



Evaluación de inoculaciones periódicas de *Bacillus Subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en el incremento de fitasas, nitrogenasas y

crecimiento del chocho (*Lupinus mutabilis*) bajo invernadero

González Tinta, Siomara Joaquina

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Ing. Falconí Saá, César Eduardo PhD

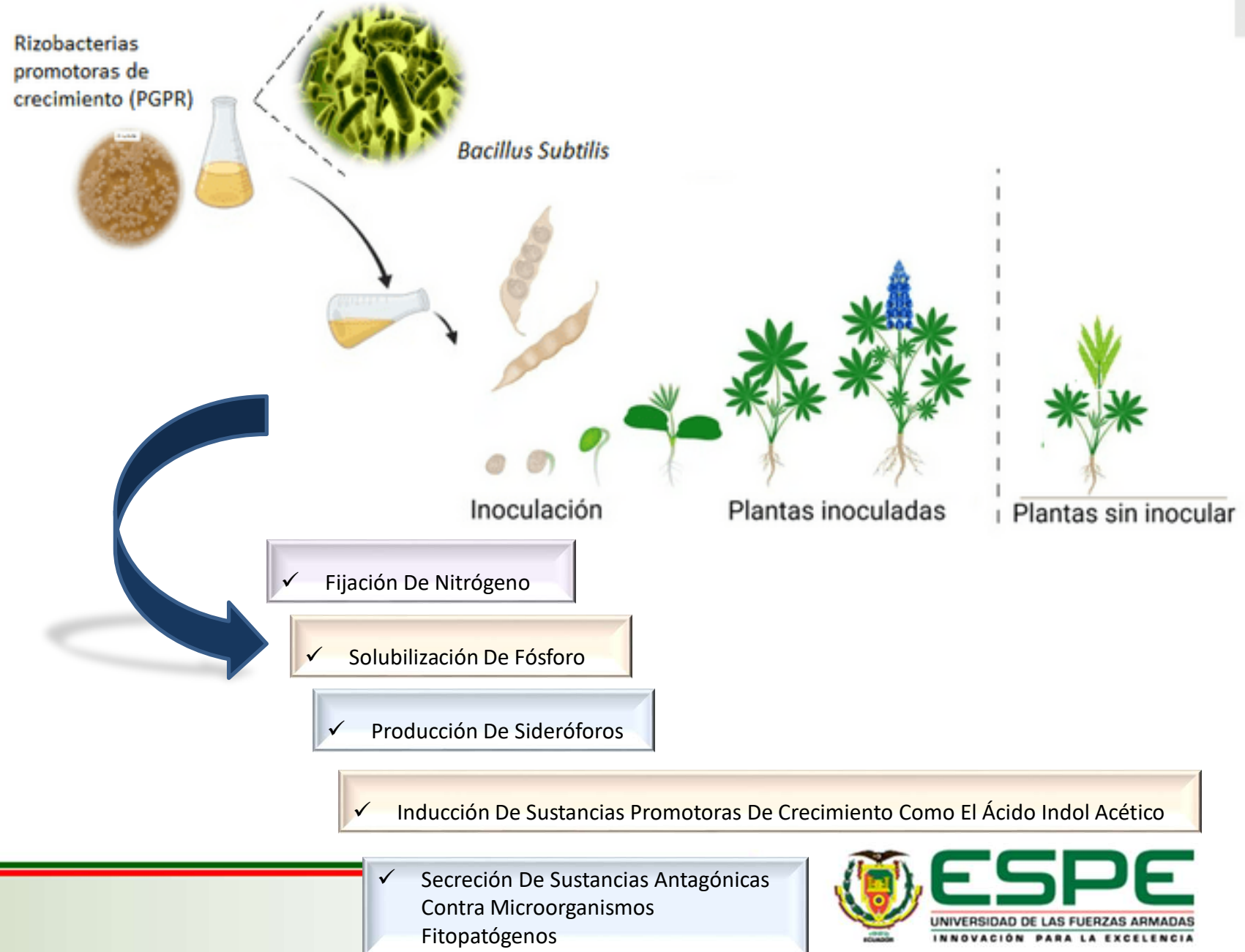
23 de junio del 2023



INTRODUCCIÓN

Actualmente, suelos de alrededor de 1900 millones de hectáreas en todo el mundo se ven afectados por su degradación; al ser un recurso no renovable y de soporte fundamental para la agricultura, se ha buscado generar estrategias amigables y sostenibles que mejoren la productividad del suelo y la obtención de productos agrícolas de buena calidad.

(Sánchez *et al.*, 2021).



Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de inoculaciones periódicas de *Bacillus Subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en el incremento de nitrogenasas, fitasas, y crecimiento del chocho bajo invernadero

Objetivos específicos

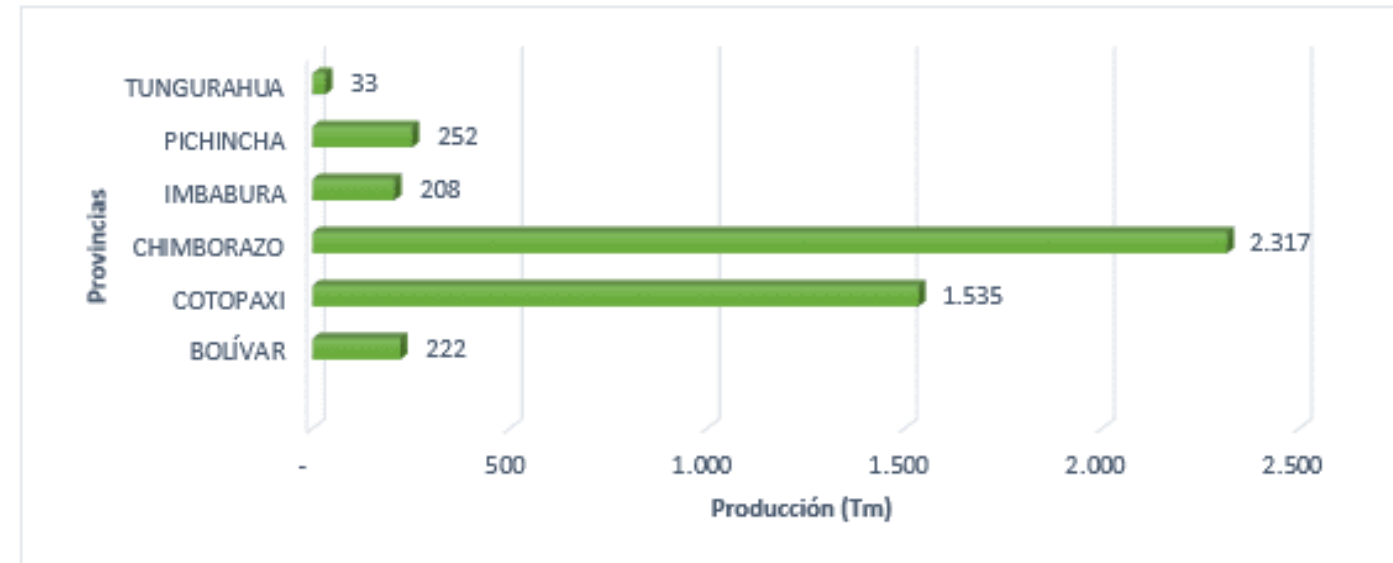
- ✓ Estimar el efecto de inoculaciones periódicas de *B. subtilis* CtpxS2 y CtpxS3-5 sobre la altura de la planta y el área de las raíces del chocho.
- ✓ Cuantificar la dinámica poblacional de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 presentes en la rizósfera del suelo del chocho, cada 15 días durante tres meses.
- ✓ Determinar el efecto de inoculaciones periódicas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre parámetros fisiológicos (fijación de nitrógeno, índice de clorofila, sólidos solubles totales, solubilización de fósforo y auxinas) en plantas de chocho.

Cultivo de chocho en el Ecuador

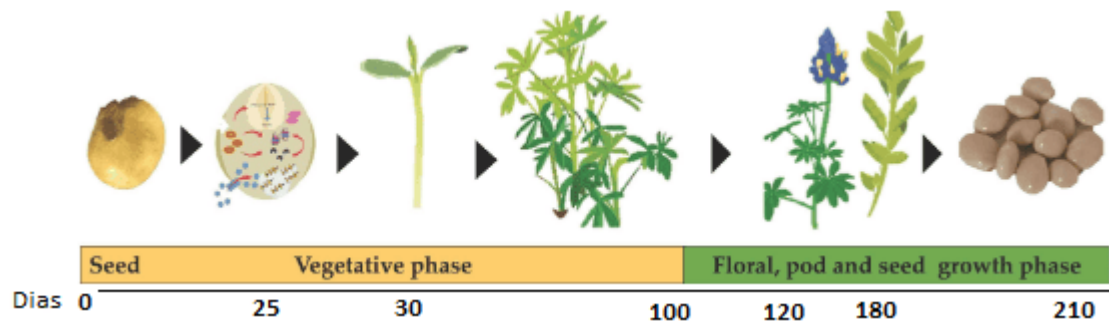
El lupino andino (*L. mutabilis*), perteneciente a la familia de las fabáceas, se cultiva tradicionalmente en la zona Andina de América entre los 2500 msnm a 3600 msnm, especialmente en países como: Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Chile y Argentina, siendo uno de los alimentos nativos más importantes debido a su alto contenido de proteína, fibra, calcio, fósforo, hierro (Peralta, 2016), (Falconí & Yáñez, 2022).

Figura 1

Producción de chocho en toneladas métricas (Tm) por provincias en el Ecuador



Nota. Tomado de Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (2021)



MECANISMOS DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL

mecanismos de quimiotaxis

Mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal

Disponibilidad de nutrientes (Biofertilizante)

- Solubilización de fosfato inorgánico
- Fijación asimbiótica de nitrógeno atmosférico
- Producción de nitrógeno orgánico y aminoácidos

Producción de hormonas reguladoras de crecimiento

- Auxinas
- Citoquininas
- Giberelinas

Mecanismos indirectos de promoción de crecimiento vegetal

Antagonismo contra microorganismos

- Antibióticos
- Sideróforos
- Enzimas líticas
- Péptidos

Producción de biopelículas

Bacillus subtilis

- ✓ Bacilo Gram positivo
- ✓ Aerobio estricto
- ✓ Produce endoesporas (ovales o cilíndricas)
- Produce antibióticos
- ✓ Matriz extracelular denominada biofilm
- ✓ Crecen a una temperatura de 30 a 45 °C (mesófilas)

(Villareal *et al.*, 2018); (Yáñez, 2012).



Nota. Tomado de Corrales *et al.* (2017).

