



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Evaluación de células y sobrenadantes de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre el crecimiento de arándano *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi

Proaño Grijalva. Brayhant Michael

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

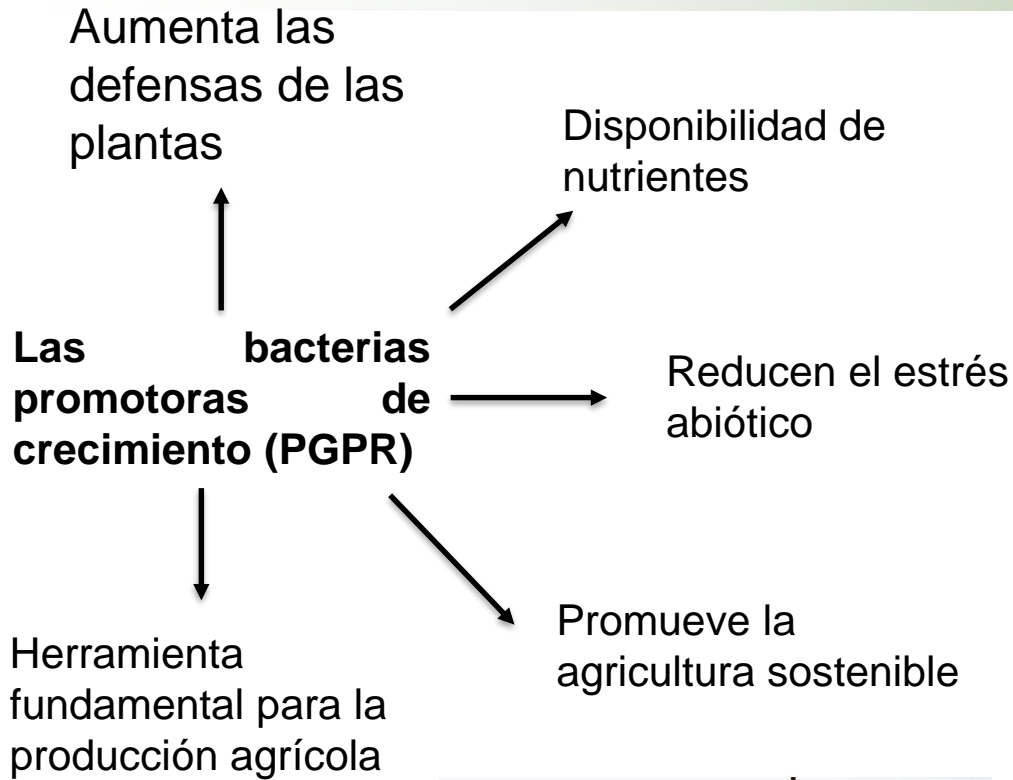
Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de Titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario

Ing. Falconí Saá, César Eduardo Ph.D

15 de agosto de 2022





Promotor del crecimiento



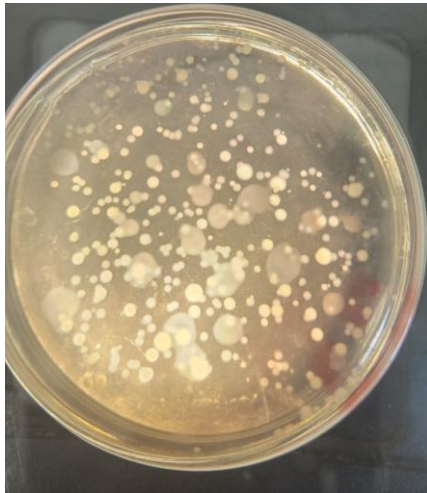
Antagonista de una variedad de patógenos *in vitro*

