



Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento, contenido de auxinas y acción enzimática en plantas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.)

Piarpuezán Flores, Oswaldo

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario

Ing. Falconí Saá, César Eduardo., PhD.

01 de septiembre del 2023



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Certificación:

Certifico que el trabajo de integración curricular: **Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento, contenido de auxinas y acción enzimática en plantas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.)**, fue realizado por el señor: **Piarpuezán Flores, Oswaldo**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 01 de septiembre del 2023



Firmado digitalmente por:
**CESAR EDUARDO
FALCONI SAA**

Ing. Falconí Saá, César Eduardo., PhD.

C. C: 0601556459

Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos



Plagiarism report

PIARPUEZÁN OSWALDO.docx

Scan details

Scan time:
September 1th, 2023 at 20:7 UTC

Total Pages:
39

Total Words:
9720

Plagiarism Detection

6.7%

Types of plagiarism		Words
Identical	1.4%	133
Minor Changes	0.1%	12
Paraphrased	5.2%	506
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection

N/A

Text coverage

- AI text
- Human text



FIRMADO ELECTRONICAMENTE POR:
CESAR EDUARDO
FALCONI SAA

Ing. Falconí Saá, César Eduardo., PhD.

C. C: 0601556459



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Responsabilidad de Autoría:

Yo, **Piarpuezán Flores, Oswaldo**, con cédula de ciudadanía No. 1725574634, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento, contenido de auxinas y acción enzimática en plantas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.)**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 01 de septiembre del 2023

Piarpuezán Flores, Oswaldo

C.C.: 1725574634



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Autorización de Publicación:

Yo, **Piarpuezán Flores, Oswaldo**, con cédula de ciudadanía No. 1725574634 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento, contenido de auxinas y acción enzimática en plantas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.),** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios es de mi responsabilidad.

Sangolquí, 01 de septiembre del 2023

Piarpuezán Flores, Oswaldo

C.C.: 1725574634

Dedicatoria

A toda mi familia, por confiar en mí.

A mis abuelos, Blanca, Isolina, Luis y Gonzalo (†) por sus enseñanzas, alegrías y amor.

A mi madre, Marlene Flores, por tu sacrificio y tu infinito amor.

A mi Padre, Oswaldo Piarpuezán, por ser mi maestro y por compartirme tu sabiduría, eres mi gran ejemplo.

A mis hermanos, Doris y Franko, gracias por su apoyo y su cariño.

A mi pareja Diana, mi amor, por ser mi sustento y mis alegrías, te amo.

Mi hija, Rafaela, el amor de mi vida, mi razón de ser.

Oswaldo Piarpuezán Flores

Agradecimientos

Mis agradecimientos más sinceros a:

Dios por brindarme la vida para gozar de momentos maravillosos.

A toda mi familia por el esfuerzo y apoyo incondicional que me brindaron en cada proceso.

A la universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y la carrera de Ingeniería Agropecuaria por brindarme la oportunidad de iniciar mi formación como profesional en esta valiosa institución.

Al Dr. Cesar Falconí, director de proyecto, por su acogida, su comprensión, y por compartirme sus conocimientos y experiencia.

A mi amigo y profesor, Ing. Darwin Claudio por la predisposición y apoyo en la realización del proyecto.

A Juana, mi mejor amiga, por todos los momentos grandiosos, por sus consejos y por su apoyo incondicional en este camino universitario.

Mario y Santiago, mis mejores amigos, por su apoyo y por todos los momentos compartidos.

A los docentes y al personal de la institución que de alguna manera me supieron apoyar.

A todos mis compañeros y amigos que conocí en la carrera, con quienes compartí buenos momentos.

Oswaldo Piarpuezán Flores

Índice de contenidos

Carátula.....	1
Certificación	2
Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos.....	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos.....	8
Índice de tablas.....	11
Índice de figuras.....	12
Resumen.....	13
Abstract.....	14
CAPÍTULO I.....	15
INTRODUCCIÓN	15
Antecedentes	15
Justificación.....	15
Objetivos	17
Objetivo General	17
Objetivos específicos	17
Hipótesis.....	17
CAPITULO II.....	18
REVISIÓN DE LITERATURA	18
Albahaca	18
Clasificación Taxonómica	19
Características morfológicas.....	19

Usos.....	21
Composición química	22
Condiciones edáficas y climáticas	23
Biofertilizantes.....	24
Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)	24
<i>Bacillus subtilis</i>	25
Solubilización de fosforo	26
Fijación de nitrógeno atmosférico	28
Producción de auxinas	28
CAPÍTULO III.....	30
METODOLOGÍA.....	30
Ubicación geográfica	30
Establecimiento del cultivo.....	31
Control de calidad	31
Inoculación de <i>Bacillus subtilis</i>	32
Diseño experimental	32
Variables a medir	34
Altura de planta	34
Dinámica poblacional de <i>Bacillus</i>	34
Índice del contenido de clorofila.....	34
Cuantificación de auxinas	35
Acción enzimática de nitrogenasas	36
Acción enzimática de fitasas.....	37
Análisis estadístico.....	37
CAPITULO IV	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39

Altura de la planta	39
Clorofila mediante medidor SPAD	42
Clorofila mediante espectrofotometría.....	43
Auxinas.....	44
Dinámica poblacional.....	45
Acción enzimática de fitasas	48
Acción enzimática de nitrogenasas	50
CAPÍTULO V	52
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
Conclusiones.....	52
Recomendaciones	53
Bibliografía	54

Índice de tablas

Tabla 1 Descripción de tratamientos	33
Tabla 2 Altura en plantas de <i>O. basilicum</i> por efecto de inoculaciones con dos cepas de <i>B. subtilis</i> a lo largo de 75 días después del trasplante.....	41
Tabla 3 Clorofila (SPAD) en plantas de <i>O. basilicum</i> por efecto de inoculaciones con dos cepas de <i>B. subtilis</i> a lo largo de 75 días después del trasplante.....	43
Tabla 4 Índice de clorofila mediante la cuantificación por espectrofotometría de plantas de albacá inoculadas con dos cepas de <i>B. subtilis</i>	44
Tabla 5 Dinámica poblacional de dos cepas de <i>B. subtilis</i> en la rizosfera de <i>O. basilicum</i> a lo largo de 75 días luego del trasplante	47

Índice de figuras

Figura 1 <i>Características morfológicas de la albahaca (O. basilicum L.)</i>	20
Figura 2 <i>Mapa de la zona de estudio</i>	30
Figura 3 <i>Croquis experimental bajo DCA</i>	33
Figura 4 <i>Contenido de auxinas en raíz de O. basilicum</i>	45
Figura 5 <i>Variación de la dinámica poblacional a 75 días del trasplante</i>	48
Figura 6 <i>Capacidad solubilizadora de fosfatos</i>	50
Figura 7 <i>Capacidad de fijar nitrógeno atmosférico</i>	51

Resumen

En la presente investigación se determinó el efecto de inoculaciones periódicas *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la promoción de crecimiento, producción de auxinas, y acción enzimática en plantas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.). *B. subtilis*, es una bacteria que ofrece múltiples beneficios al sector agropecuario, en plantas, promueven el desarrollo y aumenta la productividad, además, tiene la capacidad de solubilizar P, fijar N₂, producir auxinas y sideróforos. El trabajo de investigación se realizó en la Carrera Agropecuaria IASA I de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Las variables evaluadas fueron: altura, dinámica poblacional, índice del contenido de clorofila, cuantificación de auxinas, acción enzimática de nitrogenasas y fitasas. Se empleó un diseño completamente al azar (DCA), ejecutado mediante el software Infostat con un análisis de varianza (ANOVA), y con la prueba de significancia Tukey al 5% para la valoración de los supuestos. El estudio tuvo resultados favorables sobre la promoción de crecimiento en las plantas de albahaca tratadas con la CtpxS3-5 evidenciando mayor crecimiento (19,10 cm), producción de auxinas (3,37 mg/ml), clorofila (26,67 SPAD y 16,48 mg/ml), además, ambas cepas mostraron su capacidad de solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno (acción enzimática de fitasas y nitrogenasas), todo esto debido a la adaptación y viabilidad de la cepa en la rizosfera del cultivo, la cual logró una población de 2,54E+04 a los 75 días después del trasplante.

Palabras clave: BACILLUS, AIA, SOLUBILIZACIÓN

Abstract

The present investigation was determined the effect of periodic inoculations of *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 and CtpxS3-5 on growth promotion, auxin production, and enzymatic action in basil plants (*Ocimum basilicum* L.). *B. subtilis* is a bacterium which offers multiple benefits to the agricultural sector, in plants, it promotes development and increases productivity also it has the ability to solubilize P, fix N₂, produce auxins and siderophores. The research investigation was carried out in Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE at IASA I. The variables evaluated were: height, population dynamics, chlorophyll content index, auxin quantification, nitrogenases enzymatic action and phytases. It was used a completely randomized design (DCA), executed through Infostat software with a variance analysis (ANOVA), and with the 5% Tukey significance test for the evaluation of the assumptions. The study had favorable results on growth promotion in basil plants treated with CtpxS3-5, showing greater growth (19.10 cm), auxin production (3.37 mg/ml), chlorophyll (26.67 SPAD and 16.48 mg/ml), also, both strains showed their ability to solubilize phosphates and fix nitrogen (phytases enzymatic action and nitrogenases), all this due to adaptation and viability of the strain in the rhizosphere of the crop, which reached a population of 2.54 E+04 at 75 days after transplantation.

Keywords: BACILLUS, AIA, SOLUBILIZATION

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

Las plantas medicinales y aromáticas en los últimos años han tenido gran trascendencia en áreas académicas, ciencias de la salud y en el sector industrial. Entre estas, la albahaca y sus extractos posee gran potencial antioxidante, inmunomodulador, antimicrobiano e insecticida, además, en recientes investigaciones se ha demostrado sus efectos anticancerígenos, antiestrés, antiinflamatorios contra enfermedades cardiovasculares. (Li y Chang, 2015; Shahrajabian *et al.*, 2020).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (conocidas como PGPR, por sus siglas en inglés), habitan la rizosfera y colonizan las raíces de las plantas, estas actúan en la mejora de la disponibilidad de nutrientes, reducen el estrés abiótico, aumentan las defensas de las plantas y combaten ciertos Blake patógenos (Blake *et al.*, 2021; Falconí *et al.*, 2022; Falconí y Yáñez-Mendizábal, 2022)

Ciertas rizobacterias del género *Bacillus* promueven el crecimiento vegetal a causa de que son capaces de solubilizar fosfatos (P), fijar nitrógeno molecular (N₂), y en general, permiten que los nutrientes inaccesibles estén disponibles y sean de fácil asimilación por las plantas (Kumar *et al.*, 2011).

Las especies de *Bacillus subtilis* son capaces de formar endosporas resistentes a los cambios extremos de condiciones ambientales, además secretan metabolitos que estimulan el crecimiento y la salud de los cultivos. Estos organismos con características únicas, deberían ser motivo de investigación y explotación en el agro, y así tratar de responder a las necesidades de los sistemas de producción sostenible y ecológicos (Hashem *et al.*, 2019).

Justificación

El género *Bacillus* se ha convertido en uno de los grupos de rizobacterias más estudiados debido a que promueven el crecimiento vegetal, inducen resistencia sistémica a las

plantas Falconí y Yáñez-Mendizábal (2022) dificulta la infección por patógenos Yáñez-Mendizábal y Falconí (2018) forman endosporas (de larga vida) que le permiten soportar condiciones climáticas adversas y sobreviven en el suelo durante largos periodos (Hashem *et al.*, 2019)

Según Jabborova *et al.* (2021) *Bacillus subtilis* actúa positivamente en el desarrollo y productividad de especies vegetales, estos microorganismos también tienen la capacidad de solubilizar P, producir IAA y sideróforos.