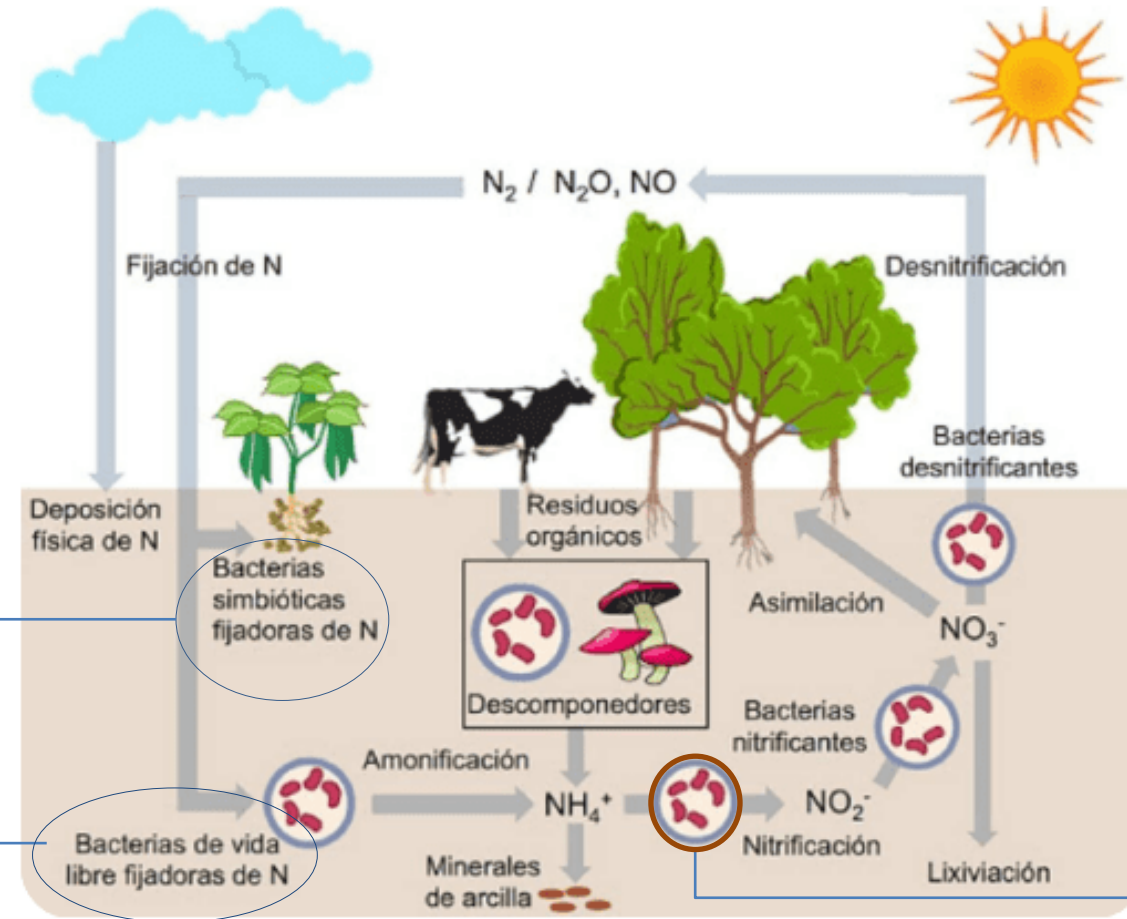
Nota. Autoría propia

Mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal

Disponibilidad de nutrientes (Biofertilizante)

Dinámica del nitrógeno

Figura 2
Ciclo del nitrógeno



- ✓ Capaces de formar nódulos en la raíz
- ✓ No considerados PGPR por no ser bacterias de vida libre.
- ✓ Géneros bacterianos simbióticos:
Rhizobium, Bradyrhizobium, Sinorhizobium

Llamados diazótrofos o consumidores de N_2
(di: dos; azoto:N; trofo: comer)
(Aranda, 2014).

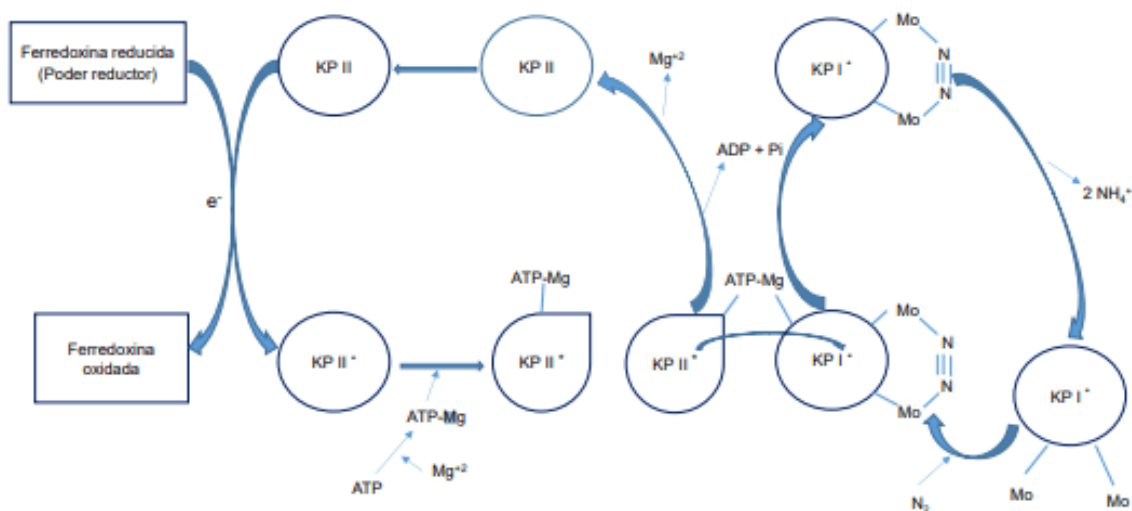
Enzima nitrogenasa (Nasa)

- ✓ Considerados PGPR (vida libre)
- ✓ Géneros bacterianos asimbióticos:
Bacillus, Pseudomonas, Aeromonas, Serratia y Azospirillum

Nota. Tomado de Corrales et al. (2017), Aranda(2014).

Figura 3

Mecanismo de acción de la nitrogenasa



Nota. Los electrones transferidos desde la ferredoxina sensibles al oxígeno son captados por el KPII, uniéndose el Mg al ATP como forma bioactiva, enlazándose al KPI y provocando la ruptura del triple enlace de N_2 para formar de NH_4^+ . KPI= componente I, KPII= componente II.

Tomado de Herrera *et al.* (2008).

Enzima nitrogenasa (Nasa)

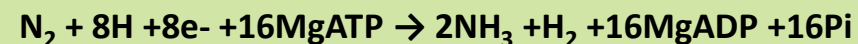
Componentes sensibles al oxígeno que regulan el complejo enzimático de las nitrogenasas

Componente I o nitrogenasa:

- Tetrámero: 2 subunidades de β -proteínas, 2 subunidades de α -proteínas
- 24 moléculas de hierro, 2 de molibdeno y un cofactor de hierro (Fe) y molibdeno (Mo) llamado ferromolibdenoproteína (FeMo-Co).

Componente II o nitrogenasa- reductasa:

- Dímero: formado por 4 átomos de hierro (Fe) unidos con 4 átomos de azufre (S) de determinadas cisteínas denominado ferroproteína, subunidades idénticas unidas a un grupo prostético 4Fe-4S, requiriendo un complejo de magnesio y energía en forma de ATP para reducir N_2 a NH_3 .



(Camelo *et al.*, 2011)

Mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal

Disponibilidad de nutrientes (Biofertilizante)

Dinámica del fósforo

Cataliza procesos de desfosforilación de grupos fosfoester
 Libera ortofosfatos libres
 Movilización de fósforo inorgánico disponible (pi) con pH neutro hacia la planta

