siderophore production

Strains were grown in triplicate in F broth (composition in g L^{-1} : 10.0 casein peptone, 10.0 meat peptone, 1.5 K_2HPO_4 , 1.5 MgSO_4 and 10.0 mL glycerin), pH adjusted at 7.2 and incubation at 30 °C for 72 h. Later, strains were revealed under UV light in a transilluminator to observe the characteristic fluorescence of the siderophore. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 was used as the positive control, and *Staphylococcus aureus* as negative.

Production of lytic enzymes

Amylases

Strains were grown in triplicate on nutrient agar (composition, g L^{-1} : 5.0 pluriptone, 3.0 meat extract, 8.0 NaCl, 15.0 agar) supplemented with 1% starch; they were incubated at 30 °C for 72 h and then 2 mL of iodine-Lugol were added for 3 min (Malleswari and Bagyanarayana, 2013).

Lipases

In triplicate, strains were grown on nutrient agar supplemented with egg lecithin and incubated at 30 °C for 48 h (Malleswari and Bagyanarayana, 2013). *Bacillus subtilis* was used as a positive control and the negative control was the medium without inoculation.

Proteases

On nutrient agar supplemented with 1% milk casein, strains were grown and incubated at 30 °C for 48 h (Malleswari and Bagyanarayana, 2013). *B. subtilis* was the positive control and *E. coli* omega 2 was the negative.

Esterases

Strains were grown in nutritive agar supplemented with CaCl_2 10.0 g L^{-1} ; they were incubated at 30 °C for 72 h and

Solubilización de fosfatos

La determinación cualitativa de la solubilización del fosfato inorgánico se realizó por triplicado en un medio de cultivo NBRIP sólido con la siguiente composición (g L^{-1}): 10.0 de glucosa, 5.0 de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5.0 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 de KCl, 0.1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.025 de azul de bromofenol, 17.0 de agar bacteriológico, con un pH final de 7.0; la siembra de las cepas en las placas se hizo por pinchado y se incubaron a 30 °C durante 72 h. *Azotobacter vinelandii* fue el testigo positivo, y *Escherichia coli* omega 2 fue el testigo negativo. Para determinar la eficacia solubilizadora de fosfatos (PSE) de las cepas bacterianas se utilizó la fórmula propuesta por González-Mancilla *et al.* (2016). Para registrar los diámetros correspondientes se utilizó un Vernier convencional.

Producción de sideróforos

Las cepas se cultivaron por triplicado en caldo F (composición, g L^{-1} : 10.0 de peptona de caseína, 10.0 de peptona de carne, 1.5 de K_2HPO_4 , 1.5 de MgSO_4 y 10.0 mL de glicerina), el pH se ajustó a 7.2 e incubación a 30 °C durante 72 h. Luego, las cepas se revelaron bajo luz UV en un transiluminador para observar la fluorescencia característica del sideróforo. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 se utilizó como testigo positivo, y *Staphylococcus aureus* como negativo.

Producción de enzimas líticas

Amilasas

Las cepas se cultivaron por triplicado en agar nutritivo (composición, g L^{-1} : 5.0 de pluriptone, 3.0 de extracto de carne, 8.0 de NaCl, 15.0 de agar) suplementado con 1% de almidón; se incubaron a 30 °C durante 72 h y luego se añadieron 2 mL de yodo-Lugol durante 3 min (Malleswari y Bagyanarayana, 2013).

Lipasas

Por triplicado, las cepas se cultivaron en agar nutritivo suplementado con lecitina de huevo y se incubaron a 30 °C durante 48 h (Malleswari y Bagyanarayana, 2013). *Bacillus subtilis* se utilizó como testigo positivo, y el testigo negativo fue el medio sin inocular.

Proteasas

En agar nutritivo suplementado con 1% de caseína de leche, las cepas se cultivaron y se incubaron a 30 °C durante 48 h (Malleswari y Bagyanarayana, 2013). *B. subtilis* fue el testigo positivo, y *E. coli* omega 2 fue el negativo.

subsequently at 4 °C for 48 h (Malleswari and Bagyanarayana, 2013). The positive control was *P. aeruginosa* PAO1, and the negative control was *E. coli* omega 2.

Production of biosurfactants

These strains were cultivated in triplicate in tubes with PPGAS broth (composition, g L⁻¹: 1.0 NH₄Cl₂, 1.5 KCl, 19.0 Tris-HCl, 0.8 MgSO₄, 5.0 glucose and 10.0 peptone of casein), pH was adjusted at 7.0 and incubated at 30 °C for 5 d at 180 rpm. The strain *P. aeruginosa* PAO1 was used as positive control, and the negative control was the broth without bacterial inoculum.

Antagonistic effect

It consisted in placing an explant from the active growth of the phytopathogenic fungus (*Colletotrichum* sp.) in the center of a PDA plate with the following composition (g L⁻¹): 200.0 infusion of potato, 20.0 dextrose, 15.0 bacteriological agar and pH was adjusted to 5.6. Before the placement on PDA agar, 2 mL of *B. licheniformis* cells (M2-7 or LYA12) were added. Afterwards, the plates were incubated at 30 °C for 10 d. Inhibition rate was calculated with the following formula:

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [(C - T) \times 100] \div C$$

where “C” is the diameter of the fungal mycelium in the negative control (without bacteria), and “T” is the diameter of the mycelium in the plates treated with the bacterial strains M2-7 and LYA12 (Ahmad *et al.*, 2017).

Production of volatile organic compounds (VOCs)

A chamber composed as the union of two polyethylene Petri dishes (5.0 cm diameter) was used. The open dishes were placed one on top of the other in such a way that they shared an empty space. In one of the dishes *Colletotrichum* sp. was grown, while in the other dish one of the bacterial strains M2-7 or LYA12 was grown. The dishes remained attached with Parafilm® wax paper for 10 d of incubation at 30 °C. The reading of the diameters to determine the one corresponding to inhibition rate was made with a conventional Vernier, using the formula proposed by Ahmad *et al.* (2017).

Seed germination test

Strains were cultured in 50 mL of nutritive broth in constant agitation at 180 rpm for 24 h at 35 °C. The cultures were centrifuged at 11 028 x g RCF for 10 min to obtain the

Esterasas

Las cepas se cultivaron en agar nutritivo suplementado con CaCl₂ 10.0 g L⁻¹; se incubaron a 30 °C durante 72 h y posteriormente a 4 °C durante 48 h (Malleswari y Bagyanarayana, 2013). El testigo positivo fue *P. aeruginosa* PAO1, y el testigo negativo fue *E. coli* omega 2.

Producción de biosurfactantes

Las cepas se cultivaron por triplicado en tubos con caldo PP-GAS (composición, g L⁻¹: 1.0 de NH₄Cl₂, 1.5 de KCl, 19.0 de Tris-HCl, 0.8 de MgSO₄, 5.0 de glucosa y 10.0 de peptona de caseína), se ajustó el pH a 7.0 y se incubó a 30 °C durante 5 d a 180 rpm. La cepa *P. aeruginosa* PAO1 se utilizó como testigo positivo, y el testigo negativo fue el caldo sin inóculo bacteriano.

Efecto antagonístico

La evaluación consistió en colocar un explante del crecimiento activo del hongo fitopatógeno (*Colletotrichum* sp.) en el centro de una placa de PDA con la siguiente composición (g L⁻¹): 200.0 de infusión de papa, 20.0 de dextrosa, 15.0 de agar bacteriológico y se ajustó el pH a 5.6. Antes de la colocación en el agar PDA, se añadieron 2 mL de células de *B. licheniformis* (M2-7 o LYA12). Después, las placas se incubaron a 30 °C durante 10 d. La tasa de inhibición se calculó con la fórmula siguiente:

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [(C - T) \times 100] \div C$$

donde “C” es el diámetro del micelio fúngico en el testigo negativo (sin bacterias), y “T” es el diámetro del micelio en las placas tratadas con las cepas bacterianas M2-7 y LYA12 (Ahmad *et al.*, 2017).

Producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs)

La cámara compuesta que se utilizó, se formó con la unión de dos placas de Petri de polietileno (5.0 cm de diámetro). Las placas abiertas se colocaron una encima de la otra de modo que compartieran un espacio vacío. En una de las placas se cultivó *Colletotrichum* sp., mientras que en la otra se cultivó una de las cepas bacterianas M2-7 o LYA12. Las placas permanecieron adheridas con papel encerado Parafilm® durante 10 d de incubación a 30 °C. La lectura de los diámetros para determinar el correspondiente a la tasa de inhibición se realizó con un Vernier convencional y se usó la fórmula propuesta por Ahmad *et al.* (2017).

cells, washed twice with sterile 0.9% saline and diluted in 2 mL of saline for counting in the Neubauer chamber. The cellular concentration was adjusted to 108 cells mL⁻¹; 50 seeds of *C. annuum* L. were used per strain to be evaluated, these were inoculated by immersion in 10 mL of the bacterial suspension and placed in agitation at 180 rpm for 2 h. As control, seeds immersed in 0.9% saline solution were used. Later they were sown in a nursery tray of 200 cavities, incubated at room temperature, and germination rate was recorded 15 d after.

Seedling inoculation and variables evaluated

One month after sowing, transplant was carried out in polyethylene bags containing 2.0 kg of sterile common soil. Pots were placed at room temperature and bacterial fertilization and inoculation was performed as follows: at the time of transplantation, plants were fertilized with 5 mL of Nitrofoska (treatment 1), 5 mL of bacterial suspension of strain M2-7 (treatment 2) and 5 mL of sterile water (treatment 3). After 30, 60 and 90 d, fertilizations and inoculations were performed with a dose of 10 mL for each treatment near the base of the plant stem with sterile syringes. Finally, the variables data registered were: height, fresh weight of the plant, stem diameter, fresh root weight, number and weight of fruits, and weight of fruits per plant.

Experimental design

The experimental design was completely randomized with 3 treatments and 3 repetitions: treatment 1 (Nitrofoska), treatment 2 (*B. licheniformis* M2-7), and treatment 3 (plants without bacterial inoculum). The experimental unit was the polyethylene bag with a chili plant. Data of height, diameter, fresh weight, fresh root weight, number and weight of fruits were analyzed with ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). The graphics were created with Excel™.

RESULTS AND DISCUSSION

Bacillus licheniformis M2-7 and LYA12 fixe nitrogen, solubilize phosphates and produce gibberellins

Within the direct mechanisms evaluated on the strains tested, phosphate solubilization and production of gibberellins were observed (Table 1).

The ability of the strains M2-7 and LYA12 of *B. licheniformis* to grow in the absence of atmospheric nitrogen (N₂) was evidenced in the modified Rennie medium. The strains evaluated in this study were able

Prueba de germinación de semilla

Las cepas se cultivaron en 50 mL de caldo nutritivo en agitación constante a 180 rpm durante 24 h a 35 °C. Los cultivos se centrifugaron a 11 028 x g RCF durante 10 min para obtener las células, se lavaron dos veces con solución salina estéril al 0.9%, y se diluyeron en 2 mL de solución salina para su recuento en la cámara de Neubauer. La concentración celular se ajustó a 108 células mL⁻¹; 50 semillas de *C. annuum* L. se utilizaron por cepa para esta evaluación; se inocularon por inmersión en 10 mL de la suspensión bacteriana y se colocaron en agitación a 180 rpm durante 2 h. Como testigo se utilizaron semillas sumergidas en solución salina al 0.9%. Después, se sembraron en un semillero de 200 cavidades, se incubaron a temperatura ambiente y el porcentaje de germinación se registró a los 15 d.

Inoculación de plántulas y variables evaluadas

Después de un mes de la siembra, el trasplante se realizó en bolsas de polietileno que contenían 2.0 kg de tierra común estéril. Las macetas se colocaron a temperatura ambiente y la fertilización e inoculación bacteriana se realizó de la siguiente manera: en el momento del trasplante, las plantas se fertilizaron con 5 mL de Nitrofoska (tratamiento 1), 5 mL de suspensión bacteriana de la cepa M2-7 (tratamiento 2) y 5 mL de agua estéril (tratamiento 3). Después de 30, 60 y 90 d, se realizaron fertilizaciones e inoculaciones con dosis de 10 mL para cada tratamiento cerca de la base del tallo de la planta con jeringa estéril. Por último, los datos de las variables registradas fueron: altura, peso fresco de la planta, diámetro del tallo, peso fresco de la raíz, número y peso de los frutos, y peso de los frutos por planta.

Diseño Experimental

El diseño experimental fue completamente aleatorio con 3 tratamientos y 3 repeticiones: tratamiento 1 (Nitrofoska), tratamiento 2 (*B. licheniformis* M2-7) y tratamiento 3 (plantas sin inóculo bacteriano). La unidad experimental fue la bolsa de polietileno con una planta de chile. Los datos de altura, diámetro, peso fresco, peso fresco de la raíz, número y peso del fruto se analizaron con ANDEVA y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los gráficos se crearon con Excel™.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

M2-7 y LYA12 fijan nitrógeno, solubilizan fosfatos y producen giberelinas

Dentro de los mecanismos directos evaluados en las cepas estuvieron la solubilización del fosfato y la producción de giberelinas (Cuadro 1).