En investigaciones posteriores, Yáñez-Mendizábal y Falconí (2018) demostraron que cepas de *Bacillus* aisladas de la filosfera de las vainas de *Lupinus mutabilis* (*B. subtilis* CtpxS2-1 y *B. subtilis* CtpxS3-5) producen lipopeptidos antifúngicos que son eficaces en el control de la antracnosis, enfermedad fúngica causada por *Colletotrichum acutatum*. Además, la aplicación de *Bacillus* activa mecanismos que logran inducir resistencia sistémica (ISR) en plantas, y también aumentó los contenidos de clorofila, proteína foliar, el contenido y actividad enzimática lo que mejoró la respuesta de crecimiento en las plantas tratadas (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2023; Yáñez-Mendizábal y Falconí, 2018, 2021).

Por todo lo mencionado, el desarrollar bioinoculantes utilizando PGPR deberían considerarse como una estrategia eficaz de biofertilización, para reducir la dependencia de fertilizantes minerales manteniendo la productividad y reduciendo los efectos negativos sobre el medio ambiente, es por eso que en este estudio se evaluará el efecto de bioproductos formulados con dos cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la promoción de crecimiento, contenido de auxinas y acción enzimática de plantas de albahaca. Estos bioproductos han sido previamente formulados en un medio de bajo costo con la metodología que describen (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2023; Yáñez-Mendizábal y Falconí, 2018, 2021).

Objetivos

Objetivo General

Determinar el efecto de inoculaciones con *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la promoción de crecimiento, producción de auxinas, y acción enzimática en plantas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) en un periodo de 3 meses.

Objetivos específicos

Analizar la acción de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la promoción de crecimiento en plantas de albahaca en un periodo de 3 meses.

Evaluar el contenido de auxinas en plantas de albahaca inoculadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en un periodo de 3 meses.

Estimar la acción enzimática de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en plantas de albahaca en un periodo de 3 meses.

Cuantificar la dinámica poblacional de *B. subtilis* presente en la rizosfera de plantas de albahaca cada 15 días a lo largo de 3 meses.

Hipótesis

H0: Las células de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 no actúan sobre los parámetros agronómicos, fisiológicos y bioquímicos en plantas de albahaca.

H1: Las células de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 actúan sobre los parámetros agronómicos, fisiológicos y bioquímicos en plantas de albahaca.

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

Albahaca

La albahaca dulce (*Ocimum basilicum* L.), conocida como el “rey de las hierbas”, es una hierba medicinal y aromática probablemente con origen en Asia Meridional, se conocen más de 250 especies de albahaca en el mundo y se cultiva principalmente en regiones tropicales y subtropicales (Makri y Kintzios, 2008).

La albahaca dulce es originaria de Asia tropical y la India, crece de forma silvestre en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Actualmente, se cultiva comercialmente en países cálidos y templados incluidos Francia, Hungría, Grecia, Egipto, Marruecos, Indonesia, EE UU y Canadá, y debido a su gran importancia en el ámbito medicinal e industrial, a estos se están sumando países sudamericanos (Arvy y Gallouin, 2007; Pushpangadan y George, 2012).

En la actualidad, la albahaca es una de las hierbas aromáticas más apetecidas y preferidas en países como Francia, Alemania y Estados Unidos, convirtiéndose, por su agradable sabor, su suave aroma y sus propiedades medicinales en la especie que más se consume en el entorno internacional (Rodríguez Armijos y Silva Aguilar, 2017; Unión Europea [UE] y Asociación de Exportadores de Guatemala [AGEXPORT], 2021).

En Ecuador la producción de albahaca puede ser otra opción para generar diversidad agrícola, cambiar la producción de cultivos tradicionales como las rosas, plátano, cacao, entre otras, y de esa manera generar un vínculo con pequeños, medianos y grandes productores para poder generar oportunidades y abrir nuevos mercados (Montoya, 2022)

La demanda de albahaca en mercados internacionales está creciendo paulatinamente, gracias a sus bondades medicinales. En Ecuador no se han realizado suficientes investigaciones, es decir que no hay información referente al manejo, producción o comercialización (Montoya, 2022).

Clasificación Taxonómica

La albahaca o basil (nombre en inglés), es una planta perteneciente a la familia: Lamiaceae; género: *Ocimum* L. y especie: *Ocimum basilicum* L. El término basil proviene del nombre científico de esta planta, cuya traducción del latín sería planta real. A continuación, se detallan las categorías a la que pertenece la misma.

Dominio: Eucaritoa

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub clase: Asteranae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Ocimum* L.

Especie: *Ocimum basilicum* L.

Características morfológicas

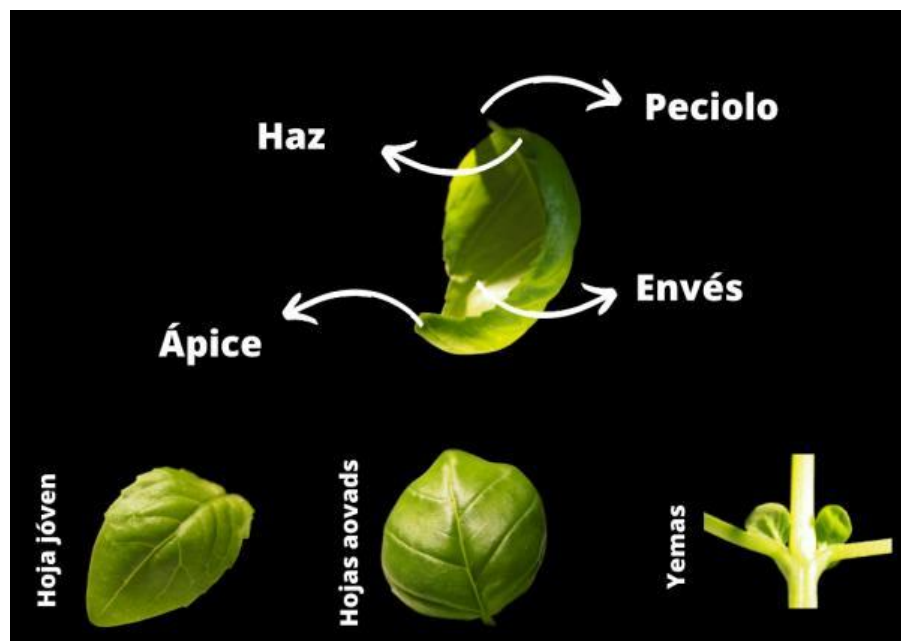
La diversidad morfológica que presentan las especies de albahaca se ha acentuado desde la domesticación del cultivo, entre especies muestran variabilidad en características fenotípicas, incluyendo la forma, superficie, margen y color de la hoja, el color del tallo, el color de la flor, altura de la planta y longitud de la inflorescencia (Javanmardi *et al.*, 2002).

Es una planta perenne o anual, herbácea de 30 a 90 cm de altura, ligeramente vellosa, posee un tallo cuadrangular erguido y muy ramificado, además, es de carácter herbáceo cuando el tejido es joven, mientras que, cuando el tallo madura y envejece se vuelve semi leñoso (Arvy y Gallouin, 2006; Department of Agriculture, Forestry and Fisheries [DAFF], 2012).

Sus hojas alcanzan de 5 a 9 cm de largo, son lanceoladas, opuestas, ligeramente dentadas o enteras, glabras en ambas caras y aovadas, presentan vellos pequeños y rígidos en la cara inferior, los cuales presentan altos contenidos de ácidos esenciales, mientras que, en la cara superior son de color verde claro, lisas y brillantes (Figura 1) (Arvy y Gallouin, 2007; Pushpangadan y George, 2012).

Figura 1

Características morfológicas de la albahaca (O. basilicum L.)



Nota. Autoría propia.

Las flores son blancas con ligeros rasgos purpuras o rosadas según la variedad, zigomorfas, dispuestas en espigas alargadas de 5 a 10 flores por verticilo, las mismas que se encuentran en los extremos de las ramas o en la parte superior del tallo. El cáliz es gamosépalo casi regular, dividido en 5 lóbulos, el labio superior es redondeado, y el labio inferior está compuesto por 4 dientes cortos y estrechos. La corola es bilabiada, el labio superior está formado por 4 pétalos dorsales subiguales, el labio inferior apenas más largo está formado por un solo pétalo ventral muy desarrollado, cóncavo o aplastado. El androceo consta de 4 estambres dinámicos. El gineceo descansa sobre un disco nectarífero. Está formado

por dos carpelos soldados. El ovario comprende 2 lóbulos que contiene 2 óvulos cada uno (Arvy y Gallouin, 2006).

La flor produce el fruto, que es un tetraquenio liso o n poco rugosos a veces, ovoides o esféricos. El fruto contiene 4 semillas que llegan a medir 1 mm de diámetro. La semilla es ovoide o esférica, exalbumianda, dura, lisa cuyo color varía del marrón al negro y está envuelta en una sustancia mucilaginoso que se hincha al contacto con el agua (AGEXPORT, 2021; Arvy y Gallouin, 2006; Bareño, 2004; DAFF, 2012)

Usos

La albahaca desde la antigüedad se utiliza en rituales, ceremonias ancestrales y medicina tradicional. Esta planta tiene un contenido de compuestos biológicamente activos capaces de actuar como insecticidas, nematicidas, antifúngicos y antimicrobianos (Vieira *et al.*, 2003).

La albahaca dulce es la especie más importante en el ámbito económico, se puede utilizar su biomasa fresca o seca, ya sea como aromatizante o como especia para la elaboración de alimentos. Además, el aceite producto de la extracción de la planta, se usa para dar sabor y aroma a los alimentos, se usa en productos dentales, bucales, y en fragancias (Filip, 2017; Shokooh y Badi, 2013).

Los usos farmacológicos más importantes de la albahaca son la actividad anticancerígena, la capacidad antioxidante, la actividad antimicrobiana, la actividad radio protectora, la actividad inmunomodulador, el efecto antiinflamatorio, la actividad antiestrés, la actividad antidiabética, la actividad antiartrítica, la actividad antipirética, el uso como agente profiláctico y en enfermedades cardiovasculares (Pushpangadan y George, 2012; Shahrajabian *et al.*, 2020).

Arvy y Gallouin (2006) informan que médicos árabes del siglo X empleaban las flores y hojas en virtud de sus virtudes estomacales, antiespasmódicas, cefálicas y pectorales.

También, existe información sobre sus usos y efectos contra la ictericia, la hidropesía, la fatiga, la angustia, el insomnio, la ansiedad y como afrodisiaco.

Extractos de esta planta puede tener una aplicación potencial en la prevención de inflamaciones patológicas. Se preparó extracto etanólico al 50 % de hojas secas in vivo, in vitro y callos de hojas de *O. basilicum*, luego se trataron a células macrófagas de ratón RAW264.7 reduciendo drásticamente los efectos inflamatorios de células afectadas (Aye *et al.*, 2019).

Composición química

Tanto la composición química como el aroma que tenga la albahaca, dependen específicamente de características como el tejido analizado, variedad, método de análisis, sitio de cultivo y tiempo de cosecha. De manera general, en esta planta se ha reportado la presencia de metabolitos secundarios como aceites esenciales, flavonoides, taninos, antocianinas y fenoles (Filip, 2017).

En investigaciones realizados por Baczek *et al.* (2019) se lograron detectar 24 sustancias que hacían parte del aceite esencial. Entre estos, el linalol y metil chavicol son compuestos dominantes y forman hasta el 90 % del total del aceite. Ambos compuestos están relacionados con el aroma de la hierba.

Los diferentes y agradables sabores de la albahaca resulta de complejas combinaciones entre distintos compuestos químicos. Carvalho *et al.* (2016) lograron identificar 62 moléculas volátiles que se pueden clasificar en cinco clases químicas: ésteres de ácidos carboxílicos, acilos grasos, mono terpenoides, fenilpropanoides y sesquiterpenoides. Los constituyentes principales son los terpenoides y fenilpropanoides, los mono-terpenos linalol y 1,8 cineol, los sesqui-terpenos α bergamoteno y α farneseno, y los fenilpropenos eugenol, estragol, z-metil cinamato, metil eugenol e isoeugenol (Arvy y Gallouin, 2006).