Sales myo-inositol hexaquisfosfato (fitatos),

fosfohistidina

cationes (Na⁺, Mg⁺², K⁺, Ca⁺², Zn⁺², Cu⁺¹⁺² y Fe⁺²⁺³),

Impide la quelación y precipitación del P y trazas de elementos

- Temperaturas de 70 OC (termo resistente)
- Capacidad hidrolítica

Reacciones de óxido- reducción

Remoción grupos fosfatos

Ácido fítico

B. subtilis

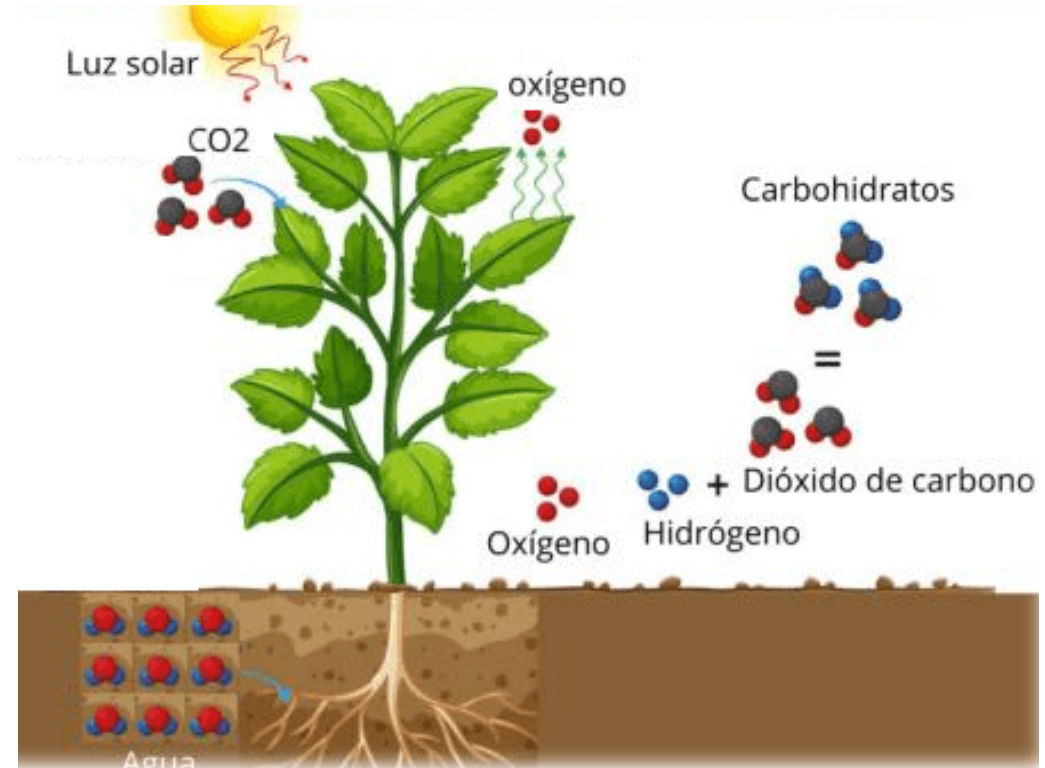
Enzimas microbianas

+

Ácidos orgánicos

Ácidos inorgánicos

Fitasas alcalinas



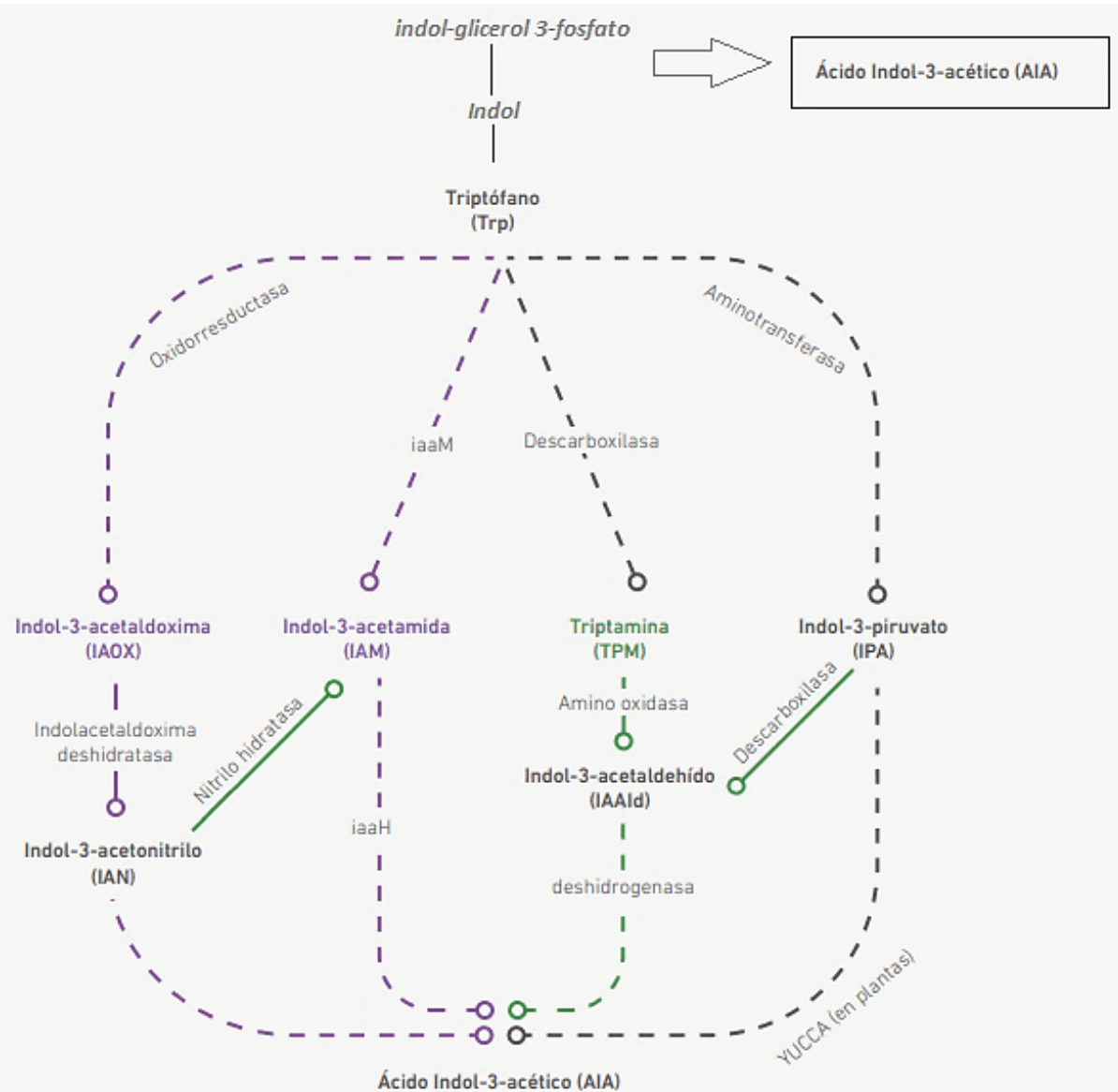
Fósforo absorbido

Fósforo orgánico

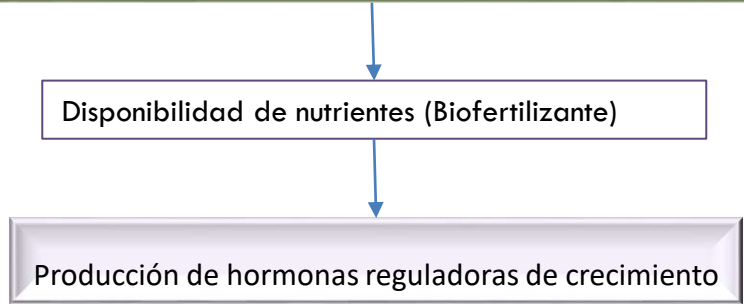
Fósforo inorgánico

Figura 4

Biosíntesis del ácido indol acético (AIA)



Mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal



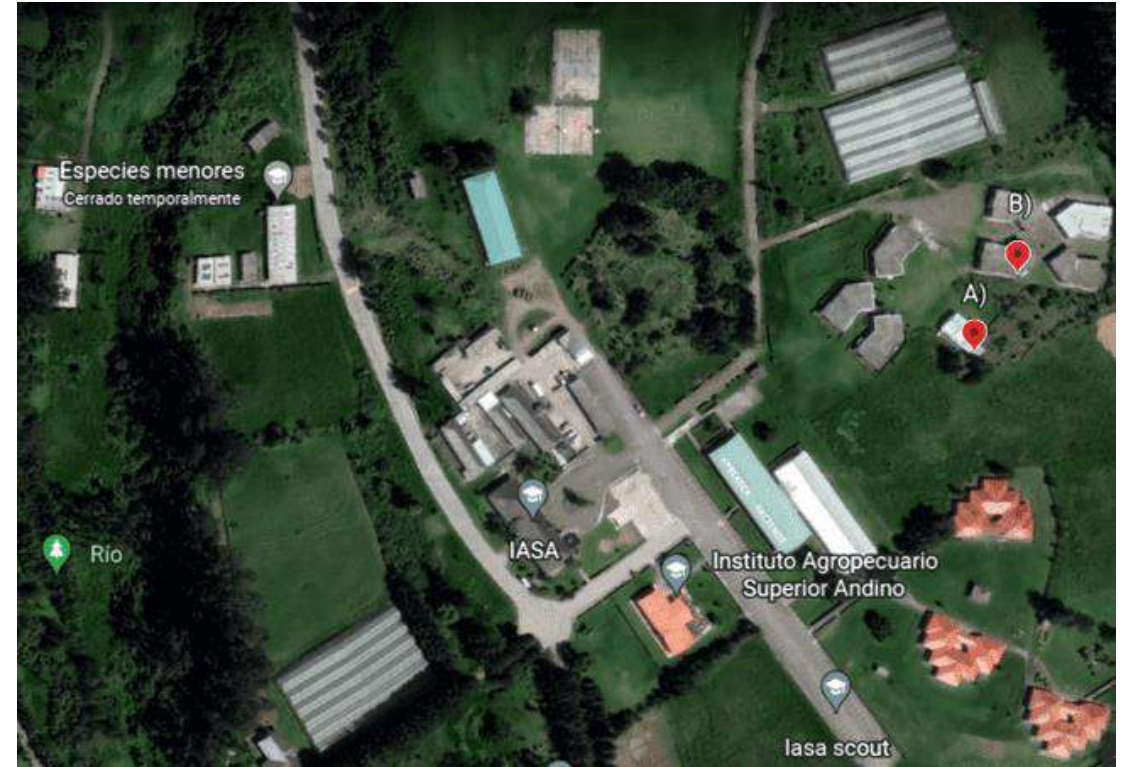
Nota. Biosíntesis del ácido indol acético conformada por cuatro rutas dependientes de triptófano como: indol-3-Acetaldoxamina (IAOX), indol -3- acetamida (IAM), triptamina (TPM) e indol-3piruvato (IPA), y una ruta independiente a partir de indol glicerol – 3 fosfato. YUCCA= Flavina monooxidasa. Tomado de Bonilla *et al.* (2021).

Ubicación del área de investigación

La presente investigación se desarrolló en dos fases, en el invernadero y en el laboratorio de Fitopatología y Control biológico de la Carrera Agropecuaria IASA I en la Hacienda “El Prado” de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicados en la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, Parroquia San Fernando.

Figura 5

Ubicación satelital del sitio de estudio



Nota. A) Invernadero de Fitopatología, B) Laboratorio de Fitopatología. Tomado de GoogleMaps (2022)

Se evaluó la respuesta de 24 plantas de chocho (*L. mutabilis*) por efecto de dos cepas de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en condiciones de invernadero.



- Sobre las unidades experimentales se distribuyeron en forma aleatoria los tratamientos descritos en la tabla 3
- El experimento se dispuso bajo un diseño completamente al azar, con tres tratamientos y 4 repeticiones

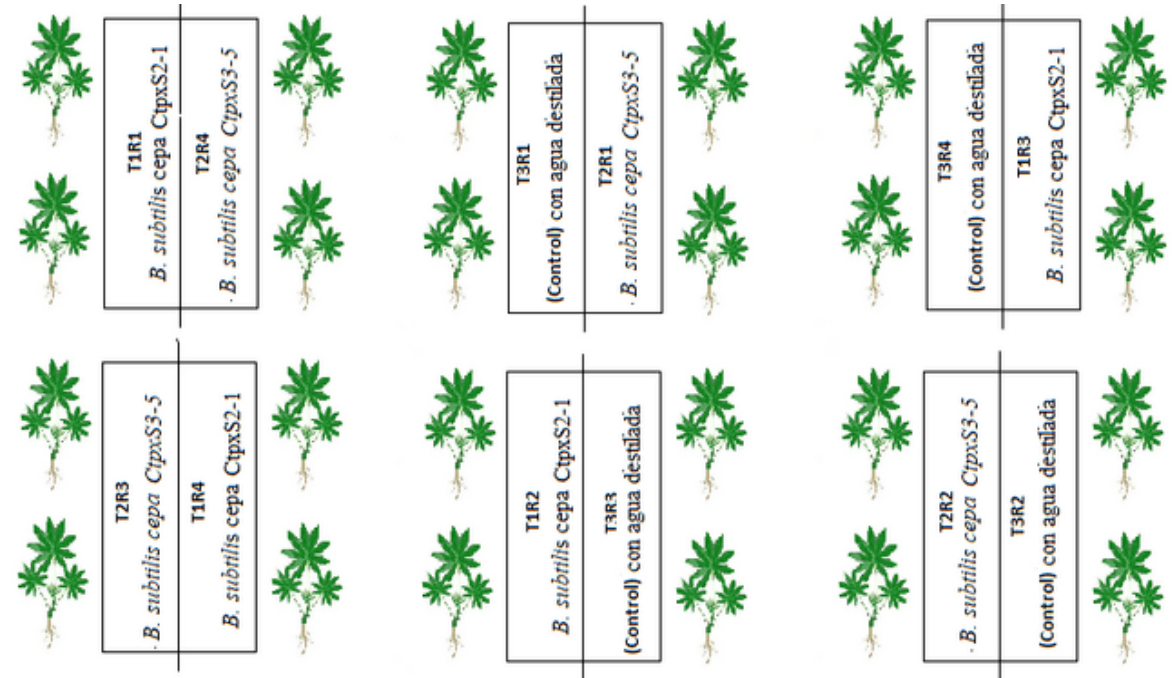
Tabla 1

Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Características
T1	Ocho semillas de chocho (<i>Lupinus mutabilis</i>) inoculadas con <i>B. subtilis</i> cepa CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml)
T2	Ocho semillas de chocho (<i>Lupinus mutabilis</i>) inoculadas con <i>B. subtilis</i> cepa CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml)
T3 (Testigo)	Ocho semillas de chocho (<i>Lupinus mutabilis</i>) con agua destilada

Figura 6

Diseño experimental del ensayo en invernadero



- Se colocaron cuatro plantas de chocho en rizotrones con dimensiones (1.0 m x 0,5 a x 0,4), cada dos plantas fue consideradas una unidad experimental, que se adecuó de acuerdo al área de estudio seleccionando.

Variables a evaluar

Variables agronómicas

- Altura de planta
- Área de raíces

Dinámica poblacional de *Bacillus subtilis*

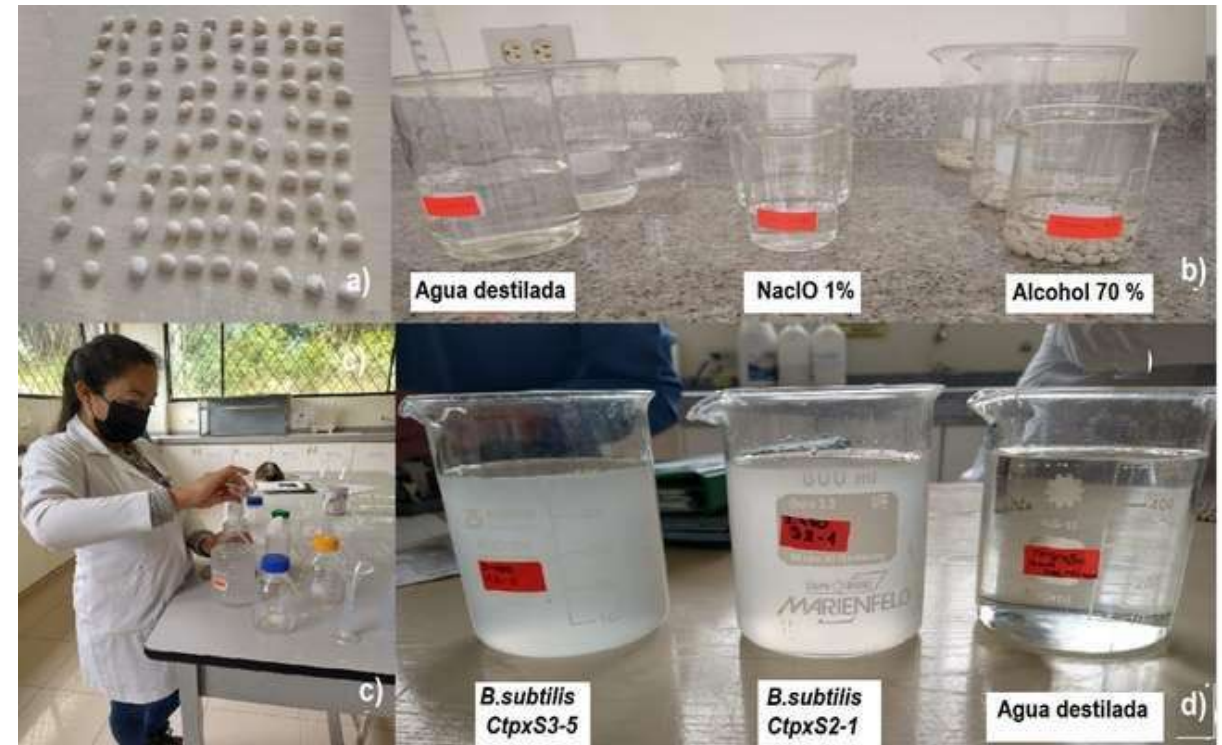
Variables fisiológicas

- Fijación de nitrógeno atmosférico
- Índice de contenido de clorofila
- Sólidos solubles totales
- Solubilización de fosfatos
- Detección y cuantificación de auxinas

Figura 7

MÉTODOS

Inoculación de *B. subtilis* CtpxS2 y CtpxS3-5 en semillas de chocho (*L. mutabilis*)



Nota. a) Selección de semillas de chocho (*L. mutabilis*) var. I-450 Andino, b) desinfección de las semillas de chocho con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1%, alcohol al 70% y con agua destilada (Yáñez et al., 2016), c) preparación de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 a una concentración de 1×10^6 (UFC/ml) d) inoculación de semillas de chocho (*L. mutabilis*). Autoría propia.

MÉTODOS

Figura 8

Establecimiento de plántulas de chocho (L. mutabilis) en el invernadero



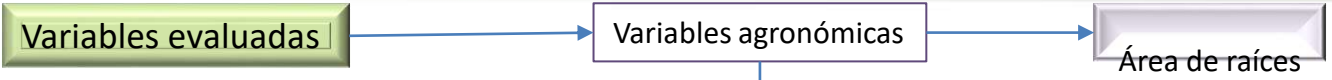
Nota. a) Esterilización del sustrato bajo solarización y soplete, b) mezcla de sustrato con tierra negra, cascarilla de arroz y arena en proporción 1:1:1, c) Colocación del sustrato en cada rizotrón, d) disposición de los rizotrones con un diseño completamente al azar e) selección de semillas germinadas considerando su tamaño de radícula, f) siembra de semillas de chocho previamente germinadas en los rizotrones. Autoría propia.

Inoculación de *Bacillus subtilis* CtpxS2 y CtpxS3-5 en plántulas de chocho (*L. mutabilis*)

- ✓ Inoculación de *B. subtilis* CtpxS2 y CtpxS3-5 a una concentración de 1×10^6 (UFC/ml) en plántulas
- ✓ Se realizó cada 15 días, durante tres meses
- ✓ En la base del tallo de cada planta de chocho
- ✓ 300 ml por planta, de forma paralela

(Falconí *et al.*, 2022).

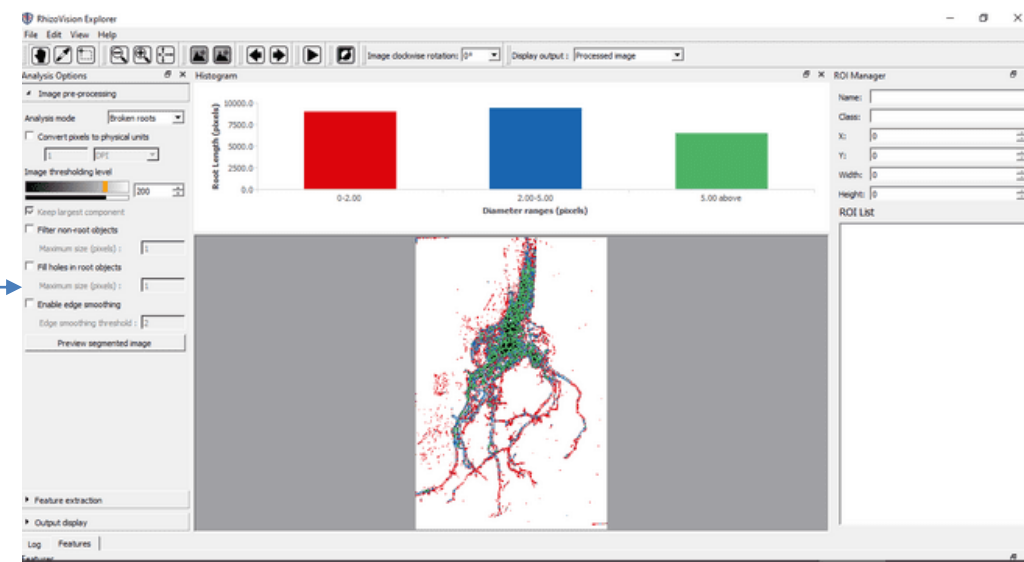
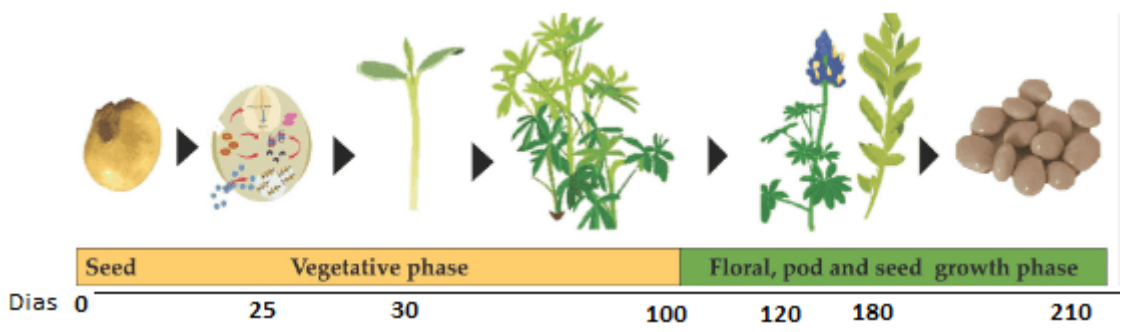




- ✓ La altura de la planta fue medida con cinta métrica,
- ✓ Desde la base del cuello hasta la parte más alta del ápice
- ✓ Durante 3 meses cada 15 días por cada unidad experimental.



El área de raíces se determinó mediante fotografías digitales del software Digital imaging of root traits (DIRT) para obtener rasgos fenotípicos como la longitud, forma y diámetro de las raíces.



Variables evaluadas

Dinámica poblacional de *Bacillus subtilis*

Figura 9

Dinámica poblacional de Bacillus subtilis

Nota. a) Recolección de la rizósfera inoculada por tratamiento y repetición, b) pesaje de 10 g de cada muestra de suelo, c) colocación de muestras del suelo a baño maría a 80 °C, d) preparación de material en la cámara de flujo laminar, e) adición de 90 ml de agua destilada (dilución 1: 10) en cada muestra de suelo, f) colocación de cada dilución en el agitador orbital durante 20 minutos, g) elaboración de bancos de dilución y método de dilución y plating hasta la dilución 10^{-4} y siembra en medio NYDA, h) incubación a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24 horas de cada muestra. Autoría propia.

$$UFC/g = \frac{\text{Número de colonias contadas} * \text{Factor de dilución}}{\text{Volúmen de la sln sembrada}}$$

Variables evaluadas

Variables fisiológicas

Fijación de nitrógeno

A partir de las dos cepas de *B. subtilis* *CtpxS-1* y *CtpxS3-5* y las colonias obtenidas del sustrato de cada tratamiento, conjuntamente con su **control negativo** *Pseudomonas sp.* (bacterias libres de nitrógeno)

- ✓ Se realizaron diluciones sucesivas hasta la 10^{-3} ,
- ✓ Se sembraron en el medio **ASHBY MANITOL** medio sólido libre de nitrógeno (Manitol 20.0 g/l, $K_2 HPO_4$ 0.2 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/l, NaCl 0.2 g/l, $K_2 SO_4$ 0.1 g/l, $CaCO_3$ 5.0 g/l, y agar 17.0 g/l)
- ✓ Las cajas petri se incubaron a $28^\circ C \pm 2$ por 5 días

(Pilatuña, 2018).

Figura 10

Cuantificación de nitrógeno en hojas frescas de *L. mutabilis*

Nota. a) Colecta de hojas frescas de *L. mutabilis* por tratamiento y repetición, b) muestras de hojas colocadas en nitrógeno líquido, hasta obtención de un polvo delgado, c) peso de 1 g de las hojas liofilizadas aforadas a 2 ml con PBS en tubos eppendorf y maceradas con micropistilo, d) centrifugación de cada muestra durante 20 minutos a 14000 RPM, e) extracción de 500 µl del sobrenadante en nuevos tubos Eppendorf con 1000 µl de PBS (relación 1:2), f) preparación de la microplaca con 25 µl de la solución madre por duplicado en cada pocillo y 200 µl del reactivo de trabajo, g) incubación a $37^\circ C$ durante 30 min de la microplaca, h) Lectura en el espectrofotómetro ajustando la onda a 540-590 nm. Autoría propia.

Variables evaluadas

Variables fisiológicas

Sólidos solubles totales

Figura 11

Cuantificación de sólidos solubles totales

Nota. f) peso nuevos tubos Eppendorf de 0,5 ml y se obtuvo el peso inicial (P_o), g) colocación de 100 μ l del sobrenadante, h) y i) colocación en la estufa en un recipiente de vidrio totalmente sellado y con sílica gel en la durante 24 horas para volver a pesar, j) obtención del peso final (P_f). Autoría propia

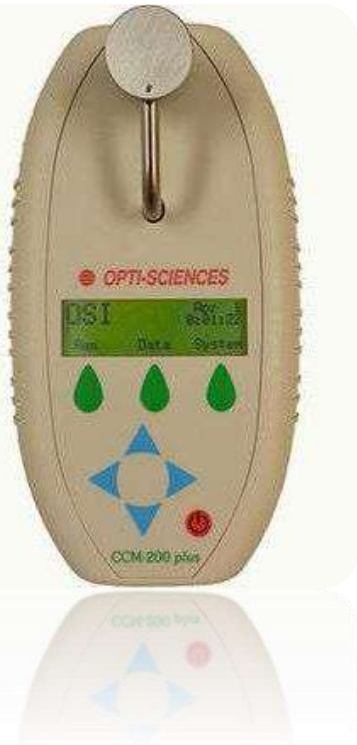
Variables evaluadas

Variables fisiológicas

Índice de contenido de clorofila

LABORATORIO

CAMPO



Se realizó la cuantificación del índice de clorofila cada 7 días en 3 folíolos de las hojas de las plantas de chocho, mediante el Fluorímetro de clorofila CCM-200 Chlorophyll Content Meter (Opti-Science).

Figura 12

Medición del índice de clorofila en hojas colectadas de *L. mutabilis*



Nota. a) colecta de hojas de *L. mutabilis*, b) corte en tiras delgadas hasta obtener 0,5 gr de cada muestra de hojas, c) adición de 5 ml de etanol 96% en tubos de ensayo con los 0,5 g de muestra de hojas pesadas, d) maceración de las muestras, e) refrigeración a -4°C durante 24 horas cada muestra, f) centrifugación a 2000 RPM por 10 minutos, g) extracción de 1 ml del sobrenadante de cada muestra y se aforó a 6 ml con etanol al 96% h) medición en el espectrofotómetro ajustando la onda a 645 y 663 nm. Autoría Propia.

Variables evaluadas

Variables fisiológicas

Detección y cuantificación de auxinas

Solubilización de fosfatos

A partir de las dos cepas de *B. subtilis* CtpxS-1 y CtpxS3-5 y las colonias obtenidas del sustrato de cada tratamiento,

- ✓ Se realizaron diluciones sucesivas hasta la 10^{-3} ,
- ✓ Se sembraron en el medio Pikovskaya (Extracto de levadura 0.5 gL⁻¹, Dextrosa 10 gL⁻¹, CaSO₄ 5 gL⁻¹, (NH₄)₂ SO₄ 0.5 gL⁻¹, KCl 0.2 gL⁻¹, MgSO₄ .H₂O 0.1 gL⁻¹, MnSO₄ .H₂O 0.0001 gL⁻¹, FeSO₄ .H₂O 0.0001 gL⁻¹, Agar 15 gL⁻¹),
- ✓ Se incubaron a 28°C ±2 por 4 días hasta observar colonias rodeadas de halo de color transparente.
- ✓ Se consideró positivo al evidenciar el viraje de color por efecto de la solubilización de fosfato (Romero *et al.*, 2019).