Endófito de las raíces de las plantas



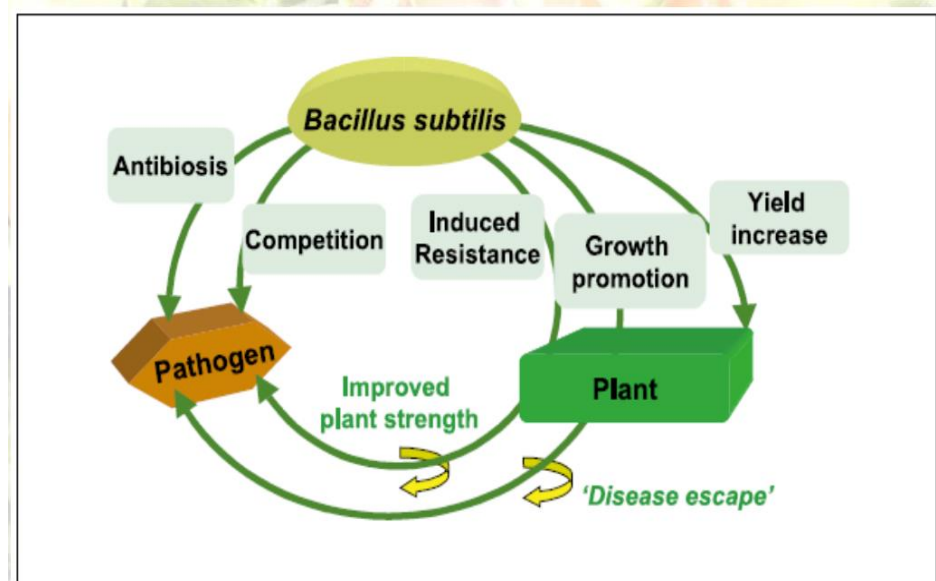
Las bacterias del género *Bacillus* son:

- Formar esporas resistentes al estrés de larga vida.
- Secretar metabolitos que estimulan el crecimiento de las plantas.
- Previenen la infección por patógenos.
- Quimiotaxis
- Asimilación de nutrientes



Mecanismo de control biológico directo e indirecto

- Propiedades antimicrobianas
- Lipopeptidos
- Exoenzimas
- Compuestos volátiles
- **Bioestimulante radicular**

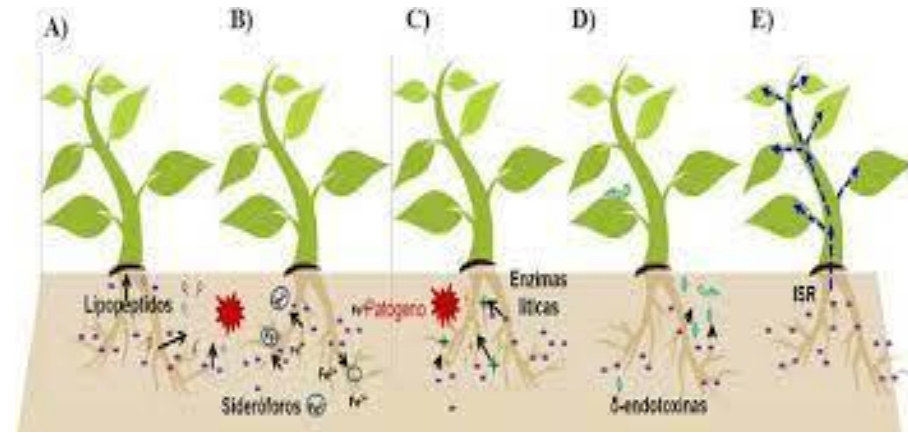


Mecanismos indirectos asociados con la actividad de biocontrol de *B. subtilis* (Lee et al., 2014).

Los efectos de *Bacillus spp.*, como biofertilizantes en plantas vegetal (Posada Uribe, 2017).



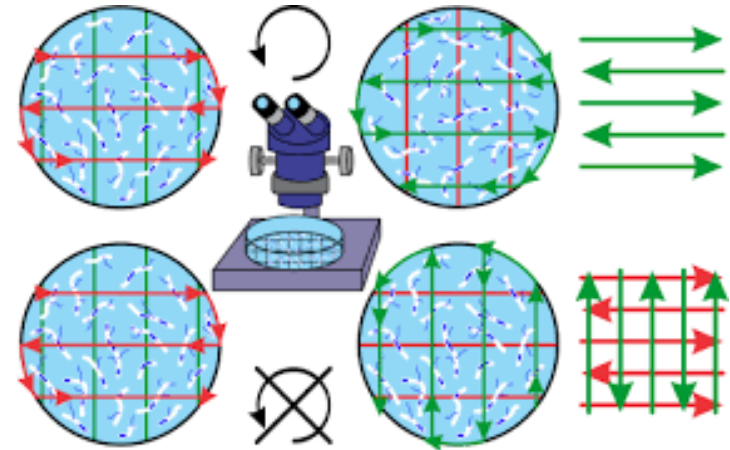
- Formación de biopelículas.
 - Crecimiento vegetal
 - Competencia por nutrientes
 - Capacidad inducir lisis celular
-
- Mejorar el crecimiento y rendimiento de los cultivos.
 - Fijación de nitrógeno.
 - Solubilización de fosforo.
 - Promover hormonas para el crecimiento vegetal.



