



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 agosto del 2023



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera Agropecuaria

Certificación:

Certifico que el trabajo de titulación: **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**, fue realizado por la señorita: **Ayala Colimba, Ana Lucia**; 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, 17 de agosto del 2023



Ing. Falconí Saá, César Eduardo, Ph. D

C.C. 0601556459

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



Tesis Final-AYALA ANA FINAL-UIC.docx

Scan details

Scan time:
August 17th, 2023 at 15:59 UTC

Total Pages:
35

Total Words:
8695

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	4.2%	368
Minor Changes	2.1%	183
Paraphrased	1.3%	110
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage
AI text
Human text

Plagiarism Results: (30)

03 EIA 385 TRABAJO GRADO.pdf	1.6%
http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/5647/1/D... pc UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRI...	
FormatosTrabajosdeTitul: ion2022.docx	1.5%
https://biblioteca.espe.edu.ec/wp-content/uploads/2022/04/... Calderon Garcia Angel David Resultados de la herramienta para verificación y/o análisis de similitud de contenidos [image:] Nota: Colocar únicamente la página que ...	
idUS - Bacterias promotoras del crecimiento vegeta...	1.4%
https://idus.us.es/handle/11441/65140?show=full Depósito de Investigación ...	

Certified by

About this report
help.copyleaks.com

copyleaks.com



Firmado electrónicamente por:
CESAR EDUARDO
FALCONI SAA

Ing. Falconi Saá, César Eduardo, Ph. D

C.C. 0601556459



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera Agropecuaria

Responsabilidad de Autoría:

Yo, **Ayala Colimba, Ana Lucia**, con cédula de ciudadanía No. **1005087141**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo titulación: **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**, 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, 17 de agosto del 2023

Ayala Colimba, Ana Lucia

C.C.: 1005087141



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera Agropecuaria

Autorización de Publicación:

Yo, **Ayala Colimba, Ana Lucia**, con cédula de ciudadanía No. **1005087141** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **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**, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios es de mi responsabilidad.

Sangolquí, 17 de agosto del 2023

Ayala Colimba, Ana Lucia

C.C.: 1005087141

Dedicatoria

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos por su infinita bondad y amor, a mi madre Victoria Colimba por poner en mi toda su fe y confianza de ver este logro echo realidad por su apoyo incondicional, a mi padre José Ignacio Ayala por su perseverancia y constancia que lo caracterizaban gracias por haber influenciado en mí el valor para salir adelante , ahora me guiaras desde el cielo ,les agradezco por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad por formarme con reglas, por motivarme para alcanzar todos mis anhelos , por ser mi soporte y compañía durante todo mi proceso de formación hasta este punto. Por su ejemplo de trabajo y superación por guiarme por el buen camino.

A mis hermanos Pilar, Danilo, José, Galo, Santiago y María José por darme apoyo, consejos y ayudarme a levantarme en momentos en el que sentía que ya no lo iba a lograr durante toda la carrera de estudios.

A mis sobrinas Nayeli y Gabriela por compartir momentos de vida conmigo.

Agradecimientos

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I por todos los conocimientos aportados para mi formación profesional, a los docentes que han demostrado su profesionalismo y calidad humana, que me han impartido su conocimiento a lo largo de estos años de carrera universitaria.

A mi Tutor Dr. Cesar Falconí quien propuso el tema de investigación, gracias por sus consejos, apoyo y paciencia que me ha tenido a lo largo del desarrollo de este trabajo, también agradezco al Ingeniero Darwin Claudio por su apoyo durante la realización de esta investigación durante la fase de laboratorio.

A todos mis amigos que he conocido a lo largo de la carrera, en especial a Henry De La Cruz por su apoyo incondicional a Xavier Sanmartín, Melany Rodríguez por su apoyo y compañía brindando durante este trayecto.

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.....	16
Objetivos	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos	17
Hipótesis	17
CAPITULO II	18
REVISIÓN LITERATURA	18
Generalidades del maíz.....	18
Hojas de maíz	18
Ciclo fenológico del cultivo de maíz.....	19

Variedad INIAP 101	20
Control biológico.....	20
Generalidades de <i>B. subtilis</i>	21
Lipopéptidos antifúngicos	21
Síntesis de lipopéptidos a partir de <i>B. subtilis</i>	22
Características de las familias de lipopéptidos	22
Potencial de <i>B. subtilis</i> como inductor de crecimiento	23
Inducción de genes de crecimiento de plantas	23
Solubilización de fosfato.....	24
Fijación de nitrógeno	24
CAPITULO III.....	26
METODOLOGÍA.....	26
Ubicación	26
Diseño experimental.....	26
Métodos	28
Fase campo.....	28
Fase de laboratorio	28
Insumos.....	28
Biológicos	28
Equipos.....	28
Medios de cultivo	29
Control de calidad de <i>B. subtilis</i>	29
Inoculación de <i>B. subtilis</i> Ctpx 2-1 y Ctpx 3-5 en plantas de maíz.....	29
VARIABLES A MEDIR.....	29
Índice de clorofila.....	29
Altura de la planta	29

Dinámica poblacional de <i>B.subtilis</i>	30
Ácido indolacético	31
Biomasa	31
Concentración de clorofila espectrofotómetro	32
CAPITULO IV	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
Dinámica poblacional de <i>B.subtilis</i>	33
Altura	34
Clorofila espectrofotómetro	36
Biomasa	36
Ácido indolacético	38
Solubilización de fósforo	39
Fijación de nitrógeno	40
Discusión	40
CAPITULO V	43
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
Conclusiones	43
Recomendaciones	43
Bibliografía:	45

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Etapas en el desarrollo de la planta de maíz</i>	19
Tabla 2 <i>Descripción de los tratamientos</i>	27
Tabla 3 <i>Croquis Experimental</i>	27
Tabla 4 <i>Ecuaciones para la obtención de clorofila en laboratorio medidas en ug/ml</i>	32
Tabla 5 <i>Altura de plantas de maíz (Zea mays) variedad INIAP 101 por efecto de B. subtilis a lo largo de 90 días.</i>	34
Tabla 6 <i>Índice de contenido de clorofila de plantas de maíz por efecto de B. subtilis</i>	35
Tabla 7 <i>Clorofila A, clorofila B y clorofila total de plantas de maíz variedad INIAP 101 efecto de células de B. subtilis a lo largo de seis inoculaciones.</i>	36
Tabla 8 <i>%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.</i>	36
Tabla 9 <i>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.</i>	38

Índice de figuras

Figura 1 <i>Etapas de crecimiento del maíz</i>	19
Figura 2 <i>Ubicación del invernadero de horticultura Hacienda “El Prado”</i>	26
Figura 3 <i>Procedimiento para la dinámica poblacional</i>	30
Figura 4 <i>Peso fresco y seco de las plantas de maíz</i>	31
Figura 5 <i>Dinámica Poblacional de células de B. Subtilis Cptx S2-1, Cptx S3-5 en la rizosfera de las plantas de maíz durante 90 días</i>	33
Figura 6 <i>Variación de la altura de las plantas de maíz por efecto de de B. subtilis a lo largo de 90 días</i>	34
Figura 7 <i>Variación del Índice de contenido de clorofila de plantas de maíz por inoculación células de B. Subtilis a lo largo de seis inoculaciones</i>	35
Figura 8 <i>% Materia seca de raíz en maíz variedad INIAP 101 por efecto de la inoculación de células de B. subtilis a lo largo de 90 días</i>	37
Figura 9 <i>% 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</i>	37
Figura 10 <i>Cantidad de auxinas de las plantas de maíz variedad INIAP 101 por efecto inoculación de células de B. subtilis a lo largo de 90 días</i>	38
Figura 11 <i>Concentración de ácido indolacético (ug/ml) por efecto de la inoculación de células de B. subtilis a lo largo de 90 días en plantas de maíz INIAP 101</i>	39
Figura 12 <i>Crecimiento de B. subtilis Cptx S2-1 y Cptx S3-5 en Pikovskaya +Azul de bromofenol</i>	39
Figura 13 <i>Crecimiento de células de B. subtilis cepas CptxS2-1, Cptx S3-5 y control en medio Ashby Manitol</i>	40

Resumen

En la actualidad diversos estudios han evidenciado que las bacterias promotoras de crecimiento que mejoran la disponibilidad de nutrientes reducen el estrés abiótico, aumenta las defensas de las plantas y ayudan a combatir los patógenos. El objetivo de este estudio fue evaluar dos cepas de *B. subtilis* (*Ctpx2-1* y *Ctpx3-5*) en la promoción de crecimiento de plantas de maíz (*Zea mays*) en etapa juvenil, el estudio tuvo una duración de 90 días y fue realizado en la Hacienda el Prado, ubicada en la provincia de Pichincha – Ecuador. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) para medir las variables de altura de planta, índice de contenido de clorofila, contenido de auxinas, acción enzimática, biomasa y dinámica poblacional en la rizosfera de las plantas. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y cuando hubo diferencias significativas las medias se discriminaron mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$). En la mayoría de las variables estudiadas como son acción enzimática, ácido indolacético, y contenido de clorofila se obtuvo que el efecto células de *B. subtilis* sobre las variables medidas mostraron diferencias significativas comparado con el tratamiento control. En conclusión, con la inoculación de dos cepas de *B. subtilis* (*Ctpx S2-1* y *Ctpx S3-5*) se demostró tener una respuesta favorable en la promoción de crecimiento, contenido de ácido indolacético y acción enzimática de plantas de maíz en etapa juvenil, siendo la cepa *Ctpx S2-1* la que más destacó positivamente en las variables estudiadas.

Palabras clave: MAÍZ ,*BACILLUS SUBTILIS*, ACCIÓN ENZIMÁTICA, DINÁMICA POBLACIONAL

Abstract

Currently, several studies have shown that growth-promoting bacteria improve nutrient availability, reduce abiotic stress, increase plant defenses, and help combat pathogens. The objective of this study was to evaluate two strains of *B. subtilis* (Ctpx2-1 and Ctpx3-5) in the growth promotion of maize (*Zea Mays*) plants in juvenile stage, the study lasted 90 days and was conducted at Hacienda el Prado, located in the province of Pichincha - Ecuador. A completely randomized design (CRD) was used to measure the variables of plant height, chlorophyll content index, auxin content, enzymatic action, biomass and population dynamics in the rhizosphere of the plants. The data were subjected to an analysis of variance and when there were significant differences the means were discriminated by Tukey's test ($p < 0.05$). In most of the variables studied, such as enzymatic action, indoleacetic acid, and chlorophyll content, the effect of *B. subtilis* cells on the variables measured showed significant differences compared to the control treatment. In conclusion, the inoculation of two strains of *B. subtilis* (Ctpx S2-1 and Ctpx S3-5) showed a favorable response in the promotion of growth, indoleacetic acid content and enzymatic action of maize plants at the juvenile stage, with the Ctpx S2-1 strain being the one that stood out most positively in the variables studied.

Keywords: CORN, *BACILLUS SUBTILIS*, ENZYMATIC ACTION, POPULATION DYNAMICS

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

El uso excesivo de agroquímicos en la agricultura ha causado una significativa contaminación de los sistemas naturales y resistencia de ciertas enfermedades de interés agrícola. Por tanto, la aplicación y uso de productos biológicos como medios sustitutivos a los tradicionales benefician el cuidado del medio ambiente, preservan recursos naturales y cuidan la salud humana. Los microorganismos se han convertido en una herramienta fundamental para la producción agrícola por su capacidad de promover la mejora y crecimiento de las plantas hasta el punto de ser comercializados como productos agrícolas. Los microorganismos constituyen elementos importantes para el desarrollo fisiológico de las plantas. Pueden desarrollar el mismo papel de los fungicidas, pesticidas y fertilizantes químicos, actuando como biofertilizantes y biopesticidas (Balaraju, 2014)

Las PGPR son muy estudiadas hoy en día por su potencial no solo para la mejora en el crecimiento de cultivos o el ejercicio como agentes de biocontrol, sino también en la variedad de posibilidades tanto de descontaminación de suelos como de reforestación y recuperación de ecosistemas (Sánchez, 2020).

En diversos estudios se ha evidenciado que las bacterias promotoras de crecimiento (PGPR) mejoran la disponibilidad de nutrientes, reducen el estrés abiótico, aumenta las defensas de las plantas y ayudan a combatir los patógenos y a la vez promueven el crecimiento vegetal mediante diferentes mecanismos, tanto directos como indirectos, al tiempo que inducen la resistencia sistémica de las plantas tanto a estreses bióticos (ataques de patógenos) como abióticos (sequía, salinidad, temperatura, contaminantes entre otros(Méndez y Gutiérrez, 2019).

Los inoculantes a base de rizóbacterias son una alternativa biotecnológica en la agricultura sostenible que puede reducir los costos de producción en las prácticas agrícolas. También ayudan a reducir el uso de fertilizantes sintéticos, pesticidas y acondicionadores artificiales que afectan negativamente a los ecosistemas naturales, de esta manera promueven hacia una agricultura más ecológica, se están investigando cepas bacterianas modificadas genéticamente que mejoran e incluso potencian la acción e interacción con las plantas, cuando anteriormente las condiciones eran desfavorables, debido a los cultivos, a los suelos o a los propios microorganismos (Rodríguez y Velasco, 2020).

Justificación

A medida que la población se eleva en número, la demanda de alimentos también aumenta, en consecuencia, la agricultura convencional intensifica el uso de agroquímicos, acarreando con ello, riesgos a la salud, al ambiente y la economía de productores y consumidores. En este contexto los biofertilizantes biológicos y ciertas prácticas agroecológicas son una alternativa importante y válida en el Ecuador. En las últimas décadas ha aumentado la investigación sobre el uso de PGPR, no solo porque puede acelerar el crecimiento de los cultivos o como biopesticida, sino también porque tiene aplicaciones prometedoras en la reforestación y restauración de ecosistemas (Shen y Ran, 2011).

Por otro lado la sanidad y la productividad en el cultivo de chocho en el Ecuador ha mejorado, en cuanto a semillas y a lo largo del ciclo del cultivo cuando son tratadas con *B. subtilis*. 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 (IAA) es la auxina más conocida y estudiada, que juega un papel principal en el crecimiento de los cultivos. 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, así como mediante la inducción del crecimiento y los mecanismos de defensa a

través de la colonización eficaz de las raíces hospedantes. Se demostró 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, sustancias precursoras de la resistencia vegetal ayudando a promover el crecimiento de radículas y plúmulas en semilla pre-inoculada. (Yáñez y Falconí, 2021)

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*).

CAPITULO II

REVISIÓN LITERATURA

Generalidades del maíz

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. El maíz, que es uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales, es una materia prima básica de la industria de transformación y derivados que son la base de nuestra alimentación (Hernández y Arthur, 2009).

Planta diploide ($2n=20$) con 10 pares de cromosomas estas pueden alcanzar una longitud media de 270 a 290 cm, pero en algunas especies y en lugares muy concretos pueden superar los 3 metros de longitud. En la caracterización y descripción del maíz no se puede dejar de mencionar su estructura típica y las partes que componen la planta de maíz. Ellos son: raíz, tallo, hojas e inflorescencia (masculina y femenina) (Morales, 2015).

El gluten de la semilla de maíz tiene un gran valor como materia alimenticia. Los principales son los concentrados de gluten, con el 23% de sustancias proteicas, y las tortas de gluten con el 41%. Está formado por una mezcla de sustancias nitrogenadas (proteínas) contenidas en el grano (Hernández y Arthur, 2009).

Hojas de maíz

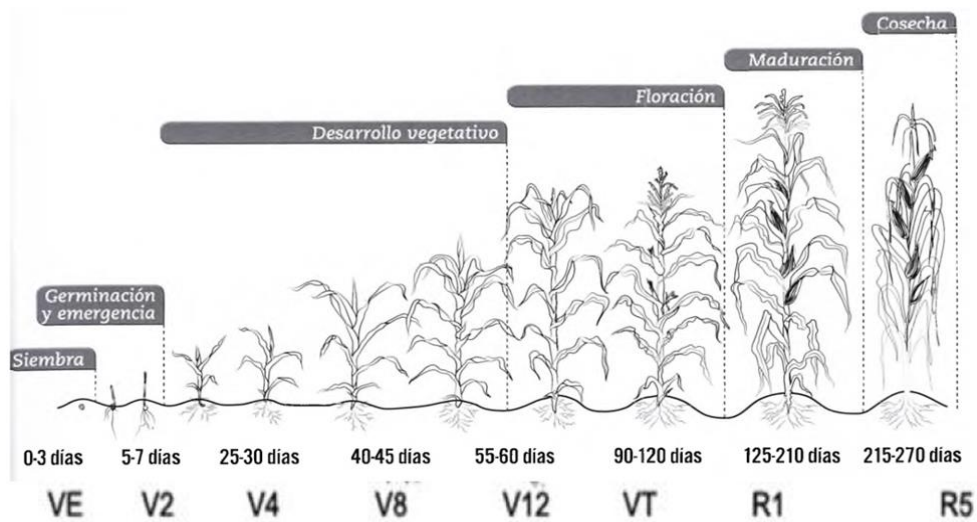
Las hojas del maíz son alargadas y un poco onduladas, salen alternas, su aspecto en el borde de la hoja es áspero, nacen muy pegadas al tallo y es donde se desarrollan las mazorcas. Se dice que las hojas tienen una gran importancia en el desarrollo y evolución de los granos. Dependiendo de cómo se cultiva una planta de maíz puede tener de 12 a 24 hojas (Morales, 2015).

Ciclo fenológico del cultivo de maíz

Todas las plantas de maíz se desarrollan de la misma manera. Sin embargo, el tiempo entre etapas de crecimiento como se puede observar en la figura 1 puede variar dependiendo del tipo de maíz, fechas de siembra, localización, y a la altitud a la que se encuentra el maíz (Peñaherrera, 2011).

Figura 1

Etapas de crecimiento del maíz



Nota. Adaptado de (Peñaherrera, 2011)

Tabla 1

Etapas en el desarrollo de la planta de maíz

Etapa vegetativa	Etapa Reproductiva
VE: Emergencia	R1: Seda
V1: Primera hoja	R2: Ampollamiento
V2: Segunda hoja	R3: Grano Lechoso
V(n): n-enésima hoja	R4: Grano Pastoso
Vt: Espigadura	R5: Llenado de grano

Nota. Adaptado de (Saavedra, 2017)

Variedad INIAP 101

“INIAP 101” es una variedad producida por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias la misma que ha sido probada en distintas provincias del Ecuador. Es mucho más precoz que el maíz local acortando el tiempo de producción con aproximadamente dos meses. Al ser más precoz permite aprovechar mejor la tierra y producir dos cosechas al año produciendo choclos de buena calidad, de buen tamaño y de grano grueso (Zambrano *et al.*, 2021).

-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 choclo,102 qq/Ha

-Altitud: de 2400 a 3000m.s.n.m

Control biológico

Se puede definir al control biológico como el uso de organismos vivos o sus derivados, para contrarrestar los daños producidos por organismos perjudiciales, los microorganismos capaces de ejercer control biológico utilizan mecanismos como la producción de antibióticos que conllevan a contrarrestar ciertos patógenos, la inducción de resistencia en la planta, y la competencia por alimento con microorganismos en el mismo microambiente La producción y formulación de bioproductos para control biológico ha sido muy estudiada en las dos últimas décadas, sin embargo, su uso no se ha extendido entre los agricultores y es muy limitado debido entre otros a las regulaciones del mercado, el modo de acción reducido en comparación con tratamientos químicos y costos de producción elevados, lo cual limita la disponibilidad en el mercado de estos productos (Corrales, 2018).

Generalidades de *B. subtilis*

B. subtilis es una bacteria Gram positiva que se encuentra en el suelo, y posee características de resistencia a condiciones extremas por la producción de endoósporas. Posee forma bacilar, y se puede observar en forma individual, en pares o en cadenas de bacilos, cuando se encuentra en esporulación se presenta en forma ovalada. Además, son capaces de producir varios tipos de enzimas hidrolíticas como glucanasas, amilasas, quitinasas y proteasas. Es característico por su amplia síntesis de moléculas bioactivas estructuralmente diversas, las principales características morfológicas de *B. subtilis* incluyen la producción de esporas y la capacidad de formar biofilms, considerado con alto interés industrial (Yáñez y Falconí, 2021).

Las esporas producidas por *B. subtilis* tienen un alto nivel de resistencia, por lo cual permite incrementar su nivel de supervivencia en la rizosfera vegetal. Por lo tanto, la capacidad de *B. subtilis* en la de producción de sustancias biocontroladoras capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, en conjunto con la formación de esporas siendo importante para la formulación de biopesticidas (Ongena y Jacques, 2008).

Lipopéptidos antifúngicos

Los lipopéptidos son moléculas bioactivas producidas por *B. subtilis* con un alto potencial de aplicaciones en la industria farmacéutica y biotecnológica debido a sus propiedades tensoactivas. La síntesis de lipopéptidos de tipo antimicrobiano se realiza de forma no ribosomal mediada por complejos multienzimáticos como péptidos sintetasas, lo que conlleva a la presencia de heterogeneidad en la secuencia de residuos de aminoácidos, ciclación de péptidos y ramificación de la cadena de ácidos grasos en los lipopéptidos, por lo cual se divide en familias de lipopéptidos como surfactinas, iturinas y fengicinas (Romero *et al.*, 2007).

Síntesis de lipopéptidos a partir de *B. subtilis*

B. subtilis posee una elevada capacidad para la producción de una gran variedad de metabolitos antifúngicos. La clasificación en familias de los lipopéptidos se debe a la heterogeneidad presentada con relación a la secuencia y longitud de residuos de aminoácidos y la ciclación de péptidos (Ongena y Jacques, 2008). La variabilidad de las familias de los lipopéptidos en relación a su estructura y propiedades fisicoquímicas de estas moléculas de naturaleza anfifílica han demostrado ser efectivas actuando de manera antagónica frente patógenos fúngicos, lo que podría explicar su influencia en los mecanismos que se han ido desarrollando por las bacterias para su acción como control biológico frente a fitopatógenos que afectan a las plantas (Yáñez y Falconí, 2021).

Características de las familias de lipopéptidos

La diferencia estructural en los lipopéptidos ha permitido dividir a los mismos en familias agrupadas por sus características y mecanismos de acción sobre los patógenos. Las fengicinas, surfactinas e iturinas son familias de lipopéptidos que se caracterizan por ser homólogos, y se encuentran compuestos por un péptido caracterizado por poseer aminoácidos con una secuencia específica (Dufour, 2007). En relación con la estructura, se diferencian por ser moléculas anfipáticas que pueden presentar características hidrofóbicas cuando se presentan restos de una cadena de carbono, o hidrofílicas cuando se presentan restos variables iónicos (Pereira *et al.*, 2013).

Los lipopéptidos de las familias surfactinas, iturinas y fengicinas tienen diversas aplicaciones industriales debido a sus propiedades tensoactivas. La presencia de varias familias de lipopéptidos confieren una ventaja a las cepas productoras de *Bacillus spp.* en nichos ecológicos específicos. La producción de iturinas se encuentra presente en *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*. Las surfactinas se han identificado en aislados de *B. coagulans*, *B. subtilis* y *B. licheniformis*. Y la presencia de fengicinas en *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* (Ongena *et al.*, 2005)

Potencial de *B. subtilis* como inductor de crecimiento

Los microorganismos endófitos residen en los tejidos de las plantas sin producir efectos negativos en el huésped. Generalmente, bacterias como *B. subtilis* benefician a las plantas al incrementar la tolerancia al estrés biótico y abiótico. Al mismo tiempo, *B. subtilis* tiene la capacidad de producir biomoléculas activas que actúan como antiplagas contra patógenos e insectos. La presencia de bacterias endófitas posee una alta capacidad de promoción del crecimiento vegetal mediante procesos como la producción de sustancias orgánicas, consideradas como producto del metabolismo secundario de las bacterias que a su vez son capaces de influir en las respuestas fisiológicas de células vegetales.

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 (Yáñez y Falconí, 2021; Falconí y Yáñez, 2022; Yáñez *et al.*, 2023). Las auxinas son las principales hormonas secretadas por bacterias de la rizósfera y se encuentra vinculada a la patogenicidad debido a que algunos fitopatógenos pueden causar respuestas hipersensibles en el huésped y de esta manera lograr una infección exitosa (Vera y Bonilla, 2011).

Inducción de genes de crecimiento de plantas

Las rizóbacterias promotoras del crecimiento como *B. subtilis* son capaces de desencadenar una serie de reacciones que involucran sustancias que influyen el crecimiento de tejidos vegetales. Las auxinas son hormonas vegetales involucradas en los procesos de crecimiento, diferenciación vascular, respuestas trópicas, formación de raíces laterales y adventicias (Ulrike, 2008).

La auxina es capaz de transportarse de una célula vegetal a otra en forma basipetal hacia las raíces en un proceso llamado transporte polar de auxinas o PAT por sus siglas en inglés *Polar Auxin Transport*. La expresión de genes involucrados con el transporte de auxinas puede indicar la estimulación del crecimiento por factores externos. La regulación de las vías de síntesis de auxinas depende también de la influencia de estímulos externos como la luz, la

temperatura y los nutrientes, y de factores internos como la presencia de otras hormonas. Además, los niveles intracelulares de auxinas son también regulados por la conjugación de auxinas con péptidos, aminoácidos y azúcares (Ljung, 2013).

Solubilización de fosfato

El fósforo es uno de los nutrientes más limitantes en el crecimiento de las plantas. Dentro de las funciones que le han sido atribuidas se encuentran la captación, almacenamiento y transferencia de energía además de formar parte de macromoléculas tales como ácidos nucleicos y fosfolípidos presentes en la membrana citoplasmática. Una gran porción de fosfatos inorgánicos aplicados al suelo como fertilizantes son inmovilizados después de su aplicación, permaneciendo de forma inasequible para la planta. Las formas inorgánicas de fósforo son solubilizadas por un grupo de microorganismos heterotróficos que excretan ácidos orgánicos, el género *B. Subtilis* es uno de los más estudiados respecto a esta capacidad y se plantea como mecanismo principal de solubilización, la excreción al medio de ácidos orgánicos (Tejera *et al.*, 2013).

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, con lo que pasa a constituir la fuente principal de nitrógeno para las plantas. Este proceso se lleva a cabo por la enzima nitrogenasa, presente en todos los microorganismos fijadores del nitrógeno. Se estima que 175 millones de toneladas de nitrógeno por año se adicionan al suelo a través de la fijación biológica del nitrógeno y se calcula que el 60 % del nitrógeno usado por las plantas proviene de la fijación biológica. Teniendo en cuenta esto, se podría reducir considerablemente el uso de fertilizantes nitrogenados en la agricultura si se emplearan los microorganismos que puedan llevar a cabo esta función. El género *Bacillus* es uno de los más explotados en este sentido

dada su gran versatilidad metabólica y su amplia capacidad de producir metabolitos contra microorganismos patógenos (Hernández *et al.*, 2011)

CAPITULO III

METODOLOGÍA

Ubicación

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 (Figura 2) el mismo que posee una temperatura media anual de 18.4 °C, humedad relativa del 40.16%

Figura 2

Ubicación del invernadero de horticultura Hacienda “El Prado”



Nota. Adaptado de (Google Maps, 2023)

La Hacienda “El Prado” se encuentra ubicada en una longitud de 78°24’44”E a una altitud de 0°23’20”S, con una altitud de 2748 m.s.n.m. Las temperaturas de la zona en estudio se ubican con una media mínima de 7.95 °C y una máxima de 19.93° C, con una precipitación anual de 1332.72 mm (Licto, 2017).

Diseño experimental

Se evaluó la respuesta de 36 plantas de maíz (*Zea mays*) variedad INIAP 101 por efecto de la inoculación de dos cepas de *B.subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 formuladas acorde con la metodología propuesta por Yáñez et al., (2023) bajo condiciones de invernadero. Se establecieron tres tratamientos (T0: Control); (T1: *B.subtilis* CtpxS2-1); (T2: *B.subtilis* CtpxS3-

5) con tres repeticiones. El ensayo se estableció con un diseño completamente al azar (DCA) con dos cepas de *B. subtilis* (*Ctpx2-1* y *Ctpx3-5*) y un método de aplicación (células de *B. Subtilis*) con tres repeticiones y un testigo. Se emplearon 36 unidades experimentales como indica el croquis experimental.

Tabla 2





































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

Tabla 3

Croquis experimental

T0R2	T2R2	T2R1	T0R3	T1R1	T2R3	T1R2	T0R1	T1R3
								
								
								
								

Nota. Autoría Propia

Métodos

Fase campo

La fase de campo se realizó en la Hacienda “El Prado” IASA I, en el invernadero de Horticultura, donde se germinaron las semillas de maíz variedad INIAP 101, en bandejas de germinación de plástico con 50 alveolos y 9 cm de profundidad; el sustrato utilizado 50% tierra negra, 25% humus y 25% pomina. Las bandejas de germinación fueron colocadas en la cámara de germinación con una humedad al 90% y una temperatura promedio de 25°C. Una vez que las plántulas se desarrollaron hasta los 10 cm, aproximadamente 15 días, se las trasplantaron a macetas de 5 litros de capacidad. Después del trasplante se instaló un sistema de riego por goteo con un timer programado para cada hora 2 litros por cada maceta.

Fase de laboratorio

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

Insumos

Se utilizarán los siguientes insumos: vasos de precipitación, frascos tarados, matraz Erlenmeyer, probetas, cajas de Petri, pipetas, puntas de pipetas, tubos de ensayo, gradillas, espátula, asas de inoculación, mechero de alcohol, alcohol, papel aluminio, papel reciclado, marcadores, cinta métrica, y tubos de centrifuga de 50 ml.

Biológicos

Plantas de maíz (*Zea mays*) variedad (INIAP101) en etapa juvenil, *B.subtilis* CtpxS2-1 y Ctpx3-5 formulados acorde con (Yáñez *et al.*, 2023)

Equipos

Se utilizaron los siguientes equipos: cámara de flujo laminar, incubadora, vórtex, balanzas, autoclave, espectrofotómetro, medidor de clorofila (OPTI- SCIENCES CCM-200 plus), baño maría digital, contador de colonias manual, y centrifugadora.

Medios de cultivo

Se utilizaron los siguientes medios: Agar nutritivo levadura dextrosa (NYDA) (8 gr caldo nutritivo, 5 gr extracto de levadura, 10 gr dextrosa y 15 gr Agar), medio Ashby, medio Pikovskaya y agua destilada.

Control de calidad de *B. subtilis*

Se preparó un banco de dilución con 9 ml de agua destilada esterilizada en tubos de ensayo. Se tomó una muestra de 1 ml del medio de bajo coste y se añadió al tubo de ensayo, esta fue la dilución 10^{-1} , a partir de esta dilución se realizaron diluciones crecientes hasta 10^{-7} . Mediante plateo en medio NYDA (8 gr caldo nutritivo, 5 gr extracto de levadura, 10 gr dextrosa y 15 gr Agar) se realizó este proceso para cuantificar la población viable y expresarla en UFC/ml (Yáñez y Falconí, 2018; Falconi *et al.*, 2022).

Inoculación de *B. subtilis* Ctpx 2-1 y Ctpx 3-5 en plantas de maíz.

Para la inoculación de los tratamientos en las plantas de maíz se prepararon 1800 ml de solución (50 ml por planta) de inóculo de *B. subtilis* por tratamiento, la inoculación de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 se realizó en la rizósfera de cada planta a una concentración de 1×10^6 UFC/ml cada 15 días durante tres meses. Para estandarizar el proceso se realizó la inoculación en horas de la mañana.

VARIABLES A MEDIR

Índice de clorofila

Para el índice del contenido de clorofila se realizaron lecturas de cada planta luego de 48 horas de la inoculación con la ayuda de un medidor de clorofila CCM-200 Chlorophyll Content Meter (opti-Sciences).

Altura de la planta

Se evaluó la altura de las plantas de maíz (*Zea mays*) previo a cada inoculación. Con la

ayuda de un flexómetro se midió la altura de cada planta desde la base del cuello del tallo hasta la parte más alta del entre nudo del tallo. Se anotaron los datos obtenidos en un cuaderno de campo, cada 15 días durante 3 meses.

Dinámica poblacional de *B.subtilis*

Al tercer día, después de la aplicación del tratamiento con *B.subtilis* de las cepas *CtpxS2-1* y *CtpxS3-5* se colectaron muestras del suelo adyacente a la raíz (rizosfera, 1g), mismas que fueron sometidas a pasteurización (baño maría 80 °C) x 20 min. Se depositaron en tubos de ensayo con agua destilada (9 ml) y se realizó un banco de dilución (1×10^{-4}) siguiendo la metodología (Yáñez y Falconí *et al.*, 2023), luego se tomaron alícuotas de 50 μ l y se depositó en cajas Petri en medio NYDA (8 gr caldo nutritivo, 5 gr extracto de levadura, 10 gr dextrosa y 15 gr Agar) luego de esto se realizó un rastrillado simple, se incubaron a 30 ° C por 24 horas (Figura 3). Con los datos recolectados cada 15 días, se construyó una gráfica de la población viable y total.

Figura 3

Procedimiento para la dinámica poblacional



Nota: En la figura A) Preparación de la solución para la inoculación de *B. subtilis*; B) Inoculación de *B. subtilis* en la rizosfera de la planta; C) Toma de 1gr de la muestra; D) Pesaje de la muestra; E) Siembra de las muestras en medio NYDA; F) Conteo de colonias de *B. subtilis*

Ácido indolacético

La concentración de AIA se midió mediante la metodología de Salkowski (Cardenas & Mantilla, 2007) para la preparación de este reactivo se utilizó 0.5M de FeCl_3 , 49 ml de agua y 49 ml de ácido perclórico y para su lectura se utilizó un espectrofotómetro a 645nm y 663nm. Para el análisis se tomaron muestras de raíz por tratamiento, se pesó 1gr de la raíz y se procedió a macerar finamente, se colocaron en tubos de ensayo con etanol al 95% previamente rotulados y cubiertos de papel aluminio para evitar la degradación de AIA, se dejó reposar las muestras en un refrigerador a -4°C por 24 horas. Se centrifugó las muestras a 100 RPM durante 15 minutos, se transfirió 3ml de reactivo Salkowski y se dejó reposar por media hora, las muestras fueron llevados a un cuarto oscuro para medir en el espectrofotómetro a 645nm y 663nm.

Biomasa

Se tomaron y pesaron las muestras de la parte aérea de la planta y raíz. Se picaron las muestras y se colocaron en fundas de papel rotuladas de cada tratamiento. Se colocaron las fundas de papel en la estufa a 100°C durante 24 horas (Figura 4). Una vez secas las muestras se determinó la biomasa con la siguiente fórmula para determinar la materia seca:

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

Figura 4

Peso fresco y seco de las plantas de maíz



Nota. Autoría propia

Concentración de clorofila espectrofotómetro

Para la medición de clorofila se tomaron hojas de cada planta de maíz de cada tratamiento, se pesó 1g de muestra de tejido vegetal, luego se colocaron las muestras en un mortero con 3 ml de etanol al 95% para moler por completo. Se colocaron las muestras en tubos de ensayo y se aforó a 6.25ml con etanol al 95% se añadió una pizca de CO_3Ca para neutralizar los compuestos ácidos y prevenir la pérdida parcial de Mg^{2+} , luego se procedió a centrifugar las muestras durante 15 minutos. De la solución centrifugada se tomó 1ml de la muestra para leer su absorbancia a 645 y 663nm en el espectrofotómetro para poder determinar la clorofila total, clorofila A y clorofila B (Tabla 4) (Ravindra, 2013).

Tabla 4

Ecuaciones para la obtención de clorofila en laboratorio medidas en ug/ml

Clorofila (ug/ml)	Ecuaciones
Clorofila A	$\text{Ch-a} = 12.25 * A_{663} - 2.78 * A_{645}$
Clorofila B	$\text{Ch-b} = 21.50 * A_{645} - 5.10 * A_{663}$
Clorofila Total	$\text{Ch-T} = \text{Ch-a} + \text{Ch-b}$

Nota. Tomado de (Ravindra, 2013)

CAPITULO IV

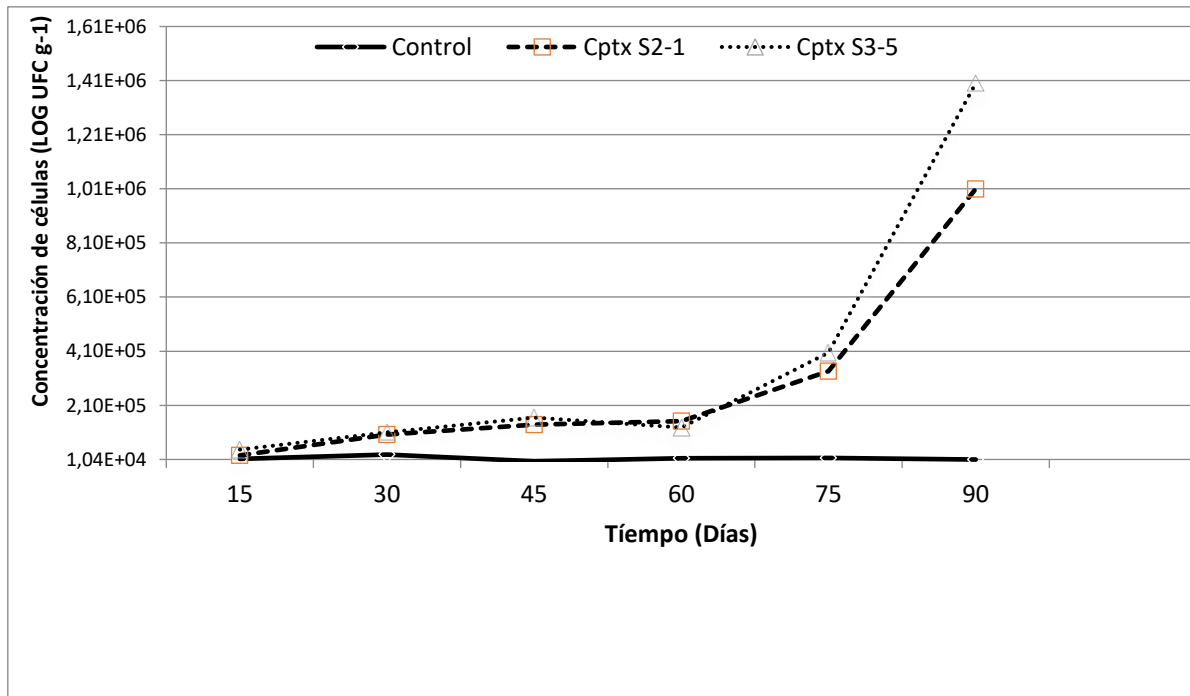
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dinámica poblacional de *B.subtilis*

Los datos obtenidos sobre las muestras colectadas de la rizósfera cada 15 días luego de realizada la inoculación de células de *B.subtilis* 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 (Figura 5).

Figura 5

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.



Nota. Autoría propia

Altura

Tabla 5

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

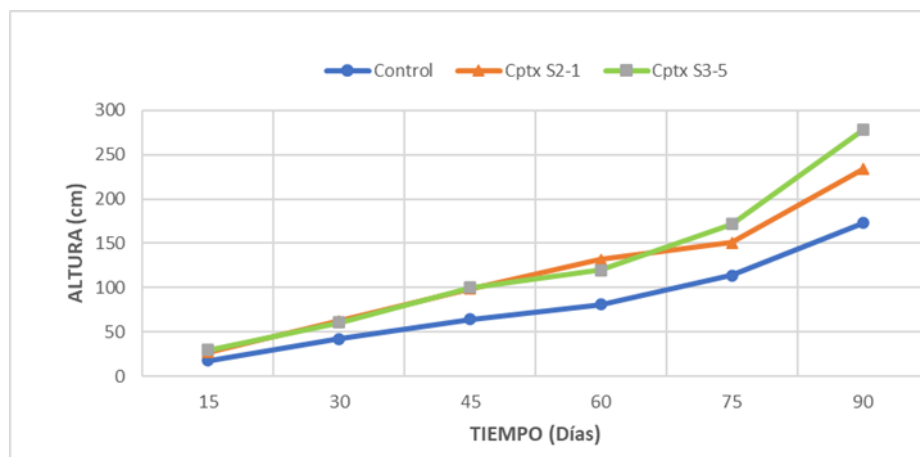
Tratamientos	Altura (cm)	
Control	81,93±51,32	A
<i>B. subtilis</i> Cptx S2-1	117,48±67,54	B
<i>B. subtilis</i> Cptx S3-5	126,71±82,49	B

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

Los datos de la variable altura no cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad por lo tanto se realizó un análisis de varianza no paramétrico de acuerdo Kruskal Wallis. La altura en cm mostró diferencias estadísticas significativas al aplicar los tratamientos con las cepas ($p = 0,0416$). Las plantas que fueron inoculadas con *B. subtilis* cepa S3-5 presentaron mayor altura seguido de la cepa S2-1 a diferencia del control (Tabla 4).

Figura 6

Variación de la altura de las plantas de maíz por efecto de células de B. subtilis a lo largo de 90 días.



Nota. Autoría propia

Índice de clorofila

Tabla 6

Índice de contenido de clorofila de plantas de maíz por efecto de células de B. subtilis.

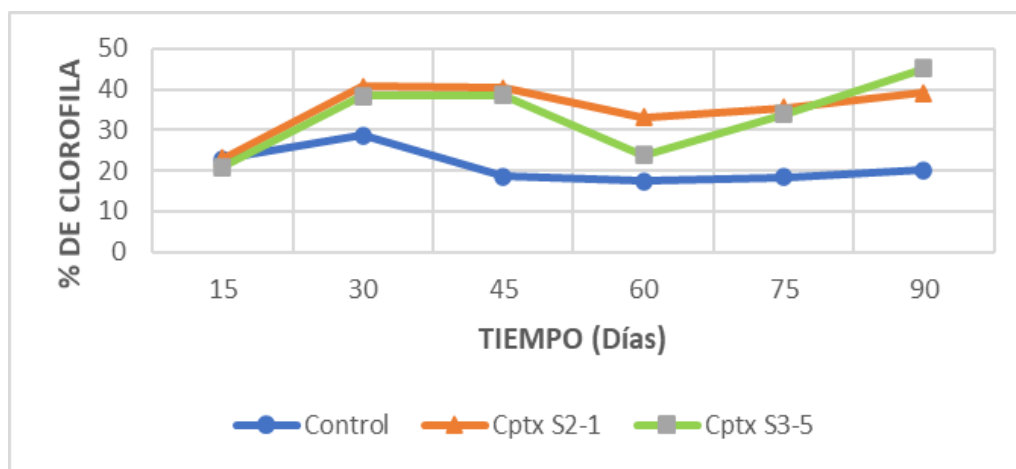
Cepa	Índice de Clorofila	
<i>B. subtilis</i> Cptx S2-1	35,31±9,39	A
<i>B. subtilis</i> Cptx S3-5	33,46±10,29	A
Control	21,01±6,56	B

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

El porcentaje de clorofila medido en la planta fue diferente al aplicar las diferentes cepas ($F_{2;105} = 27,54; p < 0,0001$). Se observa que la aplicación de ambas cepas sobre las plantas provocó el mayor porcentaje de clorofila.

Figura 7

Variación del Índice de contenido de clorofila de plantas de maíz por efecto de la inoculación células de B. Subtilis a lo largo de seis inoculaciones.



Nota. Autoría propia

Clorofila espectrofotómetro

Tabla 7

Clorofila A, clorofila B y clorofila total de plantas de maíz variedad INIAP 101 por efecto de células de *B. subtilis* a lo largo de seis inoculaciones.

Tratamiento	A	B	Total
Control	18,48±3,56	31,41±10,79	49,89±10,30
<i>B. subtilis</i> Cptx S2-1	18,47±3,29	31,73±5,59	50,20±8,96
<i>B. subtilis</i> Cptx S3-5	18,10±2,92	31,13±5,30	49,23±8,20
Valor F	0,11	0,06	0,07
Valor p	0,8972	0,9406	0,932

Nota. Autoría propia Media ± desviación estándar de clorofila A, clorofila B y clorofila total medida en ug/mL

Las medidas de clorofila A ($F_{2;69} = 0,11; p = 0,8972$), clorofila B ($F_{2;69} = 0,06; p = 0,9406$) y clorofila total ($F_{2;69} = 0,07; p = 0,932$) no presentaron diferencias al aplicar las cepas. No obstante, se observó que la cepa *Cptx S2-1* tiende a causar una mayor cantidad de clorofila B y clorofila total; así como también se encontró que en la clorofila A tiende a ser mayor cuando no se aplica ninguna cepa.

Biomasa

Tabla 8

% 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.

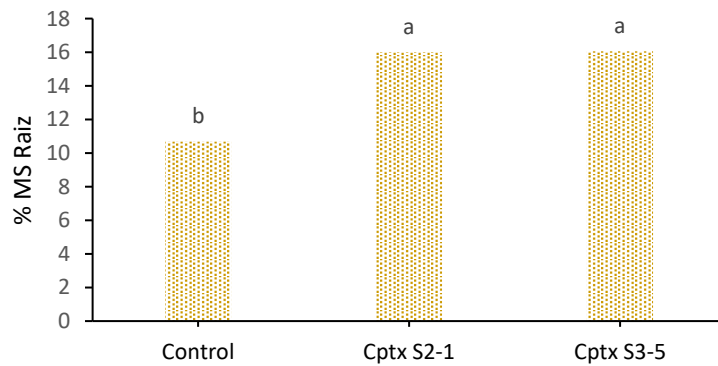
Tratamiento	% MS Planta	% MS Raíz	% MS Total
Control	18,76±2,15 b	10,68±2,47 b	18,26±1,73 b
Cptx S2-1	41,64±8,63 a	15,99±1,69 a	38,49±7,58 a
Cptx S3-5	23,27±3,32 b	16,06±1,77 a	20,87±2,91 b

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

Los datos obtenidos muestran que el mayor porcentaje de materia seca en la planta y el mayor porcentaje de materia seca total se obtuvo con el tratamiento *B. subtilis* Cptx S2-1, mientras que para el porcentaje de materia seca de raíz no se obtuvo diferencias significativas entre los dos tratamientos Cptx S2-1 y Cptx S3-5, a diferencia del control que presentó los valores más bajos.

Figura 8

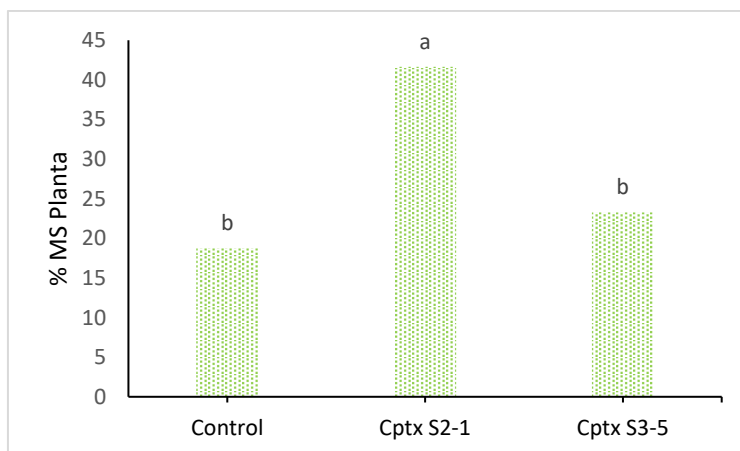
% Materia seca de raíz en maíz variedad INIAP 101 por efecto de la inoculación de células de B. subtilis a lo largo de 90 días.



Nota. Autoría propia

Figura 9

% 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.



Nota. Autoría propia

Ácido indolacético

Tabla 9

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.

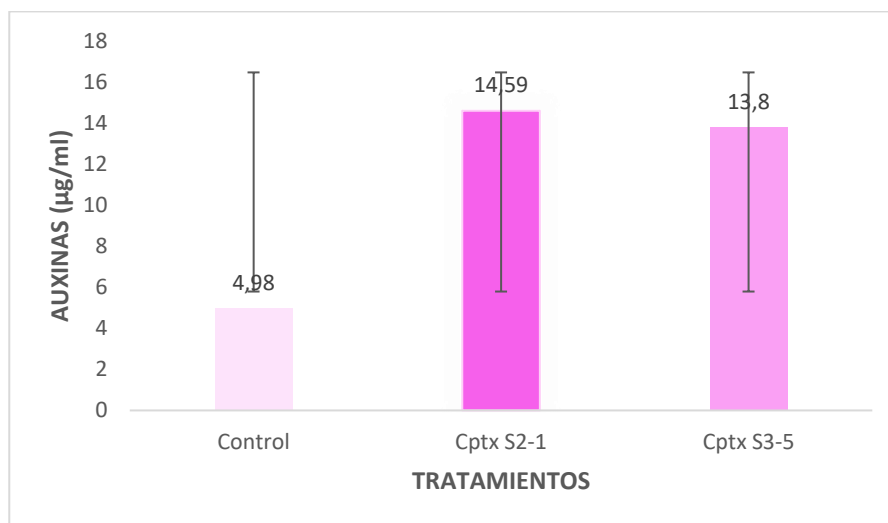
Cepa	Auxinas ($\mu\text{g/ml}$)	
<i>B.subtilis</i> Cptx S2-1	14,59 \pm 3,87	A
<i>B.subtilis</i> Cptx S3-5	13,80 \pm 3,67	A
Control	4,98 \pm 1,25	B

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

La aplicación de las cepas causó diferencias significativas sobre la cantidad de auxinas en las plantas ($F_{2;15} = 17,09; p < 0,0001$). Se encontró que la mayor cantidad de auxinas se obtuvo con la aplicación de las cepas *Cptx S2-1* y *Cptx S3-5*.

Figura 10

Cantidad de auxinas de las plantas de maíz variedad INIAP 101 bajo el efecto de la inoculación de células de B. subtilis a lo largo de 90 días.



Nota. Autoría propia

Figura 11

Concentración de ácido indolacético (ug/ml) por efecto de la inoculación de células de *B. subtilis* a lo largo de 90 días en plantas de maíz variedad INIAP 101.

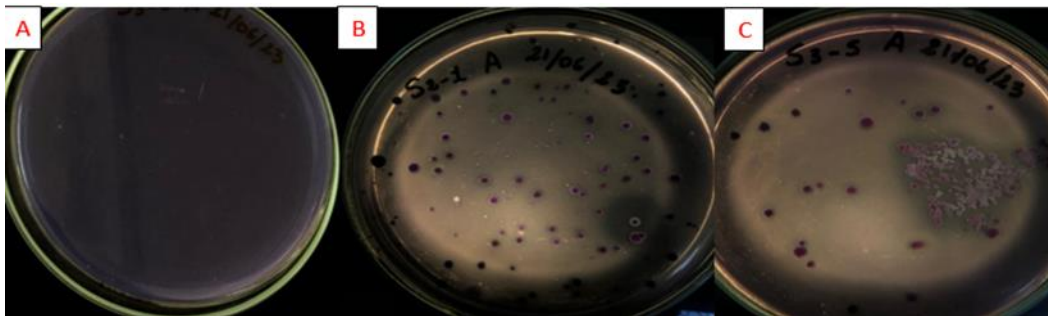
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Control			
Control			
<i>B.Subtilis Cptx S2-1</i>			
<i>B.Subtilis Cptx S2-1</i>			
<i>B.Subtilis Cptx S3-5</i>			
<i>B.Subtilis Cptx S3-5</i>			

Nota. Autoría propia

Solubilización de fósforo

Figura 12

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



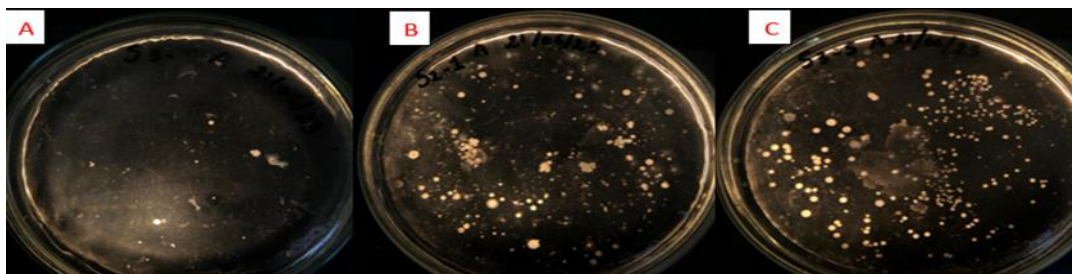
Nota: A) Placa control no existe crecimiento de *B. Subtilis*; B) Crecimiento de *B. Subtilis* cepa *Cptx S2-1* halos de color naranja; C) Crecimiento de *B. Subtilis* cepa *Cptx S3-5*

Se observa la formación de halos en las cepas de *B. subtilis* cepas *Cptx S2-1* y *Cptx S3-5* en medio *Pikovskaya*+ Azul de Bromofenol formando una zona clara alrededor de la colonia, debido a la solubilización de fosfato mediada por enzimas bacterianas como las fosfatasas a diferencia del control que no tuvo crecimiento.

Fijación de nitrógeno

Figura 13

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 en medio Ashby Manitol ;C) Crecimiento de UFC *B.subtilis* cepa S3-5.

Se evidencia el crecimiento de colonias expresado en UFC/ml de las cepas *Cptx S2-1* y *Cptx S3-5* donde la fijación del nitrógeno fue mediada por *B.subtilis* a diferencia del control que no se aplicó el tratamiento.

Discusión

Las medias para las variables altura de plantas inoculadas con *B. subtilis* cepa *Cptx S2-1*, *Cptx S3-5* presentaron diferencias significativas entre si durante los 90 días que duro la fase experimental a diferencia del control. La cepa de *B. subtilis Cptx S3-5* presentó mayor altura que los demás tratamientos seguido de la cepa *Cptx S2-1*(Tabla 3). Los datos obtenidos coinciden con (Paredes, 2021) quienes mencionan que la altura de las plantas de *Zea mays* de los tratamientos aplicados con *B. subtilis* es mayor frente al control (Chagas *et al.*, 2018) en su estudio muestra que para %masa seca de raíz y planta (MSR) hubo una diferencia significativa, siendo superior a los tratamientos con *Bacillus* y *Trichoderma* inoculados por separado como es el caso de este estudio donde las cepas *B.subtlis CptxS2-1* y *CptxS3-5* presentaron mayor %masa seca de raíz y planta (MSR) frente al control a los 90 días.

El estudio realizado por (Falconí y Yáñez, 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. Los datos obtenidos concuerdan con lo antes mencionado donde el tratamiento con mayor índice de clorofila fue para las plantas inoculadas con las cepas *B. subtilis Cptx S2-1* con un valor de $35,31 \pm 9,39$, *Cptx S3-5* $33,46 \pm 10,29$ mientras que el control tuvo un valor de $21,01 \pm 6,56$. Rodríguez *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.

Los datos obtenidos de ácido indolacético coinciden con Chagas *et al.* (2022) donde todos los aislados de *B. subtilis* utilizados fueron capaces de producir cantidades de AIA la mayoría de los aislamientos (Bs2, Bs4, Bs5, Bs6 y Bs10) proporcionaron una mayor producción de AIA en presencia del aminoácido inductor triptófano, donde la producción de AIA varió de 0.35 a 2.46 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$; con ello demuestran que la biosíntesis de AIA por bacterias ocurre a través de diferentes rutas metabólicas, siendo el aminoácido triptófano el principal precursor de la síntesis de AIA. Sin embargo, también existen vías independientes del triptófano, lo que explica que los aislados de *B. subtilis* produzcan AIA, como es el caso del presente estudio donde las cepas *Cptx S2-1* presenta un valor de $14,59 \mu\text{g mL}^{-1}$, *Cptx S3-5* con un valor de $13,80 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente al control con un valor de $4,98 \mu\text{g mL}^{-1}$.

De acuerdo con Mejía *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 los mecanismos y formas en que las rizobacterias llevan a cabo la solubilización del fosfato son a través de la secreción y producción de ácidos orgánicos. También se menciona que las enzimas fosfatasas actúan en el proceso de mineralización. Entre los ácidos orgánicos secretados durante la actividad de

solubilización, se han reportado ácido láctico, isovalérico, isobutírico y acético, esta actividad reviste de gran importancia para mejorar la adquisición de fosfatos por la planta, ya que, por sus características, cuando se agrega en forma de fertilizante al suelo, el fosfato es complejoado con el calcio, fierro o aluminio presente, formando especies insolubles, no disponibles para la planta. Por lo que se demuestra que las rizóbacterias 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, tal como se observa en los resultados encontrados en este estudio donde existe crecimiento de halos en la cepa *B. subtilis* Cptx S2-1 y Cptx S3-5 a diferencia del control, demostrando que la producción de ácidos orgánicos por las bacterias disminuye el pH, el cual a la vez favorece la solubilización de fosfatos.

Para el aislamiento y selección de bacterias fijadoras de nitrógeno Gallegos y González (2020) demostraron que de los once aislados seleccionados, se encontró crecimiento utilizando el medio NFb, indicando la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. NFb es un medio selectivo que carece de nitrógeno combinado, permite recuperar microorganismos que poseen el complejo enzimático de la nitrogenasa para reducir el nitrógeno atmosférico a nitratos o amonio, y aprovecharlo en su metabolismo en el presente estudio se utilizó medio Ashby un agar especial que, por estar libre de nitrógeno, facilita la identificación de potenciales cepas de bacterias para la fijación de nitrógeno. 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), por lo que utilizando este medio se observó crecimiento en las cepas *B. subtilis* Cptx S2-1 y Cptx S3-5 donde las colonias presentaron forma irregular, color crema, con bordes entre lobulada, aserrada y ondulada a diferencia del control que no tuvo crecimiento.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

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* presentan diferencias significativas en el contenido de ácido indolacético a diferencia del control.
- La presencia 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 y biomasa, 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.

Bibliografía:

- Balaraju, K., Park, K. S., Nam, K. W., Park, J. W., y Park, K. (2014). Growth promotion and induced disease suppression of four vegetable crops by a selected plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strain *Bacillus subtilis* 21-1 under two different soil conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(6), 1353–1362.
<https://doi.org/10.1007/s11738-014-1514-z>
- Cárdenas y Mantilla. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var yoko ono) en período de enraizamiento*. [Trabajo de Grado, Pontificia Universidad Javeriana]. <http://hdl.handle.net/10554/8381>
- Chagas, Braga, G., Lima, C. A., Martins, A. L., Souza, M. C., y Chagas, L. F. B. (2022). *Bacillus subtilis* como inoculante promotor de crecimiento vegetal em soja. *Diversitas Journal*, 7(1), 0001–0016. <https://doi.org/10.48017/dj.v7i1.2071>
- Chagas, L., Martins, A., Carvalho, M., Miller, L. de O., Oliveira, J. C. de, y Chagas Junior, A. F. (2018). *Bacillus subtilis* E *Trichoderma* sp. No incremento da biomassa em plantas de soja, feijão-caupi, milho e arroz. *Agri-environmental sciences*, 3(2), 10–18.
<https://doi.org/10.36725/agries.v3i2.430>
- Corrales, K. (2018). *Evaluación del efecto de lipopéptidos antifúngicos producidos por Bacillus subtilis ctpx s2-1 en la inducción de expresión de genes de crecimiento y resistencia de Lupinus mutabilis*. [Trabajo de Titulación, Universidad de las Américas].
<https://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/10259>
- Dufour, S. E., Veening, J.-W., Arrebola, E., Cazorla, F. M., Kuipers, O. P., Paquot, M., y Pérez, A. (2007). The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 20(4), 430–440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>

- Gallegos y González. (2020). Native *Bacillus* spp. Strains as sustainable alternative in the yield of corn forage. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 323–331.
<https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.690>
- Google Maps. (2023). *Mapa Satelital IASA I(Carrera Agropecuaria Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE)Sangolquí*. https://www.google.com/maps/place/IASA/@-0.4229716,-78.4128095,269m/data=!3m1!1e3!4m6!3m5!1s0x91d5bbbd8644851b:0xc6c8b2bb6c026969!8m2!3d-0.3856423!4d-78.4164022!16s%2Fg%2F11xpb5x_8
- Hernández, A., Arthur, R., Mera, L., Mapes, C., y Kato, Á. (2009). *Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. [Archivo PDF].
https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/versiones_digitales/Origen_deMaiz.pdf
- Hernández, B., Rojas, M., y Heydrich, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 42, 131–138.
<https://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>
- Lemus, A. (2021). “*Multiplicación en Medio Líquido de Microorganismos del Género Streptomyces Aislados de un Nicho Ecológico del Campus Belmonte de la Universidad Libre Seccional Pereira*”. [Archivo PDF]. <http://media.utp.edu.co/vicerrectoria-de-investigaciones/archivos/ponencia%20%20multiplicacion%20en%20medio%20liquido.pdf>
- Licto, S. (2017). “*Estudio de la Biofortificación Foliar con diferentes fuentes de Zinc en Rye Grass Perenne (Lolium perenne) Variedad Amazon*”. [Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/14410>
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140(5), 943–950. <https://doi.org/10.1242/dev.086363>

- Méndez, C., y Gutiérrez, A. (2019). *Evaluación del efecto de Bacillus subtilis en la promoción del crecimiento en maíz (Zea mays L.)*. [Tesis, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas]. <https://repositorio.unicach.mx/handle/20.500.12753/448>
- Morales, E. (2015). *Manejo de cultivos andinos del ecuador* (Vol. 1). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/10163>
- Ongena, M., y Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115–125.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., y Thonart, P. (2005). Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of Bacillus subtilis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(1), 29–38. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1940-3>
- Paredes, (2021). *Efecto de la aplicación de Bacillus y Streptomyces spp. nativas en el desarrollo vegetativo y rendimiento de Zea mays L., maíz, amarillo duro en Lambayeque*. [Tesis, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo].
<https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/793>
- Peñaherrera, D. (2011). *Manejo integrado del cultivo de maíz de altura*. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP. [Archivo PDF].
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/3302/1/iniapscpm190.pdf>
- Pereira, J. F. B., Gudiña, E. J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J. A., Coutinho, J. A. P., y Rodrigues, L. R. (2013). Optimization and characterization of biosurfactant production by Bacillus subtilis isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, 111, 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.040>
- Ravindra, (2013). One-Pot Synthesis of Cyclic Carbonates from Aldehydes, Sulfur Ylide, and CO₂. *Synlett*, 25(01), 97–101. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1340072>

- Rodríguez, A., y Velasco, A. (2020). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Revista Terra Latinoamericana*, 38(2), 333–345.
<https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.470>
- Rodríguez, M. G., Gallegos, M. Á., Rodríguez, L., Fortis, M., Guadalupe Luna, J., y González, U. (2020). Native *Bacillus* spp. Strains as sustainable alternative in the yield of corn forage. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 323–331. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.690>
- Saavedra, G. (2017). *Clasificación botánica, germinación y desarrollo*. [Archivo PDF].
<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/7802/NR40103.pdf?sequence=6&isAllowed=y>
- Sánchez, J. (2020). Plant growth promotion of commercial vegetable crops by *Bacillus* strains. *Acta Agronomica*, 69(1), 54–60. <https://doi.org/10.15446/acag.v69n1.79606>
- Shen, Q., y Ran, W. (2011). Inoculation of soil by *Bacillus subtilis* Y-IVI improves plant growth and colonization of the rhizosphere and interior tissues of muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 47(5), 507–514. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0558-0>
- Tejera, B., Heydrich, M., y Rojas, M. (2013). Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agronomía Mesoamericana*, 24(2), 357.
<https://doi.org/10.15517/am.v24i2.12535>
- Ulrike. (2008). Auxin: at the root of nodule development. *Functional Plant Biology*, 35(8), 651.
<https://doi.org/10.1071/FP08177>
- Vera, S. P., y Bonilla, R. R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 159–166.
https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:227
- Yáñez, V., y Falconí, C. (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, V., Falconí, C. E., y Kanaley, K. (2023). Production optimization of antifungal lipopeptides by *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 using low-cost optimized medium. *Biological Control*, 185, 105306. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105306>
- Yáñez, 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>
- Zambrano, J.L., Velásquez, J., Peñaherrera, D., Sangoquiza, C., Cartagena, Y., Villacrés, E., Garcés, S., Ortíz, R., León, J., Campaña, D., López, V., Asaquibay, C., Nieto, M., Sanmartín G., Pintado, P., Yáñez, C., y Racines, M. (2021). *Guía para la producción sustentable de maíz en la Sierra ecuatoriana*. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. [Archivo PDF]. <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5796/1/GUIA%20CULTIVO%20DE%20MAIZ%202021-1.pdf>