Figura 13

Detección y cuantificación de auxinas en raíces de *L. mutabilis*

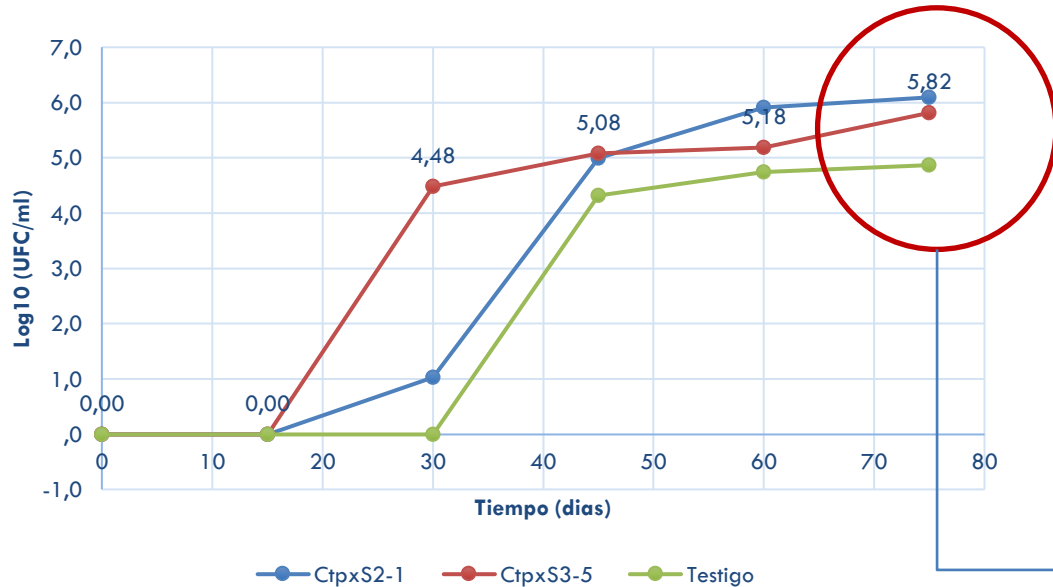
Nota. a) y b) Toma de muestras de raíz y peso de 1 g de cada muestra, c) colocación las raíces en tubos Falcon envueltos con papel aluminio y acetona al 80% hasta cubrir totalmente las raíces, d) reposo de las muestras a -4°C durante 5 días, e) y f) maceración y filtración de las muestras de raíz, g) recolecta de 500 µl de cada muestra filtrada en tubos de ensayo y adición de 1,5 ml de reactivo de Salkowski, se dejó reposar durante 30 minutos, se homogenizó con vortex, h) se colocó 1500 µl en cada celda por muestra y por duplicado para ser llevados al espectrofotómetro para evaluar (AIA). Autoría propia.

VARIABLES EVALUADAS

Dinámica poblacional de *Bacillus subtilis*

Figura 14

Dinámica poblacional de inoculaciones periódicas de *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5, en la rizósfera de plantas de chocho a lo largo de tres meses



Feng *et al.*, (2016), en cuyo estudio mencionaron que la población de *B. subtilis* inicialmente se reduce en la filósfera de fresa bajo invernadero, pero más del 50% en el campo, por lo que se puede sustentar que *Bacillus subtilis* son bacterias dependientes de factores ambientales que interfieren directamente en la estabilidad y producción de metabolitos, evidenciando la dificultad de predecir la respuesta de las bacterias cuando se liberan al medio natural (Falconí *et al.*, 2022)

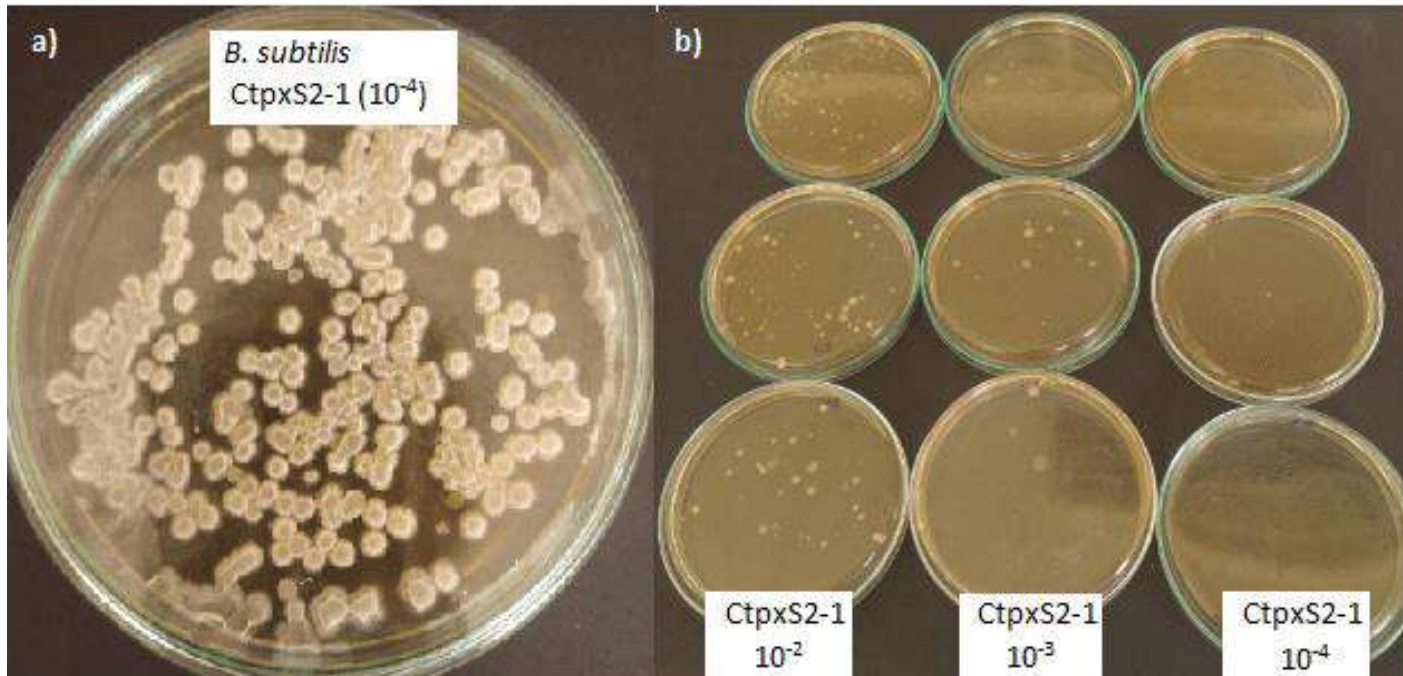
Falconí *et al.*, (2022) una vez que alcanza la adhesión y colonización en la rizósfera o filósfera, la población de *B. subtilis* llega a permanecer estable por un periodo de tiempo equivalente a 7,0 log10 UFC/g, evaluado en la filósfera del lupino después de la pulverización de la bacteria durante dos meses

B. subtilis la cepa CtpxS2-1 presentó a una estabilidad de alrededor de 5,82 log10 (UFC/g) y 6,09 log10 (UFC/g) de la cepa CtpxS3-5

Nota. a) Población de *B. subtilis* cepa CtpxS2-1, CtpxS3-5 y testigo, recuperados de la rizósfera de los cultivares de chocho. Para mejorar la homogeneidad de las varianzas, los datos de concentración bacteriana se transformaron a Log10 (UFC/g), cada punto representa la media ± DE, de seis inoculaciones realizadas cada 15 días. Autoría propia.

Figura 15

Dilución y plating de *B. subtilis* CtpxS2-1 (10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} UFC/ml) colectado de la rizósfera de chocho y crecido en medio NYDA



Nota. a) *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^{-4} UFC/ml), medio NYDA, b) Diluciones sucesivas de *B. subtilis* CtpxS2-1 (10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) por triplicado en medio NYDA, incubadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24 horas. Autoría propia.

Castañeda & Sánchez (2016) mencionan que *B. subtilis* demuestra ser una de las especies con mayor velocidad de crecimiento (**Falconí et al., 2022**), llegando a estabilizarse para posteriormente descender evidenciando que la tasa de reproducción es igual a la de mortalidad, proceso donde los microorganismos mueren en diferentes periodos ya que no todas se desarrollan en el mismo tiempo.

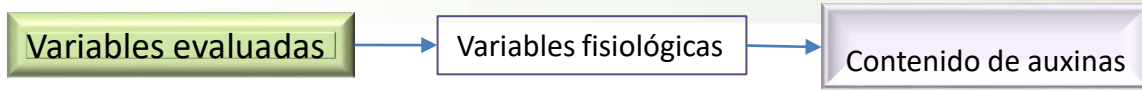
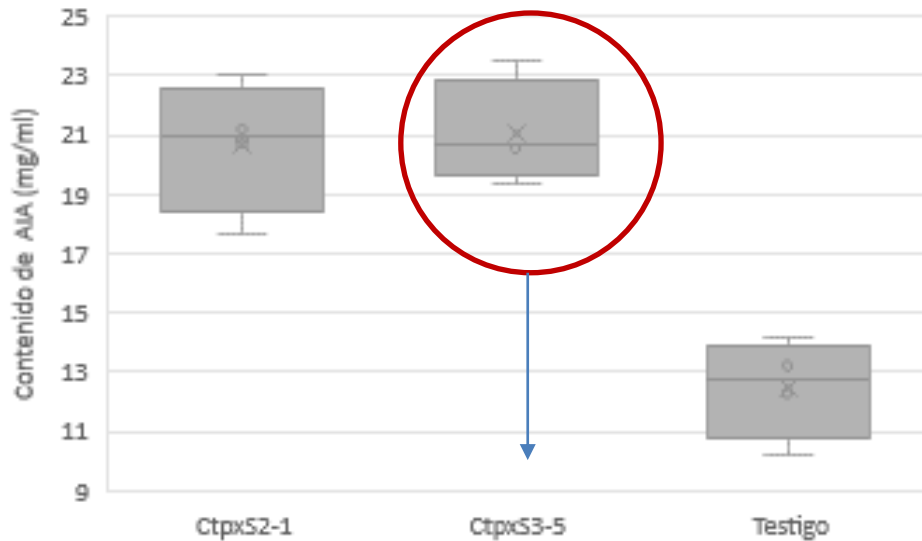


Figura 16

Efecto de inoculaciones con dos cepas de *B. subtilis* en los promedios y límites superiores e inferiores de auxinas (mg/ml) en hojas de *L. mutabilis* a lo largo de tres meses



Nota. *B. subtilis* cepa CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), *B. subtilis* cepa CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml), Testigo (agua destilada). Autoría propia.

Las rizobacterias (PGPR) son capaces de producir sustancias orgánicas como auxinas, giberelinas, etileno, ácido abscísico y citoquininas (Cabello et al., 2019), permitiendo el desarrollo y regulación de parámetros fisiológicos, bioquímicos y morfológicos (Camelo et al., 2011), como se sustenta en algunos estudios realizados en plántulas de trigo (*T. aestivum* L.) (Abbasi et al., 2011), tomate (*S. lycopersicum* L.) (Almoneafy et al., 2012) y chocho (*L. mutabilis*) (Yáñez & Falconí, 2021)

Tabla 2

Promedio \pm desviación estándar del contenido de auxinas (AIA), en hojas frescas de chocho al final de la fase experimental.

Tratamiento	AIA (mg/ml)	
CtpxS2-1	12,46 \pm 2,23	A
CtpxS3-5	21,05 \pm 1,74	A
Testigo	12,46 \pm 1,69	B

Nota. *B. subtilis* cepa CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), *B. subtilis* cepa CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml), Testigo (agua destilada). Autoría propia.

