

**Efecto de dos cepas de (*Bacillus subtilis*) en la promoción de crecimiento, contenido de auxinas, y acción enzimática en plantas de maíz (*Zea mays*) en etapa juvenil**

Ayala Colimba Ana Lucia

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Ing. Falconí Saá, César Eduardo, Ph. D.

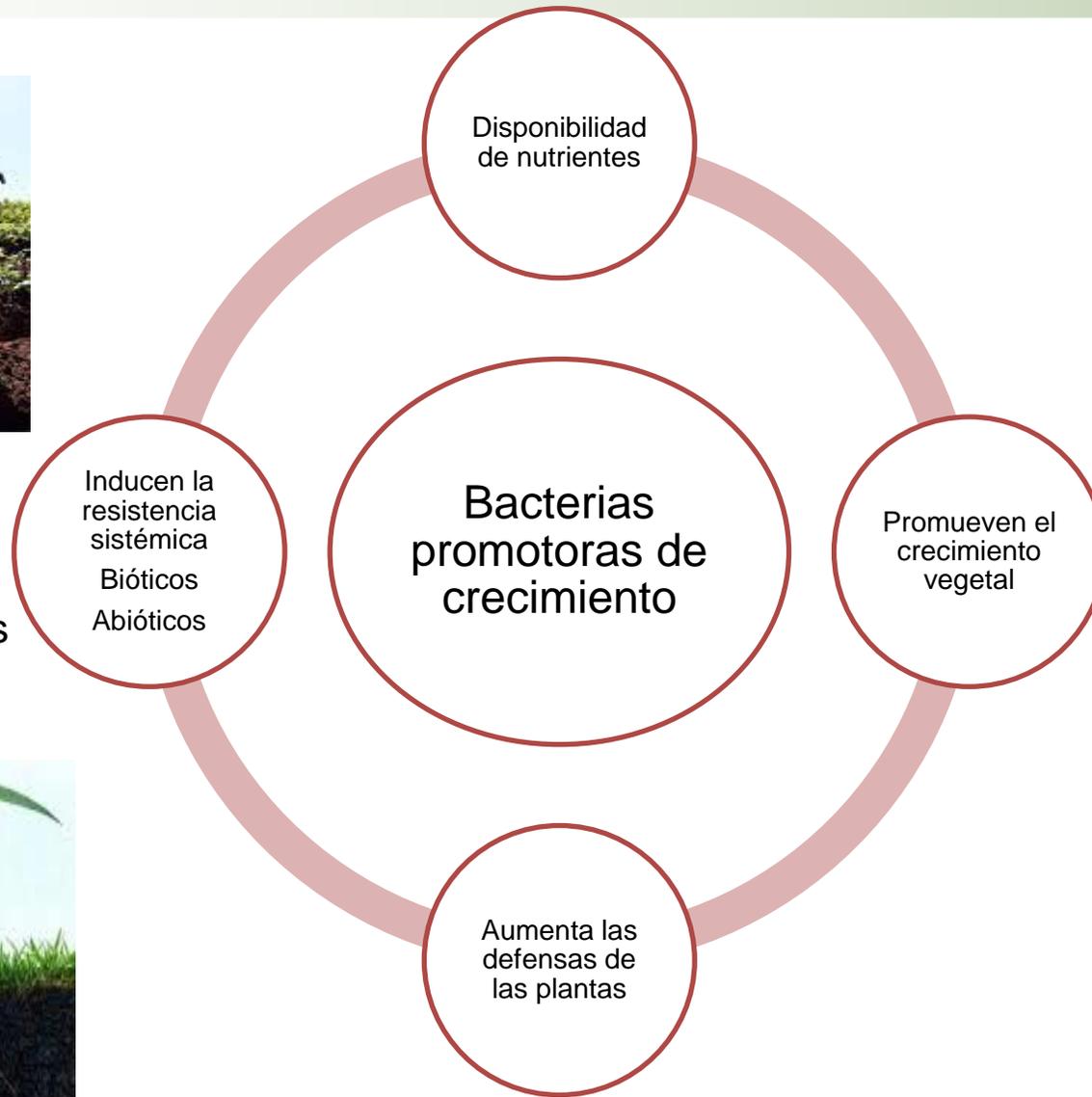
17 de agosto del 2023



# INTRODUCCIÓN



- Microorganismos
- Herramienta fundamental
- Crecimiento de las plantas
- Productos agrícolas.



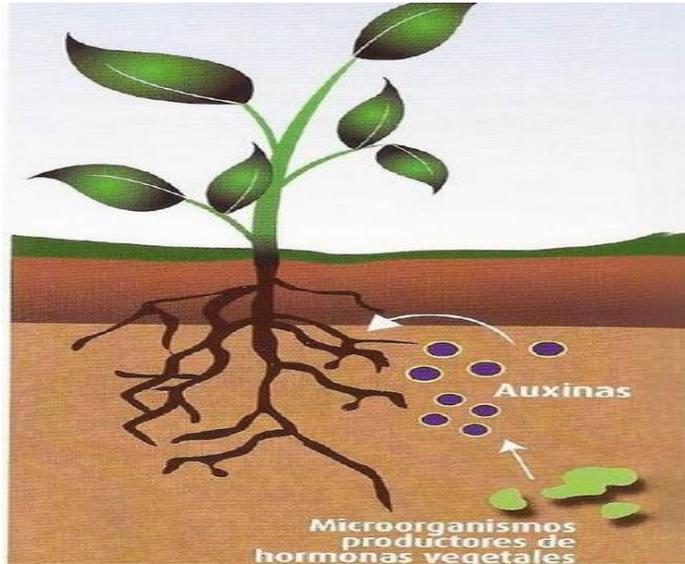
↓

Inoculantes a base de rizóbacterias son una alternativa biotecnológica en la agricultura que puede reducir los costos de producción.



# JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que las rizóbacterias son capaces de producir metabolitos de importancia agrícola.