Table 1. Direct and indirect mechanisms of bacterial strain related to plant promotion capacity.**Cuadro 1. Mecanismos directos e indirectos de las cepas bacterianas relacionados con la capacidad de promoción en plantas.**

Essays	Control (+)	M2-7	LYA12	Control (-)
BNF	+	+	+	-
Phosphate solubilization	+	+	+	-
Gibberellins production	+	+	+	-
Siderophores production	+	+	+	-
Amylases	+	+	+	-
Lipases	+	+	+	-
Esterases	+	+	+	-
Proteases	+	+	+	-
BS production	+	+	+	-
VOC	+	+	+	-

+=Activity; -= Without activity; BNF= Biological nitrogen fixation; BS= Biosurfactants; VOC= Volatile organic compounds. ♦ +=Actividad; -= Sin actividad; BNF= Fijación biológica del nitrógeno; BS= Biosurfactantes; VOC= Compuestos orgánicos volátiles.

to fix nitrogen and transform it to ammonium (NH_4^+) in such a way that allowed the growth of the strains at 24 h of incubation. Nitrogen-fixing bacteria have a wide taxonomic diversity, with different life forms and association with plants (Tabassum *et al.*, 2017). Chávez-Ambriz *et al.*, (2016) reported the capability of *Bacillus* sp. MA04, *B. megaterium* MA06 and *B. subtilis* MA12 to fix nitrogen in FBN medium at 5 d of incubation. Other bacterial species that express this ability are: *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. macerans* and *B. polymyxa* (Guzmán *et al.*, 2012).

Natural solubilization of phosphates is a phenotypic character that many soil microorganisms exhibit. In this study, M2-7 and LYA12 strains showed this ability of solubilizing inorganic phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Table 1). Phosphate solubilization is expressed quantitatively by Phosphate Solubilization Efficacy (PSE). The analysis of variance for the inorganic phosphate source $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ showed statistical differences ($p \leq 0.05$) in the PSE between the positive control (*A. vinelandii*), and strains LYA12 and negative control *E. coli* (Figure 1). Likewise, the strain *B. licheniformis* M2-7 showed higher PSE ($p \leq 0.05$) respect to the modified strain (LYA12).

Phosphate solubilizing bacteria were isolated from different types of soil, including bacteria of the genus *Azotobacter*, making them potential species as bio fertilizers (Zhao *et al.*, 2014). Also, solubilizing

La capacidad de las cepas M2-7 y LYA12 de *B. licheniformis* para crecer en ausencia de nitrógeno atmosférico (N_2) fue evidente en el medio Rennie modificado. Las cepas evaluadas en este estudio fueron capaces de fijar el nitrógeno y transformarlo en amonio (NH_4^+), de tal manera que permitieron el crecimiento de las cepas a las 24 h de incubación. Las bacterias fijadoras de nitrógeno tienen una diversidad taxonómica amplia con diferentes formas de vida y asociación con las plantas (Tabassum *et al.*, 2017). Chávez-Ambriz *et al.*, (2016) reportaron la capacidad de *Bacillus* sp. MA04, *B. megaterium* MA06 y *B. subtilis* MA12 para fijar nitrógeno en medio FBN a los 5 d de incubación. Otras especies bacterianas que expresan esta capacidad son: *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. macerans* y *B. polymyxa* (Guzmán *et al.*, 2012).

La solubilización natural de fosfatos es un carácter fenotípico que presentan muchos microorganismos del suelo. En este estudio, las cepas M2-7 y LYA12 mostraron esta capacidad de solubilizar fosfato inorgánico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Cuadro 1). La solubilización de fosfato se expresa cuantitativamente por la eficacia de solubilización de fosfato (PSE). El análisis de varianza para la fuente de fosfato inorgánico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ mostró diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) en la PSE entre el testigo positivo (*A. vinelandii*), y las cepas LYA12 y el testigo negativo *E. coli* (Figura 1). Asimismo, la

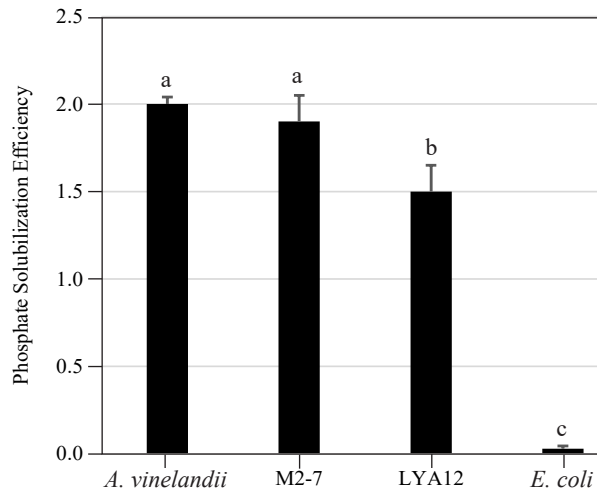


Figure 1. Phosphate Solubilization Efficiency. Values are means $\pm$ SD of three independent experiments. One-way ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). Different letters on bars indicate significant differences.

Figura 1. Eficiencia de la solubilización de fosfato. Los valores son medias $\pm$ SD de tres experimentos independientes. ANDEVA de una vía y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas.

capacity of phosphates by different bacterial species of the *Bacillus* genus was reported; among them: *Bacillus circulans*; *B. megaterium* MA06 and MA17 (Chávez-Ambriz *et al.*, 2016). The average of the PSE recorded by the strains M2-7 and LYA12 ranged between 2.0 and 1.5 mm. Thus, they can be classified as potential phosphate solubilizers since they have results similar to other bacteria such as *Pseudomonas* sp. and *Pantoea* sp. (Chávez-Ambriz *et al.*, 2016).

The strains *B. licheniformis* M2-7 and *B. licheniformis* LYA12 were producers of gibberellins (Table 1). Camelo *et al.*, (2011) identified the gibberellins produced by *B. licheniformis* type AG1, isoAG3 and AG20, and they were cataloged as potentially active. These phytohormones mainly influence germination by interrupting the dormancy period of the seeds (Camelo *et al.*, 2011). Although these phytohormones are of great importance, the production of gibberellins by PGPB is scarce and only *B. licheniformis* and *B. pumilus* are reported as effective producers of these phytohormones (Camelo *et al.*, 2011).

cepa *B. licheniformis* M2-7 mostró una PSE mayor ($p \leq 0.05$) respecto a la cepa modificada (LYA12).

Bacterias solubilizadoras de fosfatos se aislaron en diferentes tipos de suelo, incluyendo bacterias del género *Azotobacter*, lo que las convierte en especies potenciales como biofertilizantes (Zhao *et al.*, 2014). También se reportó la capacidad de solubilización de fosfatos por especies bacterianas diferentes del género *Bacillus*, entre ellas: *Bacillus circulans*; *B. megaterium* MA06 y MA17 (Chávez-Ambriz *et al.*, 2016). El promedio del PSE registrado por las cepas M2-7 y LYA12 osciló entre 2.0 y 1.5 mm. Por lo tanto, se pueden clasificar como potenciales solubilizadores de fosfato ya que tienen resultados similares a otras bacterias como *Pseudomonas* sp. y *Pantoea* sp. (Chávez-Ambriz *et al.*, 2016).

Las cepas *B. licheniformis* M2-7 y *B. licheniformis* LYA12 fueron productoras de giberelinas (Cuadro 1). Camelo *et al.*, (2011) identificaron las giberelinas producidas por *B. licheniformis* tipo AG1, isoAG3 y AG20, y las catalogaron como potencialmente activas. Estas fitohormonas influyen principalmente en la germinación porque interrumpen el periodo de latencia de las semillas (Camelo *et al.*, 2011). Aunque estas fitohormonas son de gran importancia, la producción de giberelinas por parte de las PGPB es escasa y sólo *B. licheniformis* y *B. pumilus* se reportan como productores efectivos de estas fitohormonas (Camelo *et al.*, 2011).

Sideróforos, amilasas, lipasas, proteasas, esterases y biosurfactantes producidos por *Bacillus licheniformis* M2-7 y LYA12

Las cepas del género *Bacillus* fueron capaces de producir metabolitos secundarios relacionados con mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal. La producción de sideróforos se observó en el caldo F; las cepas M2-7 y LYA12 fueron capaces de producir fluorescencia, hecho que denota la cualidad de secretar moléculas de bajo peso molecular (Cuadro 1). La producción de sideróforos por bacterias promotoras del crecimiento vegetal ejerce un efecto de biocontrol al reducir la biodisponibilidad del hierro para los microorganismos fitopatógenos de la rizósfera, y con ello disminuir su colonización. Este efecto se observó con *Bacillus altitudinis* que antagonizó de manera eficiente a *Thanatephorus cucumeris* (Sunar *et al.*, 2013). *Bacillus megaterium* Jz11, *B.*

Siderophores, amylases, lipases, proteases, esterases and biosurfactants produced by *Bacillus licheniformis* M2-7 and LYA12

Strains of the genus *Bacillus* were able to produce secondary metabolites related to indirect mechanisms of plant growth promotion. Siderophores production was observed in the F broth; M2-7 and LYA12 strains were able to produce fluorescence, which denotes the quality of secreting low molecular weight molecules (Table 1). The production of siderophores by plant growth promoting bacteria exerts a biocontrol effect, by reducing the bioavailability of iron for the phytopathogenic microorganisms of the rhizosphere, thus decreasing their colonization. This effect was reported with *Bacillus altitudinis* which efficiently antagonized to *Thanatephorus cucumeris* (Sunar *et al.*, 2013). *Bacillus megaterium* Jz11, *B. megaterium* EJH-7 (Chávez-Ambriz *et al.*, 2016), *B. altitudinis*, and *B. subtilis* (Ahmad *et al.*, 2017) are among the *Bacillus* species reported with this mechanism.

In this study *B. licheniformis* M2-7 and LYA12 were able to produce lytic enzymes such as: amylases, lipases, proteases and esterases in each selective culture medium (Table 1). Similar to *B. altitudinis* and *B. amyloliquefaciens*, other PGPB that produce enzymes (Sunar *et al.*, 2013). Also the quality of biosurfactant was observed at the supernatants of the bacterial strains M2-7 and LYA12 (Table 1). We observed that supernatants were able to reduce the surface tension, because they formed foam in the PPGAS medium.

Biosurfactants are active surface molecules, formed between the interfaces: air/water or oil/water. *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* M2-7, *B. halotolerans* BJAL and *Bacillus* sp. ANF21 are reported to produce surfactin, whose main function at physiological level is its antibiotic activity that allows them to solubilize the main components of microbial cell membranes; this gives them a greater chance of survival in ecological niches with a high competitiveness for nutrients (Ongena *et al.*, 2007).

***Bacillus licheniformis* M2-7 and LYA12 inhibited the growth of *Colletotrichum* sp.**

Dual confrontations were carried out between strains of *B. licheniformis* (M2-7 and LYA12) against *Colletotrichum* sp. Antagonism was visible due to

megaterium EJH-7 (Chávez-Ambriz *et al.*, 2016), *B. altitudinis*, y *B. subtilis* (Ahmad *et al.*, 2017) son algunas de las especies de *Bacillus* reportadas con este mecanismo.

En este estudio, *B. licheniformis* M2-7 y LYA12 fueron capaces de producir enzimas líticas como amilasas, lipasas, proteasas y esterases en cada medio de cultivo selectivo (Cuadro 1). En forma similar a *B. altitudinis* y *B. amyloliquefaciens*, otras PGPB que producen enzimas (Sunar *et al.*, 2013). También se observó la cualidad biosurfactante en los sobrenadantes de las cepas bacterianas M2-7 y LYA12 (Tabla 1). Los sobrenadantes fueron capaces de reducir la tensión superficial, ya que formaron espuma en el medio PPGAS.

Los biosurfactantes son moléculas superficiales activas, formadas entre las interfaces: aire/agua o aceite/agua. De *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* M2-7, *B. halotolerans* BJAL y *Bacillus* sp. ANF21 se ha informado que producen surfactina, cuya función principal a nivel fisiológico es su actividad antibiótica que les permite solubilizar los componentes principales de las membranas celulares microbianas; esto les da una posibilidad de supervivencia mayor en nichos ecológicos con una competitividad alta por nutrientes (Ongena *et al.*, 2007).

***Bacillus licheniformis* M2-7 y LYA12 inhibieron el crecimiento de *Colletotrichum* sp.**

Enfrentamientos duales se realizaron entre cepas de *B. licheniformis* (M2-7 y LYA12) contra *Colletotrichum* sp. El antagonismo fue visible debido a la capacidad de las cepas de impedir el crecimiento radial normal del hongo fitopatógeno. Los tratamientos con las cepas bacterianas redujeron el crecimiento micelial del hongo; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las cepas ($p \leq 0.05$), es decir, ambas cepas tienen la misma capacidad antagonica contra *Colletotrichum* sp. para evitar el crecimiento del hongo (Figura 2).

La gran capacidad antagonica de las especies del género *Bacillus* sobre los microorganismos fitopatógenos ya se ha demostrado; y se les atribuye un gran potencial como biocontrol de patógenos (Ragazzo-Sánchez *et al.*, 2011). En cuanto a los efectos antagonicos, sobre el modo de acción de las especies de *Bacillus*, algunos autores han informado que la producción de enzimas líticas, antibióticos o metabolitos

the ability of the strains to prevent normal radial growth of the phytopathogenic fungus. Treatments with bacterial strains reduced the mycelial growth of the fungus; however, no significant differences were found between the strains ($p \leq 0.05$). That is, both strains have the same antagonistic capacity against *Colletotrichum* sp. to prevent fungus growth (Figure 2).

A great antagonistic capacity of species of the genus *Bacillus* on phytopathogenic microorganisms was proved before; and a great potential is attributed to them as biocontrol for pathogens (Ragazzo-Sánchez *et al.*, 2011). Regarding antagonistic effects, on the mode of action of *Bacillus* species, some authors have reported that production of lytic enzymes, antibiotics or metabolites can generate changes in cytoplasmic membranes. In addition, production of fungicide compounds is widely described for *Bacillus* strains. Iturin and surfactin, antibiotics of lipopeptide nature, are the most studied as biocontrol (Touré *et al.*, 2004).

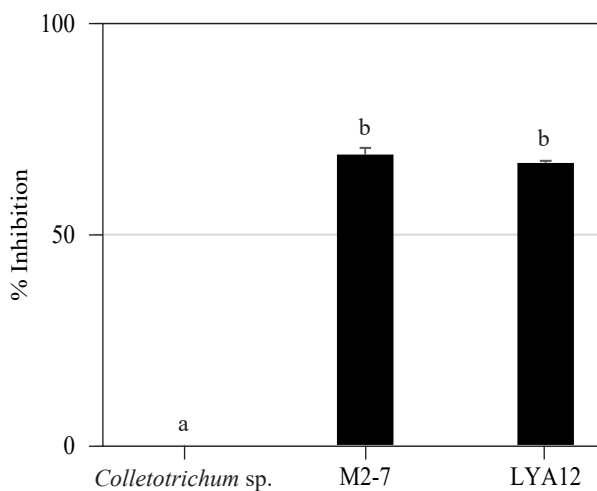


Figure 2. Percentage of inhibition by strains *Bacillus licheniformis* (M2-7 and LYA12) against *Colletotrichum* sp. Values are expressed as means $\pm$ SD of three independent experiments. One-way ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). Different letters on bars indicate significant differences.

Figura 2. Porcentaje de inhibición de las cepas *Bacillus licheniformis* (M2-7 y LYA12) contra *Colletotrichum* sp. Los valores se expresan como medias $\pm$ SD de tres experimentos independientes. ANDEVA de una vía y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas.

puede generar cambios en las membranas citoplasmáticas. Además, la producción de compuestos fungicidas está descrita con amplitud para las cepas de *Bacillus*. La iturina y la surfactina, antibióticos de naturaleza lipopéptida, son los más estudiados como biocontrol (Touré *et al.*, 2004).

El efecto antagónico de las cepas M2-7 y LYA12 de *B. licheniformis* se observó por los compuestos volátiles producidos sobre el crecimiento de *Colletotrichum* sp. (Cuadro 1). Las observaciones tras 10 d de incubación permitieron visualizar que el testigo (*Colletotrichum* sp. creciendo sin exposición a los compuestos volátiles de las bacterias) presentó pigmentación en el micelio. Esta pigmentación estuvo completamente ausente en las unidades experimentales ensayadas con bacterias. De acuerdo con el porcentaje de inhibición obtenido, las cepas bacterianas evaluadas inhibieron el crecimiento del hongo fitopatógeno en un 11.33% (M2-7) y un 6.66% (LYA12). Sin embargo, el crecimiento del hongo no mostró diferencias significativas entre las cepas (Figura 3).

Con frecuencia las PGPB sintetizan y liberan compuestos volátiles con función de biocontrol sobre los fitopatógenos. En nuestro estudio, las cepas bacterianas de *B. licheniformis* (M2-2 y LYA12) mostraron actividad antagónica no sólo por compuestos difundidos en el medio sino también por VOC. Aunque se ha aislado una gran diversidad de VOCs que inhiben el crecimiento de fitopatógenos, aún se desconoce el papel biológico de la mayoría. Esta línea de investigación representa un campo de trabajo con gran aplicabilidad en áreas como la agricultura sostenible.

Bacillus licheniformis* M2-7 y LYA12 aumentaron la germinación de semillas de *Capsicum annuum

La germinación de las semillas de *C. annuum* en el testigo fue del 72%, mientras que las semillas inoculadas con las cepas M2-7 y LYA12 alcanzaron porcentajes de germinación del 89 y 78%, 15 d después de la siembra (Figura 4). La cepa *B. licheniformis* M2-7 mostró un porcentaje de germinación mejor ($p \leq 0.05$) que la cepa modificada (LYA12) y el testigo (semillas sin bacterias).

Bacillus es uno de los géneros bacterianos más estudiados debido a la capacidad de promover el crecimiento de plantas de cultivos de importancia económica (Myresiotis *et al.*, 2015). En nuestro estudio,

The antagonistic effect of M2-7 and LYA12 strains of *B. licheniformis* by the volatile compounds produced was observed on the growth of *Colletotrichum* sp. (Table 1). Observations after 10 d of incubation, allowed visualizing that the control (*Colletotrichum* sp. growing without exposure to the volatile compounds of the bacteria), presented pigmentation in the mycelium. This pigmentation was completely absent in those experimental units tested with bacteria. According to the percentage of inhibition obtained, evaluated bacterial strains inhibited growth of the phytopathogenic fungus by 11.33% (M2-7) and 6.66% (LYA12). However, fungus growth did not show significant differences between strains (Figure 3).

It is frequent that PGPB synthesize and release volatile compounds with a biocontrol function on phytopathogens. In our study, bacterial strains of *B. licheniformis* (M2-7 and LYA12) showed antagonistic activity not only by compounds diffusible in the medium but also by VOC. Although a great diversity of VOC have been isolated that inhibit the growth of phytopathogens, the biological role of most of them is still unknown. This line of research represents a field of work with vast applicability in areas such as sustainable agriculture.

Bacillus licheniformis* M2-7 and LYA12 increased the germination of *Capsicum annuum

Germination obtained on *C. annuum* seeds in control was 72%, while seeds inoculated with strains M2-7 and LYA12 reached germination percentages of 89 and 78%, 15 d after sowing (Figure 4). Strain *B. licheniformis* M2-7 showed a better germination percentage ($p \leq 0.05$) than the modified strain (LYA12) and the control (seeds without bacteria).

Bacillus is one of the most studied bacterial genera due to the ability to promote the growth of economically important crop plants (Myresiotis *et al.*, 2015). In our study, the bacterial strain that showed the best beneficial effect on seed germination was M2-7, followed by LYA12 (Figure 4). In this regard, Aguirre-Medina and Espinosa-Moreno (2016) evaluated the effect of four bacterial strains of the genus *Bacillus*: *Bacillus* sp. MA04, *B. megaterium* MA06, *B. subtilis* MA12 and *B. megaterium* MA17 in the germination of chili seeds and determined that strain MA06 significantly improved germination (96.83%), 15 days after sowing.

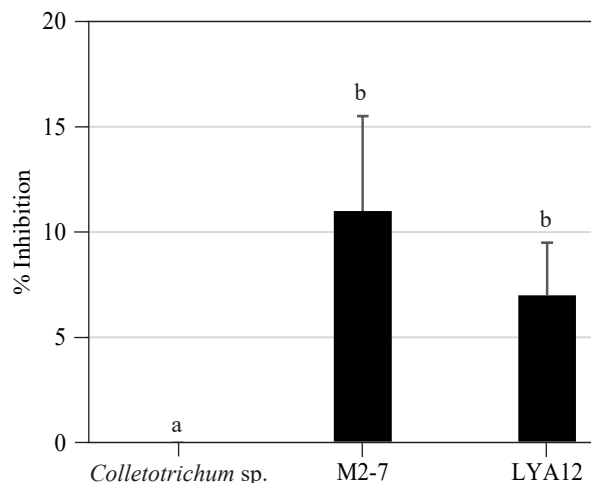


Figure 3. Percentage of inhibition by volatile compounds of the strains *Bacillus licheniformis* (M2-7 and LYA12) against *Colletotrichum* sp. Values are expressed as means $\pm$ SD of three independent experiments. One-way ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). Different letters on bars indicate significant differences.

Figura 3. Porcentaje de inhibición por compuestos volátiles de las cepas *Bacillus licheniformis* (M2-7 y LYA12) contra *Colletotrichum* sp. Los valores se expresan como medias $\pm$ SD de tres experimentos independientes. ANDEVA de una vía y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas.

la cepa bacteriana que mostró efecto benéfico mejor sobre la germinación de las semillas fue M2-7, seguida de LYA12 (Figura 4). Al respecto, Aguirre-Medina y Espinosa-Moreno (2016) evaluaron el efecto de cuatro cepas bacterianas del género *Bacillus*: *Bacillus* sp. MA04, *B. megaterium* MA06, *B. subtilis* MA12 y *B. megaterium* MA17 en la germinación de semillas de chile y determinaron que la cepa MA06 mejoró de modo significativo (96.83%) la germinación 15 días después de la siembra.

Bacillus licheniformis* M2-7 aumentó la producción de *C. annuum

Con respecto a la altura de la planta, el análisis de los datos mostró que la cepa M2-7 aumentó la altura en un 124.96% en comparación con el testigo. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en comparación con el fertilizante químico (Cuadro 2). Las plantas inoculadas con la bacteria M2-7 alcanzaron una altura media de 78.1 cm en

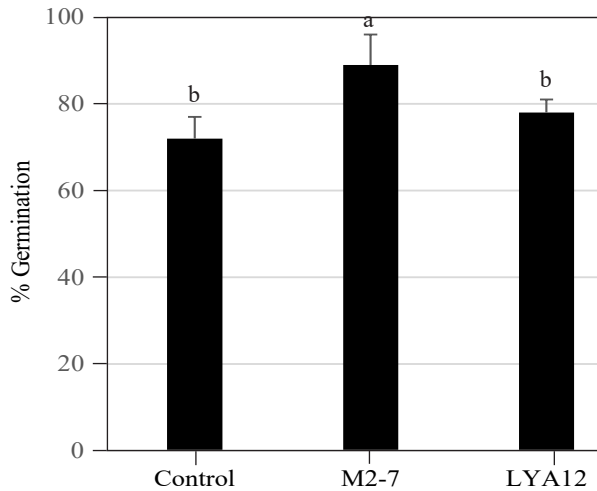


Figure 4. Germination percentage. Values are means $\pm$ SD of three independent experiments. One-way ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). Different letters on bars indicate significant differences.

Figura 4. Porcentaje de germinación. Los valores son las medias $\pm$ SD de tres experimentos independientes. ANDEVA de una vía y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas.

Bacillus licheniformis M2-7 increased the production of *C. annuum*

Respect to plant height, data analysis showed that M2-7 strain increased height 124.96% compared to control. Although, there was no statistically significant difference when compared to chemical fertilizer (Table 2). Plants inoculated with the M2-7 bacteria reached an average height of 78.1 cm compared to plants with chemical fertilizer (67.4 cm) and the control (34.7 cm). In addition, the effect of inoculation with M2-7 strain was expressed on fresh

comparación con las plantas con fertilizante químico (67.4 cm) y el testigo (34.7 cm). Además, el efecto de la inoculación con la cepa M2-7 se manifestó en peso fresco, diámetro del tallo, peso de la raíz, número y peso de los frutos. En todas las variables, el tratamiento con *B. licheniformis* M2-7 mostró diferencias estadísticas (Tukey, $p \leq 0.05$) en comparación con los otros tratamientos evaluados.

En el análisis de la variable peso fresco de la planta, la prueba de Tukey mostró que la cepa M2-7 causó el incremento mayor en biomasa de planta (56.4 g), seguida por el fertilizante químico (32.7 g), y el testigo (16.6 g). Este incremento equivale a un 235% en el tratamiento con la cepa M2-7, y un 96% de incremento en el peso de las plantas con el tratamiento de fertilizante químico, comparado con el testigo. Nuestros resultados coinciden con los documentados por Luna *et al.* (2013), quienes evaluaron el efecto de la inoculación de cuatro cepas de *Bacillus* (MA04, MA06, MA12 y MA17) en el crecimiento de plántulas de pimiento durante 2 meses. Estos autores encontraron que la cepa MA12 de *B. subtilis* indujo hasta un 37% más de biomasa en las plantas de pimiento. González-Manzilla *et al.* (2016) encontraron que la inoculación de las cepas *Rhizobium nepotum* CPAC35 y *Serratia plymuthica* CPPC55 mejoró significativamente la biomasa total de las plantas al incrementarla en un 72% a los 82 d de la siembra.

El diámetro promedio del tallo de las plantas tratadas con la cepa M2-7 (1.02 mm) mostró una diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0.05$) respecto al tratamiento con fertilizante (0.55 mm) y al testigo (0.25 mm). Esto representa un 308% más con la cepa M2-7, y un 120% más con el fertilizante en comparación con el testigo. En otro estudio, Yau *et al.*, (2013) encontraron aumentos de diámetro debido

Table 2. Effect of strain M2-7 on the growth and yield of *C. annuum* L.

Cuadro 2. Efecto de la cepa M2-7 en el crecimiento y rendimiento de *C. annuum*.

Treatment	Height (cm)	PFW (g)	ST (mm)	RW (g)	NF	FW (g)
Fertilizer	67.4 $\pm$ 3.02a	32.78 $\pm$ 6.31b	0.55 $\pm$ 0.08b	6.2 $\pm$ 1.05b	3.5 $\pm$ 0.50b	18.61 $\pm$ 2.67b
M2-7	78.13 $\pm$ 4.05a	56.00 $\pm$ 4.22a	1.02 $\pm$ 0.40a	13.61 $\pm$ 1.98a	7.5 $\pm$ 1.22a	46.17 $\pm$ 11.46a
Control	34.73 $\pm$ 14.35b	16.67 $\pm$ 16.67c	0.25 $\pm$ 0.14c	3.33 $\pm$ 1.33c	1.8 $\pm$ 1.26c	9.33 $\pm$ 8.18c

PFW = fresh weight of the plant; ST = stem diameter; RW = root weight; NF = number of fruits; FW: fruit weight. Values are means $\pm$ SD of three independent experiments. One-way ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). Different letters in columns indicate significant differences. ♦ PFW = peso fresco de la planta; ST = diámetro del tallo; RW = peso de raíz; NF = número de frutos; FW: peso del fruto. Los valores son medias $\pm$ SD de tres experimentos independientes. ANDEVA de una vía y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas.

weight, stem diameter, root weight, number and weight of fruits. In all of variables, *B. licheniformis* M2-7 treatment showed statistical differences (Tukey, $p \leq 0.05$) compared to the other evaluated treatments.

In the analysis of the variable fresh weight of the plant, the Tukey test showed that strain M2-7 caused the greatest increase in plant biomass (56.4 g), followed by chemical fertilizer (32.7 g), and control (16.6 g). This increase is equivalent to 235% in the treatment with the M2-7 strain, and 96% increment in weight of plants with the chemical fertilizer treatment, compared to control. Our results agree with those reported by Luna *et al.* (2013), who evaluated the effect of the inoculation of four *Bacillus* strains (MA04, MA06, MA12 and MA17) on the growth of bell pepper seedlings for 2 months. They found that *B. subtilis* MA12 strain induced up to 37% more biomass in bell pepper plants. Gonzalez-Manzilla *et al.* (2016) found that the inoculation of the *Rhizobium nepotum* CPAC35 and *Serratia plymuthica* CPPC55 strains significantly improved total plant biomass by increasing it 72% at 82 d after sowing.

The average stem diameter of plants treated with M2-7 strain (1.02 mm) showed significant difference (Tukey, $p \leq 0.05$) respect to fertilizer treatment (0.55 mm) and control (0.25 mm). That represents 308% plus with strain M2-7, and 120% plus with fertilizer compared to the control. In another study, Yau *et al.*, (2013) found diameter increases due to the inoculation of *Serratia marcescens* and *Bacillus cereus* in chili plants. In our study, *B. licheniformis* M2-7 induced greater root growth in *C. annuum* plants.

The greater root development may be related to the production of indole acetic acid that modifies morphology and increases root biomass. The indole acetic acid (IAA) produced by the inoculated strains is the main metabolite that induces plant growth, by increasing cell division and tissue differentiation. Both effects expressed in a higher biomass content (Camelo *et al.*, 2011). This was corroborated by Ribaudó *et al.*, (2006), who found higher content of IAA in the tissues of plants inoculated with *Azospirillum* sp. compared to non-inoculated plants.

The average fruit yield obtained for the plants treated with *B. licheniformis* M2-7 was 7.5 and it

a la inoculación de *Serratia marcescens* y *Bacillus cereus* en plantas de chile. En nuestro estudio, *B. licheniformis* M2-7 indujo un mayor crecimiento de las raíces en las plantas de *C. annuum*.

El desarrollo mayor de las raíces puede estar relacionado con la producción de ácido indol acético que modifica la morfología y aumenta la biomasa de las raíces. El ácido indol acético (IAA) producido por las cepas inoculadas es el principal metabolito que induce el crecimiento vegetal, al aumentar la división celular y la diferenciación de los tejidos. Ambos efectos se expresan en un contenido de biomasa mayor (Camelo *et al.*, 2011). Esto fue corroborado por Ribaudó *et al.*, (2006), quienes encontraron un contenido mayor de IAA en los tejidos de las plantas inoculadas con *Azospirillum* sp. en comparación con las plantas no inoculadas.

El rendimiento promedio de frutos obtenido para las plantas tratadas con *B. licheniformis* M2-7 fue de 7.5 y fue diferente ($p \leq 0.05$) al tratamiento 1 (Nitrofoska, 94%) y al tratamiento 3 (plantas sin inóculo). Este resultado coincide con lo observado por Aguirre-Medina y Espinosa-Moreno (2016) quienes encontraron que la inoculación de *Rhizophagus* y *Azospirillum* produjo alrededor de seis o siete frutos por planta de chile. Hernández-Castillo *et al.* (2014) estudiaron el efecto de tres especies de *Bacillus* en *C. annuum* 40 d después del trasplante. Encontraron que las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* (B1), *B. licheniformis* (B3) y *B. subtilis* (B13) aumentaron significativamente el crecimiento y el rendimiento del chile verde (jalapeño) en comparación con el tratamiento químico (tiabendazol 10 ml L⁻¹ de agua) y el testigo con incrementos promedio de 28 y 34.5%.

Nuestros resultados demostraron que la cepa *B. licheniformis* M2-7 tuvo un efecto promotor del crecimiento en el chile debido a todos los mecanismos directos mostrados. Estos son: la fijación biológica de nitrógeno, la producción de auxinas giberelinas, la solubilización del fosfato, y la actividad de la ACC deaminasa producida e involucrada en la biofertilización. El aislamiento y la caracterización de cepas bacterianas nuevas, promotoras del crecimiento vegetal, adaptadas a las condiciones ambientales de la región en estudio, y a especies de interés agrícola, representa una alternativa tecnológica como biofertilizantes en la producción de cultivos.

was different ($p \leq 0.05$) to treatment 1 (Nitrofoska, 94%) and treatment 3 (plants without inoculum). This result agrees with that reported by Aguirre-Medina and Espinosa-Moreno (2016) who found that the inoculation of *Rhizophagus* and *Azospirillum* produced around six or seven fruits per chili plant. Hernández-Castillo *et al.* (2014) studied the effect of three species of *Bacillus* on *C. annuum*, 40 d after transplant. They found that *Bacillus amyloliquefaciens* (B1), *B. licheniformis* (B3) and *B. subtilis* (B13) strains significantly increased growth and yield of green pepper (jalapeno), compared to the chemical treatment (thiabendazole 10 mL L⁻¹ of water) and the control with an average increases of 28 and 34.5%.

Our results demonstrated that *B. licheniformis* M2-7 strain had a growth promoting effect in chili due to all of the direct mechanisms expressed. Those are, biological nitrogen fixation, auxin gibberellins production, phosphate solubilization, and ACC activity deaminase produced and involved in biofertilization. The isolation and characterization of new bacterial strains promoting plant growth, adapted to the environmental conditions of the region under study, and to species of agricultural interest, represents a technological alternative as biofertilizers in crop production.

CONCLUSIONS

Strain M2-7 can be used in specific formulations to increase the germination percentage, production and yield of *Capsicum annuum*.

In every growth and yield variable tested, M2-7 and LYA12 strains showed increases. Also, they promoted physio-chemical, and biological benefits when compared to chemical fertilizer; thus proving their potential, as fungus biocontrol and as biofertilizer for chili plants.

LITERATURE CITED

- Aguirre-Medina, J. F., y J. A. Espinosa-Moreno. 2016. Crecimiento y rendimiento de *Capsicum annuum* L. inoculado con endomicorriza y rizobacterias. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 7: 1539-1550.
- Ahmad, Z., J. Wu, L. Chen, and W. Dong. 2017. Isolated *Bacillus subtilis* strain 330-2 and its antagonistic genes identified by the removing PCR. *Scient. Rep.* 7: 1777-1790.
- Camelo, M., S. P. Vera, y R. R. Bonilla. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Cienc. Tecnol. Agropec.* 12: 159-166.

CONCLUSIONES

La cepa M2-7 puede utilizarse en formulaciones específicas para aumentar el porcentaje de germinación, la producción y el rendimiento de *Capsicum annuum*.

En todas las variables de crecimiento y rendimiento probadas, las cepas M2-7 y LYA12 mostraron incrementos. Además, promovieron beneficios físico-químicos y biológicos en comparación con el fertilizante químico; y demostraron así su potencial como biocontrol de hongos y como biofertilizante para las plantas de chile.

—End of the English version—

---*---

- Chávez-Ambríz, L. A., A. Hernández-Morales, J. A. Cabrera-Luna, L. Luna-Martínez, y J. R. Pacheco-Aguilar. 2016. Aislados de *Bacillus* provenientes de la rizósfera de cactus incrementan la germinación y la floración en *Mammillaria spp.* (Cactaceae). *Rev. Argentina Microbiol.* 48: 333-341.
- García-Gaytán, V., F. Gómez-Merino, L. I. Trejo-Téllez, G. Baca-Castillo, and S. García-Morales. 2017. The Chilhuacle Chili (*Capsicum annuum* L.) in Mexico: Description of the variety, its cultivation, and uses. *Int J. Agron.* 2017: 1-13.
- Gonzalez-Mancilla, A., J. J. Almaraz-Suárez, R. Ferrera-Cerrato, M. P. Rodríguez-Guzmán, O. R. Taboada-Gaytán, A. Trinidad-Santos, A. Alarcón, y R. I. Arteaga-Garibay. 2016. Caracterización y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de chile poblano (*Capsicum annuum* L.). *Rev. Int. Contam. Ambie.* 33: 463-474.
- Guevara-Luna, J., P. Alvarez-Fitz, E. Ríos-Leal, M. Acevedo-Quiroz, S. Encarnación-Guevara, M. E. Moreno-Godínez, M. Castellanos-Escamilla, J. Toribio-Jiménez, and Y. Romero-Ramírez. 2018. Biotransformation of benzo[a]pyrene by the thermophilic bacterium *Bacillus licheniformis* M2-7. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34: 88.
- Guzmán, A., M. Obando, D. Rivera, y R. R. B. Buitrago. 2012. Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 14: 182-190.
- Hernández-Castillo, F. D., R. H. Lira-Saldivar, G. Gallegos-Morales, M. Hernández-Suárez, y S. Solís-Gaona. 2014. Biocontrol de la marchitez del chile con tres especies de *Bacillus* y su efecto en el crecimiento y rendimiento. *Phyton.* 83: 49-55.
- Luna, M. L., Martínez, P. R. A., Hernández, I. M., Arvizu, M. S. M., Pacheco, y A. J. R. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Rev. Fitotec. Mex.* 36: 63-69.

- Malleswari, D., and G. Bagyanarayana. 2013. Plant growth-promoting activities and molecular characterization of rhizobacterial strains isolated from medicinal and aromatic plants. *J. Pharm. Biol. Sci.* 6: 30–37.
- Myresiotis, C. K., Z. Vryzas, and E. Papadopoulou-Mourkidou. 2015. Effect of specific plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on growth and uptake of neonicotinoid insecticide thiamethoxam in corn (*Zea mays* L.) seedlings. *Pest. Manage. Sci.* 71: 1258–1266.
- Ongena, M., E. Jourdan, A. Adam, M. Paquot, A. Brans, B. Joris, J. L. Arpigny, and P. Thonart. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9: 1084–1090.
- Ragazzo-Sánchez, J. A., A. Robles-Cabrera, L. Lomelí-González, G. Luna-Solano, y M. Calderón-Santoyo. 2011. Selección de cepas de *Bacillus spp.* productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Rev. Chapingo Serie Hortic.* 17: 5–11.
- Ribaudo, C. M., E. M. Krumpholz, F. D. Cassán, R. Bottini, M. L. Cantore, and J. A. Curá. 2006. *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *J. Plant. Growth. Regul.* 24: 175–185.
- Rojas-Aparicio, A., J. A. Hernández-Eligio, J. Toribio-Jiménez, M. A. Rodríguez-Barrera, M. Castellanos-Escamilla, and Y. Romero-Ramírez. 2018. Genetic expression of *pobA* and *fabHB* in *Bacillus licheniformis* M2-7 in the presence of benzo[a]pyrene. *Genet. Mol. Res.* 17: 1–11.
- Santoyo, G., M. del C. Orozco-Mosqueda, and M. Govindappa. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Sci. Technol.* 22: 855–872.
- Tabassum, B., A. A. Khan, M. Tariq, M. Ramzan, M. S. Iqbal Khan, N. Shahid, and K. Aaliya. 2017. Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. *Appl. Soil. Ecol.* 121: 102–117.
- Torres, L. G., M. A. Ávila, y I. Ortiz. 2014. Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Ambient. Algal.* 4: 26–46.
- Touré, Y., M. Ongena, P. Jacques, A. Guiró, and P. Thonart. 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.* 96: 1151–1160.
- Yau, J. A., F. Diáñez, F. Marín, F. Carretero, and M. Santos. 2013. Screening and evaluation of potential biocontrol fungi and bacteria foliar endophytes against *Phytophthora capsici* and *Phytophthora parasitica* on pepper. *J. Food. Agric. Environ.* 11: 490–495.
- Zhao, K., P. Penttinen, X. Zhang, X. Ao, M. Liu, X. Yu, and Q. Chen. 2014. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting Burkholderia cepacia with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiol. Res.* 169: 76–82.
- Zhou, D., X. F. Huang, J. M. Chaparro, D. V. Badri, D. K. Manter, J. M. Vivanco, and J. Gou. 2015. Root and bacterial secretions regulate the interaction between plants and PGPR leading to distinct plant growth promotion effects. *Plant. Soil.* 401: 259–272.