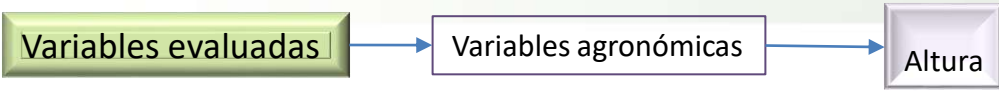
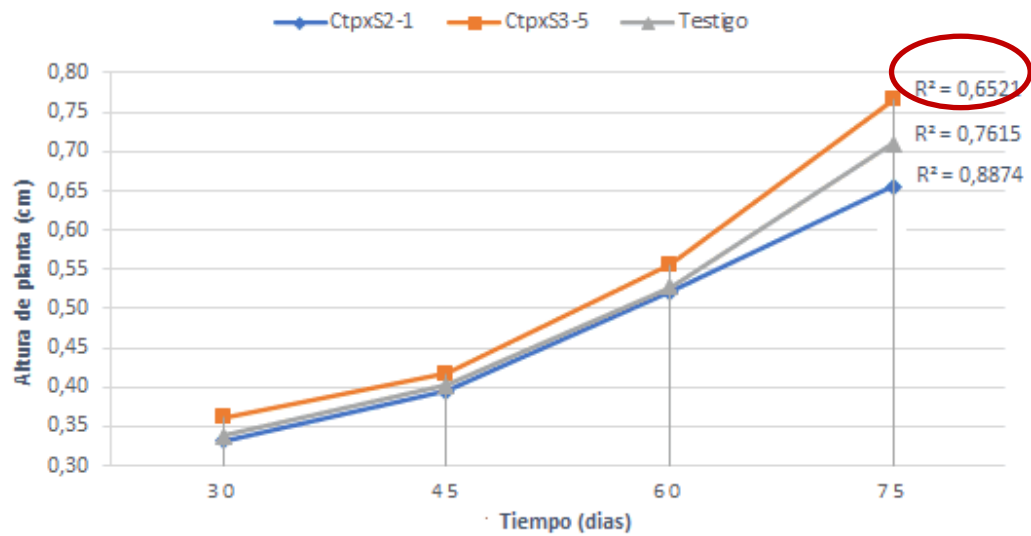
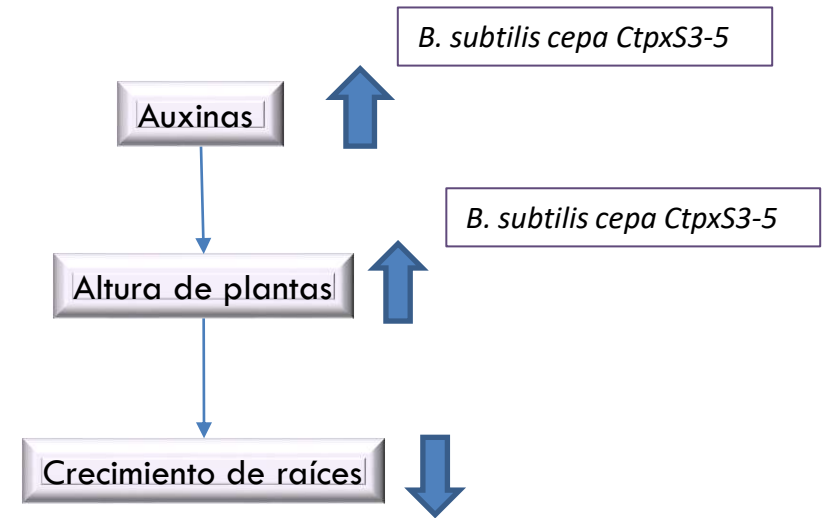


Figura 17

Altura de las plantas de chocho (cm) durante tres meses de aplicación, a partir de la formación de plántulas (30 días)



Nota. Variación de las alturas en plantas de chocho cada 15 días. Autoría propia



Castañeda & Sánchez (2016) la tasa de crecimiento máxima de las plantas, están limitadas por la capacidad de las bacterias de procesar nutrientes; **Cabello et al., (2019)** mencionó en su estudio que la concentración de IAA es directamente proporcional al crecimiento del tallo inhibiendo el crecimiento de raíz, mediante inoculaciones de *B.subtilis* que promovieron el crecimiento del tallo en un 45% a comparación del 17% del control absoluto.

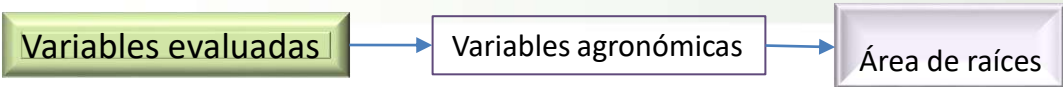
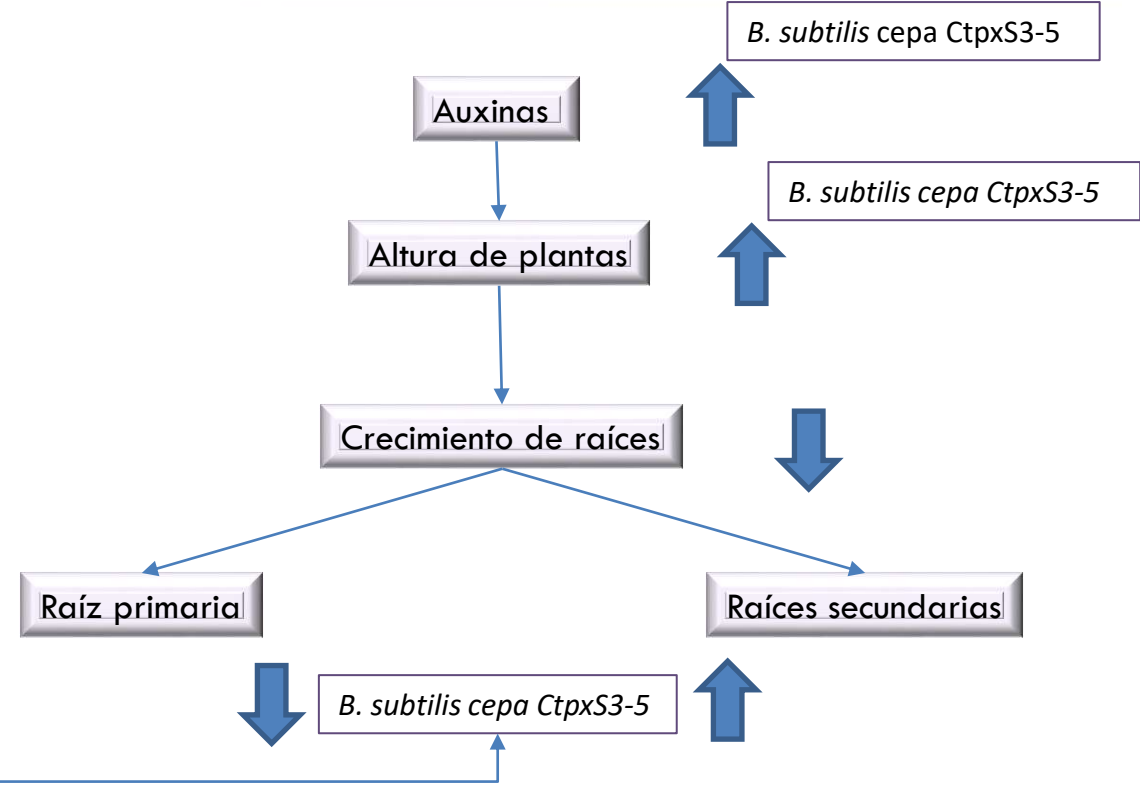
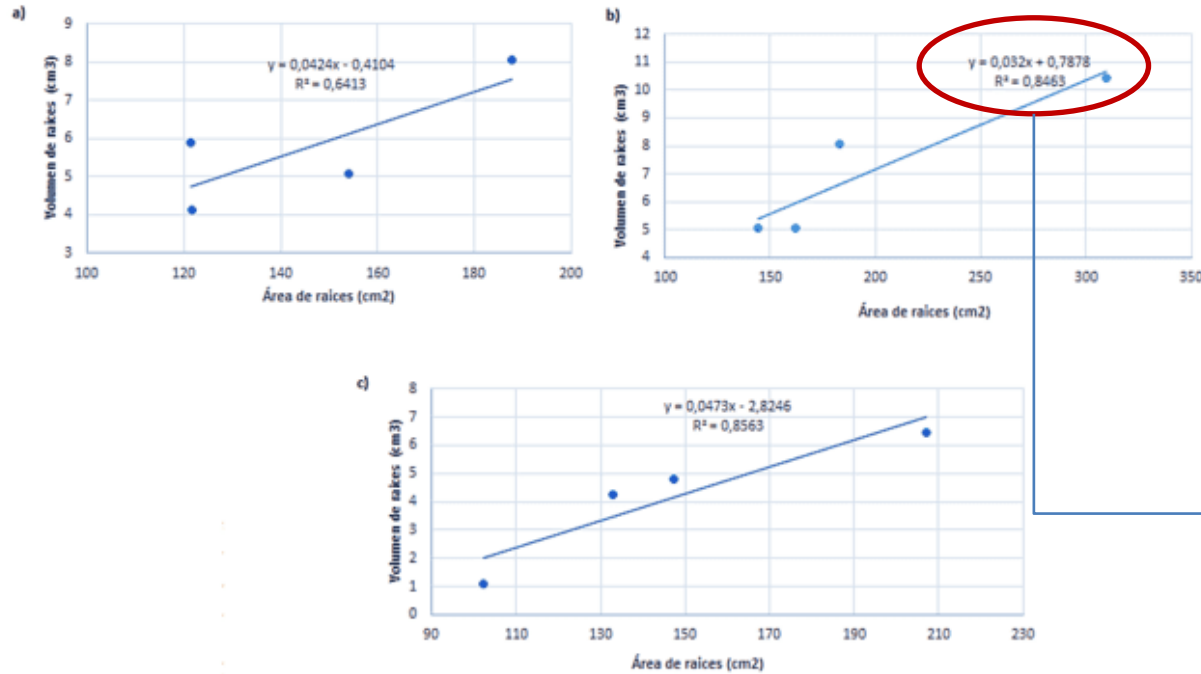


Figura 18

Correlación entre el área y volumen de raíces de chocho tratadas con *B. subtilis* cepa CtpxS2-1 y CtpxS3-5



Rojas *et al.* (2016) verificaron que mientras las auxinas estimulan el crecimiento de los tallos y coleóptilos, inhiben el crecimiento de la raíz primaria, pero estimulan la formación de raíces secundarias

Nota. a) Correlación entre el área y volumen de *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), b) Correlación entre el área y volumen de *B. subtilis* cepa CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml), c) Correlación entre el área y volumen del Testigo (agua destilada). Autoría propia

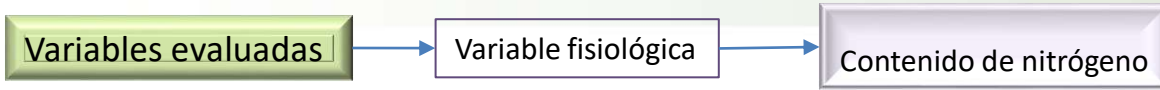
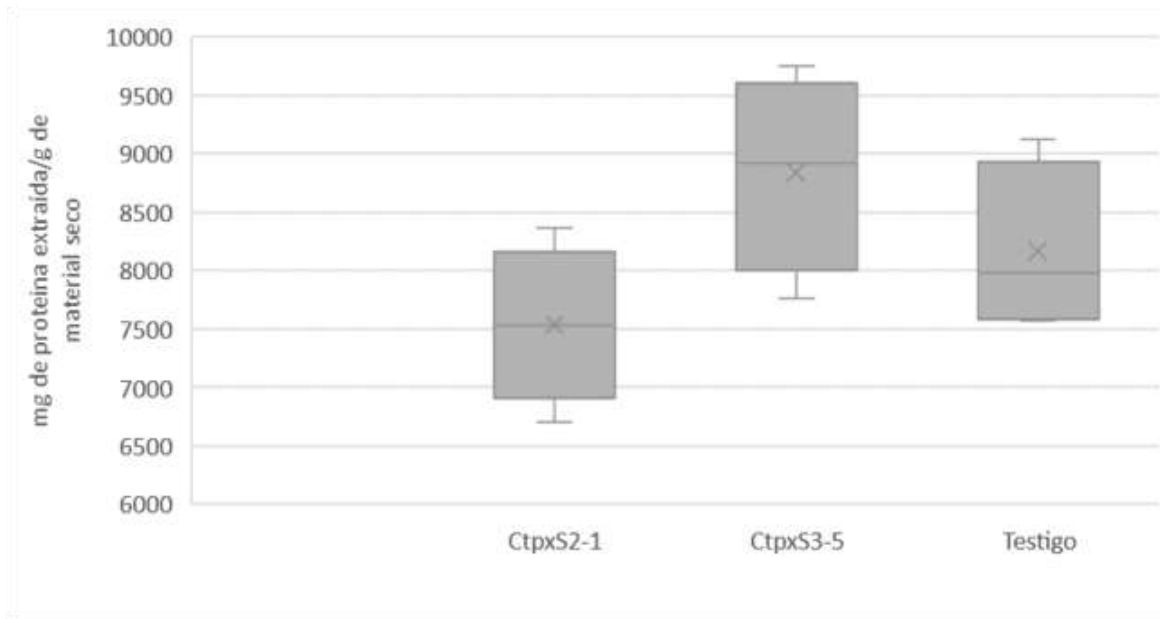
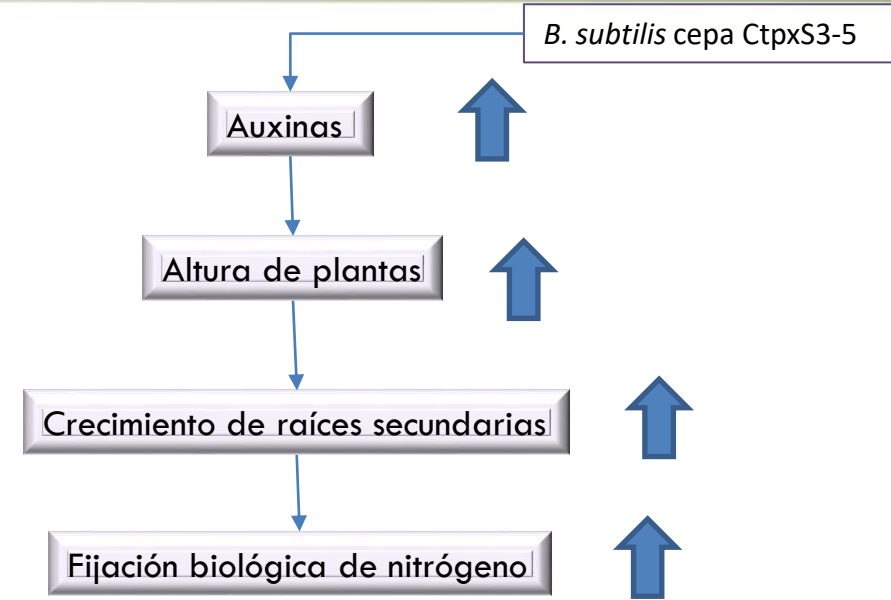


Figura 19

Representación de los promedios y límites superiores e inferiores del contenido proteico por cada gramo de material seco en hojas de *L. mutabilis* producto de inoculaciones con *B. subtilis*

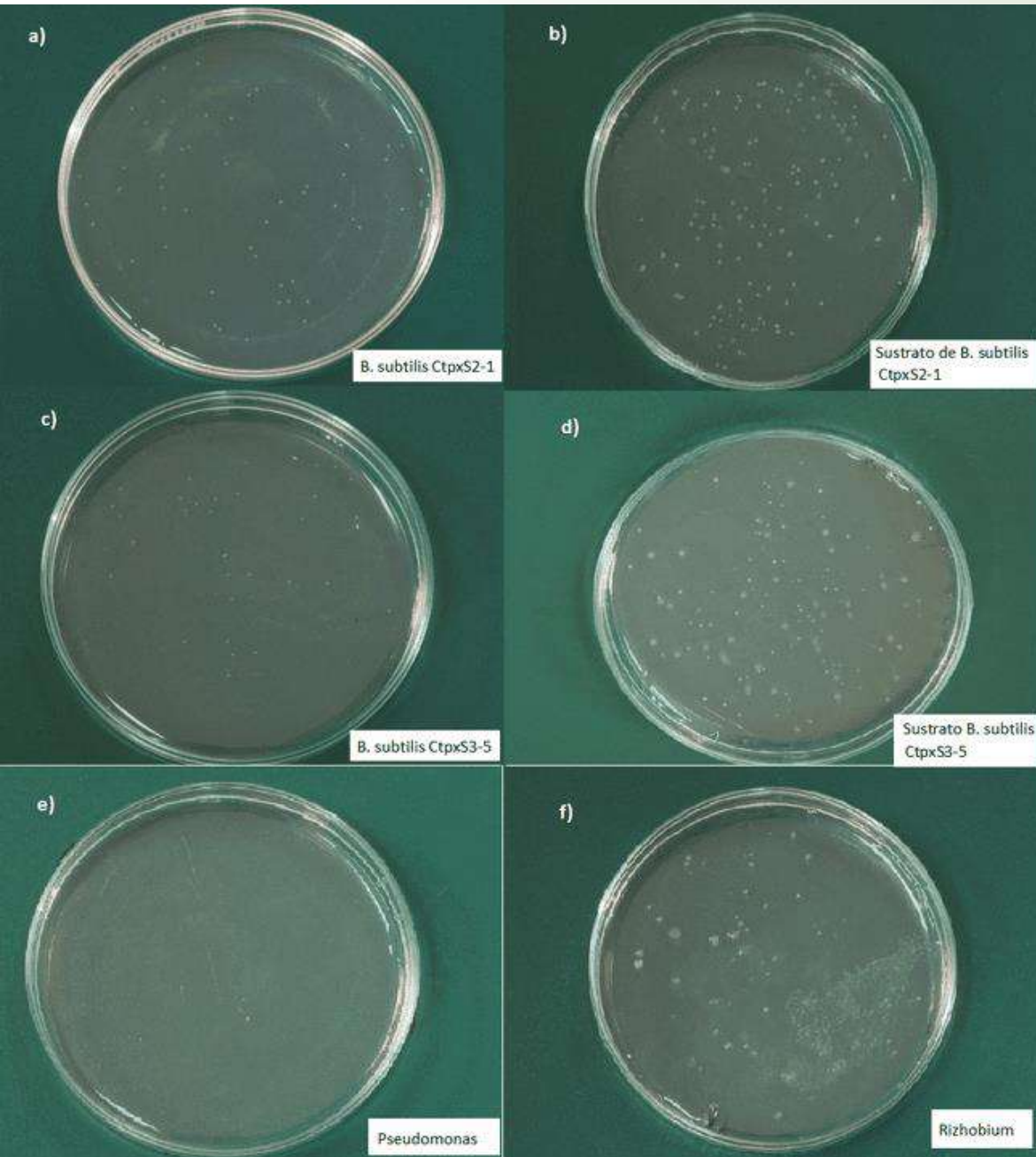


Nota. Inoculaciones de *B. subtilis* cepa CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), *B. subtilis* cepa CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml), T3 testigo (agua destilada). Autoría propia.



Corrales et al. (2017) mencionaron que los efectos benéficos del género *Bacillus* en la rizósfera están relacionados con la producción de auxinas afectando el crecimiento de raíces laterales y permitiendo el aumento de la capacidad de la planta en la absorción de nutrientes, a partir de mecanismos de fijación biológica de nitrógeno (**Ortega et al., 2022**) y la solubilización de fósforo (**González, 2019**)

Inoculaciones en medio Ashby Manitol de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 (1×10^3 UFC/ml).



Bonilla et al. (2021) menciona que las *Pseudomonas sp.* a pesar de ser consideradas como bacteria de vida libre, no presentan crecimiento en medio libre de nitrógeno, coincidiendo con **Sangoquiza et al. (2018)** quienes mencionan que las características principales de *Pseudomonas sp.* son el control de patógenos, producción de sideróforos y como solubilizador de fósforo.

Nota. a) *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^3 UFC/ml) en medio Ashby manitol b) Sustrato inoculado con *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^3 UFC/ml) en medio Ashby manitol c) *B. subtilis* cepa CtpxS3-5 (1×10^3 UFC/ml) en medio Ashby manitol, d) Sustrato inoculado con *B. subtilis* CtpxS3-5 (1×10^3 UFC/ml) en medio Ashby manitol, e) *Pseudomonas sp.* 1×10^3 UFC/ml) en medio Ashby manitol f) *Rhizobium* 1×10^3 UFC/ml) en medio Ashby manitol. Autoría propia

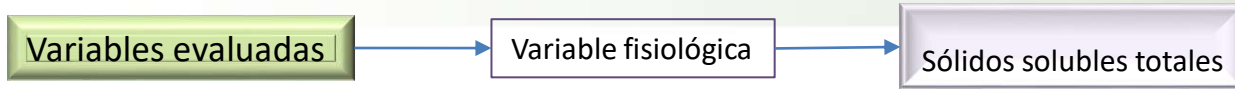


Tabla 3

Promedio \pm desviación estándar del contenido de sólidos solubles totales (SST), en hojas frescas de chocho al final de la fase experimental.

Tratamiento	SST (mg/ g)		
Ctpx3-5	5,25 \pm 1,19	A	
Ctpx2-1	3,50 \pm 0,91	A	B
Testigo	2,88 \pm 0,75		B

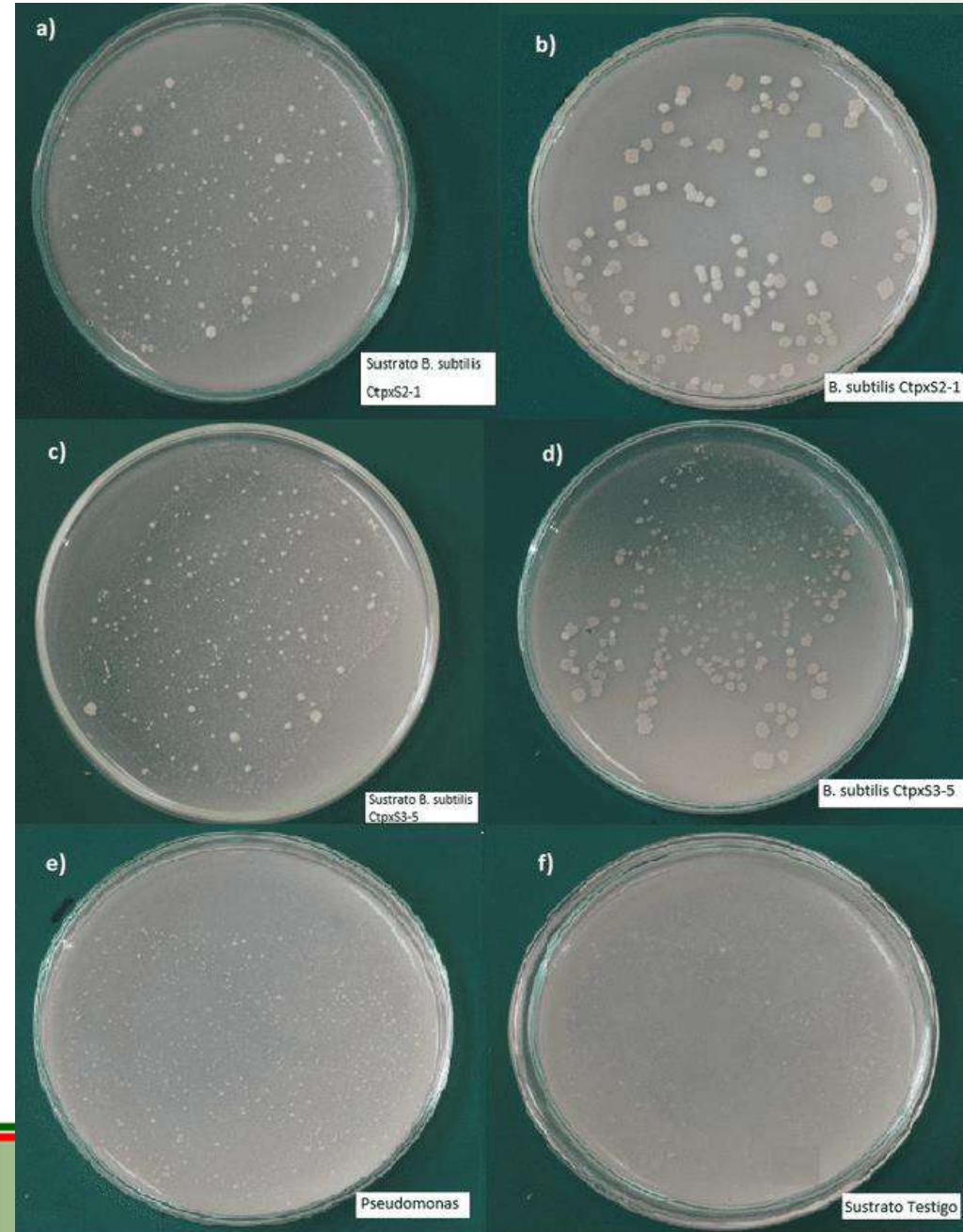
Nota. Medias en la misma columna con letra diferente difieren estadísticamente (Tukey, $\alpha > 0,05$)

Bonilla et al., (2021) quienes mencionan que *Bacillus* está conformado por dos componentes proteicos (b-proteínas y a-proteínas) sensibles al oxígeno, que regulan la enzima nitrogenasa permitiendo la disponibilidad de nitrógeno en las plantas, quienes sugieren realizar el análisis proteico y sólidos solubles totales para verificar el proceso de fijación de N₂ de las rizobacterias.

Cantidad de carbohidratos solubles y compuestos nitrogenados presentes por gramo de material vegetal fresco

Figura 21

Inoculaciones de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en medio Pikovskaya, dilución 10^{-3}



Variables evaluadas

Variable fisiológica

Solubilización de fosfatos

Mejía et al. (2022), quienes mediante inoculaciones de *Bacillus spp.*, y *B. cereus* en plántulas de chile habanero (*C. chinense Jacq.*), evidenciaron la capacidad solubilizadora de fósforo y producción de auxinas mediante aislados en medio Pikovskaya que fueron considerandos positivos debido a la formación de halos de color amarillo en el medio de cultivo que contenía azul de bromofenol como indicador.

Nota. a) Sustrato inoculado con *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^3 UFC/ml) en medio Pikovskaya, b) *B. subtilis* CtpxS2-1 (1×10^3 UFC/ml) en medio Pikovskaya, c) Sustrato inoculado con *B. subtilis* CtpxS3-5 (1×10^3 UFC/ml) en medio Pikovskaya d) *B. subtilis* cepa CtpxS3-5 (1×10^3 UFC/ml) en medio Pikovskaya, e) *Pseudomonas* (1×10^3 UFC/ml) en medio Pikovskaya f) Sustrato Testigo (1×10^3 UFC/ml) en medio Pikovskaya. Autoría propia

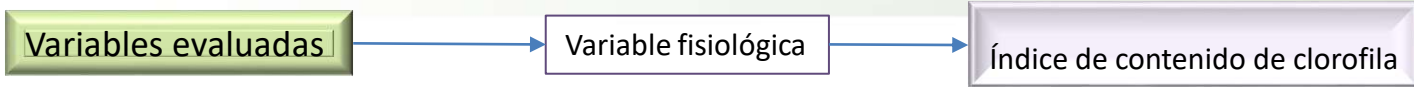


Figura 22

Efecto de inoculaciones periódicas de *B. subtilis* cepa Ctpx2-1, Ctpx3-5 y testigo en hojas de *L. mutabilis*

Tratamiento	Tiempo				Unidades CCI
	30	45	60	75	
T1R1					0
T1R2					0--14
T1R3					14--17
T1R4					17--20
T2R1					20--23
T2R2					23--26
T2R3					26--29
T2R4					29--32
T3R1					32--35
T3R2					35--38
T3R3					38--41
T3R4					41--44

Nota. T1 con cuatro repeticiones: *B. subtilis* cepa CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), T2 con cuatro repeticiones (*B. subtilis* cepa CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml), T3 con cuatro repeticiones (agua destilada). Autoría propia.

Alamilla *et al.*, (2020) en plantas de acelga, *B. subtilis* ($0.92 \text{ mg/ml} \pm 0.25$) y vermicomposta ($0.92 \text{ mg/ml} \pm 0.23$) presentaron un aumento en la promoción de crecimiento, concentraciones de clorofila y carotenos

Callejas *et al.* (2013) a partir de los dispositivos SPAD-502 (650 nm rojo y 940 nm infrarrojo) y CCM-200 (665 nm rojo y 940 nm infrarrojo) midieron el contenido de clorofila en hojas de *V. vinifera* var. Thompson Seedless y Red Globe, obteniendo mayor concentración de clorofila y tasas altas de eficiencia fotosintética en el tercio medio en hojas más cercanas al racimo durante periodos de brotación y floración, debido a la alta movilidad que posee el nitrógeno en el tercio medio de las plantas, permitiendo la acumulación de clorofila y nitrógeno en las hojas, a su vez destacaron la importancia de la elección del estado fenológico y la ubicación de la toma de datos con estos instrumentos para obtener datos confiables

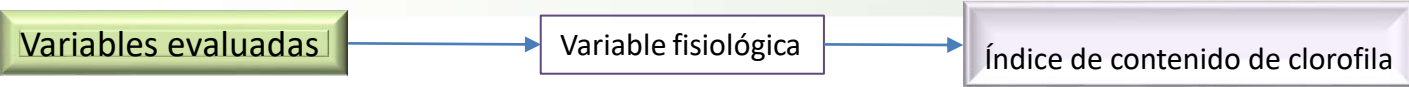
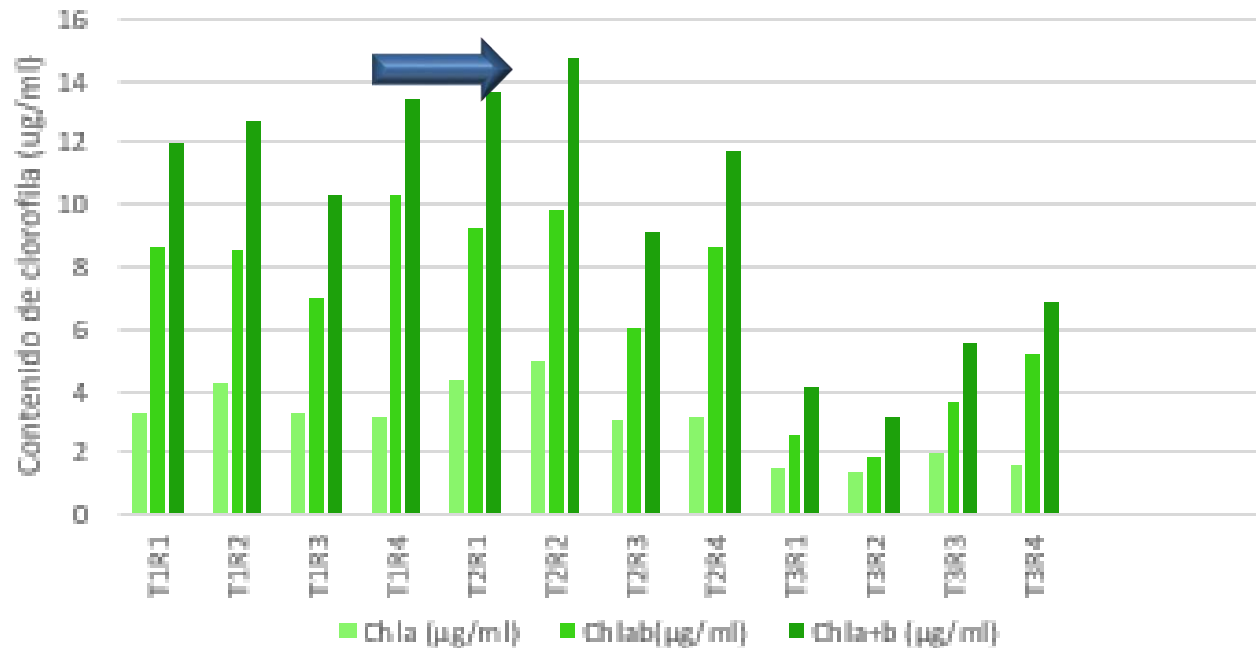


Figura 23

Efecto de inoculaciones periódicas de dos cepas de *B. subtilis* en clorofila a (Chla), clorofila b (Chlb) y clorofila total (Chla+b) en hojas de *L. mutabilis*



Acurio et al., (2020) donde se inocularon bacterias promotoras de crecimiento de *Bacillus sp.* a plántulas de *S. lycopersicum* evidenciando el aumento de la actividad fotosintética al doble frente a los controles, permitiendo que los nutrientes estén a disposición para la planta, evitando procesos de estrés.

Nota. T1 con cuatro repeticiones: *B. subtilis* cepa CtpxS2-1 (1×10^6 UFC/ml), T2 con cuatro repeticiones: *B. subtilis* cepa CtpxS3-5 (1×10^6 UFC/ml), T3 con cuatro repeticiones: testigo (agua destilada). Autoría propia

Conclusiones

- ❑ Las inoculaciones periódicas de *Bacillus Subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 incrementaron las nitrogenasas, fitasas, y crecimiento del chocho bajo invernadero.
- ❑ El efecto de inoculaciones periódicas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre la altura y área de las plantas de chocho, la cepa CtpxS3-5 presentó mayor altura ($R^2=0,65$) y correlaciones significativas ($R^2=0,84$) entre el área y el volumen de las raíces de las plantas obteniendo mayor formación de raíces secundarias.
- ❑ De acuerdo a la dinámica poblacional de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 presentes en la rizósfera del suelo del chocho, la cepa Ctpx2-1 tuvo mayor número de Unidades Formadoras de Colonias por cada gramo de rizósfera recolectado (UFC/g), logrando estabilidad alrededor de 5,82 log10 (UFC/g) después de cada aplicación a lo largo de tres meses de evaluación.
- ❑ Con aplicaciones periódicas *B. subtilis* CtpxS3-5 se obtuvo los mejores resultados en cuanto a la fijación de nitrógeno (8842,05 mg/g); índice de clorofila (26 a 44 unidades de CCI); sólidos solubles totales (5,25 mg/g); solubilización de fósforo evidenciando cambio positivo al desarrollar un halo transparente alrededor de las colonias; y mayores concentraciones de AIA (21,5 mg/ml) en las raíces.

Recomendaciones

- Con la finalidad de aumentar la promoción de crecimiento y mejorar la disponibilidad de fitasas y nitrogenadas en las plantas se recomienda el uso de *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5.
- Realizar investigaciones complementarias para *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5 con la finalidad de mejorar la capacidad de crecimiento y comportamiento con respecto a las condiciones fisiológicas, agronómicas y ambientales.
- Realizar aplicaciones periódicas con *B. subtilis* Ctpx2-1 y Ctpx3-5 en periodos de tiempo más corto, con el fin de aumentar las unidades formadoras de colonia en la rizósfera y mejorar la calidad y productividad de las plantas.
- Es importante efectuar control de calidad del producto para lograr mejores resultados en los beneficios de *Bacillus* sobre las plantas.
- En las inoculaciones realizadas con el medio Pikovskaya es recomendable añadir azul de bromofenol, para hacer más notoria la presencia de halos de color amarillo en el medio de cultivo como respuesta positiva a la solubilización de fósforo de las bacterias.

¡Gracias!



Laboratorio de Fitopatología y Control
biológico de la Carrera Agropecuaria IASA I