JUSTIFICACIÓN

B. subtilis es capaz de producir fitohormonas, Blake et al. (2021) observaron que la inoculación con una cepa de *B. subtilis* productora de citoquinina condujo a una acumulación significativamente mayor de citoquinina en las plantas de lechuga, lo que resultó en un mejor crecimiento y rendimiento.

Yáñez-Mendizábal & Falconí (2018) demostraron la capacidad antifúngica de *B. subtilis* contra patógenos como *Colletotrichum acutatum* en chocho.



- Síntesis de catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa
- Sustancias precursoras de la resistencia vegetal
- Promover el crecimiento de radículas y plúmulas en semilla pre-inoculada



Objetivo General

- Evaluar la respuesta de arándano *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi por efecto de células y sobrenadantes de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5

Objetivos Específicos

- Evaluar el crecimiento de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en un medio de bajo costo.
- Determinar el efecto de células y sobrenadantes de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre las características agronómicas (altura, índice de clorofila, biomasa) de *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi
- Determinar el efecto de células y sobrenadantes de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 sobre la colonización y crecimiento de raíces de *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi cada 15 días.



- H0: Células o sobrenadantes de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 no promueven el crecimiento de plantas de arándano.
- H1: Células o sobrenadantes de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 promueven el crecimiento de plantas de arándano.



Ubicación del trabajo de investigación

Figura 1. *Visión satelital del área de desarrollo del proyecto.*



Nota: Instalaciones IASA obtenido de (Google Maps, 2020)

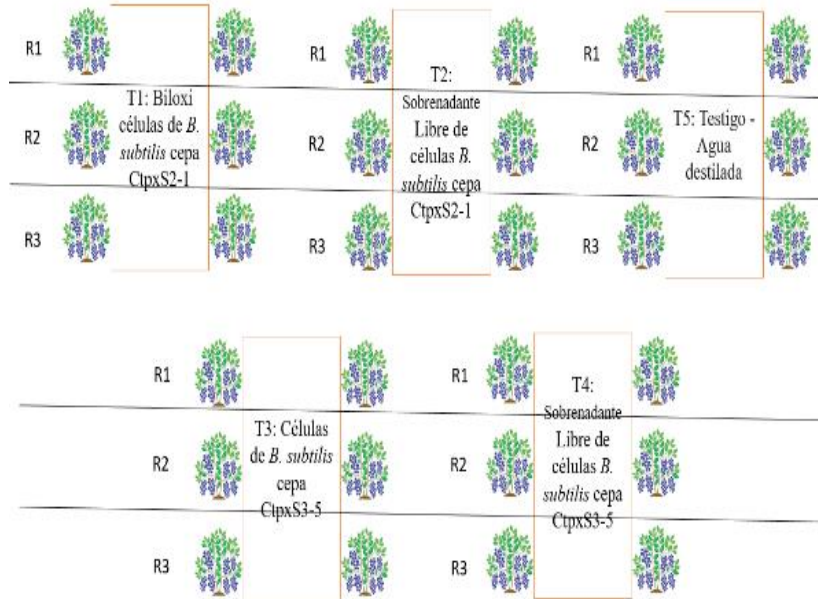
Provincia: Pichincha
Cantón: Rumiñahui
Sector: San Fernando
Latitud: 0°23'27.98" S

El estudio se llevó a cabo en el área y laboratorios de Fitopatología y Control Biológico de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I, hacienda “El Prado” (Figura 1)

Se instalaron 5 rizotrones con dimensiones (1.0 m x 0,5 a x 0,4). Se colocaron seis plantas de *Vaccinium myrtillus* var. Biloxi de un año de producción por rizotron.

Croquis del Diseño

Figura 2. Croquis del Diseño experimental



El modelo matemático fue:

$$Y_{ijk} = u + C_i + M_j + CM_{ij} + E_{ijk}$$

Se establecieron en un Diseño Completamente al Azar con arreglo bifactorial 2x2 con tres repeticiones y un testigo. Se emplearon 15 unidades experimentales y se utilizaron 2 plantas como unidad muestral.