Entre los ácidos grasos que predominan en las especies de albahaca son el ácido esteárico, el ácido oleico, el ácido palmítico, el ácido linoleico, el ácido mirístico, el ácido α -linolénico, el ácido cárpico, el ácido láurico y el ácido araquidónico (Shahrajabian *et al.*, 2020).

Entre los principales componentes de la albahaca dulce están los mono-terpenos, sesqui-terpenos y los fenilpropanoides. Los compuestos aromáticos que predominan y son responsables del aroma característico de la albahaca son el linalol, estragol, cineol y en menor proporción el eugenol (Filip, 2017; Makri y Kintzios, 2008; Shokooh y Badi, 2013).

O. basilicum contiene compuestos fenólicos y flavonoides que le confieren su capacidad antioxidante, entre estos están el ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido sináptico, ácido ferúlico, ácido vanílico, quercetina, rutina, clorogénico y p-hidroxibenzoico. Estos compuestos son potenciales eliminadores de radicales libres y quelantes de metales (Javanmardi *et al.*, 2002; Jayasinghe *et al.*, 2003; Shahrajabian *et al.*, 2020).

El linalol es un mono-terpeno que ha mostrado una serie de actividades biológicas, como sedantes, alivia el estrés y efectos neurológicos. El estragol tiene un olor dulce, se usa en la constitución de ciertas fragancias y emana un agradable olor aromático a fruta y anís. El eugenol es un compuesto utilizado en la industria de la perfumería, saborizantes y como medicamento antiséptico local (Filip, 2017; Li y Chang, 2015).

Condiciones edáficas y climáticas

La albahaca se adapta a climas tropicales y subtropicales, la zona mediterránea que se caracteriza por poseer regiones templadas y subtropicales, es una zona idónea para el cultivo de esta especie. La temperatura para su desarrollo puede variar entre 7 a 27 °C, y para la germinación se necesita temperaturas cercanas a 20°C. Se desarrolla mejor en días con altas temperaturas llenos de sol, no resisten heladas, ni temperaturas bajas (DAFF, 2012).

La albahaca es un cultivo que necesita un manejo sencillo desde la siembra hasta la cosecha, se adapta muy bien a climas cálidos y templados, se desarrolla adecuadamente a temperaturas de 15 a 25 °C, le afectan fuertemente las heladas y a bajas temperaturas dificulta su reproducción (Arvy y Gallouin, 2007; Montoya, 2022).

Los suelos francos, con buena aireación y con altos contenidos de materia orgánica son idóneos para un buen desarrollo de la planta, además, se ha demostrado que la albahaca es

resistente a suelos salinos, alcalinos y moderadamente ácidos (Pushpangadan y George, 2012). Se ha evidenciado un buen desarrollo radicular en suelos profundos, con buen drenaje, suelos de textura liviana, suelos francos o francos arenosos son fundamentales para el buen crecimiento de la planta (UE y AGEXPORT, 2021).

Biofertilizantes

Son compuestos fertilizantes de origen orgánico que proporcionan nutrientes necesarios para el desarrollo de las plantas, están elaborados en mezcla de una o más especies de microorganismos útiles que viven en el ambiente fácilmente adaptables a los distintos medios de cultivo (Mehrafarin *et al.*, 2013).

En una agricultura sostenible para aumentar la fertilidad del suelo, mejorar el crecimiento y producción de las plantas se está usando bioproductos formulados con diferentes cepas de microorganismos seleccionados de la rizosfera que sean capaces de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fosfatos, promover el crecimiento radicular y así mejorar la disponibilidad y absorción de nutrientes (Canbolat *et al.*, 2006).

Vessey (2003) define al biofertilizante como una sustancia que contiene microorganismos vivos que, al ser aplicado a las semillas, a la superficie de las plantas o al suelo, estos microbios se asocian con la planta colonizando la rizosfera o el interior de la planta y promueven el crecimiento aumentando el suministro o la disponibilidad de nutrientes esenciales.

Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)

Las rizobacterias promotoras de crecimiento son bacterias que colonizan la rizosfera, son capaces de promover el desarrollo de las plantas al mejorar la disponibilidad de nutrientes, producir hormonas vegetales y moléculas que estimulan el crecimiento. Además, Kanjanasopa *et al.* (2021) mencionan que las rizobacterias participan en procesos de inducción a resistencia de las plantas ante el estrés biótico y abiótico, por medio de la liberación de metabolitos antimicrobianos, síntesis de fitohormonas y producción de sideróforos. Etesami y Glick (2020)

indican que las PGPR generan fitohormonas asociadas al desarrollo de las plantas, disuelven fosfatos insolubles y el fósforo presente en el suelo, producen sideróforos provocando la supresión de patógenos y en recientes investigaciones se ha demostrado que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico. Etesami y Glick (2020) señalan también los usos más importantes de las PGPR en diferentes aspectos del sector agropecuario como lo son: la fitorremediación, biofertilización, control biológico y últimamente se está usando para la fito desalinización.

Lin *et al.* (2019) demostraron que el efecto de inoculaciones constantes con una bioformulación de PGPR previamente seleccionadas en un cultivo de maíz bajo invernadero, fue positivo en cuanto a la fijación y asimilación del nitrógeno, ya que como resultado se obtuvo altas concentraciones de nitrógeno en la biomasa de la planta.

Las bacterias que viven en la rizosfera del suelo pueden mejorar el desarrollo de las plantas por medio de varios mecanismos como la solubilización de fosfatos, el antagonismo contra patógenos, la producción de fitohormonas, sideróforos y antibióticos, la inhibición de la actividad vegetal, síntesis de etileno e inducción de resistencia sistémica a patógenos (Falconí y Yáñez-Mendizábal, 2022; Walia *et al.*, 2014; Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2012; Yáñez-Mendizábal y Falconí, 2018)

Kour *et al.* (2020) realizaron ensayos en condiciones de sequía y demostraron que las PGPR provocan cambios físicos y químicos que crean plantas resistentes a condiciones de estrés abiótico, de igual modo demostraron la capacidad de solubilizar fosfatos y fósforo mineral que se encuentra insoluble en la estructura del suelo. Asimismo, en suelos salinos, estos microorganismos aumentan la absorción de nutrientes y reducen la necesidad de utilizar fertilizantes químicos (Etesami y Noori, 2019).

Bacillus subtilis

Del género *Bacillus*, la especie que más abunda y tiene un gran interés industrial es *Bacillus subtilis*, los diversos beneficios que aportan al desarrollo y salud de las plantas, y la capacidad de este organismo para formar endosporas resistentes a factores ambientales

adversos, han hecho de esta rizobacteria una opción prometedora para la formulación de bioproductos y el uso en la producción agropecuaria (Blake *et al.*, 2021; Yáñez-Mendizábal y Falconí, 2021).

Para Kumar *et al.* (2011), *B. subtilis* es un elicitor potencial de la resistencia sistémica inducida (RIS), de igual forma han demostrado que por medio de diferentes métodos influye directa o indirectamente en el crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos (Falconí *et al.*, 2022).

Arkhipova *et al.*, (2005) demostraron que la inoculación con *B. subtilis* influyó positivamente en el crecimiento de hojas y raíces de lechugas, también aumentó la concentración de clorofila y carotenoides, asimismo el contenido de hormonas como citocininas, ácido indol-3-acético (IAA) y ácido abscísico (ABA) fue elevado.

B. subtilis es capaz de producir IAA bacteriano, el cual cambia la reserva de auxinas en la planta, volviéndolo más eficaz, por lo tanto, mejora el crecimiento de raíz y facilita la nutrición de la planta (Wagi y Ahmed, 2019).

Ahmad *et al.* (2018) evidenciaron la eficacia de usar aislados de *B. subtilis* para solubilizar fosfato insoluble, además reiteran lo que, en muchas investigaciones, *Bacillus* es una bacteria que coloniza las raíces, promueve el desarrollo vegetal y que se adapta fácilmente a suelos salinos con niveles altos de CE y pH.

Yáñez-Mendizábal *et al.* (2012) lograron componer un medio de cultivo de bajo costo para obtener una buena multiplicación bacteriana de la cepa de *B. subtilis* CPA-8, el medio fue elaborado a partir de subproductos industriales ricos en nitrógeno y carbono. Además, el bioproducto fue un eficaz biocontrolador de monilia frutícola en melocotones. Recientemente, este medio de cultivo ha sido optimizado (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2023).

Solubilización de fosforo

De los nutrientes esenciales para que un cultivo crezca y se desarrolle correctamente, el fosforo es el nutriente más importante después del nitrógeno, por lo que se necesita cantidades

altas y generalmente es deficiente en los suelos de producción agrícola. Las plantas solo utilizan una pequeña cantidad de nutrientes fosfatados aplicados y el resto se inmoviliza y no está disponible para la planta (Shektar, 1999). En consecuencia, se requiere el uso constante de altas cantidades de fertilizantes fosfatados para sostener la producción de cultivos, debido a su baja eficiencia, es económica y ambientalmente insostenible, además a esto, el uso de fertilizantes sintéticos afecta la diversidad microbiana, la fertilidad del suelo y provoca una reducción en el rendimiento de los cultivos (Ahmad *et al.*, 2019; Shektar, 1999).

En suelos de producción agrícola la eficiencia de asimilación de fosfatos por parte de las plantas es muy baja, puesto que el fósforo aplicado forma enlaces con el aluminio y el hierro en suelos ácidos y con el calcio en suelos alcalinos, de cualquier manera, el fósforo queda inmóvil y no asimilable por las raíces de los cultivos (Gadagi y Sa, 2002). Una manera ecológica de solubilizar fosfatos inmóviles es a través de microorganismos solubilizadores de fosfatos mediante la producción de ácidos orgánicos, diferentes fitohormonas y reacciones de producción de enzimas fosfatasas (Wafula y Murunga, 2020).

La disponibilidad de fósforo en el suelo está relacionada con la solubilidad de los componentes fosfatados metálicos presentes, la capacidad de unión de la molécula al sustrato, las reacciones que forman con los diferentes elementos presentes y las capacidades solubilizadoras de la flora microbiana (García y Delgado, 2016).

La liberación de formas insolubles de fósforo a través de bacterias solubilizantes de fosfatos es un aspecto crucial para poder aumentar la disponibilidad de fósforo en el suelo. Las bacterias que son capaces de solubilizar fósforo generalmente se estudian mediante el aislamiento en placa en medio Pikovskaya (Wafula y Murunga, 2020). El medio permite que las bacterias se desarrollen y formen un halo o zonas claras amarillentas alrededor de las colonias como resultado de la conversión del fosfato tricálcico insoluble que contiene el medio a formas fosfatadas solubles (Gadagi y Sa, 2002; Shektar, 1999).

Fijación de nitrógeno atmosférico

El nitrógeno (N) es uno de los macronutrientes más importantes en la nutrición de cultivos, este participa en el desarrollo de las plantas y es un factor limitante para el crecimiento de las mismas. Sin embargo, las plantas no pueden acceder directamente al gas di nitrógeno (N₂), que constituye alrededor del 78% de la atmósfera (Cruz *et al.*, 2021). Las plantas absorben el nitrógeno disponible en el suelo a través de sus raíces en forma de amonio y nitratos. La limitada biodisponibilidad del nitrógeno y la dependencia de los cultivos de este elemento han generado una industria masiva de fertilizantes a base de N en todo el mundo (Cruz *et al.*, 2021).

Aunque los microbios que promueven el crecimiento de las plantas son excelentes fijadores de nitrógeno, su uso es limitante debido a su rango de huéspedes seleccionados. En contraste, una variedad de microbios nitrificantes y desnitrificantes, fijadores de nitrógeno y oxidantes de amoníaco, han mostrado su participación en el ciclo del nitrógeno para mejorar los nutrientes del suelo y el crecimiento de las plantas. Para una disponibilidad eficiente de nitrógeno, se necesita una asociación simbiótica entre bacterias, hongos, endófitos y plantas hospedadas (Cruz *et al.*, 2021; Rojas *et al.*, 2020).

Los microorganismos que tienen la capacidad de fijación biológica del N₂ han ganado reputación y en la actualidad son muy valorados y utilizados para mejorar los rendimientos de los cultivos. Bacterias como *Bacillus* se encuentran entre los géneros que poseen esta capacidad (Cruz *et al.*, 2021; Rojas *et al.*, 2016; Vessey, 2003). *Bacillus* es uno de los géneros que participa como fijador de nitrógeno atmosférico. Se ha descrito que la especie *Bacillus fusiformis* muestra alta actividad nitrogenasa, por lo que se utiliza en la promoción del crecimiento de plantas, como el maíz, trigo y arroz (Rojas *et al.*, 2016).

Producción de auxinas

Las hormonas vegetales afectan la expresión de diferentes caracteres en el fenotipo de la planta, como la elongación, la división y la diferenciación celular. Además, algunos tipos de

fitohormonas desempeñan un papel importante en la respuesta de las plantas al estrés biótico y abiótico. Muchas bacterias son capaces de producir más de un tipo de hormona vegetal, sin embargo, muchas de ellas pueden producir y degradar la misma hormona (Boiero *et al.*, 2007).

Según Aloni *et al.* (2006) el IAA controla una amplia gama de funciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas, a causa de que esta auxina es un componente clave en la conformación de la arquitectura y el desarrollo de la raíz, además, participa en la diferenciación del tejido vascular de la raíz, la regulación de la iniciación de la raíz lateral, el posicionamiento del pelo de la raíz polar y el gravitropismo de la raíz.

La auxina bacteriana mejora el desarrollo de la raíz de la planta especialmente el aumento y crecimiento de raíces secundarias, mejorando así la superficie de contacto radicular lo que facilita la nutrición de la planta y, en consecuencia, resulta en mejor crecimiento y rendimiento de la planta. Las auxinas se sintetizan con la ayuda de precursores secretados a través de exudados radiculares (Olanrewaju *et al.*, 2017).

Wagi y Ahmed (2019) descubren la capacidad de dos cepas bacterianas de *B. subtilis*, So3II y Mt3b, mostraron un potencial de producción de AIA bacteriana en diferentes condiciones ambientales, por lo tanto, el potencial de producción de AIA puede mejorarse modificando y descubriendo condiciones óptimas de crecimiento. La utilización de hormonas vegetales mejora el crecimiento y rendimiento de las plantas de forma respetuosa con el ambiente.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

Ubicación geográfica

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Fitopatología y Control biológico, y el trabajo de campo en el Invernadero de Horticultura de la Carrera Agropecuaria IASA I de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, la cual se encuentra ubicada en la Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia Sangolquí, Barrio San Fernando, Hacienda el Prado a una altitud de 2748 m.s.n.m. y latitud de 0° 23" 20" S, 78° 24" O (Figura 2) (Yáñez-Mendizábal y Falconí, 2021).

Figura 2

Mapa de la zona de estudio



Nota. Representación gráfica de la ubicación del Invernadero de Horticultura y Laboratorio de Fitopatología y Control biológico. Recuperado de: Google Earth.

Establecimiento del cultivo

Se dispuso de 36 plántulas de albahaca que se trasplantaron a la sexta semana posterior a la siembra en macetas de tres litros que contenían sustrato según los requerimientos de suelo para albahaca, la cual demanda de suelos francos con buena aireación y con alto contenido de materia orgánica (UE y AGEXPORT, 2021): 70% de fibra de coco y 10 % de pomina que aportan aireación al sustrato, mientras que el 10% de humus y 10% de tierra negra cubrieron el requerimiento de altos contenidos de materia orgánica. Las macetas con las plántulas fueron ubicadas en el invernadero de horticultura sobre pallets de 1,0 x 1,5 m.

Se estableció, además, un sistema de riego automatizado por goteo, el cual estaba compuesto una bomba de 0,5 HP, un tanque de 500 L, un filtro, una manguera principal de tres cuartos, laterales de 16 ml, goteros de 4 salidas y estacas las cuales se acoplaron a los goteros, los cuales comprenden una capacidad de 2,1 litros por cada hora. Además, el sistema contó con un timer programado para regar dos veces al día, tres veces a la semana en total, es decir 210 ml diarios.

Control de calidad

Para el ensayo experimental se consiguió las cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 formuladas en medio de bajo coste (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2023), que fueron la fuente de inóculo para plantas de albahaca. Estos productos fueron sometidos a un control de calidad, mediante dilución y plateo (Falconí y Yáñez-Mendizábal, 2022), para lo cual se sembraron alícuotas de 50 μ L de tres diluciones de cada cepa en cajas Petri con medio NYDA (8 g/L de caldo nutritivo, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de dextrosa y 18 g/L de agar). Las cajas se incubaron durante 24 horas a 30°C y se realizó la cuantificación de colonias para determinar la población viable del bioproducto y expresarlo en UFC/ml. Determinada a partir de la siguiente fórmula:

$$UFC\ ml^{-1} = \frac{\text{Número de colonias contadas} * \text{factor de dilución}}{\text{Volumen sembrados en ml}}$$

Inoculación de *Bacillus subtilis*

Se inocularon 50 ml de una solución a base de *B. subtilis*, la cual se realizó teniendo en cuenta la dosificación recomendada por el bioproducto para plantas ornamentales, utilizando así 4 ml del mismo por cada litro de agua. Se inoculo el producto con una jeringuilla de 50 ml, aplicando el mismo en la parte más cercana al tallo y al suelo, es decir en la parte basal de las plantas de albahaca procurando que la solución llegue a la raíz para que las bacterias colonicen la rizosfera y promuevan el crecimiento vegetal mediante esta relación simbiótica. Este procedimiento se realizó para ambas cepas, en el caso de las plantas control se añadió 50 ml de agua. Las inoculaciones se llevaron a cabo durante 3 meses, cada 15 días.

Las muestras de la rizosfera se tomaron tres días posterior a la inoculación, en total se muestrearon 6 plantas por cada tratamiento (dos plantas por repetición), tomando alrededor de 1 gramo de la rizosfera de cada planta. Estas muestras fueron llevadas al laboratorio de Fitopatología y Control Biológico, donde fueron procesadas.

Diseño experimental

El presente estudio se estableció bajo un Diseño completamente al Azar (DCA), con un total de 36 plantas de albahaca para la evaluación del efecto de inoculaciones periódicas de *B. subtilis* sobre estas. El diseño constó de dos tratamientos y un testigo como se describe en la Tabla 1. Además, cada tratamiento contó con tres repeticiones, a su vez cada repetición se constituyó de 4 plantas, es decir 12 plantas por tratamiento. Cabe recalcar, que se utilizaron 6 plantas de cada tratamiento como unidad muestral.

Tabla 1

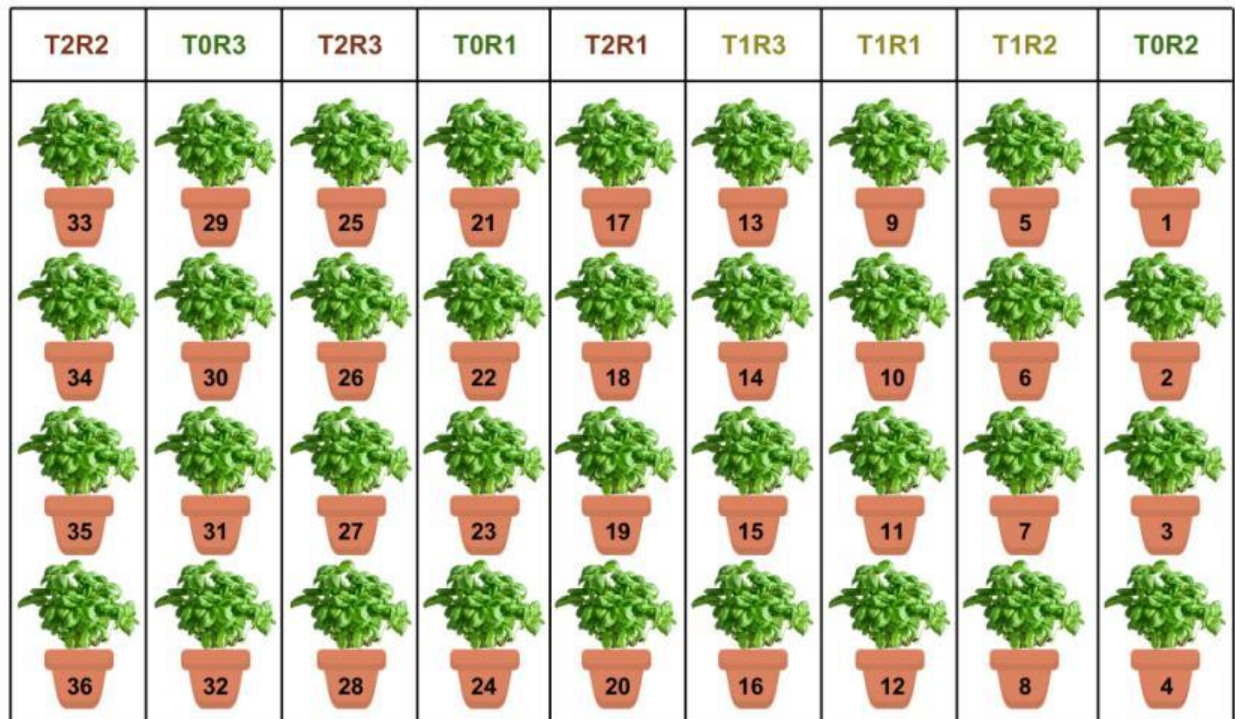
Descripción de tratamientos

Tratamientos	Descripción	Concentración	Períodos de inoculación
T0	Agua	50 ml/planta	Cada 15 días
T1	<i>B. subtilis</i> CtpxS2-1	50 ml/planta	Cada 15 días
T2	<i>B. subtilis</i> CtpxS3-5	50 ml/planta	Cada 15 días

Nota. Autoría propia.

Figura 3

Croquis experimental bajo DCA



Nota. Autoría propia.

Variables a medir

Altura de planta

Para la variable altura de planta se utilizó un flexómetro, con el cual se midió desde el borde de la maceta hasta el ápice más alto, con el fin de evitar variaciones en la medición debido a que con el pasar del tiempo el volumen del sustrato cambió. Los datos de altura de planta se registraron en una hoja de cálculo Excel, cada 15 días a partir de la última inoculación.

Dinámica poblacional de *Bacillus*.

A partir de la primera inoculación de cada cepa de *B. subtilis*, se monitorearon las dinámicas poblacionales, en el tiempo. Para determinar la población microbiana se colectaron muestras de 1 g de la rizosfera de plantas de albahaca, tres días posteriores a cada inoculación. Cada muestra fue sometida en baño maría a 80°C durante 20 minutos, con el fin de eliminar microorganismos incapaces de formar endosporas. Se prepararon bancos de dilución 1:10 para cada muestra y el medio de cultivo NYDA (8 g/L de caldo nutritivo, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de dextrosa y 18 g/L de agar). En el plateo se sembraron dos repeticiones de las diluciones seriadas las cuales incrementaron conforme las inoculaciones, es decir, se empezó con un plateo desde 1×10^{-2} hasta 1×10^{-4} y se terminó con siembras desde la dilución 1×10^{-3} hasta la dilución 1×10^{-5} , debido a la eficiente adaptación de la bacteria en la rizosfera de las plantas. Posterior a la siembra, las cajas Petri fueron incubadas a 30°C durante 24 horas, entonces mediante un contador de colonias se cuantificó la población de bacterias siguiendo la metodología de (Falconí y Yáñez-Mendizábal, 2022).

Los datos referentes a dinámica población se registraron en una hoja de cálculo de Excel para una posterior interpretación de resultados en UFC/ml por cada repetición.

Índice del contenido de clorofila.

El contenido de clorofila se midió mediante métodos destructivos y no destructivos. Para este último se utilizó un medidor de contenido de clorofila CCM - 200 Chlorophyll Content Mater

(Opti-Sciences), el cual estima el contenido de clorofila en el tejido de la hoja mediante transmitancia. Después de calibrar el medidor se realizaron lecturas de 3 pares de hojas jóvenes de cada planta que conforma la unidad muestral. El contenido de clorofila mediante el método no destructivo se midió cada 15 días.

En cuanto al método destructivo, se utilizó un espectrofotómetro, el cual estima el contenido de clorofila mediante absorbancia. Las lecturas se realizaron 2 veces a lo largo de la investigación, para lo cual se tomaron muestras de hojas jóvenes, dichas muestras se llevaron a crio congelación hasta su procesamiento. Se pesó 0,5 g de hojas trituradas y se colocó las mismas en tubos, además se añadió sobre éstas 5 ml de etanol al 96%. Con una varilla de vidrio se maceraron las muestras con el fin de obtener la clorofila de las hojas. Finalmente, se añadió 1 ml de etanol en cada tubo, luego se dejó reposar 24 horas a -4°C en completa oscuridad.

Una vez transcurrido este tiempo, se homogenizaron las muestras en un vortex, se vertieron en tubos de 2 ml y se colocaron en la centrifuga a 2000 rpm durante 20 minutos. De estos tubos se tomó 1 ml del sobrenadante, al cual se le añadió 5 ml de etanol. En celdas, se colocó 1 ml de la solución obtenida, mismas que se colocaron en el espectrofotómetro. Las lecturas se realizaron con el software Thermo-inside con absorbancias de 645 y 663 nm.

Las fórmulas para la determinación de clorofila a y b fueron las siguientes:

$$\text{Clorofila } a = (13,36 * \text{Absorbancia } 663) - (5,19 * \text{Absorbancia } 645)$$

$$\text{Clorofila } b = (27,43 * \text{Absorbancia } 645) - (8,12 * \text{Absorbancia } 663)$$

Cuantificación de auxinas

Anguiano *et al.* (2017) estableció el siguiente el protocolo para detectar auxinas (AIA). Para preparar el reactivo de Salkowsky se utilizó: 15 ml de H₂SO₄, 25 ml de agua destilada y 0,75 ml de FeCl₃·6H₂O (0,5M). Para calibrar la curva se preparó diluciones de ácido 3-

indolacético (AIA) puro con 0, 5, 10, 15, 25 y 30 $\mu\text{g/ml}$ en etanol, debido a que el AIA no es soluble en agua, pero si en acetona o etanol. Se utilizará la curva de calibración con el R2 más alto para calcular las concentraciones de AIA.

Para preparar las muestras se recolecto las raíces frescas de albahaca, se trituro finamente y se pesó 1 g de raíz, rápidamente se colocó las muestras en tubos de ensayo completamente cubiertos para evitar la degradación de AIA y se añadió 5 ml de acetona (80%), se dejó reposar durante 24 horas a - 4 °C, luego de transcurrir el tiempo necesario hay que moler las muestras en los mismos tubos con la ayuda de varillas de vidrio, los tubos fueron centrifugados a 20000 rpm durante 10 min para obtener el sobrenadante, el cual debe ser aforado a 6,25 ml con etanol.

Para la cuantificación de AIA, de los 6,25 ml de la muestra, se tomó 1 ml del sobrenadante y se mezcló con 1 ml del reactivo Salkowsky directamente en la celda para espectrofotómetro, se incubaron durante 30 minutos y se leyeron a 520 nm.

Acción enzimática de nitrogenasas

El Medio Ashby manitol es un agar libre de nitrógeno y facilita la identificación de microorganismos con capacidad para fijar nitrógeno atmosférico. Los microorganismos que se desarrollan en este medio reemplazan la transformación y asimilación de nitrógeno mineral por el nitrógeno atmosférico que se encierra en el microambiente de la caja Petri (Egas Yerovi, 2010).

Para lograr el crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, se sembraron muestras de cada una de las cepas bacterianas en agar Ashby libre de nitrógeno. Las placas fueron incubadas a 30°C por 7 días. Si luego de los 7 días se observa crecimiento de colonias bacterianas quiere decir que las bacterias son capaces de fijar el N₂ presente en el ambiente y de crecer en un medio libre de nitrógeno.

Acción enzimática de fitasas

Para detectar microorganismos que solubilizan fosfatos se usa el Agar de Pikovskaya. Los compuestos que contienen fósforo se derivan de plantas y microorganismos (Nautiyal, 1999).

El medio se formuló para 1 L y contenía: 10 g de glucosa; 2,5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g de NaCl; 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de KCl; 0,5 g de extracto de levadura; 0,002 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; y 0,002 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Nautiyal, 1999).

Para preparar el medio se disolvió completamente 31,3 g en 1000 ml de agua destilada caliente. El medio se debe esterilizar en la autoclave a 15 psi, 121 °C y durante 15 minutos. Se deja enfriar a 45 – 50 ° C y distribuir en cajas Petri estériles. Esperar hasta que gelifique el medio para proceder con la siembra de las muestras. Las cajas Petri fueron incubadas a 30°C por 7 días. Si luego de los 7 días se observa un halo color amarillo claro alrededor del crecimiento de colonias, quiere decir que las bacterias son capaces de solubilizar fosfatos presentes en el medio.

Análisis estadístico

Utilizando el software Infostat se realizó un análisis de varianza (ANOVA), teniendo en cuenta el DCA. Además, para la valoración de los supuestos se utilizó la prueba de significancia Tukey al 5%. Los resultados medidos dentro del ensayo, es decir las variables de respuesta se estudiaron mediante estadística descriptiva, la cual permitió de manera sencilla resumir la información recolectada para su posterior interpretación.

El modelo matemático utilizado para el análisis estadístico se detalla a continuación.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + M_{ij}/T_i + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variables de respuesta

μ = Media experimental o media general

T_i = Efecto del tratamiento

M_{ij} = Número de muestras

ϵ_{ijk} = Error experimental

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Altura de la planta

En la Tabla 2, se presentan los resultados de 7 muestreos de la altura de planta tomados en el transcurso del estudio. Se observa que la altura de las plantas tratadas con *B. subtilis* tuvieron una tendencia a incrementar durante todo el periodo de estudio, consistente en todos los muestreos, comprado con el control.

Además, se puede observar que las plantas de todos los tratamientos tuvieron un crecimiento inicial lento, pero a partir del día 45 hasta el día 60 (periodo de cosecha), su crecimiento fue exponencial. La tabla 2, confirma que la aplicación de tratamientos tuvo un efecto significativo con respecto al control. A los 55 días de crecimiento, las plantas del tratamiento *B. subtilis* Ctpx S3-5 presentaron una altura media de 38,0 cm, obteniendo la mejor respuesta en la altura de la planta, seguido del tratamiento con *B. subtilis* Ctpx S2-1 que presentaron una media de 31,10 cm. Ambos tratamientos con *B. subtilis* mostraron diferencias significativas en contraste con el control que presentó medias de 29,40 cm a los 75 días. Los resultados obtenidos en cuanto a la altura se encuentran dentro del rango que la planta de puede alcanzar durante su producción pues como lo señalado por Montoya (2022) en su estudio sobre el manejo agronómico del cultivo de albahaca en Ecuador, quién menciona que la planta puede alcanzar una altura promedio fue 30 a 50 cm.

Estos resultados además no concuerdan con lo mencionado por Saha *et al.* (2016) en su estudio sobre el crecimiento, rendimiento, calidad y nutrición de albahaca, en donde detallan que utilizando cultivos acuapónicos a los tres meses la albahaca alcanza alturas de hasta 89,9 cm, mientras que para cultivos hidropónicos muestra alturas de 78,7cm. Comparando con nuestros resultados, la aplicación de la cepa Ctpx S3-5 mostró un altura de 38 cm, muestra claramente la diferencia de crecimiento entre sistemas de producción, y quizá se podría deber a que en los sistema acuapónicos hay mayor presencia de nitrógeno y deficiencia de ciertos

macro y microelementos, lo que podría causar el alargamiento de las plantas, mas no el buen desarrollo de estas.

Otro que no se ajusta a los resultados de este ensayo es el de Mehrafarin *et al* (2013) en donde evalúan el efecto de bioestimulantes y biofertilizantes sobre rasgos morfológicos de albahaca, los estudios alcanzan medias superiores a los del presente estudio en menor tiempo, es decir, entre 57,66 y 80 cm de altura a las 5 semanas. Esto quizá refleja que la acción conjunta de *Bacillus/Pseudomonas* aumenta la capacidad solubilizadora de fosfatos (P), mejora la facultad de fijar nitrógeno atmosférico (N₂), es decir que la asimilación de nutrientes por parte de la planta va a ser eficaz y en contraste va a mejorar el desarrollo y crecimiento de los cultivos.

En el estudio que llevo a cabo Rasouli-Sadaghiani *et al.* (2010), se evaluó el efecto de hongos micorrícicos arbusculares sobre el crecimiento, la producción de aceites esenciales y la absorción de nutrientes en albahaca, en el tratamiento control y el tratamiento con *Glomus fasciculatum* se consiguió alturas medias de 33,05 y 52,25 cm respectivamente a los 84 días a partir de la siembra, lo que no está de acuerdo con los resultados obtenido en este estudio, en donde el tratamiento control y tratamiento Ctpx S3-5 obtuvieron alturas de 29,40 y 38 cm respectivamente. Esto quizá se debe a que la absorción de nutrientes fue alta en plantas tratadas con micorrizas, es decir, la simbiosis entre hongo-planta fue eficiente mostrando que la altura obtenida es resultado de una buena absorción y asimilación de los nutrientes esenciales.

Tabla 2

Altura en plantas de O. basilicum por efecto de inoculaciones con dos cepas de B. subtilis a lo largo de 75 días después del trasplante

Tratamiento	Día 0	Día 15	Día 30	Día 45	Día 55	Día 60	Día 75
	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Control	9,5 ± 0,0 a	12,73 ± 1,40 a	16,33 ± 0,65 b	20,80 ± 0,85 b	29,40 ± 0,10 c	14,93 ± 1,83 a	17,60 ± 1,28 a
Ctpx S2-1	9,5 ± 0,5 a	14,13 ± 0,85 a	18,87 ± 0,98 ab	23,43 ± 0,51 a	31,10 ± 0,72 b	15,90 ± 1,15 a	18,47 ± 1,37 a
Ctpx S3-5	9,33 ± 0,29 a	15,03 ± 0,84 a	19,77 ± 1,97 a	24,43 ± 1,40 a	38,00 ± 0,30 a	16,33 ± 1,46 a	19,10 ± 0,85 a

Nota. Medias seguidas por letras distintas dentro de las columnas difieren significativamente, Tukey ($p > 0,05$). Media ± desviación estándar de la variable. Autoría propia.

Clorofila mediante medidor SPAD

Los tratamientos con inoculaciones sucesivas con *B. subtilis* tuvieron un efecto significativo ($P > 0.01$), sobre el contenido de clorofila (SPAD) (Tabla 3). Los resultados indican que el mayor índice de clorofila 27,77 SPAD lo obtuvo el tratamiento Ctpx S3-5, seguido del tratamiento Ctpx S2-1 con un índice de clorofila 23,67 SPAD, y el tratamiento con menor concentración de clorofila fue el control con 20,40 SPAD. Estos resultados están de acuerdo con los de Saha *et al.* (2016) sobre el crecimiento, rendimiento, calidad y nutrición de albahaca bajo sistemas agrícolas sin suelo, es decir en sistemas de producción hidropónico y acuapónico, alcanzando medias de contenido de clorofila de 28,7 y 29,3 SPAD respectivamente a los tres meses a partir del trasplante. Esto sugiere el efecto positivo de utilizar biofertilizantes en mezcla con *B. subtilis*, ya que muestran resultados en el contenido de clorofila cercanos a sistemas de producción tecnificados y eficientes.

Los resultados obtenidos en este ensayo no concuerdan con los obtenidos por Mehrafarin *et al.* (2013) acerca del efecto de bioestimulantes y biofertilizantes sobre rasgos morfológicos de albahaca, obteniendo valores de hasta 39,96 SPAD a los 84 días a partir de la siembra en aplicaciones con diferentes tipos de biofertilizantes. Es probable que los altos contenidos de clorofila se deben al método de aplicación de los biofertilizantes, en el presente ensayo se realizó la aplicación del biofertilizante vía drench, mientras que en el estudio elaborado por Mehrafarin *et al.* (2013) la aplicación se la hizo foliar, la aplicación foliar es más eficiente en la absorción de nutrientes, por ende, el cultivo puede presentar contenidos de clorofila más altos, debido a su fácil y rápida absorción de nutrientes.

Rasouli *et al.* (2010) evaluaron el efecto de hongos micorrícicos arbusculares sobre el crecimiento, la producción de aceites esenciales y la absorción de nutrientes en la albahaca, demostrando que las plantas inoculadas con micorriza tenían un peso de brotes y raíces, una altura de planta y un índice de clorofila significativamente más altos que el control.

Tabla 3

Clorofila (SPAD) en plantas de *O. basilicum* por efecto de inoculaciones con dos cepas de *B. subtilis* a lo largo de 75 días después del trasplante

Tratamiento	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60	Día 75
	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Control	15,63 ± 0,81 b	15,77 ± 0,72 b	18,43 ± 0,32 c	20,77 ± 0,57 c	19,37 ± 1,72 b
Ctpx S2-1	16,67 ± 0,57 ab	20,97 ± 1,64 a	22,00 ± 0,89 b	24,40 ± 0,95 b	24,87 ± 1,72 a
Ctpx S3-5	17,53 ± 0,65 a	24,13 ± 1,58 a	24,10 ± 1,05 a	26,90 ± 0,53 a	26,67 ± 1,08 a

Nota. Medias seguidas por letras distintas dentro de las columnas difieren significativamente, Tukey ($p > 0,05$). Autoría propia.

Clorofila mediante espectrofotometría

Al realizar la cuantificación de clorofila mediante el método destructivo se extrajeron muestras de hojas al inicio y al final del ensayo (Tabla 4). Se apreció el aumento del contenido de clorofila a lo largo del desarrollo del cultivo en todos los tratamientos, pero al finalizar el ensayo, no se logró obtener diferencia significativa entre los tratamientos comparado con el control. En la figura 5 se puede apreciar el aumento en el contenido de clorofila del día 15 al día 75 en todos los tratamientos. En términos numéricos el mejor resultado al final del estudio se obtuvo con aplicaciones de *B. subtilis* Ctpx S3-5 con una media de 16,48 mg/ml, seguido del tratamiento con *B. subtilis* Ctpx S2-1 con media de 15,4 mg/ml, y por último el control que tuvo una media de 13,47 mg/ml.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman con los obtenidos por Larimi *et al.* (2014) sobre cambios en la densidad de nitrógeno, contenido de clorofila y el área foliar de albahaca dulce (*Ocimum basilicum* L.) afectada por la aplicación de biofertilizantes y fertilizante a base de nitrógeno, en el cual observaron un aumento significativo en el porcentaje de

nitrógeno, área foliar y el contenido de clorofila en los cultivos tratados con biofertilizantes con respecto al tratamiento control: Este efecto probablemente se debe al efecto favorable de los microorganismos responsables de la fijación de nitrógeno que aumenta el contenido de nitrógeno en los tejidos vegetales, en consecuencia también aumenta el área foliar y la concentración de clorofila en las hojas.

Tabla 4

Índice de clorofila mediante la cuantificación por espectrofotometría de plantas de albacá inoculadas con dos cepas de B. subtilis.

Tratamiento	Día 15	Día 75
	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Control	7,43 ± 0,15 b	13,47 ± 1,84 a
Ctpx S2-1	9,83 ± 1,10 ab	15,40 ± 0,80 a
Ctpx S3-5	11,93 ± 1,59 a	16,48 ± 1,25 a

Nota. Medias seguidas por letras distintas dentro de las columnas difieren significativamente, Tukey ($p > 0,05$). Media ± desviación estándar. Autoría propia.

Auxinas

En la Figura 4 podemos observar que el tratamiento *B. subtilis* Ctpx S3-5 tiene diferencia significativa ($P > 0,05$), en el contenido de auxinas en la raíz de *O. basilicum* con 3,37 mg/ml con respecto al control con resultados de 2,30 mg/ml, el tratamiento Ctpx S2-1 con 2,50 mg/ml, no presentó diferencia significativa ($P > 0,05$) con ningún otro tratamiento.

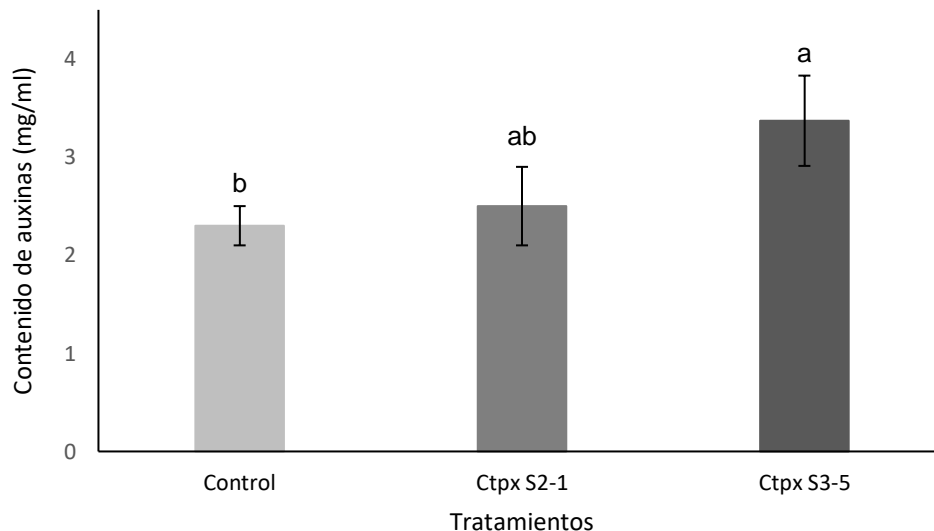
Según Walia *et al.* (2014) en su estudio sobre el efecto de 11 aislados de la cepa CKT1 de *Bacillus subtilis* como inóculo sobre el crecimiento de plántulas de tomate en condiciones de invernadero se demostró que el aislado N11 de la cepa CKT1 de *B. subtilis* presentó la

capacidad para producir una cantidad apreciable de AIA (0,03 mg/ml) en comparación con los demás aislados, la inoculación con el aislado N11 exhibió mejoras en el crecimiento de la planta, solubilización de fosfato, producción de AIA y producción de sideróforos.

Kudoyarova *et al.* (2017) en su estudio acerca del efecto de las bacterias productoras de auxinas y solubilizadoras de fosfato sobre la movilidad del fósforo del suelo, la tasa de crecimiento y la adquisición de P por las plantas de trigo, se determinó que el contenido de AIA en las raíces de las plantas tratadas aumentó 2,5 veces en comparación con las plantas control, también mejoró sustancialmente en la concentración de otras fitohormonas como la citocininas, IBA, ABA y zeatina, lo que demuestra una efectiva capacidad de producir auxinas por parte de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Figura 4

Contenido de auxinas en raíz de *O. basilicum*



Nota. Las barras de error representan la desviación estándar. Letras distintas dentro de las columnas difieren significativamente, Tukey ($P > 0,05$). Autoría propia.

Dinámica poblacional

Con respecto al efecto de *B subtilis* sobre la colonización y adaptación bacteriana a la rizosfera del cultivo de albahaca, se utilizó el método de dilución y plateo Falconí *et al.* (2022)

cada 15 días después de haber realizado la inoculación con células de *B. subtilis* para monitorear la dinámica poblacional. La cepa Ctpx S3-5 mostró un mayor número de colonias por mililitro (UFC/ml), es decir una colonización significativa con respecto al control, con resultados de $2,54E+04$ y $9,87E+03$ log UFC/g respectivamente. El tratamiento con la cepa Ctpx S2-1 con $1,89E+04$ log UFC/g no mostró diferencias significativas comparado con los tratamientos.

En la Figura 5 se observa claramente la capacidad de adaptación de la cepa CtpxS3-5 con respecto a los demás tratamientos, al día 45 tiene su punto máximo de crecimiento con $2,85E+04$ log UFC/g, luego de los 45 días la concentración de colonias baja debido a las condiciones climáticas, altas temperaturas y humedad relativa baja que se presentó en el invernadero, lo que repercute en el desarrollo normal de *B. subtilis*. Se aprecia que a pesar de que la inoculación se realizó con el bioproducto a una concentración de $10E+08$ log UFC/g, la adaptación y colonización bacteriana a la rizosfera de la albahaca se da lentamente y a concentraciones muy bajas, incluso el tratamiento con la cepa Ctpx S3-5 que obtuvo un crecimiento máximo de $2,85E+04$ log UFC/g no se acerca a la concentración inicial del producto aplicado. La baja capacidad de las bacterias de adaptarse al medio y desarrollarse tienen que ver específicamente a las condiciones del sustrato, baja fertilidad, debido a que se usó sustrato inerte y no tiene fuentes de nutrimentos para las bacterias. Otro aspecto que participa en la colonización de bacterias en la rizosfera del cultivo es la naturaleza de las sustancias que secreta la raíz de la albahaca, estas sustancias por lo general dependiendo del origen, tienen usos antimicrobianos.

Tabla 5

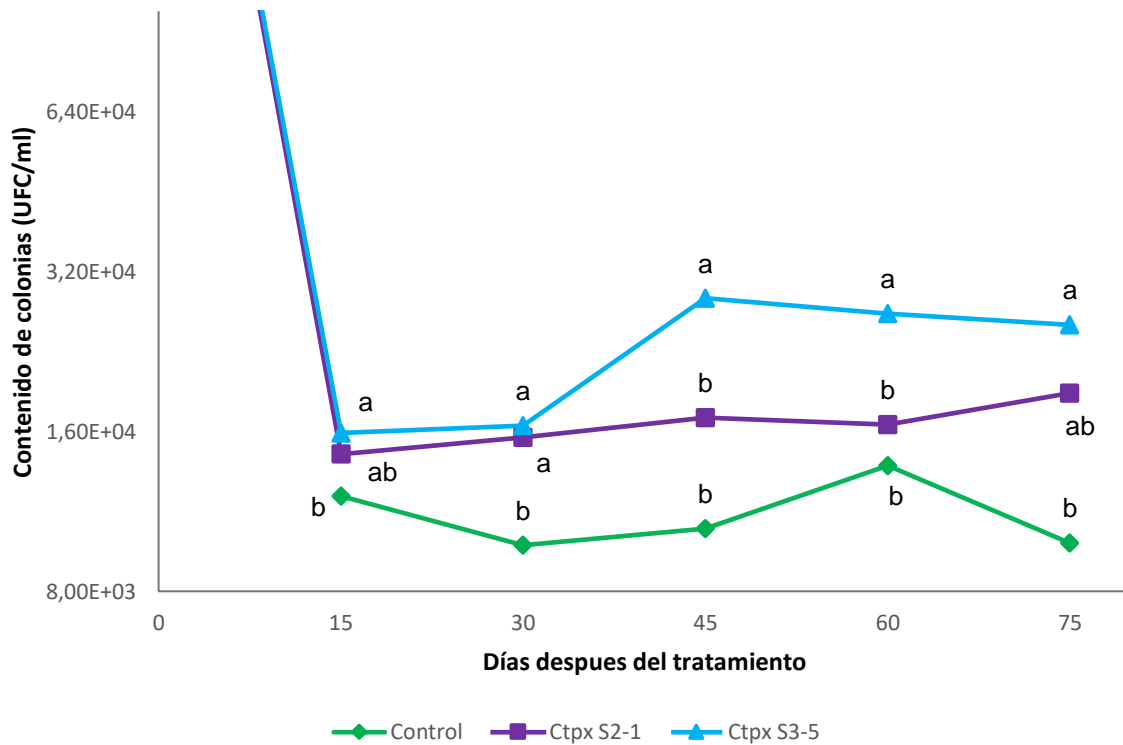
Dinámica poblacional de dos cepas de B. subtilis en la rizosfera de O. basilicum a lo largo de 75 días luego del trasplante

Tratamiento	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60	Día 75
	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Control	1,21E+04 ± 1530,80 b	9,77E+03 ± 725,14 b	1,05E+04 ± 305,51 b	1,38E+04 ± 1212,44 b	9,87E+03 ± 750,56 b
Ctpx S2-1	1,45E+04 ± 850,49 ab	1,56E+04 ± 472,58 a	1,70E+04 ± 4064,89 b	1,65E+04 ± 4981,30 b	1,89E+04 ± 3458,32 ab
Ctpx S3-5	1,59E+04 ± 568,62 a	1,64E+04 ± 305,51 a	2,85E+04 ± 2888,48 a	2,67E+04 ± 3547,30 a	2,54E+04 ± 1452,58 a

Nota. Medias seguidas por letras distintas dentro de las columnas difieren significativamente, Tukey (P>0,05). Las medias están acompañadas con sus respectivas desviaciones estándar. Autoría propia.

Figura 5

Variación de la dinámica poblacional a 75 días del trasplante.



Nota. Autoría propia.

Acción enzimática de fitasas

En el presente estudio se define la capacidad solubilizadora de fosfato de forma cualitativa mediante la observación de la formación de un halo amarillo claro alrededor de las colonias de *B. subtilis* (Figura 6), la formación del halo nos indica procesos de producción de fitasas, fosfatasas y ácidos orgánicos.

En el estudio realizado por Ahmad *et al.* (2019) sobre el potencial de dos cepas de *Bacillus* solubilizantes de fosfatos para mejorar el crecimiento y la absorción de nutrientes en cultivos de frejol mungo y maíz, donde especifica que el uso de biofertilizantes compuestos a base de bacillus subtilis y bacillus aryabhattai aumenta el crecimiento de las plantas, mejora el estado nutricional de los cultivos, incrementa la concentración de nitrógeno (N), de fósforo (P) y de potasio (K) en brotes de los cultivos.

Según Walia *et al.* (2014) en el estudio que trata sobre el efecto de la inoculación con la cepa CKT1 de *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento de plántulas de tomate registraron resultados de solubilización de P (190ug/ml) significativamente diferentes con respecto al control sin inoculación, presentando mejoras notables en el crecimiento y rendimiento productivo de los cultivos.

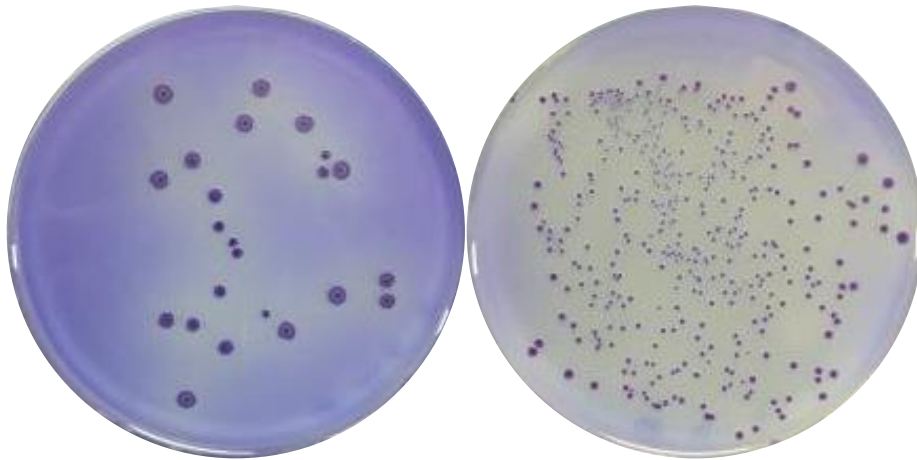
La coinoculación a plantas de nogal con bacterias solubilizadoras de fosfatos acelera el crecimiento vegetal y mejora la absorción de nutrientes, dando como resultado una mayor concentración en el contenido de fósforo (P) en comparación con el testigo. Esto gracias a la capacidad de los microorganismos de producir y liberar ácidos orgánicos, los cuales reaccionan con los compuestos fosfatados y facilitan la solubilización y liberación del P (Yu *et al.*, 2012).

Gadagi y Sa (2002) desarrollaron un nuevo método de aislamiento para microorganismos que solubilizan hierro y fosfatos de aluminios utilizando colorantes indicadores de pH, los resultados indicaron la eficiencia del medio para el aislamiento y dedujeron que la solubilización de fosfatos de hierro y aluminio se asocia con la disminución del pH, es decir que la solubilización de fosfatos es más efectiva en medios ligeramente ácidos.

El uso de bacterias productoras de auxinas y solubilizadoras de fosfatos en suelos de producción agrícola aumentó la concentración de P en las plantas, de la misma manera aumento la concentración de P móvil en el suelo, esto sugiere la capacidad de las plantas de una absorción eficaz de fosfatos solubilizados debido a la actividad microbiana (Kudoyarova *et al.*, 2017).

Figura 6

Capacidad solubilizadora de fosfatos



Nota. Resultados de la solubilización de fosfatos. Formación del halo de solubilización de las cepas CtpxS3-5 (izquierda) y Ctpx S2-1 (derecha) de *B. subtilis* en medio Pikovskaya. Autoría propia.

Acción enzimática de nitrogenasas

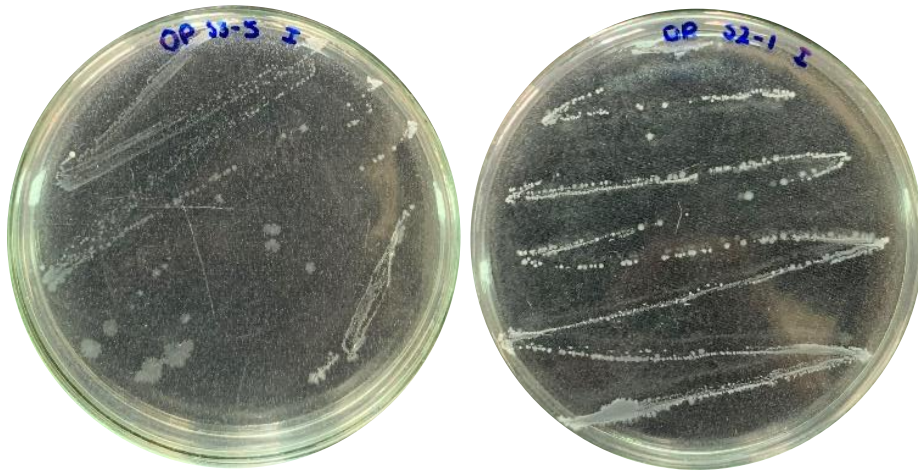
Se determinó cualitativamente la capacidad de fijar di nitrógeno (N_2) de ambas cepas de *B. subtilis*, se realizó en el medio ASHBY, medio sólido libre de nitrógeno y se inoculó por estriado con las cepas Ctpx S2-1 y Ctpx S3-5. Como control negativo se utilizó medio sin inocular. Se observó la capacidad de las dos cepas para crecer en el medio sin nitrógeno. Por tanto, el microorganismo se desarrolló a expensas del nitrógeno atmosférico presente en el microambiente de la caja Petri. El di nitrógeno es un factor limitante debido a su escasa disponibilidad en el suelo y la nula capacidad de absorción de las plantas de este elemento, es por eso que las bacterias que poseen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico son elementos claves para la formulación de biofertilizantes.

Yu *et al.* (2012) realizaron un estudio sobre inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato y fijadoras de nitrógeno sobre la solubilización de roca fosfórica y su efecto sobre la promoción del crecimiento y la absorción de nutrientes por parte de la nuez, donde se observó que la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno (N) incrementó la absorción total de

fosforo (P) de plántulas de nogal en comparación con el control no inoculado, esto en contraste de su capacidad de asociación de la bacteria y el suelo, en la disponibilidad de nutrientes en el suelo.

Figura 7

Capacidad de fijar nitrógeno atmosférico



Nota. Resultados de la fijación de N₂. Crecimiento de colonias en medio ASHBY (libre de nitrógeno). Cepa CtpxS3-5 (izquierda) y cepa Ctpx S2-1 (derecha) de *B. subtilis* en medio ASHBY. Autoría propia.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- A partir de inoculaciones periódicas con dos cepas de *B. subtilis* se determinó que CtpxS3-5 (T2), fue la cepa que mayor efecto tuvo en cuanto a promoción de crecimiento, producción de auxinas y acción enzimática de fitasas y nitrogenasas en plantas de albahaca respecto a las plantas tratadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 (T1).
- La promoción de crecimiento en plantas de albahacas se evidenció mediante el análisis de la variable altura tanto de plantas testigo como de plantas inoculadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 obteniendo alturas de 17,60 cm, 18,47 cm y 19,10 cm respectivamente, siendo este último el tratamiento que presentó numéricamente mayores resultados.
- Las plantas de albahaca inoculadas con *B. subtilis* CtpxS3-5 (T2) mostraron contenidos de auxinas en la raíz de 3,37 mg/ml, lo cual infiere la acción efectiva de la cepa bacteriana en el desarrollo y crecimiento de las plantas. Además, cabe recalcar que los resultados para contenido de auxinas de *B. subtilis* CtpxS2-1 (T1) y el testigo (T0) fueron inferiores al T2.
- La determinación de la acción enzimática de las cepas de *B. subtilis* fue posible mediante el uso de medios de cultivo Pikovskaya agar y Ashby, los cuales permitieron demostrar la capacidad de la bacteria para solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno respectivamente, lo cual resulta en la promoción de crecimiento en plantas de albahaca.
- A partir de muestras de la rizosfera de plantas de albahaca se evaluó el crecimiento y la adaptación de la población de *B. subtilis*, siendo la CtpxS3-5 la cepa que mayor cuantificación obtuvo en el tiempo ($2,54E+04$), esto se relaciona directamente con la promoción de crecimiento vegetal que alcanzaron las plantas a lo largo de tres meses,

lo cual se constata con los resultados obtenidos en las variables agronómicas y fisiológicas.

Recomendaciones

- Probar dosis más altas de inóculo de la cepa CtpxS3-5 para comprobar si tiene mayor influencia sobre el desarrollo vegetal en plantas de albahaca.
- Cuantificar la capacidad de la bacteria en la fijación nitrógeno, y solubilización de fósforo.
- Utilizar diferentes microorganismos (PGPR) en combinación con *B. subtilis* para potenciar su efecto en el desarrollo de las plantas.

Bibliografía

- Ahmad, M., Adil, Z., Hussain, A., Mumtaz, M. Z., Nafees, M., Ahmad, I., y Jamil, M. (2019). Potential of phosphate solubilizing bacillus strains for improving growth and nutrient uptake in mungbean and maize crops. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 56(2), 283–289. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/19.7285>
- Ahmad, M., Ahmad, I., Hilger, T. H., Nadeem, S. M., Akhtar, M. F., Jamil, M., Hussain, A., y Zahir, Z. A. (2018). Preliminary study on phosphate solubilizing *Bacillus subtilis* strain Q3 and *Paenibacillus* sp. strain Q6 for improving cotton growth under alkaline conditions. *PeerJ*, 6. <https://doi.org/10.7717/peerj.5122>
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., y Ullrich, C. I. (2006). Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: Regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany*, 97(5), 883–893. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl027>
- Anguiano, J., Flores, A., Ochoa, Y., Arredondo, R., y Olalde, V. (2017). Fast Detection of Auxins by Microplate Technique. *American Journal of Plant Sciences*, 08(02), 171–177. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.82013>
- Arkhipova, T. N., Veselov, S. U., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V., y Kudoyarova, G. R. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, 272(1–2), 201–209. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047-x>
- Arvy, M. P., y Gallouin, F. (2007). *Especies, aromatizantes y condimentos*. Editorial Mundi-Prensa.
- Aye, A., Jeon, Y. D., Lee, J. H., Bang, K. S., y Jin, J. S. (2019). Anti-inflammatory activity of ethanol extract of leaf and leaf callus of basil (*Ocimum basilicum* L.) on RAW 264.7 macrophage cells. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 19(2), 217–226. <https://doi.org/10.1007/s13596-019-00372-2>

- Baczek, K., Kosakowska, O., Gniewosz, M., Gientka, I., y Weglarz, Z. (2019). Sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) productivity and raw material quality from organic cultivation. *Agronomy*, 9(6), 279. <https://doi.org/10.3390/agronomy9060279>
- Bareño, P. (2004). *Hierbas aromáticas culinarias para exportación en fresco, manejo agronómico, producción y costos*. [Archivo PDF]. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/14068>
- Blake, C., Christensen, M. N., y Kovacs, A. T. (2021). Molecular aspects of plant growth promotion and protection by bacillus subtilis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(1), 15–25. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR>
- Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassán, F., y Luna, V. (2007). Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(4), 874–880. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0731-9>
- Canbolat, M. Y., Barik, K., Çakmakçı, R., y Şahin, F. (2006). Effects of mineral and biofertilizers on barley growth on compacted soil. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, 56(4), 324–332. <https://doi.org/10.1080/09064710600591067>
- Carvalho, S. D., Schwieterman, M. L., Abrahan, C. E., Colquhoun, T. A., y Folta, K. M. (2016). Light quality dependent changes in morphology, antioxidant capacity, and volatile production in sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Frontiers in Plant Science*, 7, 1328. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01328>
- Cruz, C., Vishwakarma, K., Choudhary, D., y Varma, A. (2021). *Soil Nitrogen Ecology*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-71206-8>
- Egas Yerovi, J. J. (2010). *Efecto de la inoculación con Azotobacter sp. en el crecimiento de plantas injertadas de cacao (Theobroma cacao), genotipo nacional, en la Provincia de Esmeraldas* [Tesis de Licenciatura, Escuela Politécnica Nacional]. <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/2307>

- Etesami, H., y Glick, B. R. (2020). Halotolerant plant growth–promoting bacteria: Prospects for alleviating salinity stress in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 178. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104124>
- Etesami, H., y Noori, F. (2019). Soil Salinity as a Challenge for Sustainable Agriculture and Bacterial-Mediated Alleviation of Salinity Stress in Crop Plants. *Saline Soil-Based Agriculture by Halotolerant Microorganisms*, 1–22. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8335-9_1
- Falconí, C. E., y Yáñez-Mendizábal, V. (2022). Available Strategies for the Management of Andean Lupin Anthracnose. *Plants*, 11(5), 654. <https://doi.org/10.3390/plants11050654>
- Falconí, C. E., Yáñez-Mendizábal, V., y Claudio, D. R. (2022). Native *Bacillus subtilis* Strains Efficiently Control Lupin Anthracnose Both under Greenhouse and in Field Conditions. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 12(6), 2519–2526. <https://doi.org/10.18517/ijaseit.12.6.17169>
- Filip, S. (2017). Basil (*Ocimum basilicum* L.) a Source of Valuable Phytonutrients. *International Journal of Clinical Nutrition y Dietetics*, 3, 118. <https://doi.org/10.15344/2456>
- Gadagi, R. S., y Sa, T. (2002). New isolation method for microorganisms solubilizing iron and aluminum phosphates using dyes. *Soil Science and Plant Nutrition*, 48(4), 615–618. <https://doi.org/10.1080/00380768.2002.10409246>
- García, A. M., y Delgado, A. (2016). Effect of *Bacillus subtilis* on phosphorus uptake by cucumber as affected by iron oxides and the solubility of the phosphorus source. *Agricultural and Food Science*, 25(3), 216–224. <https://doi.org/10.23986/afsci.56862>
- Hashem, A., Tabassum, B., y Fathi Abd_Allah, E. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>

- Jabborova, D., Enakiev, Y., Sulaymanov, K., Kadirova, D., Ali, A., y Annapurna, K. (2021). Plant growth promoting bacteria bacillus subtilis promote growth and physiological parameters of zingiber officinale roscoe. *Plant Science Today*, 8(1), 66–71. <https://doi.org/10.14719/pst.2021.8.1.997>
- Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H. P., y Vivanco, J. M. (2002). Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5878–5883. <https://doi.org/10.1021/jf020487q>
- Jayasinghe, C., Goto, N., Aoki, T., y Wada, S. (2003). Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4442–4449. <https://doi.org/10.1021/jf034269o>
- Kanjanasopa, D., Aiedhet, W., Thitithanakul, S., y Paungfoo-Lonhienne, C. (2021). Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biological Control Agent in Rice. *Agricultural Sciences*, 12(01), 1–8. <https://doi.org/10.4236/as.2021.121001>
- Kour, D., Rana, K. L., Kaur, T., Sheikh, I., Yadav, A. N., Kumar, V., Dhaliwal, H. S., y Saxena, A. K. (2020). Microbe-mediated alleviation of drought stress and acquisition of phosphorus in great millet (*Sorghum bicolor* L.) by drought-adaptive and phosphorus-solubilizing microbes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101501. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101501>
- Kudoyarova, G. R., Vysotskaya, L. B., Arkhipova, T. N., Kuzmina, L. Y., Galimsyanova, N. F., Sidorova, L. V., Gabbasova, I. M., Melentiev, A. I., y Veselov, S. Y. (2017). Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(11). <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2556-9>
- Kumar, A., Prakash, A., y Johri, B. N. (2011). Bacillus as PGPR in Crop Ecosystem. *Bacteria in Agrobiolology: Crop Ecosystems*, 37–59. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_2

- Larimi, S., Shakiba, M., Mohammadinasab, A., y Vahed, M. (2014). Changes in nitrogen and chlorophyll density and leaf area of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) affected by biofertilizer and nitrogen application. *International Journal of Biosciences*, 5(9), 256–265. <https://doi.org/10.12692/ijb/5.9.256-265>
- Li, Q. X., y Chang, C. L. (2016). Basil (*Ocimum basilicum* L.) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 231–238. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00025-0>
- Lin, Y., Watts, D. B., Kloepper, J. W., Adesemoye, A. O., y Feng, Y. (2019). Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria at Various Nitrogen Rates on Corn Growth. *Agricultural Sciences*, 10(12), 1542–1565. <https://doi.org/10.4236/as.2019.1012114>
- Makri, O., y Kintzios, S. (2008). *Ocimum* sp. (Basil): Botany, cultivation, pharmaceutical properties, and biotechnology. In *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* (Vol. 13, Issue 3, pp. 123–150). https://doi.org/10.1300/J044v13n03_10
- Mehrafarin, A., Badi, H. N., y Khalighi, F. (2013). Effects of bio-stimulators and bio-fertilizers on morphological traits of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Annals of Biological Research*, 4(5), 146–151. <https://n9.cl/qn270>
- Montoya Montero, J. (2022). *Manejo agronómico del cultivo de albahaca (Ocimum basilicum L.) en el Ecuador* [Tesis de Ingeniería, Universidad Técnica de Babahoyo]. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/13123>
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., y Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11). <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>

- Department of Agriculture, Forestry and Fisheries. (2012). *Basil production* [Archivo PDF].
<https://www.readkong.com/page/basil-production-agriculture-forestry-fisheries-7124163>
- Pushpangadan, P., y George, V. (2012). Basil. *Handbook of Herbs and Spices: Second Edition*, 1, 55–72. <https://doi.org/10.1533/9780857095671.55>
- Rahimi Shokooch, Dehghani-Meshkani, M., Mehrafarin, A., Khalighi-sigaroodi, F., y Naghdi Badi, H. (2013). Changes in Essential Oil Composition and Leaf traits of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Affected by Bio-stimulators / fertilizers Application. *Journal of Medicinal Plants*, 12(47), 2023–2030. <https://jmp.ir/article-1-81-fa.html>
- Rasouli, M., Hassani, A., Barin, M., Rezaee, Y., y Sefidkon, F. (2010). Effects of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on growth, essential oil production and nutrients uptake in basil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(21), 2222–2228.
<https://doi.org/10.5897/JMPR10.337>
- Rodríguez Armijos, C. A., y Silva Aguilar, D. K. (2017). *Proyecto de factibilidad para la creación de una microempresa productora y comercializadora de sachet de albahaca en la ciudad de Nueva Loja, cantón Lago Agrio de la provincia de Sucumbíos para el año 2017* [Tesis de Ingeniería, Universidad Nacional de Loja].
<http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/19600>
- Rojas, M., Pérez, M., Castro, D., Hernández, B., Rocafull, Y., y Moya, D. (2020). Bacterias del género *Bacillus* con potencialidades para la sostenibilidad agrícola en Cuba. *Academia de Ciencias de Cuba*, 11(3).
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-01062021000300004&lng=es&nrm=iso
- Rojas, M., Tejera, B., Bosh, D., Ríos, Y., Rodríguez, J., y Heydrich, M. (2016). Potentialities of *Bacillus* strains for promoting growth in maize (*Zea mays* L.). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 50, 485–496. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193049037016>

- Saha, S., Monroe, A., y Day, M. R. (2016). Growth, yield, plant quality and nutrition of basil (*Ocimum basilicum* L.) under soilless agricultural systems. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(2), 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.aogas.2016.10.001>
- Shahrajabian, M. H., Sun, W., y Cheng, Q. (2020). Chemical components and pharmacological benefits of Basil (*Ocimum basilicum*): a review. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 1961–1970. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1828456>
- Shektar, C. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Unión Europea, y Asociación de Exportadores de Guatemala. (2021, December 30). *Albahaca, Ocimum basilicum* [Archivo PDF]. <https://www.export.com.gt/documentos/guia-de-cultivos/guia-de-cultivo-de-albahaca.pdf>
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571–586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Vieira, R. F., Goldsbrough, P., y Simon, J. E. (2003). Genetic Diversity of Basil (*Ocimum* spp.) Based on RAPD Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(1), 94–99. <https://doi.org/10.21273/JASHS.128.1.0094>
- Wafula, E. N., y Murunga, S. I. (2020). Isolation and Identification of Phosphate Solubilizing and Nitrogen-Fixing Bacteria from Lake Ol’Bolossat Sediments, Kenya. *Modern Applied Science*, 14(10), 37. <https://doi.org/10.5539/mas.v14n10p37>
- Wagi, S., y Ahmed, A. (2019). *Bacillus* spp.: Potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ*, 7, 7528. <https://doi.org/10.7717/peerj.7258>
- Walia, A., Mehta, P., Chauhan, A., y Shirkot, C. K. (2014). Effect of *Bacillus subtilis* strain CKT1 as inoculum on growth of tomato seedlings under net house conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 84(1), 145–155. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0189-3>

- Yáñez-Mendizábal, V., y Falconí, C. E. (2018). Efficacy of *Bacillus* spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on Andean lupin seeds by lipopeptide production. *Biological Control*, 122, 67–75.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.004>
- Yáñez-Mendizábal, V., y Falconí, C. E. (2021). *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 induces systemic resistance against anthracnose in Andean lupin by lipopeptide production. *Biotechnology Letters*, 43(3), 719–728. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03066-x>
- Yáñez-Mendizábal, V., Falconí, C., y Kanaley, K. (2023). Production optimization of antifungal lipopeptides by *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 using low-cost optimized medium. *Biological Control*, 185, 105306.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964423001597>
- Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., y Teixidó, N. (2012). Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low-cost commercial products and by-products. *Biological Control*, 60(3), 280–289.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.001>
- Yu, X., Liu, X., Zhu, T. H., Liu, G. H., y Mao, C. (2012). Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. *European Journal of Soil Biology*, 50, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.01.004>