Entre los que destacan el ácido salicílico, los sideróforos y las fitohormonas; de estos últimos, el ácido indolacético.



De acuerdo con estudios realizados por (Yáñez y Falconí, 2018) *B. subtilis* produce lipopéptidos antifúngicos que son factores clave para mejorar la salud de las plantas mediante el antagonismo directo de los patógenos a través de la colonización eficaz de las raíces hospedantes.

Demostrando la capacidad antifúngica de *B.subtilis* contra patógenos como *Colletotrichum acutatum* en chocho y a su vez el efecto de la bacteria para promover la síntesis de catalasa, peroxidasa y 17 superóxido dismutasa,



# OBJETIVOS

## *Objetivo General*

Determinar el efecto de células de *B.subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la promoción de crecimiento (altura, índice de clorofila, biomasa), producción de auxinas (ácido indol acético), y acción enzimática (fitasas y nitrogenasas) en plantas de maíz (*Zea Mays*) en un periodo de 3 meses.

## *Objetivos Específicos*

1. Cuantificar la promoción de crecimiento en plantas de maíz por efecto de *B. subtilis*.
2. Determinar el contenido de auxinas en plantas de maíz inoculadas con *B.subtilis*.
3. Establecer la acción enzimática de plantas de maíz por efecto de *B.subtilis*.
4. Cuantificar la dinámica poblacional de *B. subtilis* presente en la rizósfera del cultivo cada 15 días durante 3 meses.



# HIPÓTESIS

**H0:** Las células de *B.subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 no promueven el crecimiento, la producción de auxinas y la acción enzimática en plantas de maíz (*Zea Mays*).

**H1:** Las células de *B.subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 promueven el crecimiento, la producción de auxinas y la acción enzimática en plantas de maíz (*Zea Mays*).

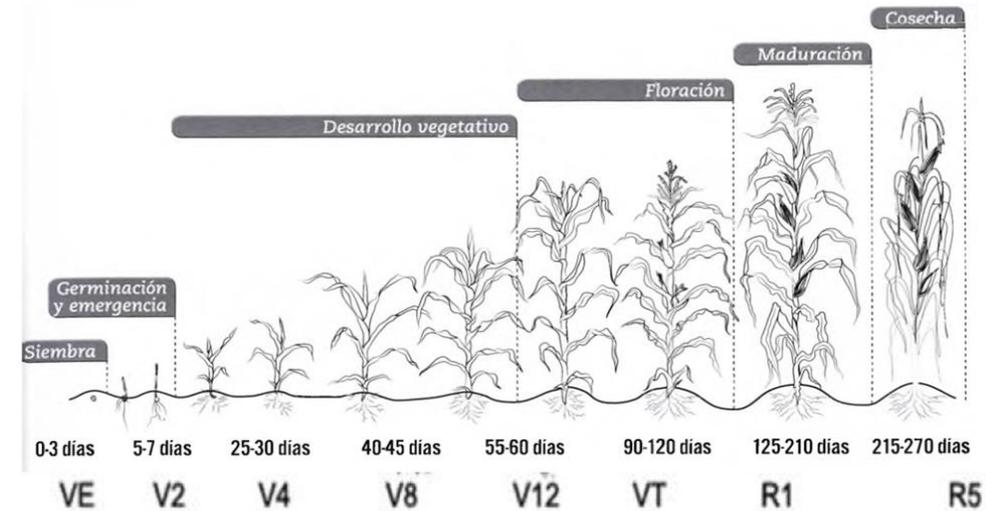
# REVISIÓN DE LITERATURA

El maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia de las Poaceas, es una planta de cultivo anual, monoica con una flor femenina (elote, mazorca, choclo, espiga) y una masculina (espiguilla) con las cuales se produce una polinización cruzada (Morales, 2015).

## Variedad INIAP 101



**Tipo:** precoz  
**Grano:** grande, harinoso y blanco  
**Altura de la planta:** 195cm  
**Cosecha en choclo:** 120 días



**Cosecha en seco:** 205 días  
**Rendimiento:** 240 sacos/Ha choclos  
**Rendimiento seco:** 102 qq/Ha  
**Altitud:** de 2400 a 3000m.s.n.m



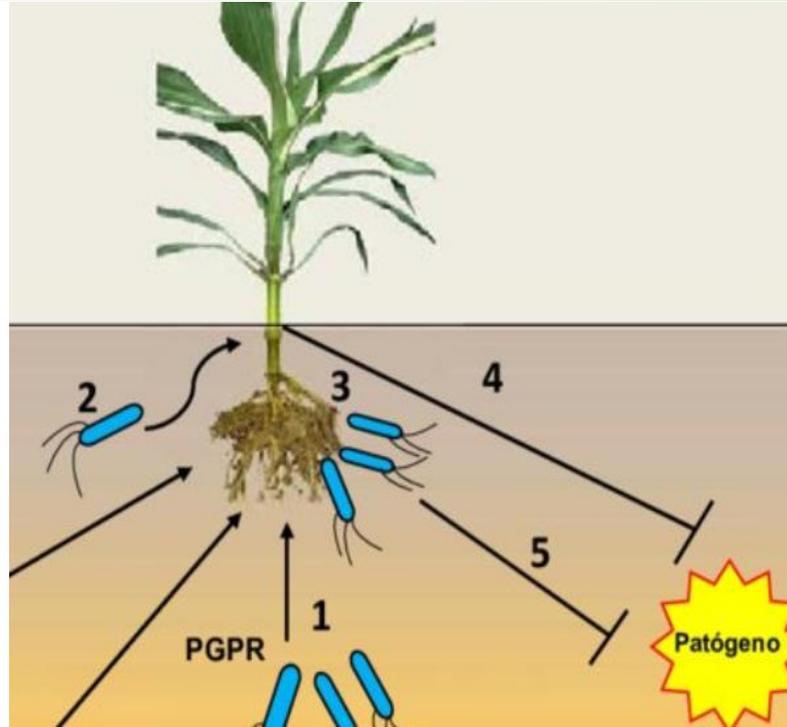
Nota. Adaptado de (INIAP, 2016)

# REVISIÓN DE LITERATURA

*B. Subtilis* posee forma bacilar cuando se encuentra en esporulación se presenta en forma ovalada (Ongena y Jacques, 2008).



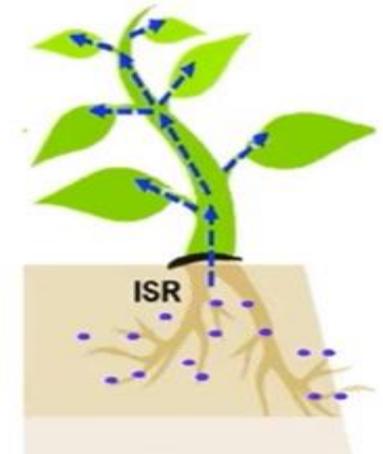
- Rápida colonización de sustratos
- Actividad antagonista frente a hongos patógenos



En el caso de *B. subtilis*, se ha demostrado la producción de fitohormonas que activan respuestas moleculares, bioquímicas, fisiológicas y morfológicas en la rizósfera de plantas (Falconí y Yáñez, 2022; Yáñez *et al.*, 2023).

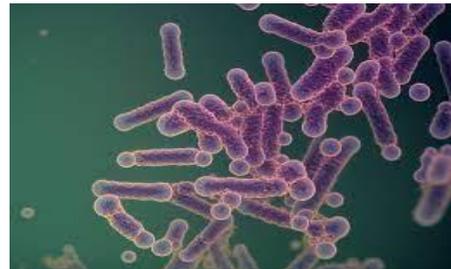
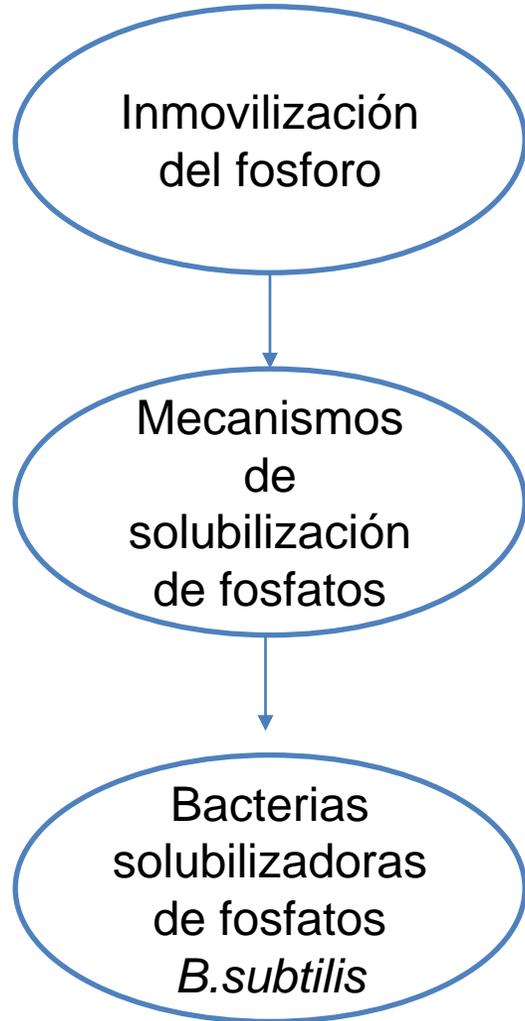
## Modo de acción

- Producción de lipopéptidos
- Producción de enzimas líticas
- Producción de sideróforos
- Colonización y competencia
- Inducción y resistencia



# REVISIÓN DE LITERATURA

## Solubilización de Fosfato



## Fijación de Nitrógeno

La fijación biológica del nitrógeno es un proceso microbiano en el que el nitrógeno atmosférico se reduce a amonio y se incorpora a la biomasa. Este proceso se lleva a cabo por la enzima nitrogenasa, presente en todos los microorganismos fijadores del nitrógeno.



# METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN



El experimento se llevó a cabo en la provincia de Pichincha, en el canto Rumiñahui parroquia de Sangolquí, barrio San Fernando, en el campus de la Carrera de Ingeniería Agropecuarias de la ESPE IASA I en la Hacienda “El Prado” dentro del invernadero de Horticultura

## Fase de Laboratorio

Se realizó en los laboratorios de Fitopatología y Control Biológico de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I, Hacienda “El Prado”.



# DISEÑO EXPERIMENTAL

El ensayo se estableció con un diseño completamente al azar (DCA) se utilizó un método de aplicación (células de *B. Subtilis*) con tres repeticiones y un testigo. Se emplearon 36 unidades experimentales como indica el croquis experimental.

TOR2	T2R2	T2R1	TOR3	T1R1	T2R3	T1R2	TOR1	T1R3
								
								
								
								

## Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Repeticiones	Plantas	Descripción
T0	R1	4	12 plantas inoculadas con agua destilada
	R2	4	
	R3	4	
T1	R1	4	12 plantas inoculadas con células de <i>B. subtilis</i> Cptx S2-1
	R2	4	
	R3	4	
T2	R1	4	12 plantas inoculadas con células de <i>B. subtilis</i> Cptx S3-5
	R2	4	
	R3	4	

Nota. Autoría Propia



# FASE DE CAMPO



Ubicación del experimento



Varietal INIAP 101



Germinación de semillas



Transplante



Inoculación de *B. Subtilis*



Medición de clorofila



Medición de altura



Sistema de riego por goteo

# FASE DE LABORATORIO

## Procedimiento para la dinámica poblacional



Inoculación de *B.subtilis*



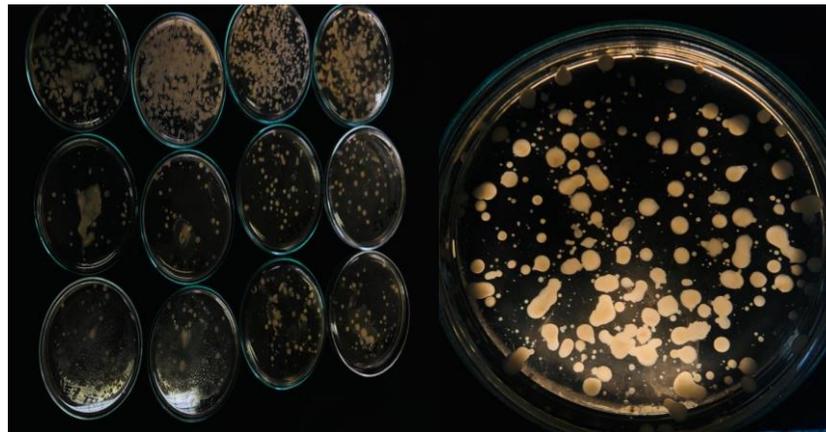
Toma de muestra de la rizósfera



Muestras sometidas a baño maría.



(Yáñez y Falconí, 2023)



Crecimiento de *B.subtilis*



Siembra en cajas Petri

# FASE DE LABORATORIO

## Ácido Indolacético



## % Materia Seca

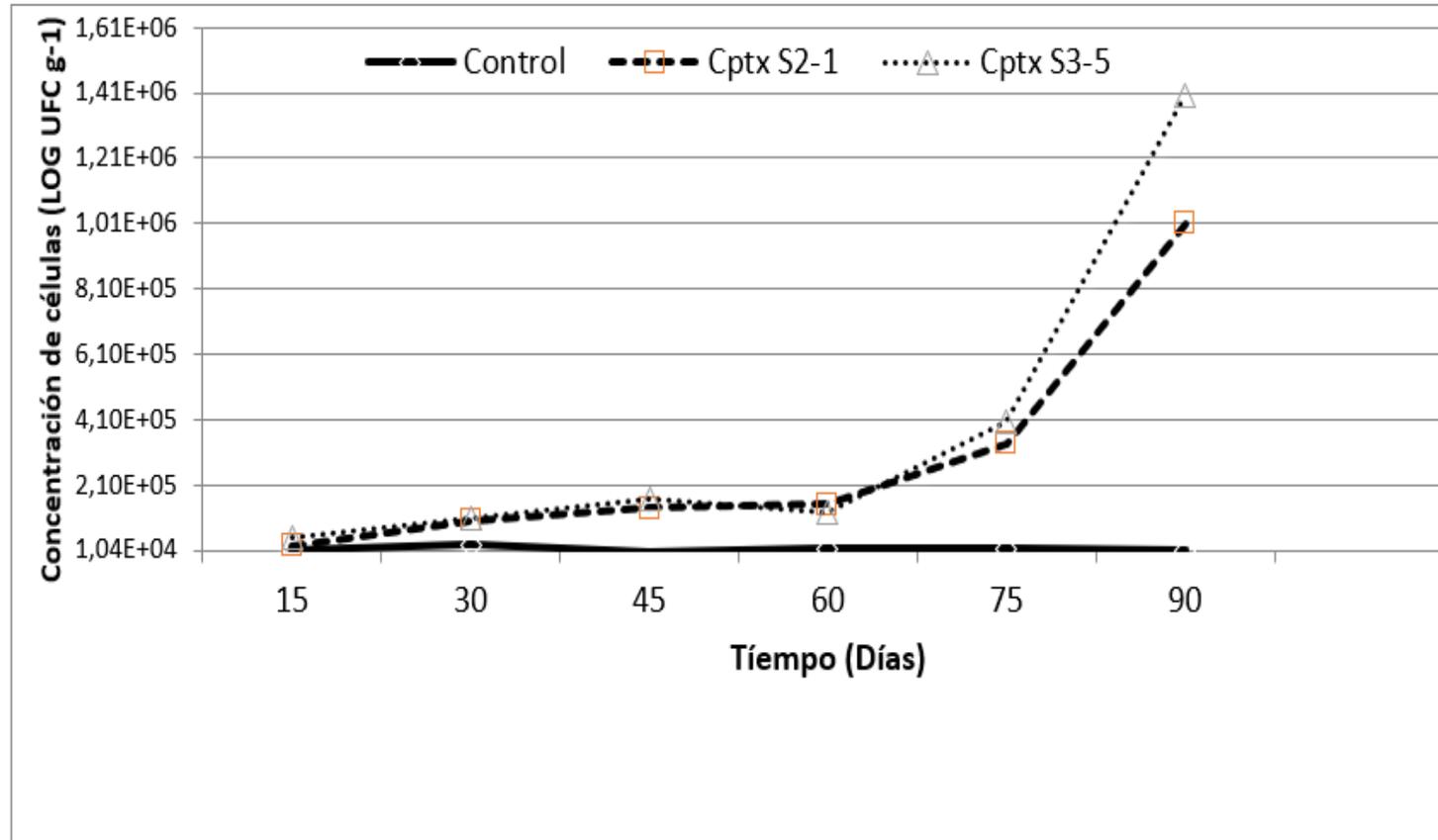


$$\text{Materia Seca} = \frac{\text{Peso Seco}}{\text{Peso Fresco}} * 100$$

**Nota:** A) Muestras de raíz ; B) Pesaje de 1gr de muestra y se colocó en tubos de ensayo rotulados, se añadió 5 ml de acetona (80%); C) Centrifugación muestras a 500rpm (15 min), D) Se colocó 1ml sobrenadante y se añadió 3ml de reactivo de Salkowski (30min), se colocó 1ml en cada celda para leer en el espectrofotómetro (549nm).

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dinámica Poblacional de células de *B. Subtilis* Cptx S2-1, Cptx S3-5 y control en la rizosfera de las plantas de maíz durante 90 días.



El grafico nos muestra que el tratamiento de células de la cepa *B. subtilis* Cptx S3-5 tuvo mayor número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro 1,40E+06 UFC/ml y la cepa *B. subtilis* Cptx S2-1 con 1,01E+06 UFC/ml a diferencia del control que durante los 90 días se mantuvo constante con un valor de 1,04E+04 UFC/ml

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

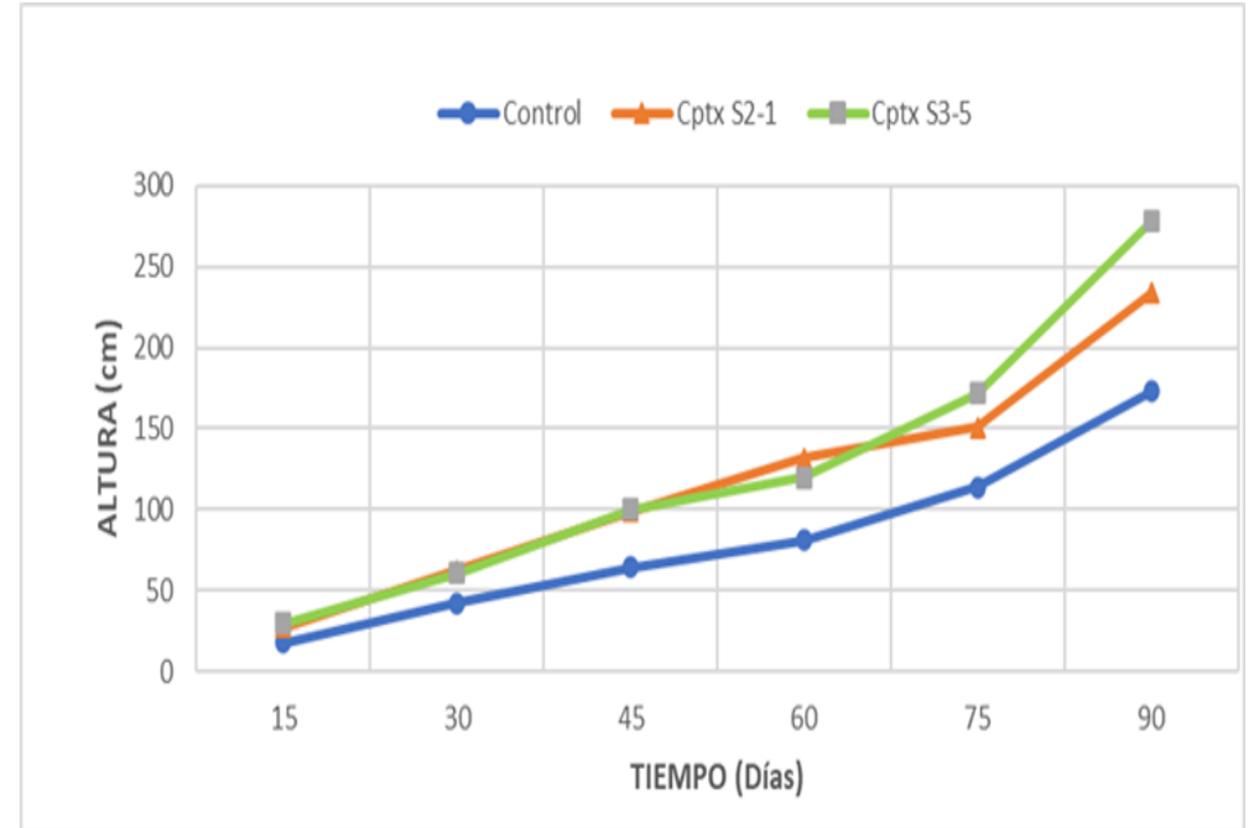
Altura de plantas de maíz (*Zea mays*) variedad INIAP 101 por efecto de células de *B. subtilis* a lo largo de 90 días.

Tratamientos	Altura (cm)	
Control	81,93±51,32	A
<i>B. subtilis</i> Cptx S2-1	117,48±67,54	B
<i>B. subtilis</i> Cptx S3-5	126,71±82,49	B

Nota. Media ± desviación estándar, medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

La cepa de *B. subtilis* Cptx S3-5 presentó mayor altura que los demás tratamientos seguido de la cepa Cptx S2-1. Los datos obtenidos coinciden con (Paredes, 2021) quienes mencionan que la altura de las plantas de maíz (*Zea mays*) de los tratamientos aplicados con *B. subtilis* es mayor frente al control.

## Altura



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Índice de contenido de clorofila de plantas de maíz por efecto de células de *B. subtilis* a lo largo de 90 días.

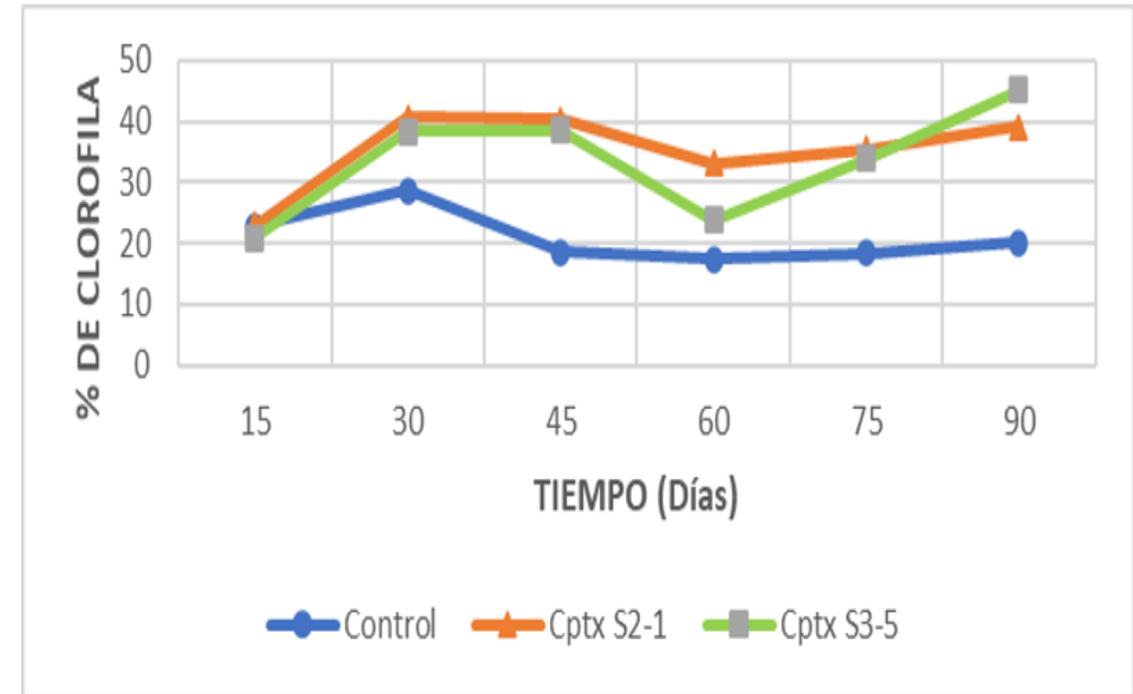
Cepa	Índice de Clorofila	
<i>B. subtilis</i> Cptx S2-1	35,31±9,39	A
<i>B. subtilis</i> Cptx S3-5	33,46±10,29	A
Control	21,01±6,56	B

*Nota.* Media ± desviación estándar, medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

(Yáñez y Falconí, 2021) en plantas de chocho inoculadas con *B.Subtilis* cepa *Ctpx S2-1* obtuvieron mayor contenido de clorofila en dos variedades de chocho (I-451 *Guranguito* y F3 (ECU 2658 x ECU 8415) con relación al testigo.

(Rodríguez-Hernández *et al.*, (2020) mencionan que la adición de bacterias fijadoras de nitrógeno como es el caso de *B.Subtilis* aumenta relativamente el contenido de clorofila en las plantas de maíz mejorando la capacidad fotosintética.

## Índice de Clorofila



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

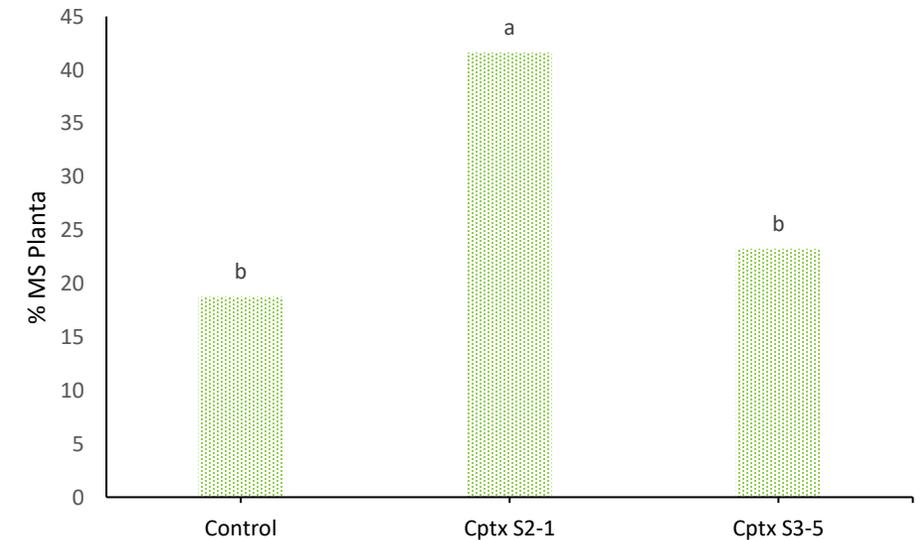
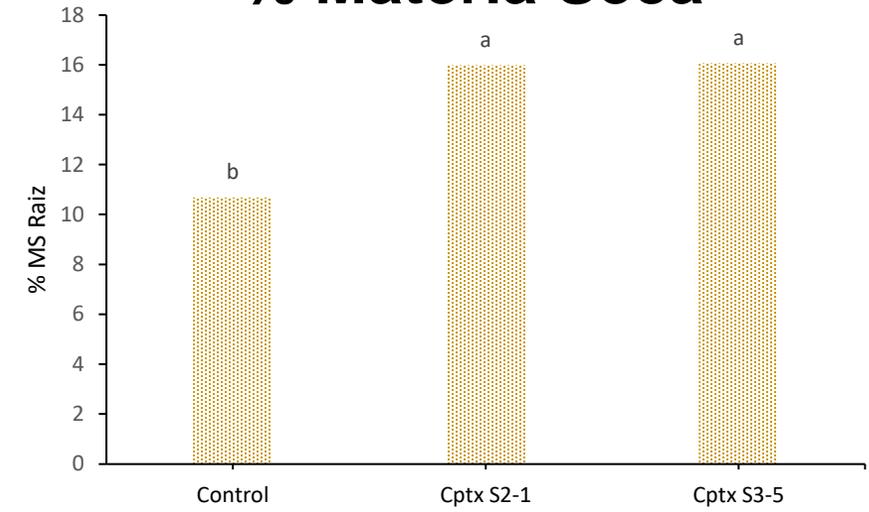
%Materia seca de plantas de maíz variedad INIAP 101 por efecto de la inoculación de células de *B. Subtilis* a lo largo de 90 días.

Tratamiento	% MS Planta	% MS Raíz	% MS Total
Control	18,76±2,15 <b>b</b>	10,68±2,47 <b>b</b>	18,26±1,73 <b>b</b>
Cptx S2-1	41,64±8,63 <b>a</b>	15,99±1,69 <b>a</b>	38,49±7,58 <b>a</b>
Cptx S3-5	23,27±3,32 <b>b</b>	16,06±1,77 <b>a</b>	20,87±2,91 <b>b</b>

Nota: Media ± desviación estándar de % de materia seca de plantas de maíz INIAP 101.

(Chagas *et al.*, 2018) en su estudio muestra que para %materia seca de raíz y planta (MSR) hubo diferencias significativas, siendo superior los tratamientos con *Bacillus* inoculados por separado.

## % Materia Seca



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

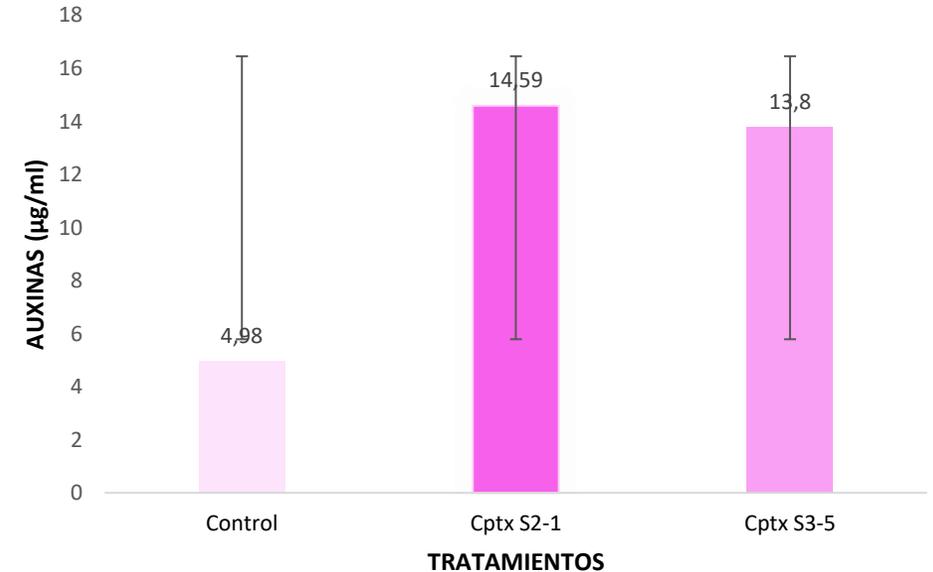
Acido Indolacético por efecto de la inoculación de células de *B. Subtilis* a lo largo de 90 días en planta de maíz variedad INIAP 101.

Cepa	Auxinas ( $\mu\text{g/ml}$ )	
<i>B.subtilis</i> Cptx S2-1	14,59 $\pm$ 3,87	A
<i>B.subtilis</i> Cptx S3-5	13,80 $\pm$ 3,67	A
Control	4,98 $\pm$ 1,25	B

*Nota.* Media  $\pm$  desviación estándar; medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

(Sánchez, 2020) donde todos los aislados de *B. subtilis* utilizados fueron capaces de producir cantidades de AIA (Bs2, Bs4, Bs5, Bs6 y Bs10) donde la producción de AIA varió de 0.35 a 2.46  $\mu\text{g/ ml}$  demostrando así que *B. subtilis* proporciona una mayor producción de AIA.

## Ácido Indolacético

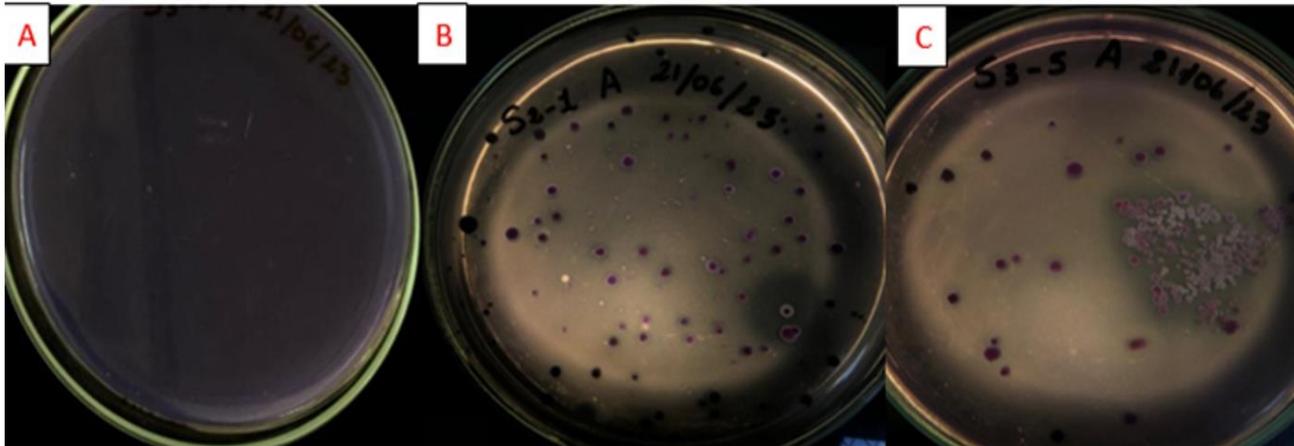


	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Control			
Control			
<i>B.Subtilis</i> Cptx S2-1			
<i>B.Subtilis</i> Cptx S2-1			
<i>B.Subtilis</i> Cptx S3-5			
<i>B.Subtilis</i> Cptx S3-5			

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Solubilización de Fósforo

Crecimiento de *B. subtilis* Cepa Cptx S2-1 y Cptx S3-5 en medio Pikovskaya +Azul de bromofenol.



*Nota:* A) Placa control no existe crecimiento de *B. Subtilis*; B) Crecimiento de *B. Subtilis* cepa Cptx S2-1 halos de color naranja; C) Crecimiento de *B. Subtilis* cepa Cptx S3-5 debido a la solubilización de fosfato mediada por enzimas bacterianas como las fosfatasas

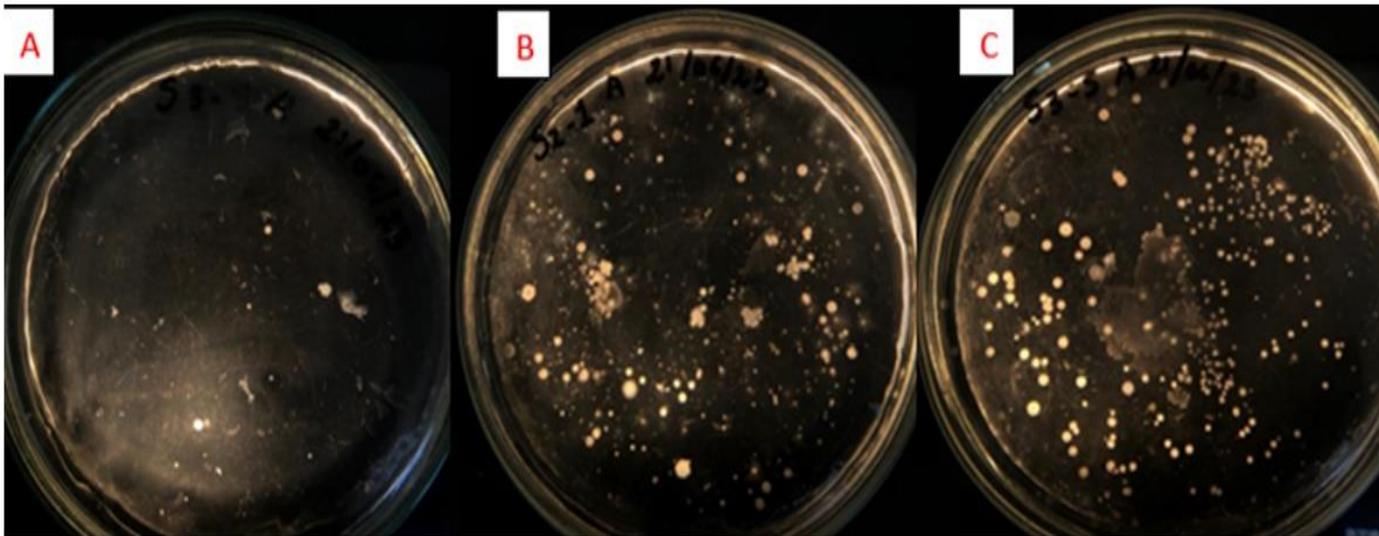
(Bautista et al., (2022) los aislados de *B. Subtilis* presentaron concentraciones de fosfato superiores a los demás aislados y al control, donde la concentración de fosfato solubilizado aumentó en la mayoría de los aislados del tercer al sexto día de crecimiento.

(Chagas et al., 2022) mencionan que la solubilización del fosfato es a través de la secreción y producción de ácidos orgánicos. Por lo que se demuestra que las rizobacterias son capaces de solubilizar el fósforo mediante acidificación, quelación o mediante procesos enzimáticos, donde se identifica a *B. subtilis* capaz de solubilizar fosfato en medio líquido.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Fijación de Nitrógeno

Crecimiento de células de *B. subtilis* cepas CptxS2-1, Cptx S3-5 y control en medio Ashby Manitol.



*Nota:* A) Placa control no existe crecimiento de *B. subtilis*; B) Crecimiento de UFC *B.subtilis* cepa S2-1 ;C) Crecimiento de UFC *B.subtilis* cepa S3-5

(Gallegos & González, 2020) demostraron que en los once aislados hubo crecimiento de *B.subtilis* utilizando el medio NFb, demostrando que los microorganismos que crecen en este medio reemplazan la metabolización del nitrógeno por el nitrógeno atmosférico que se encierra en el microambiente de la caja de Petri.

(Lemus, 2021) en su estudio de aislados de *B.subtilis* demuestra la capacidad que poseen debido al complejo enzimático de la nitrogenasa para reducir el nitrógeno atmosférico a nitratos o amonio, y aprovecharlo en su metabolismo.

# CONCLUSIONES

- Plantas inoculadas con *B.Subtilis Cptx S3-5* y *Cptx S2-1* presentaron mayor altura durante los 90 días del ensayo, células de *B.Subtilis* tiene acción directa sobre la elongación de plantas de maíz en contraste al control.
- Las plantas de maíz variedad INIAP 101 tratadas con *B.Subtilis cepas Cptx S2-1* y *Cptx S3-5* presentaron diferencias significativas en el contenido de ácido indolacético a diferencia del control.
- El crecimiento de halos por acción enzimática demuestra la presencia de fosfatasas en los exudados de *B.subtilis* adicionalmente se observó el crecimiento de las colonias de forma irregular lo que demuestra la capacidad de fijar nitrógeno.
- *B.Subtilis* presento una progresión lineal de sobrevivencia a través del tiempo, lo que explica la presencia de un mayor contenido de ácido indolacético, mayor altura, mayor índice de clorofila y % materia seca , en plantas tratadas con *B. subtilis* respecto a plantas control, la cepa Cptx S3-5 durante los 90 días demostró ser más eficiente en cuanto adaptabilidad y los demás parámetros agronómicos.

# RECOMENDACIONES

- Continuar con la investigación hasta el periodo de producción y de cosecha por lo que se demostró que en estado vegetativo la aplicación de células de *B. Subtilis* Cptx S2-1 y Cptx S3-5 presentaron resultados favorables para la planta en cuanto a la promoción de crecimiento de plantas de maíz.
- Llevar a cabo más ensayos experimentales con variaciones en la concentración de células de *B. Subtilis* para poder determinar las condiciones óptimas que generan una respuesta positiva en las variables agronómicas de las plantas.
- Enfatizar en las investigaciones el incremento de resistencia de plantas ante estrés ambiental debido a interacciones con bacterias promotoras de crecimiento.

# AGRADECIMIENTOS