Tabla 3. Descripción de los tratamientos del experimento

Tratamiento	Cepas <i>B. subtilis</i>	Tipo de inoculación
T1	S3-5	Células
T2	S3-5	Sobrenadantes
T3	S2-1	Células
T4	S2-1	Sobrenadantes
Testigo	-	-

Instalación de rizotrones



Siembra de plantas



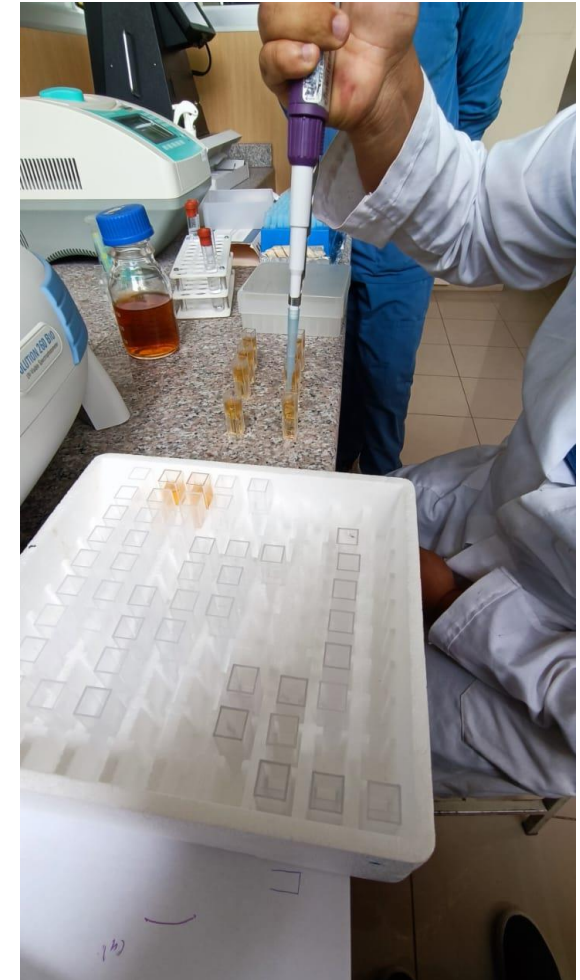
Preparación de células y sobrenadantes



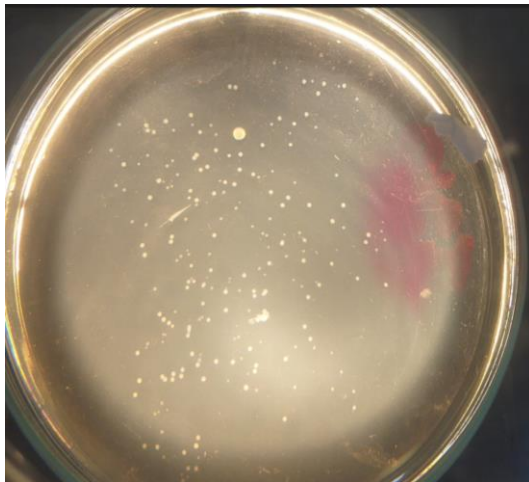
Células y sobrenadantes de *B.subtilis*



Espectrofotometría



Cuantificación de placas



Medición de variables



RESULTADOS

Tabla 2

Análisis de la varianza para el contenido de clorofila de plantas de arándano

	15 DDT		30 DDT		45 DDT		60 DDT		75 DDT		90 DDT		105 DDT		
	gl	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor		
TRATAMIENTOS	4	0.14	ns	0.25	ns	0.04	*	0,02	*	0,0002	*	<0,0001	*	<0,0001	*
CONTRASTES															
C1	1	---	---	---	---	0,52	ns	0,68	**	0,5672	ns	0,781	ns	0,4625	ns
C2	1	---	---	---	---	0,24	ns	0,37	**	0,0174	*	0,0094	*	0,147	ns
C3	1	---	---	---	---	0,07	*	0,01	*	<0,0001	*	<0,0001	*	<0,0001	*
C4	1	---	---	---	---	0,02	*	0,04	*	0,2454	ns	0,1437	ns	0,7782	ns
ERROR	25														
TOTAL	29														

Nota: C1: (Testigo vs Células o Sobrenadantes S2-1 + Células o Sobrenadantes S3-5)

C2: (Cepa S3-5 vs Cepa S2-1)

C3: Inoculación células vs Inoculación sobrenadantes

C4: Interacción Cepa x Inoculo

*** valores son significativos P<0,05, ^{ns} valores no son significativos**



RESULTADOS

Tabla 3

Media ± desviación estándar del contenido de clorofila de plantas de arándano

TRATAMIENTOS	45 DDT		60 DDT		75 DDT		90 DDT		105 DDT						
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE					
TESTIGO	12,772	± 2,1185	AB	17,527	± 0,6802	AB	19,977	± 2,0919	AB	20,862	± 3,4564	AB	22,923	± 6,3635	AB
CELULAS S2-1	17,048	± 3,374	A	20,753	± 4,7683	A	24,478	± 3,661	A	26,433	± 1,7738	A	30,453	± 3,3	A
SOBRENADANTE S2-1	11,755	± 2,967	B	14,297	± 2,9513	B	16,955	± 2,1776	B	20,317	± 5,019	B	15,005	± 4,8591	BC
CELULAS S3-5	12,55	± 1,3374	AB	16,65	± 1,5743	AB	20,04	± 2,4301	AB	24,528	± 2,0643	AB	26,433	± 7,0647	A
SOBRENADANTE S3-5	13,278	± 4,4154	AB	15,977	± 4,3723	AB	15,342	± 3,7249	B	14,003	± 4,4059	C	12,27	± 5,2795	C

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Yáñez-Mendizábal & Falconí (2018), reportaron en plántulas de chocho tratadas con *B. Subtilis* S2-1 obtuvieron los valores más altos de proteína y clorofila, además establecieron que los lipopeptidos tienen la misma capacidad de reducir enfermedades causadas por hongos.



RESULTADOS

Tabla 4

Análisis de la varianza para la altura de plantas de arándano

	15 DDT		30 DDT		45 DDT		60 DDT		75 DDT		90 DDT		105 DDT		
	gl	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor	p valor	
TRATAMIENTOS	4	0,081	ns	0,16	ns	0,0211	*	0,001	*	0,0002	*	<0,0001	*	<0,0001	*
CONTRASTES															
C1	1	---	---	---	---	0,35	ns	0,1169	ns	0,5672	ns	0,781	ns	0,4625	ns
C2	1	---	---	---	---	0,59	ns	0,7384	ns	0,0174	*	0,0094	*	0,147	ns
C3	1	---	---	---	---	0,0018	*	<0,0001	*	<0,0001	*	<0,0001	*	<0,0001	*
C4	1	---	---	---	---	0,4622	ns	0,6765	ns	0,2454	ns	0,1437	ns	0,7782	ns
ERROR	25														

TOTAL 29

Nota: C1: (Testigo vs Células o Sobrenadantes S2-1 + Células o Sobrenadantes S3-5)

C2: (Cepa S3-5 vs Cepa S2-1)

C3: Inoculación células vs Inoculación sobrenadantes

C4: Interacción Cepa x Inoculo

* valores son significativos $P < 0,05$, ns valores no son significativos



Tabla 5

Media \pm desviación estándar de la altura de plantas de arándano

TRATAMIENTOS	45 DDT		60 DDT		75 DDT		90 DDT		105 DDT						
	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE	X	DE					
TESTIGO	12,772	\pm 2,1185	AB	17,527	\pm 0,6802	AB	19,977	\pm 2,0919	AB	20,862	\pm 3,4564	AB	22,923	\pm 6,3635	AB
CELULAS S2-1	17,048	\pm 3,374	A	20,753	\pm 4,7683	A	24,478	\pm 3,661	A	26,433	\pm 1,7738	A	30,453	\pm 3,3	A
SOBRENADANTE S2-1	11,755	\pm 2,967	B	14,297	\pm 2,9513	B	16,955	\pm 2,1776	B	20,317	\pm 5,019	B	15,005	\pm 4,8591	BC
CELULAS S3-5	12,55	\pm 1,3374	AB	16,65	\pm 1,5743	AB	20,04	\pm 2,4301	AB	24,528	\pm 2,0643	AB	26,433	\pm 7,0647	A
SOBRENADANTE S3-5	13,278	\pm 4,4154	AB	15,977	\pm 4,3723	AB	15,342	\pm 3,7249	B	14,003	\pm 4,4059	C	12,27	\pm 5,2795	C

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Los porcentajes de humedad de plantas tratadas con células de *B. subtilis*, estuvieron por encima del 60%. Tao et al. (2019), determinaron en plantas de pimiento, un aumento en el número de hojas, número de brotes y área foliar



Tabla 6

Análisis de la varianza para el peso seco de plantas de arándano

	Peso seco Hojas (g)			Peso seco Tallos (g)			Peso seco Raíz (g)		
	gl	p valor		p valor		p valor			
TRATAMIENTOS	4	0,001	*	0.011	*	0,0001	*		
CONTRASTES									
C1	1	0,17	ns	0,072	ns	0,148	ns		
C2	1	0,315	ns	0,137	ns	0,822	ns		
C3	1	0,0016	*	0,019	*	0,001	*		
C4	1	0,366	ns	0,054	*	0,009	*		
ERROR	25								
TOTAL	29								

Nota: C1: (Testigo vs Células o Sobrenadantes S2-1 + Células o Sobrenadantes S3-5)

C2: (Cepa S3-5 vs Cepa S2-1)

C3: Inoculación células vs Inoculación sobrenadantes

C4: Interacción Cepa x Inoculo

*** valores son significativos $P < 0,05$, ^{ns} valores no son significativos**



Tabla 7

Media ± desviación estándar del peso seco de plantas de arándano

TRATAMIENTOS	PESO SECO HOJA				PESO SECO TALLO				PESO SECO RAIZ			
	X		DE		X		DE		X		DE	
TESTIGO	1,89	±	0,69	B	1,83	±	0,59	B	3,25	±	0,46	BC
CELULAS S2-1	3,41	±	0,79	AB	3,84	±	1,7	A	4,17	±	0,74	AB
SOBRENADANTE S2-1	1,73	±	0,49	B	2,09	±	0,92	B	3,4	±	1,17	BC
CELULAS S3-5	4,66	±	3,31	A	2,45	±	0,37	AB	5,21	±	1,01	A
SOBRENADANTE S3-5	1,8	±	0,26	B	2,26	±	0,65	AB	2,51	±	0,6	C

Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Células y sobrenadantes de *B. subtilis* promueven el crecimiento de plantas de arándano, sin embargo, el desarrollo de plantas tratadas con células aumenta en mayor grado. Los pesos frescos y secos de hojas, tallos y raíz reflejaron los efectos de *B. subtilis*, en las plantas de arándano. Además, los pesos frescos y secos del tallo de pimiento fueron mayores al usar *Bacillus subtilis* SL-13-t, esto puede ser por la producción de varias fitohormonas como auxinas, AIA y elementos de defensa como lipoproteínas y biopolímeros.



Tabla 8

Análisis de la varianza para el peso húmedo de plantas de arándano

	gl	Peso húmedo Hojas (g)		Peso húmedo Tallos (g)		Peso húmedo Raíz (g)	
		p valor		p valor		p valor	
TRATAMIENTOS	4	0,0129	*	0,0228	*	< 0,0001	*
CONTRASTES							
C1	1	0,52	ns	0,153	ns	0,192	ns
C2	1	0,275	ns	0,096	*	0,0032	*
C3	1	0,0018	*	0,0308	*	< 0,0001	*
C4	1	0,186	ns	0,079	*	0,776	ns
ERROR	25						
TOTAL	29						

Nota: C1: (Testigo vs Células o Sobrenadantes S2-1 + Células o Sobrenadantes S3-5)

C2: (Cepa S3-5 vs Cepa S2-1)

C3: Inoculación células vs Inoculación sobrenadantes

C4: Interacción Cepa x Inoculo

*** valores son significativos $P < 0,05$, ^{ns} valores no son significativos**



Tabla 9

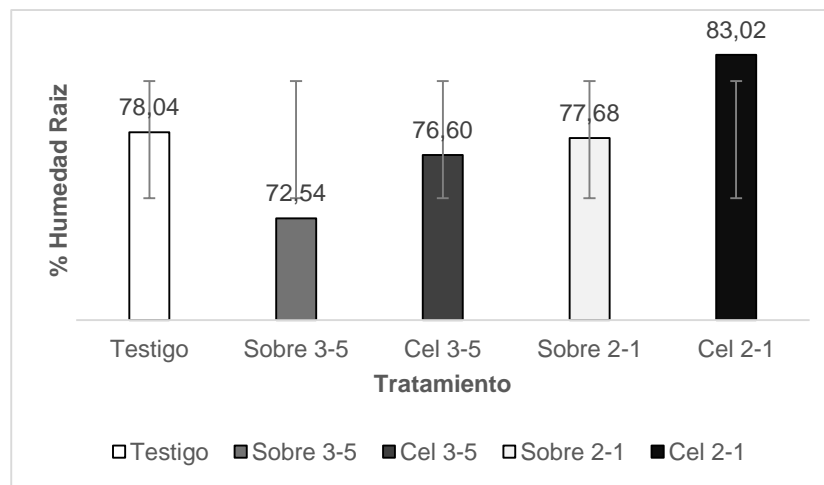
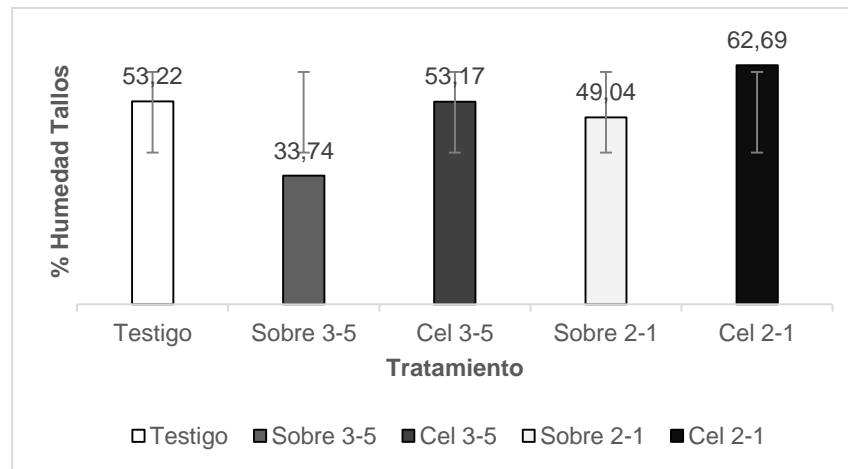
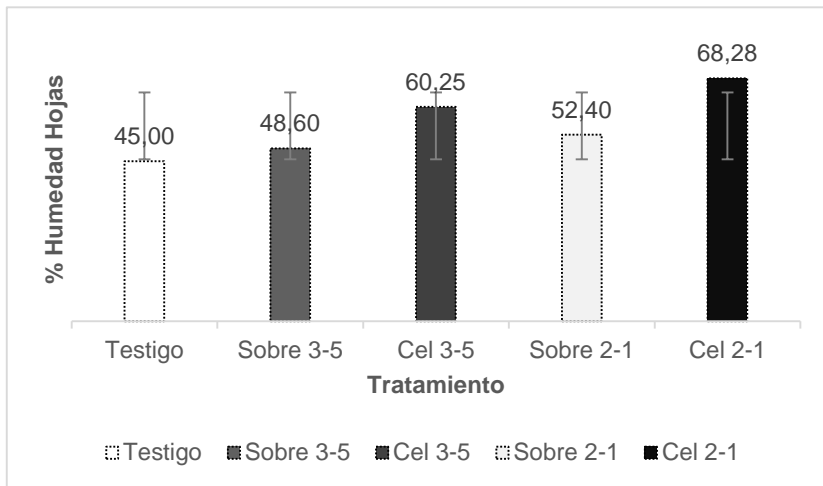
Media \pm desviación estándar del peso húmedo de plantas de arándano

TRATAMIENTOS	PESO HUMEDO HOJA				PESO HUMEDO TALLO				PESO HUMEDO RAIZ			
	X	DE			X	DE			X	DE		
TESTIGO	6,65	\pm 1,58	BC		3,98	\pm 1,29	C		15,27	\pm 3,12	BC	
CELULAS S2-1	12,72	\pm 2,11	A		5,09	\pm 1,26	AB		25,02	\pm 3,67	A	
SOBRENADANTE S2-1	5,16	\pm 2,01	C		4,58	\pm 1,58	AB		15,72	\pm 1,17	BC	
CELULAS S3-5	8,67	\pm 2,26	AB		8,96	\pm 2,33	A		19,23	\pm 2,67	AB	
SOBRENADANTE S3-5	4,77	\pm 0,99	C		4,47	\pm 1,21	AB		2,51	\pm 2,29	C	

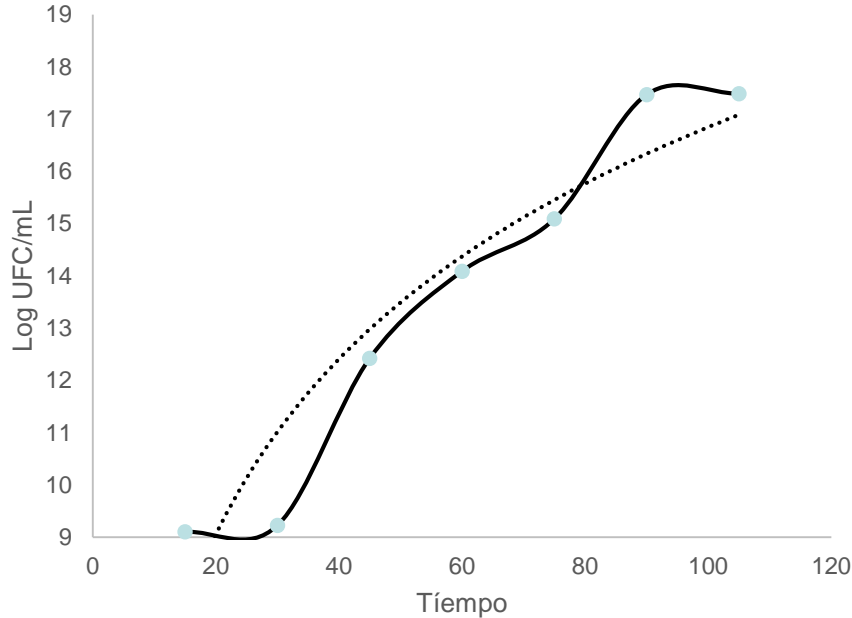
Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



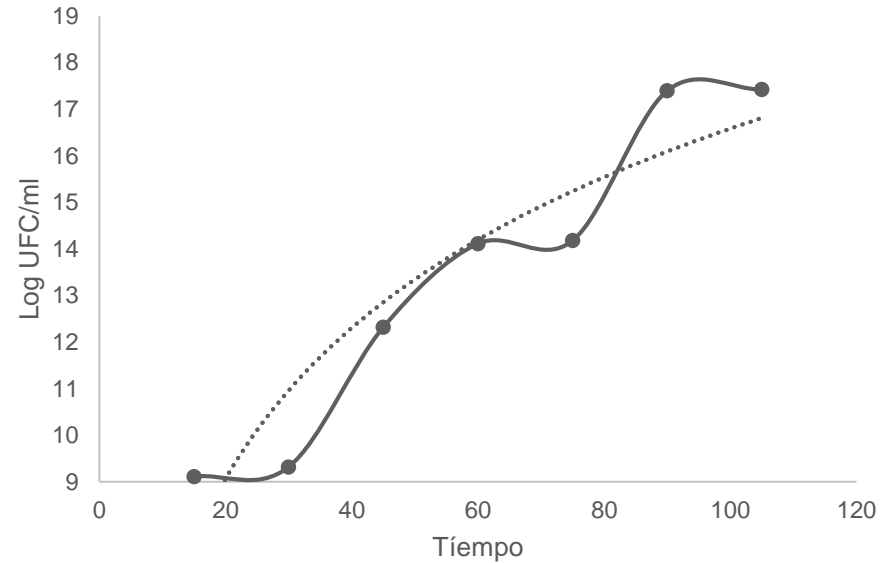
Porcentaje de humedad plantas de arándano por efecto de inoculación con células y sobrenadantes.



Dinámica poblacional células *B. Subtilis* S3-5



Dinámica poblacional células *B. Subtilis* S2-1



B. subtilis es una bacteria con la capacidad de establecerse, crecer y multiplicarse de manera rápida en el tiempo. Los metabolitos primarios encargadas del crecimiento son sintetizadas durante la fase exponencial, mientras que los metabolitos secundarios se desarrollan en la fase estacionaria. Yáñez-Mendizábal et al (2011), reportaron una fase de latencia de 5 horas después de la cual se produjo un crecimiento exponencial alcanzando una población máxima de 3×10^9 UFC ml⁻¹



CONCLUSIONES

- La capacidad de producción de metabolitos primarios y secundarios de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 influyeron en el crecimiento y adaptación a condiciones de estrés del cultivo de arándano.
- El comportamiento de *B. subtilis* en el tiempo determinó un crecimiento de tipo logístico donde se inició con una concentración inicial de 1×10^9 UFC/mL para ambas cepas y hasta el término del ensayo con una concentración de 2.66×10^{17} UFC/ml para S2-1 y 3.07×10^{17} UFC/ml para S3-5.
- Se concluye la efectividad de inoculación en campo de células de *B. subtilis* en comparación a los sobrenadantes. Los mejores rendimientos en altura, índice de clorofila, peso seco, peso fresco y humedad se obtuvieron con células de *B. subtilis* independiente del tipo de cepa empleada.
- *B. subtilis* colonizo la rizosfera de las plantas, las concentraciones en el tiempo determinaron un cambio en la población en el suelo, sin embargo, el tipo de raíz de la planta no permitió evidenciar la interacción entre la estructura radicular y la bacteria.



- El arándano es un cultivo de gran interés comercial en el último tiempo por lo cual se puede realizar estudios complementarios, uno de ellos aislar los microorganismos que se encuentran en la estructura radicular de la planta.
- El uso de *B. subtilis* en el suelo es recomendable aplicarlo de manera conjunta con otros microorganismos con la finalidad de establecer la interacción y el modo de acción de los mismos en beneficio de los cultivos.
- Se recomienda realizar una nueva evaluación con los mismos factores empleados, ofreciendo a la planta el sustrato y pH ideal para su desarrollo.





Gracias por su atención



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA