



Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento, producción de auxinas y acción enzimática en plantas de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) en un periodo de 3 meses

Molina Sotalín, Kate Micaela

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 PhD

30 de agosto del 2023

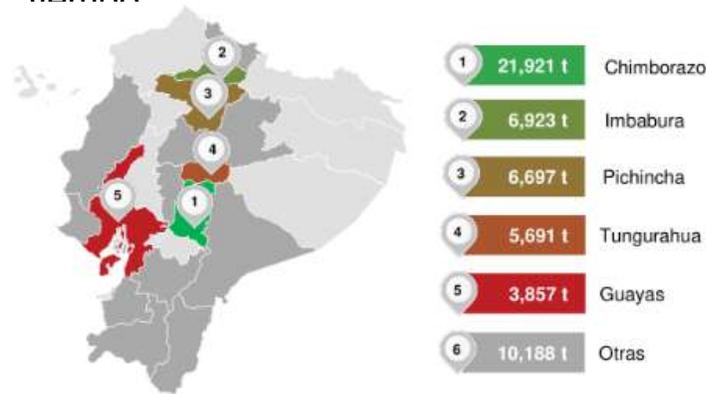


Antecedentes



Tomate (*Solanum lycopersicum*)

Es una de las hortaliza más productivas del mundo, por lo que su demanda ha crecido con el paso del tiempo.

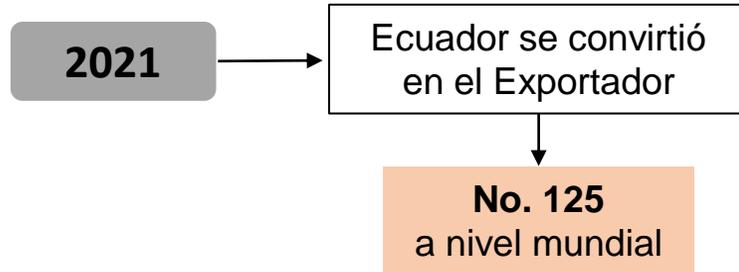


Beneficios

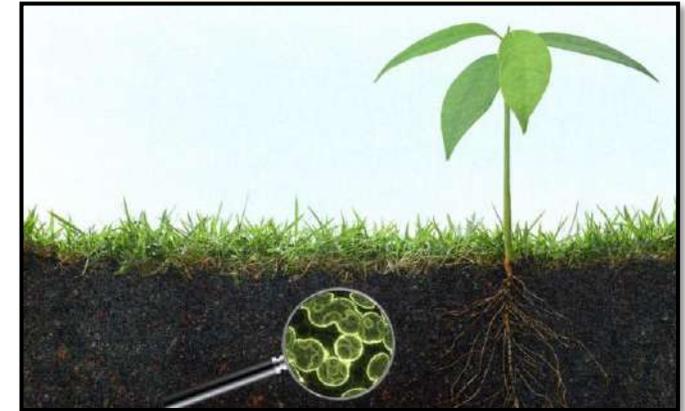
Ricos en fibra, vitamina C, licopeno y beta-caroteno



INEC, ESPAC (2021)



Microorganismos del suelo



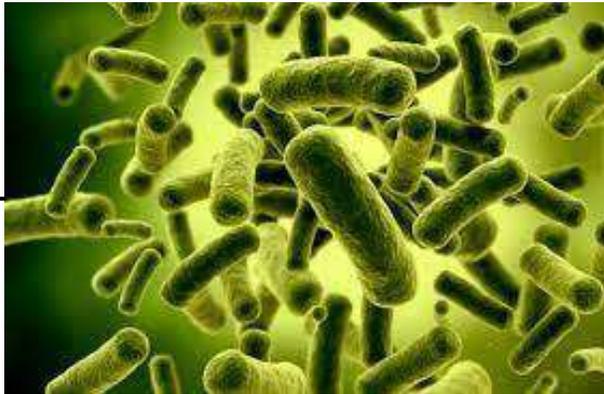
Rizobacteria promotoras de crecimiento vegetal (RPCV)

Bacillus subtilis

Antagonista de enfermedades fúngicas

Promoción de crecimiento vegetal

Justificación



Bacillus subtilis

Rizobacteria promotoras de crecimiento vegetal (RPCV)

Se encuentra en asociación con las plantas dentro la rizosfera

Actúa en la promoción del crecimiento y mejora del estrés biótico de la planta.

Creando un microbioma favorable a través de la colonización de raíces

Yáñez-Mendizábal y Falconí (2021) mencionan que *B. subtilis* tiene la capacidad de promover el crecimiento de las plantas mediante la producción de metabolitos como auxinas, sideróforos, ácidos orgánicos y antibióticos

Tomate Cherry

El empleo de biofertilizantes bacterianos ha sido una de las alternativas sostenibles para aumentar la producción agrícola y minimizar la utilización de fertilizantes y fungicidas, específicamente en el cultivo de tomate Cherry.



Corrales-Ramírez et al. (2017); Hashem et al. (2019)



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 tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) en un periodo.

ESPECÍFICOS

1. Determinar la promoción de crecimiento en plantas de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) por efecto de *B. subtilis* en un periodo de 3 meses.
2. Cuantificar el contenido de auxinas en plantas de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*).
3. Establecer la acción enzimática en plantas de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) por efecto de *Bacillus subtilis* en un periodo de 3 meses.
4. Cuantificar la dinámica poblacional de *B. subtilis* presente en la rizosfera del cultivo cada 15 días durante 3 meses.

HIPÓTESIS

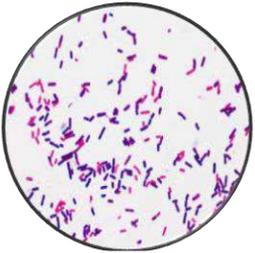
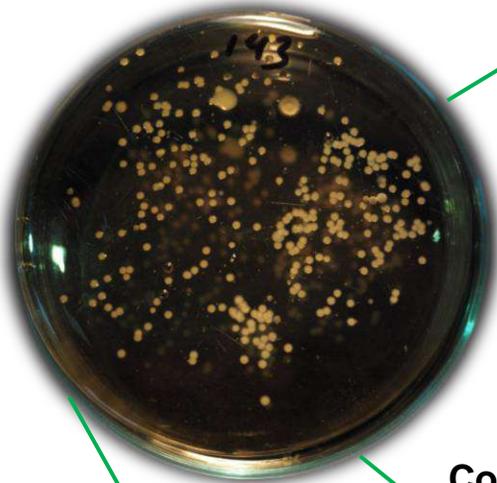
H0: Las células de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 no actúan en la promoción de crecimiento en plantas de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*).

H1: Las células de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 actúan en la promoción de crecimiento en plantas de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*).

Bacillus subtilis

Bacteria Gram (+)

Habita de forma endémica en los suelos



Colonización de la rizósfera

Esta colonización de microorganismos bacterianos a nivel radicular está relacionada con la concentración y composición de los exudados de las raíces

Asimilación de nutrientes

Producción de sustancias capaces de movilizar nutrientes de tipo aminoácido, sideróforos o ácidos orgánicos que liberaran fósforo, hierro y/o aluminio

Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (RPCV)



Corrales-Ramírez et al. (2017); Khan et al. (2016)

Ubicación de la zona de investigación



Hacienda "El Prado" - IASA I

Provincia: Pichincha
Cantón: Rumiñahui
Sector: San Fernando
Latitud: 0°23'27.98" S
Longitud: 78°,24'44" O

Invernadero de Horticultura

- Temperatura media anual de 20,04 °C
- Humedad relativa de 60%

Condiciones laboratorio

Temperatura media anual es de 16,3 °C

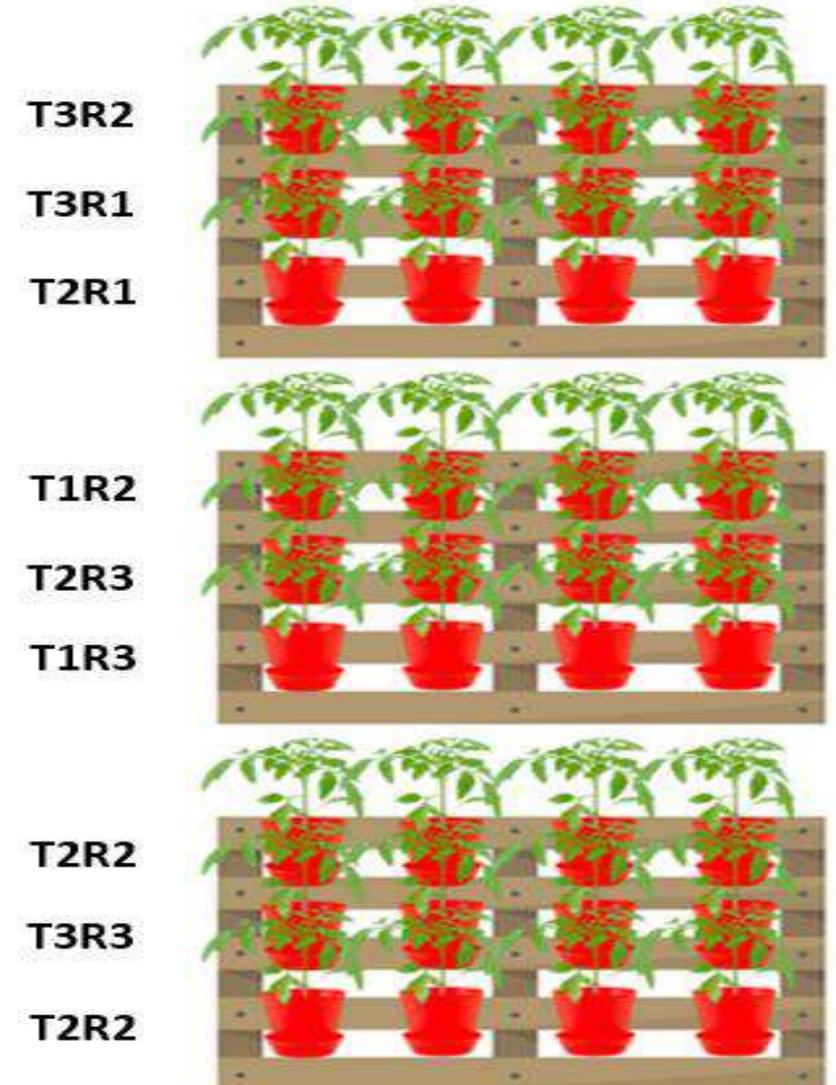
Diseño experimental

Se estableció un Diseño Completamente al Azar con tres tratamientos, cada tratamiento tiene tres repeticiones, en la cual una unidad experimental está compuesta por cuatro macetas como unidad muestral.

Tratamientos

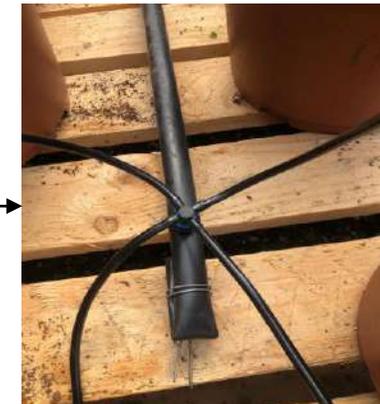
Tratamientos	Características
T1	Bacillus subtilis cepa CtpxS2-1
T2	Bacillus subtilis cepa CtpxS3-5
T3 (Testigo)	Plantas inoculadas con agua destilada

Croquis experimental



Fase de campo

Preparación de sustrato y trasplante



Sistema de riego por goteo

Inoculación de Tratamientos

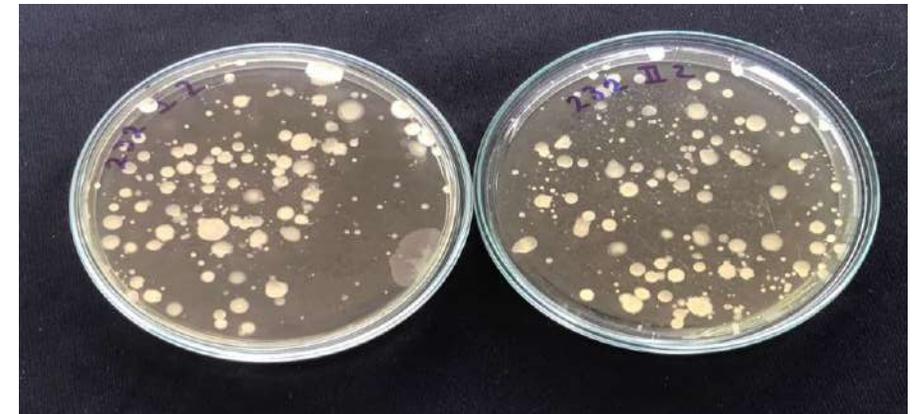
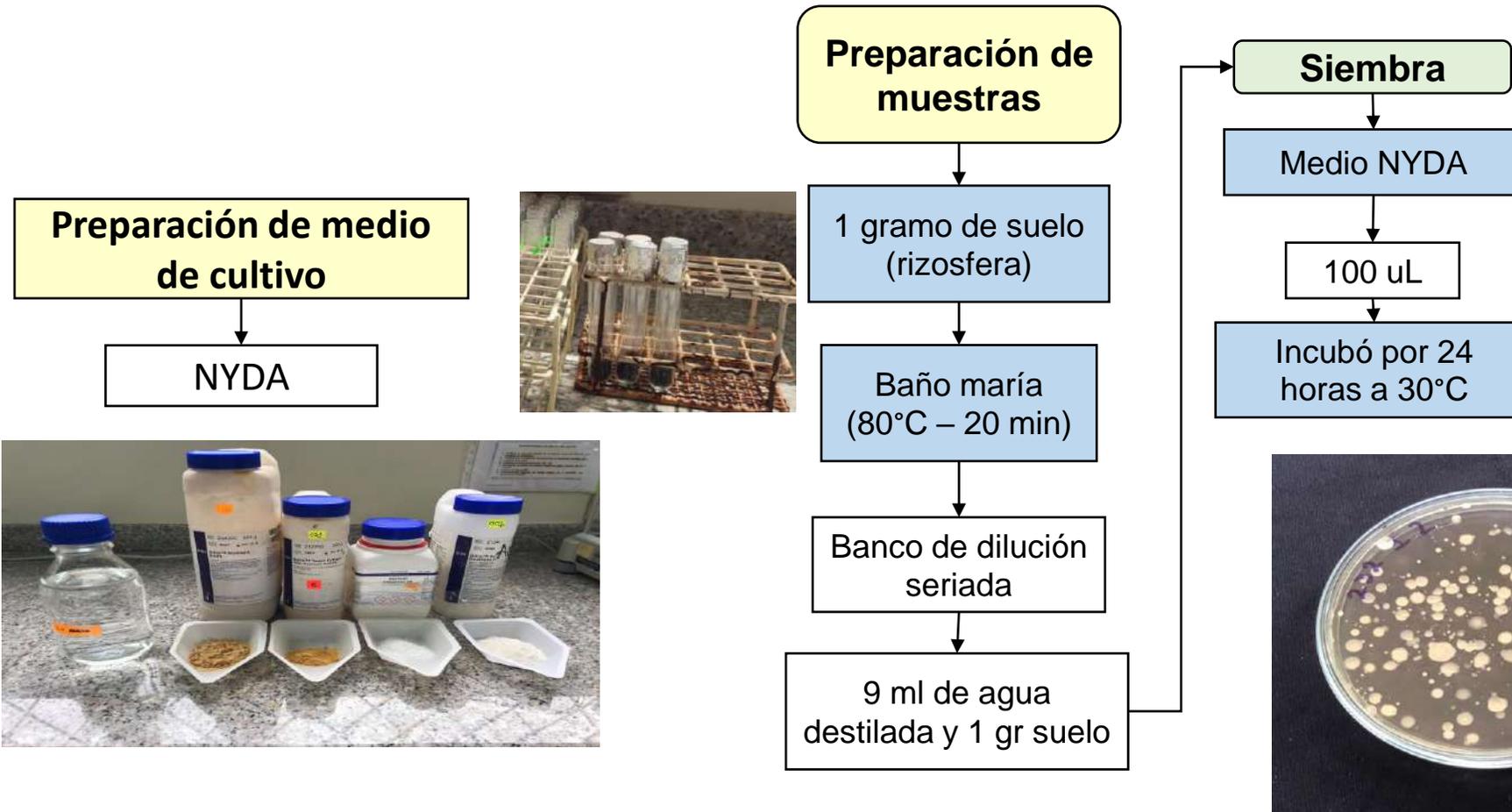


Aplicación directamente en la rizosfera de la planta

50 ml



Dinámica poblacional



Variables a medir

Variables cuantitativas

Altura de la planta



Índice de contenido de clorofila



Fluorímetro de clorofila CCM-200

Índice de contenido de clorofila

Espectrofotometría

2,5 g de la hoja fresca
5 mL de acetona (80%)
Carbonato de calcio

Colocar la muestra y guardar en refrigeración (9°C) 24h

Centrifugar
200 rpm - 10 minutos

Calibración espectrofotómetro

$$Cl_{ha} = (12,7 * A_{663}) - (2,69 * A_{645})$$

$$Cl_{hb} = (22,9 * A_{663}) - (8,12 * A_{645})$$

$$Ch_{LT} = (8,02 * A_{663}) - (20,21 * A_{645})$$



% Humedad

Toma de muestras

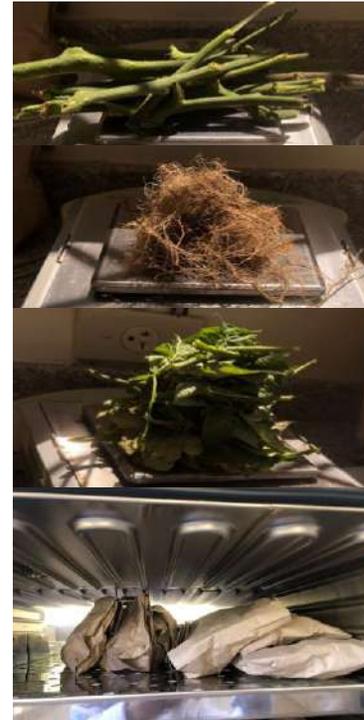
Pesaje de la muestra fresca

Secado en la estufa

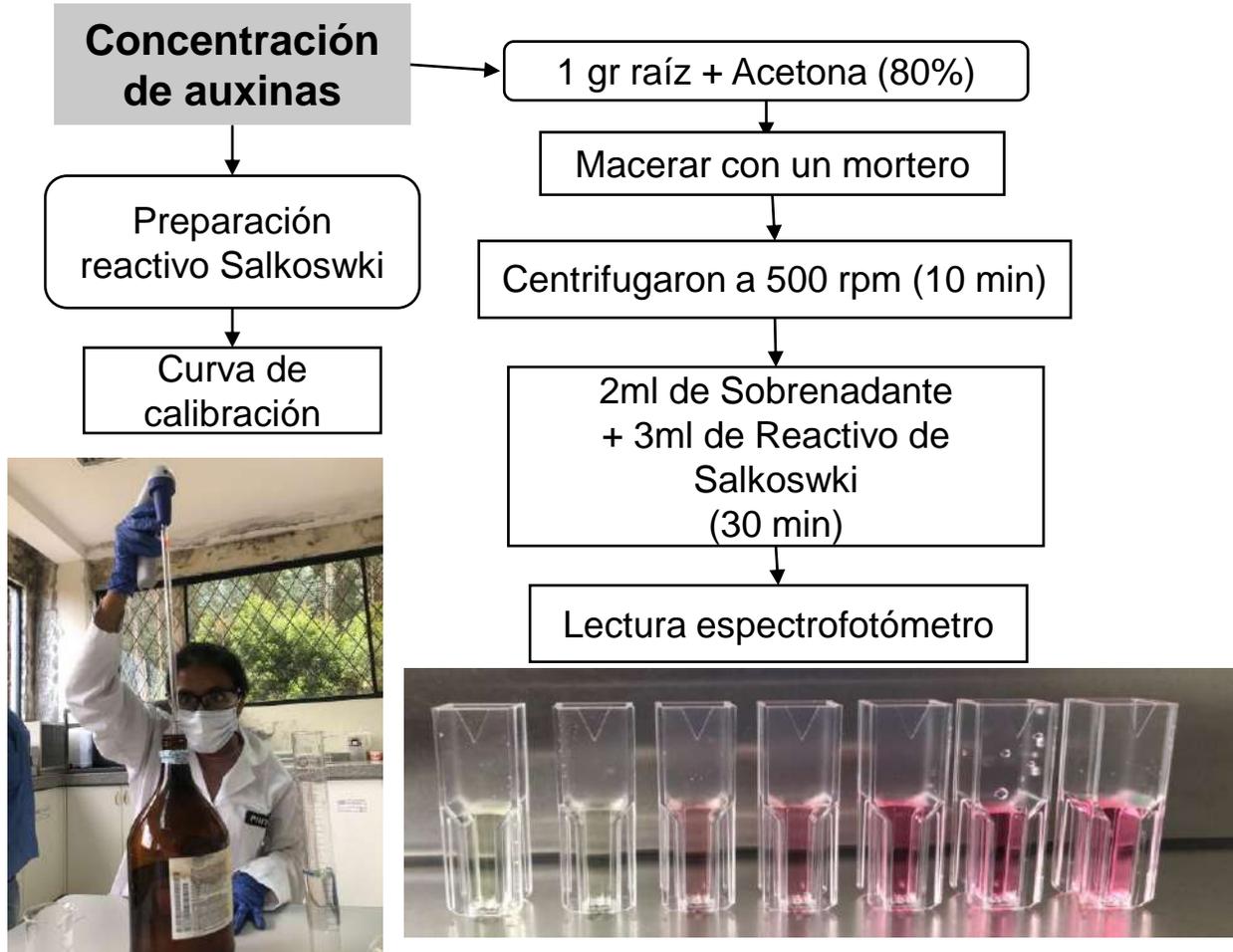
96°C
24 Horas
Pesaje de la muestra seca

Cálculo del % de Humedad

$$\% \text{Humedad} = \frac{\text{Peso muestra inicial} - \text{Peso muestra seca}}{\text{Peso de la muestra inicial}} * 100$$



Variables cuantitativas



Variables cualitativas

Fijación de nitrógeno

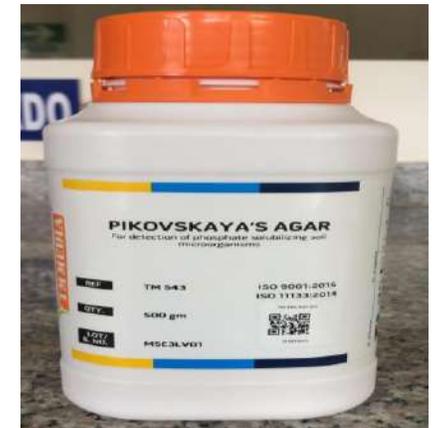
Se utilizó un medio libre de nitrógeno

Medio Ashby Manitol



Solubilización de fostatos

Medio de agar Pikovskaya



• **Altura**

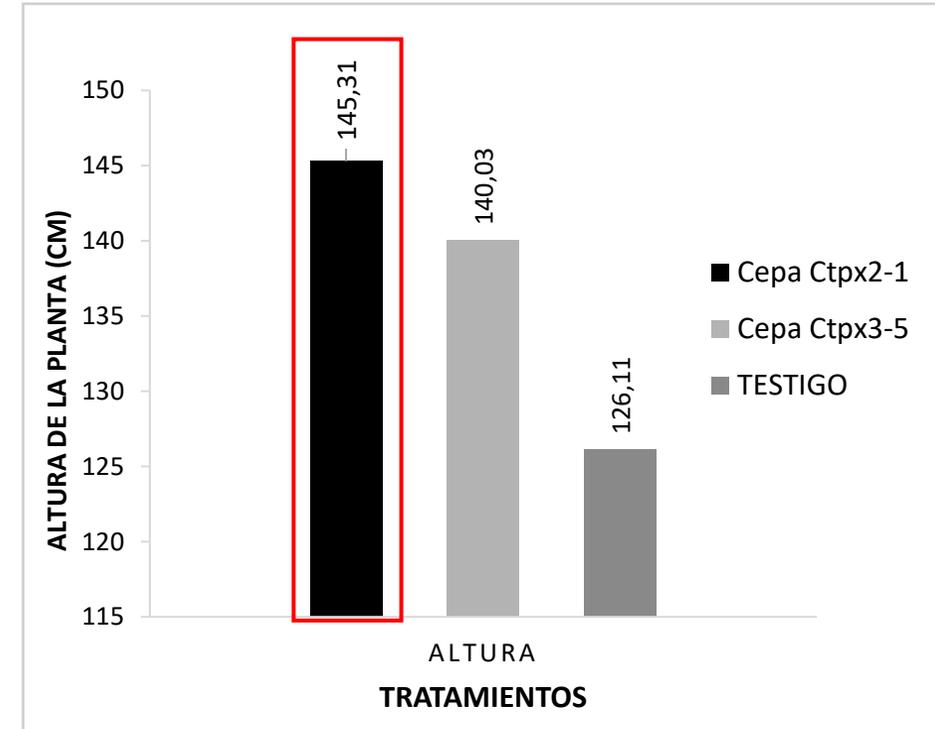
Tabla 1. Efecto de las aplicaciones sucesivas de dos cepas de *B. subtilis* en la altura (cm) de plantas de tomate Cherry

TRATAMIENTO	30 DÍAS		45 DÍAS		60 DÍAS		75 DÍAS	
	X ± DE		X ± DE		X ± DE		X ± DE	
Cepa Ctpx2-1	104,34 ± 1,74	A	118,16 ± 1,09	A	133,44 ± 1,52	A	145,31 ± 0,69	A
Cepa Ctpx3-5	105 ± 3,43	A	115,03 ± 1,18	A	132,67 ± 1,22	A	140,03 ± 0,03	B
TESTIGO	96,03 ± 0,40	B	116,06 ± 2,87	A	121,86 ± 0,99	B	126,11 ± 0,14	C

Nota. Media ± desviación estándar, medias con letras diferentes pertenecen a grupos estadísticamente heterogéneos ($\alpha > 0.05$).

Anguiano et al. (2019) afirma que *B. subtilis* tiene un efecto promotor de crecimiento a partir de la tercera semana de inoculación, lo que corrobora con los resultados de esta investigación que a partir del día 30 (cuarta semana).

Figura 1. Altura en plantas de tomate Cherry en la fase final de la experimentación



Bharucha et al. (2013) señalan que la promoción del crecimiento depende del equilibrio entre las auxinas y otras fitohormonas.

• Índice de clorofila

Tabla 2. Efecto de las aplicaciones sucesivas de dos cepas de *B. subtilis* en el índice de contenido de clorofila (ICC) en hojas de tomate Cherry

TRATAMIENTO	0 DÍAS		15 DÍAS		30 DÍAS		45 DÍAS		60 DÍAS		75 DÍAS	
	X ± DE		X ± DE		X ± DE		X ± DE		X ± DE		X ± DE	
CEPA CTPX2-1	17,87 ± 0,97	A	25,96 ± 1,53	A	31,74 ± 0,73	A	38,24 ± 0,33	A	38,39 ± 1,20	A	44,45 ± 0,32	A
CEPA CTPX3-5	18,27 ± 0,21	A	25,95 ± 1,72	A	27,70 ± 1,53	B	35,51 ± 0,03	B	35,17 ± 0,77	B	40,76 ± 0,56	B
TESTIGO	15,78 ± 0,14	B	22,33 ± 1,29	A	27,40 ± 0,11	B	31,74 ± 0,13	C	30,56 ± 0,30	C	37,00 ± 0,48	C

Nota. Media ± desviación estándar, medias con letras diferentes pertenecen a grupos estadísticamente heterogéneos ($\alpha > 0.05$).

Martínez & Ocón (2008) reportan la gran movilidad que posee el nitrógeno, al lograr acumular el mayor contenido de clorofila y nitrógeno en las hojas.

Stefan et al. (2013) afirman que el potencial promotor del crecimiento de las dos cepas de rizobacterias *Bacillus pumilus* y *Bacillus mycoides* que en combinación o solas, son eficaces para aumentar las actividades fotosintéticas, la eficiencia en el uso del agua y el contenido de clorofila en plantas de frijol en condiciones de no aplicar fertilizantes químicos

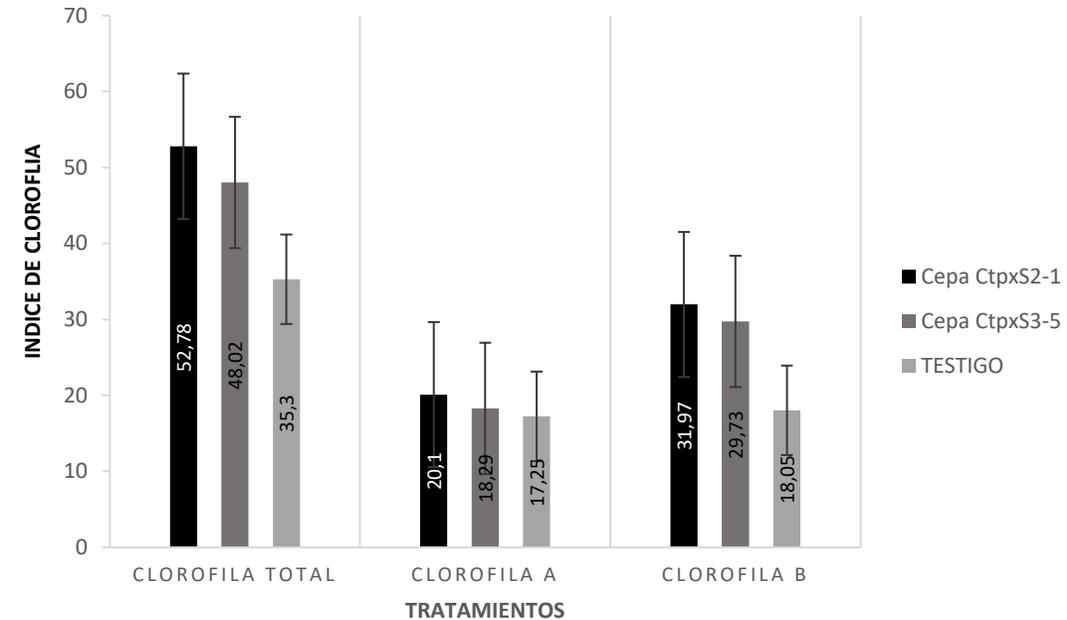
• Índice de clorofila

Tabla 3. Efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de *B. subtilis* en el índice de contenido de clorofila (ug/ml) en hojas de tomate Cherry

TRATAMIENTO	60 días		75 días		
	X ± DE		X ± DE		
Clorofila Total	Cepa Ctpx2-1	51,78 ± 1,73	A	52,06 ± 1,03	A
	Cepa Ctpx3-5	55,60 ± 2,72	A	48,02 ± 4,43	A
	TESTIGO	38,37 ± 1,52	B	35,30 ± 1,93	B
Clorofila A	Cepa Ctpx2-1	19,43 ± 1,72	A	20,10 ± 0,73	A
	Cepa Ctpx3-5	20,25 ± 0,54	A	18,29 ± 0,27	AB
	TESTIGO	14,46 ± 0,95	B	17,25 ± 1,56	B
Clorofila B	Cepa Ctpx2-1	32,36 ± 0,09	A	31,97 ± 0,94	A
	Cepa Ctpx3-5	35,34 ± 2,21	A	29,73 ± 4,16	A
	TESTIGO	23,91 ± 1,06	B	18,05 ± 2,98	B

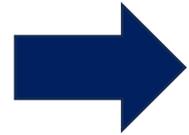
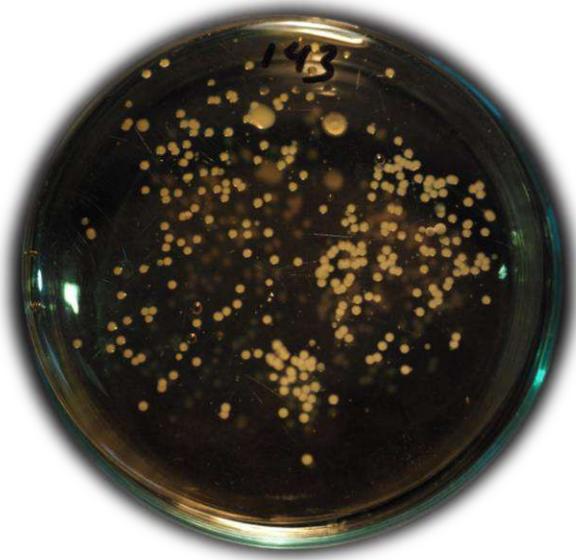
Nota. Media ± desviación estándar, medias con letras diferentes pertenecen a grupos estadísticamente heterogéneos ($\alpha > 0.05$).

Figura 2. Índice de contenido de clorofila (ug/ml) en hojas de tomate Cherry en la fase final de la experimentación



Lovaisa et al. (2018) afirma que el efecto de PGPR pueden promover el crecimiento, mejorar la nutrición mineral e incrementar el contenido de clorofila en las hojas

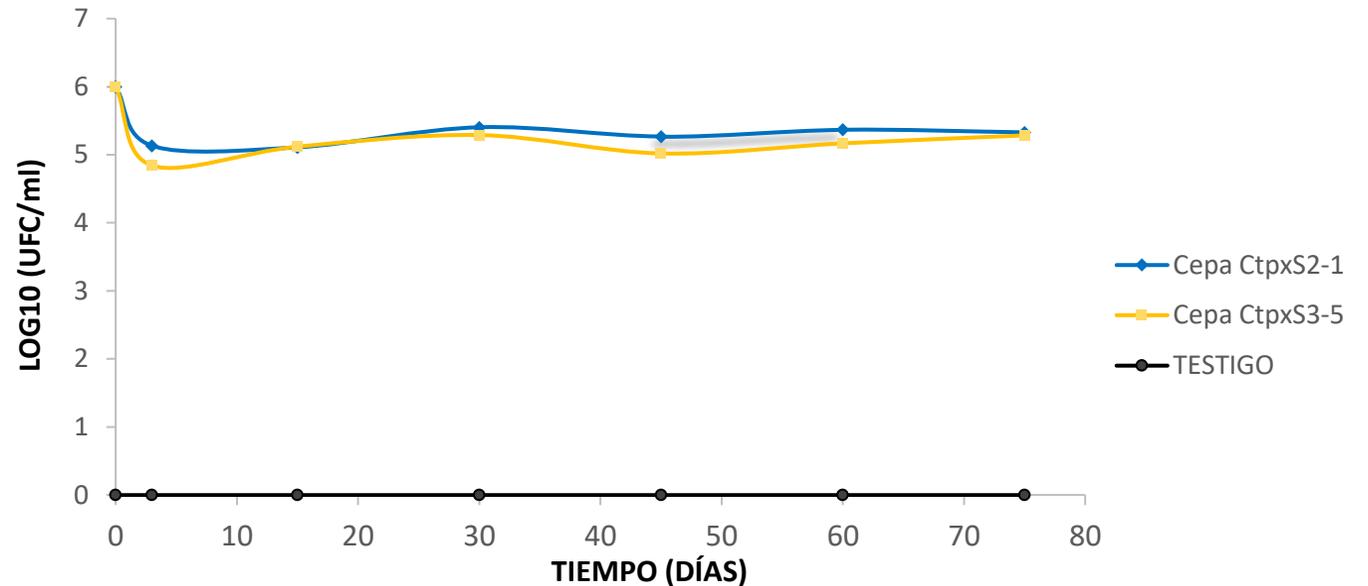
• **Dinámica poblacional**



Cepa *B. subtilis* Ctpx2S-1 → $2,13 \times 10^5$ UFC/g

Cepa *B. subtilis* CtpxS2-1 → $1,95 \times 10^5$ UFC/g

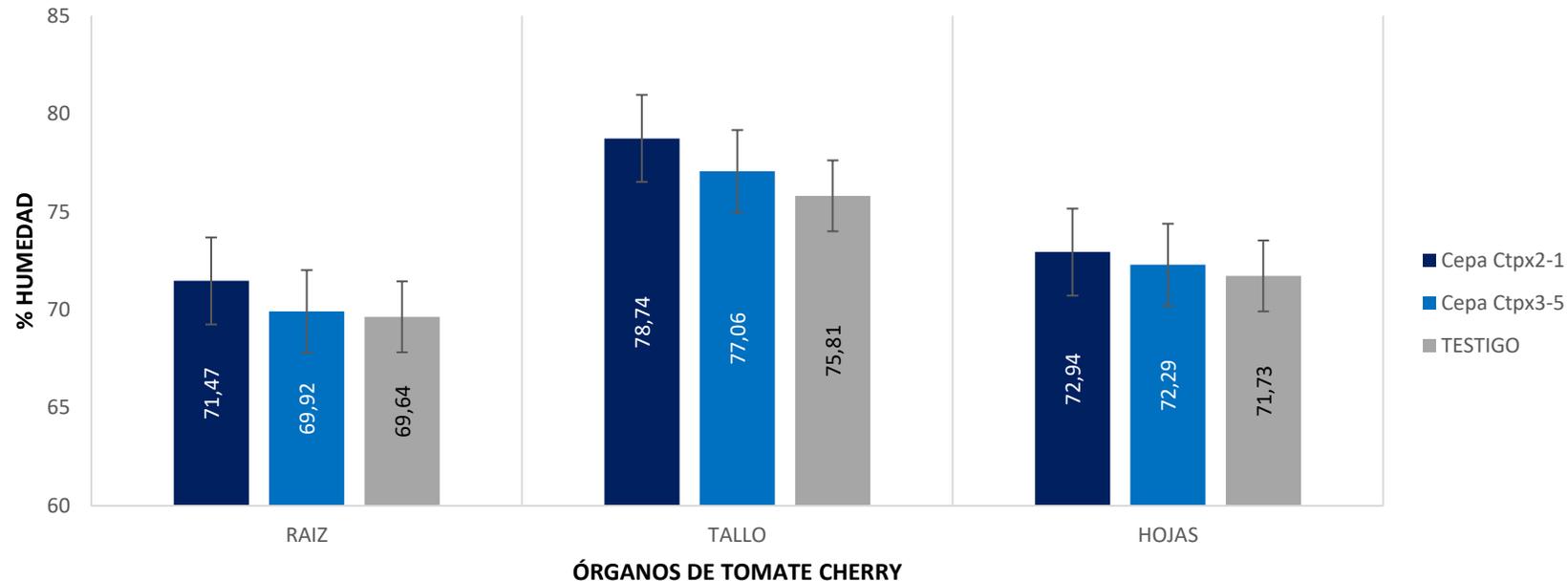
Figura 3. Crecimiento de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la rizosfera de plantas de tomate Cherry, por efecto de inoculaciones periódicas



Nunes et al., (2023) la presencia más prolongada de la bacteria en la rizosfera daría como resultado un beneficio prolongado de promoción de crecimiento.

• Porcentaje de humedad

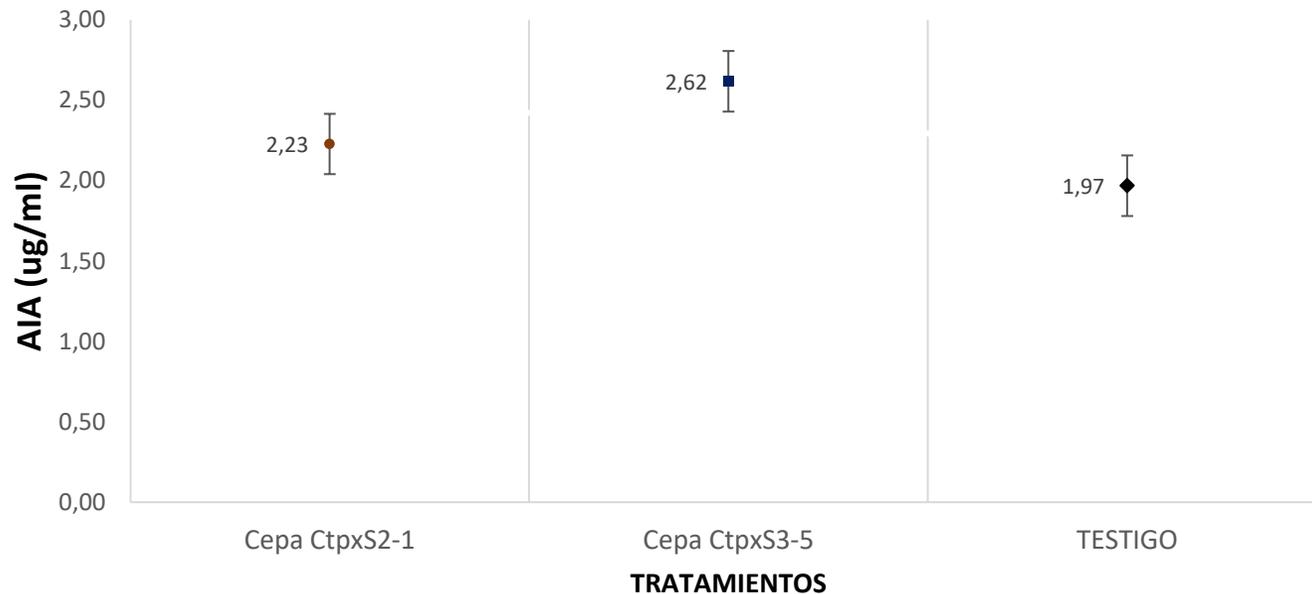
Figura 4. Efecto de aplicaciones sucesivas de dos cepas de *B. subtilis* en el porcentaje de humedad de órganos (raíz, tallo y hojas) de plantas de tomate Cherry



Anguiano Cabello et al. (2019) no encontraron diferencias significativas para el porcentaje de humedad en tallos, hojas y raíces que evaluaron en tres cepas *B. subtilis* (BSN, BS14 y BS8) en cultivos de *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana*.

- Auxinas (AIA)**

Figura 5. Contenido de AIA de las cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en plantas de tomate Cherry



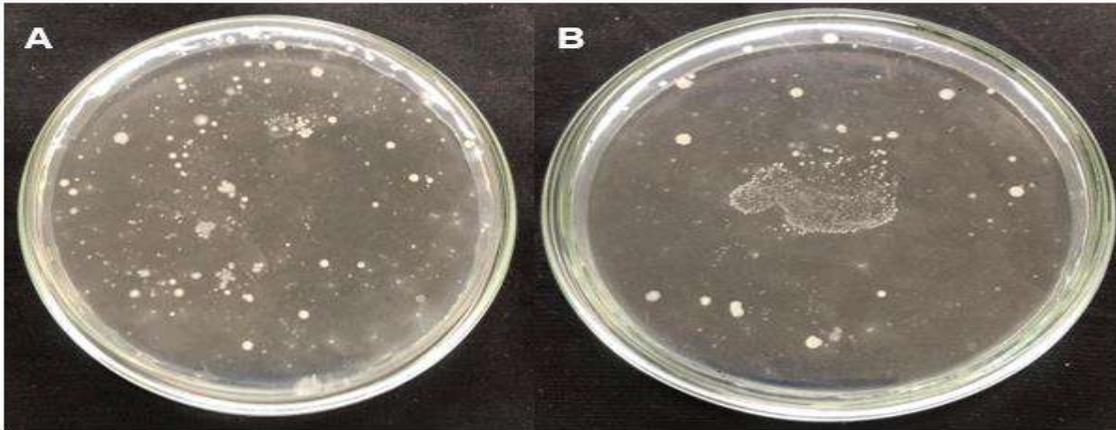
Khan et al. (2016) afirman que la concentración de IAA es elevada bajo el efecto de diferentes cepas de *Bacillus*, razón por la cual las cepas tuvieron un efecto positivo en la promoción de crecimiento y desarrollo de la planta.



(Anguiano Cabello et al., 2019). mostrando que *B. subtilis*, puede producir diferentes concentraciones de metabolitos secundarios como es el caso en la producción de hormonas vegetales (Anguiano Cabello et al., 2019).

• Fijación de nitrógeno

Figura 6. Crecimiento de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en medio libre de nitrógeno (Ashby manitol)

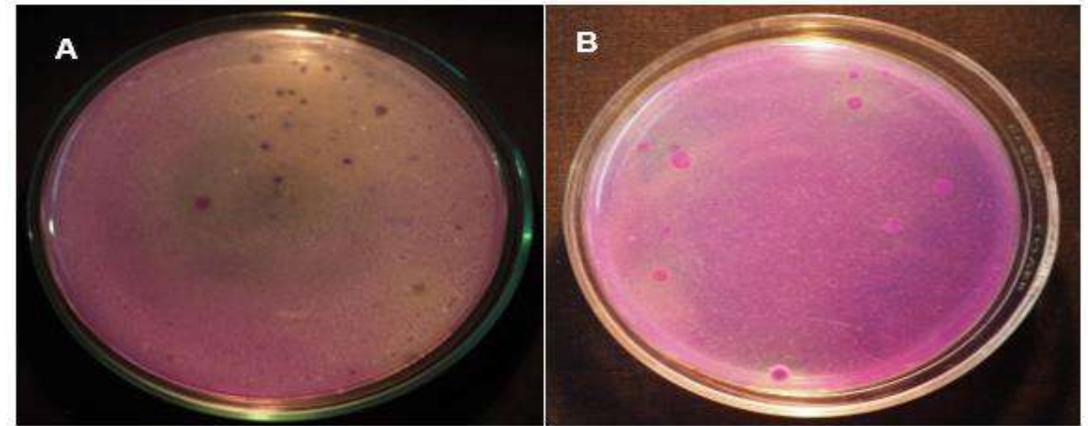


Nota. Crecimiento de bacterias (A) *B. subtilis* CtpxS2-1 (B) *B. subtilis* CtpxS3-5 en dilución 10^{-3} .

Molina-Romero et al. (2015) la fijación de nitrógeno mediante *B. subtilis* participan en el proceso microbiano, en el cual el nitrógeno atmosférico se reduce a amonio y se incorpora a la biomasa mediante procesos microbianos, convirtiéndose así en la fuente principal de nitrógeno para las plantas.

• Solubilización de fosfatos

Figura 7. Solubilización de fósforo de cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en medio Pikovskaya



Nota. Crecimiento de halo amarillento alrededor de las colonias (A) *B. subtilis* propia CtpxS2-1 (B) *B. subtilis* CtpxS3-5 en dilución 10^{-3} . Autoría.

Constanza et al. (2014) mencionan que la relación del halo en el medio y su capacidad solubilizadora nos indican procesos de producción de enzimas como fosfatasas, fitasas y ácidos orgánicos

- El efecto de la cepa de *B. subtilis* CtpxS2-1 presentó respuestas positivas en la colonización de la rizosfera en plantas de tomate Cherry, favoreciendo su crecimiento y aumento el contenido de clorofila
- El contenido de auxinas en plantas de tomate Cherry inoculada con la cepa de *B. subtilis* CtpxS3-5 tuvo un efecto mayor con 2,62 ug/ml, determinando que la concentración de AIA contribuyó con una respuesta positiva por el potencial promotor de crecimiento por acción de las fitohormonas, como ácido indol-3-acético (AIA, 3-AIA)
- Las cepas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 tienen la capacidad de fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos (SF), actividades que realizan mediante enzimas como nitrogenasas y fitasas, funcionando como bioindicadores.
- El efecto de las inoculaciones periódicas de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 colonizaron exitosamente la rizosfera de las plantas de tomate Cherry, lo que se evidenció con las respuestas positivas de las variables agronómica y fisiológicas del cultivo.

- Continuar con el seguimiento de las plantas de tomate Cherry en un periodo más largo para obtener un crecimiento bacteriano (UFC/ml) mayor y su efecto en la producción y calidad.
- Realizar otras investigaciones similares en diferentes especies de solanáceas para determinar si el efecto de *B. subtilis* es igual o mayor que en tomate Cherry.
- Analizar el crecimiento bacteriano de *B. subtilis* por medio de la densidad óptica en espectrofotómetro, para evidenciar la concentración real de Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo (UFC/g).
- Determinar en futuras investigaciones el incremento de las cantidades de nitrógeno y fósforo en las plantas bajo el efecto de *B. subtilis* mediante mecanismos como fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato.



GRACIAS POR SU ATENCIÓN



**Carrera de
Agropecuaria**



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA