

Efecto de *Bacillus subtilis* en la promoción de crecimiento, contenido de auxinas y acción enzimática en plantas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.)

Piarpuezán Flores, Oswaldo

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario

Ing. Falconí Saá, César Eduardo., PhD

01 de septiembre del 2023



Albahaca

- Áreas académicas
- Ciencias de la salud
- Sector industrial



Antioxidante

Inmunomodulador

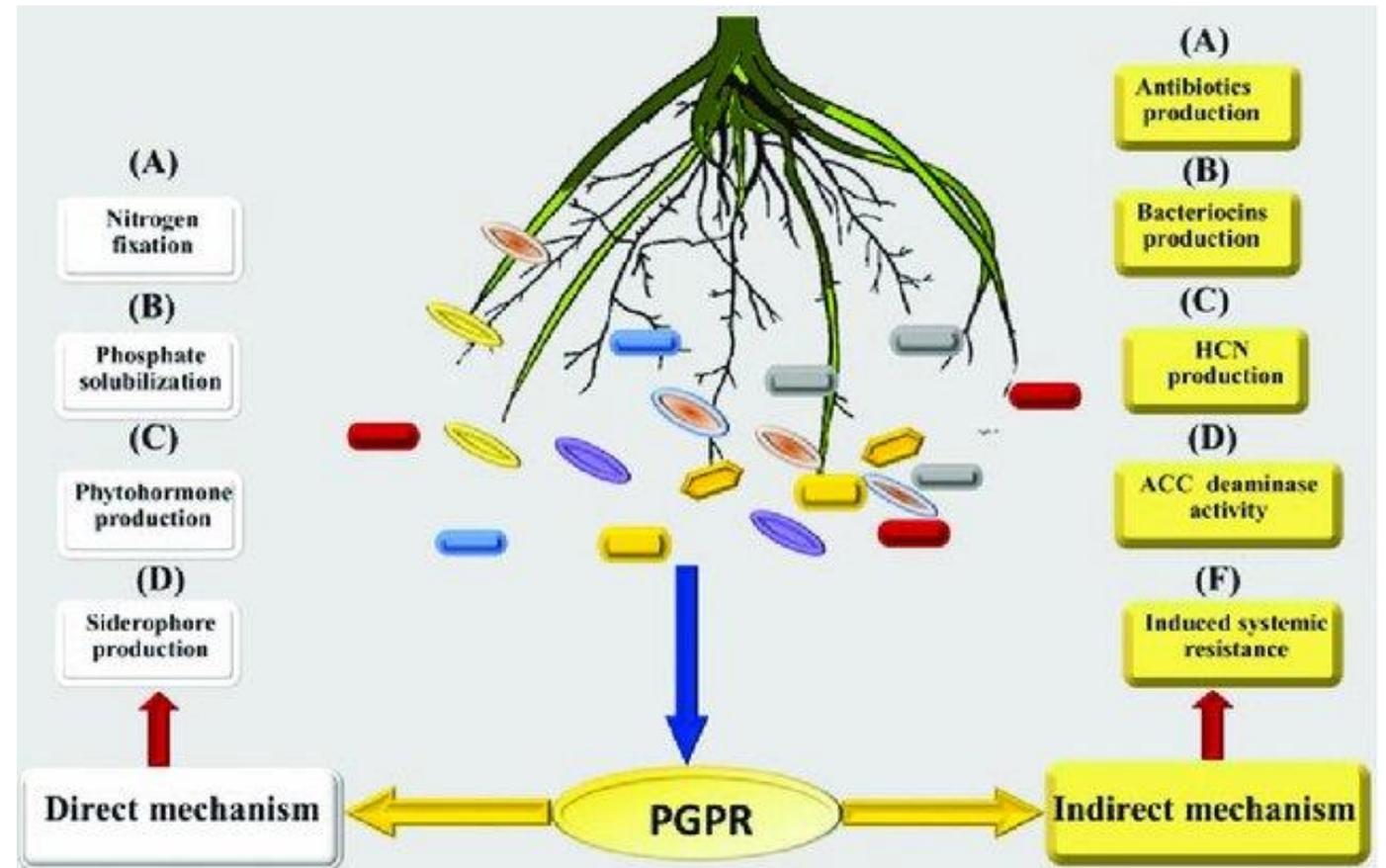
Insecticida

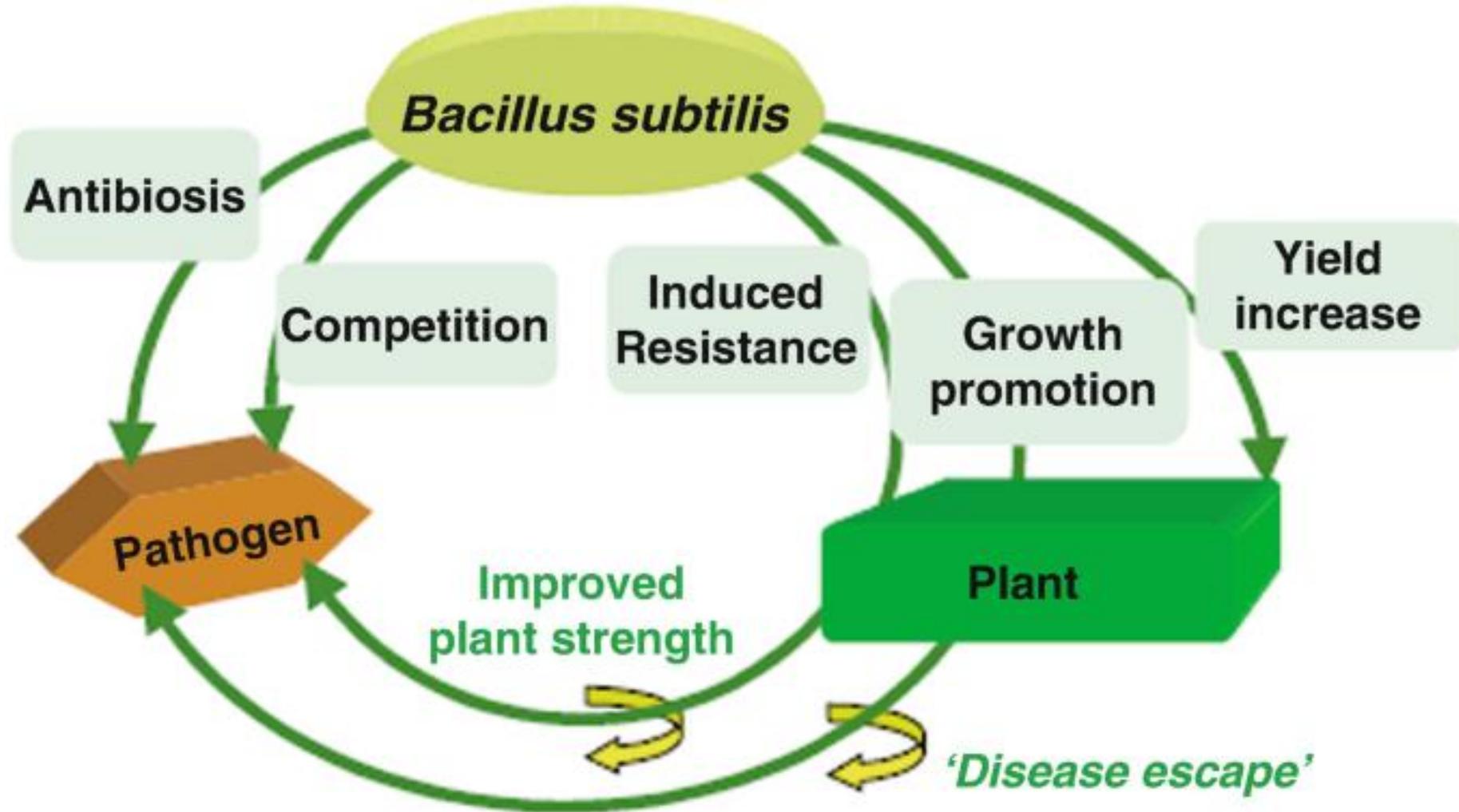
Antimicrobiano

Antiestrés

Anticancerígenos

Rizobacterias





(Falconí y Yáñez-Mendizábal, 2018, 2021, 2022)

(Jaborova *et al.*, 2021)

(Hashem *et al.*, 2019)



OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto de inoculaciones con *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la promoción de crecimiento, producción de auxinas, y acción enzimática en plantas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) en un periodo de 3 meses.

Objetivos específicos

- Analizar la acción de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en la promoción de crecimiento en plantas de albahaca en un periodo de 3 meses.
- Evaluar el contenido de auxinas en plantas de albahaca inoculadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en un periodo de 3 meses.
- Estimar la acción enzimática de *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 en plantas de albahaca en un periodo de 3 meses.
- Cuantificar la dinámica poblacional de *B. subtilis* presente en la rizosfera de plantas de albahaca cada 15 días a lo largo de 3 meses.

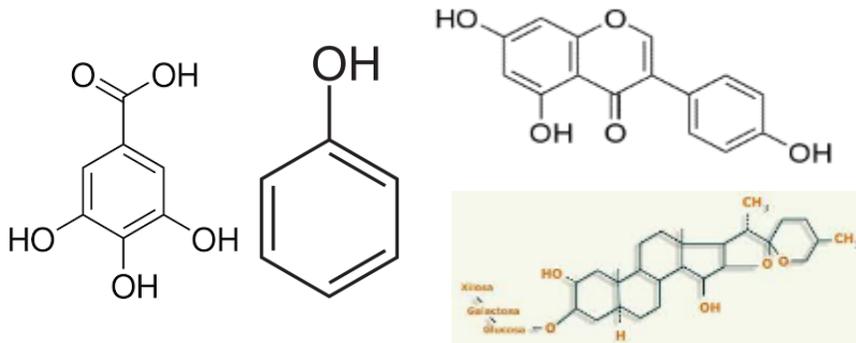
Hipótesis

- **H0:** Las células de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 no actúan sobre los parámetros agronómicos, fisiológicos y bioquímicos en plantas de albahaca.
- **H1:** Las células de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 actúan sobre los parámetros agronómicos, fisiológicos y bioquímicos en plantas de albahaca.

MARCO TEÓRICO

Albahaca

Ocimum basilicum L



Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)

Son bacterias que colonizan la rizosfera

Capaces de promover el desarrollo de las plantas

Al mejorar la disponibilidad de nutrientes

Producir hormonas vegetales

Moléculas que estimulan el crecimiento.

B. subtilis



METODOLOGÍA

AREA DE ESTUDIO



Ubicación geográfica del Área de investigación

ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO



Sustrato

70% fibra de coco
25% pomina
05% humus



36 plantas de albahaca
Trasplante 6ta semana

METODOLOGÍA

INOCULACION DE BACILLUS SUBTILIS



B. subtilis CtpxS2-1 y CtpxS3-5



Preparación del inóculo



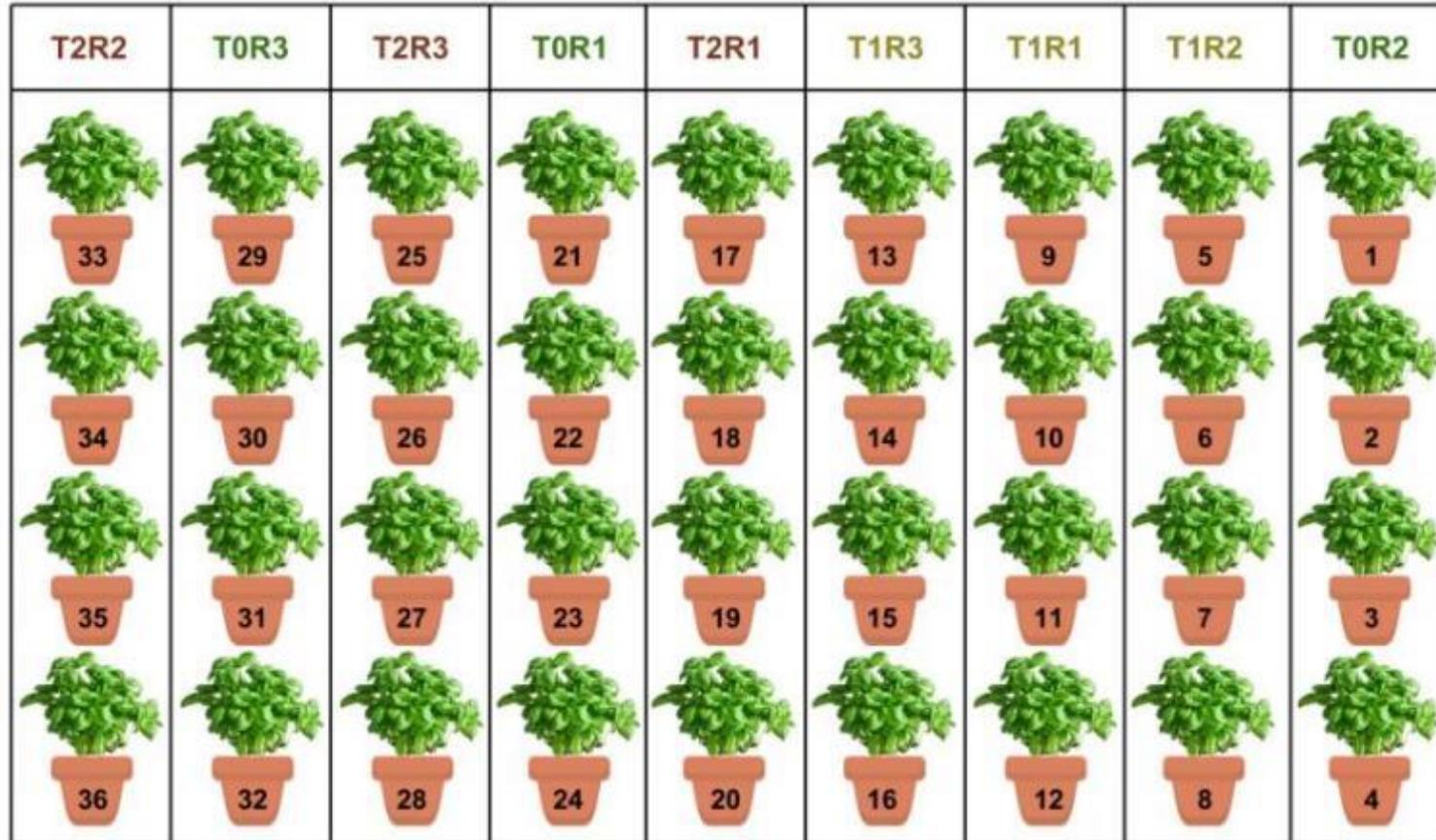
Inoculación

50 ml de una solución a base de *B. subtilis*

Inoculación: Parte basal

METODOLOGÍA

DISEÑO EXPERIMENTAL



Croquis experimental

Tratamiento	Descripción
T0	Testigo
T1	<i>B. subtilis</i> CtpxS2-1
T2	<i>B. subtilis</i> CtpxS3-5

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis de varianza:

(ANOVA)

Valoración de los supuestos

Prueba de significancia Tukey al 5%.

Modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + M_{ij}/T_i + \epsilon_{ijk}$$

METODOLOGÍA

VARIABLES A MEDIR

Dinámica poblacional

$$UFC\ g^{-1} = \frac{\text{Número de colonias contadas} * \text{factor de dilución}}{\text{Volumen sembrados en ml}}$$



Rizosfera



Dilución



Plateo



Medio NYDA



Incubación



Conteo



Conteo

METODOLOGÍA

VARIABLES A MEDIR

Altura de la planta

Medición: desde el borde de la maceta hasta el ápice más alto



Clorofila (SPAD)

Lectura: 3 pares de hojas jóvenes de cada planta



METODOLOGÍA

VARIABLES A MEDIR

Clorofila (espectrofotómetro)

$$\text{Clorofila } a = (13,36 * \text{Absorbancia } 663) - (5,19 * \text{Absorbancia } 645)$$

$$\text{Clorofila } b = (27,43 * \text{Absorbancia } 645) - (8,12 * \text{Absorbancia } 663)$$



Toma de muestras



Pesaje (0,5g)



Macerado



5ml etanol 96%



Homogenización



2000 rpm durante 20 minutos



Sobrenadante



1 ml + 5 ml etanol

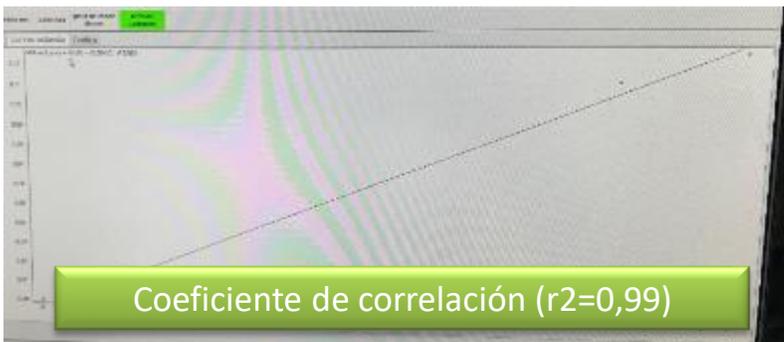


645 y 663 nm

METODOLOGÍA

VARIABLES A MEDIR

Cuantificación de auxinas



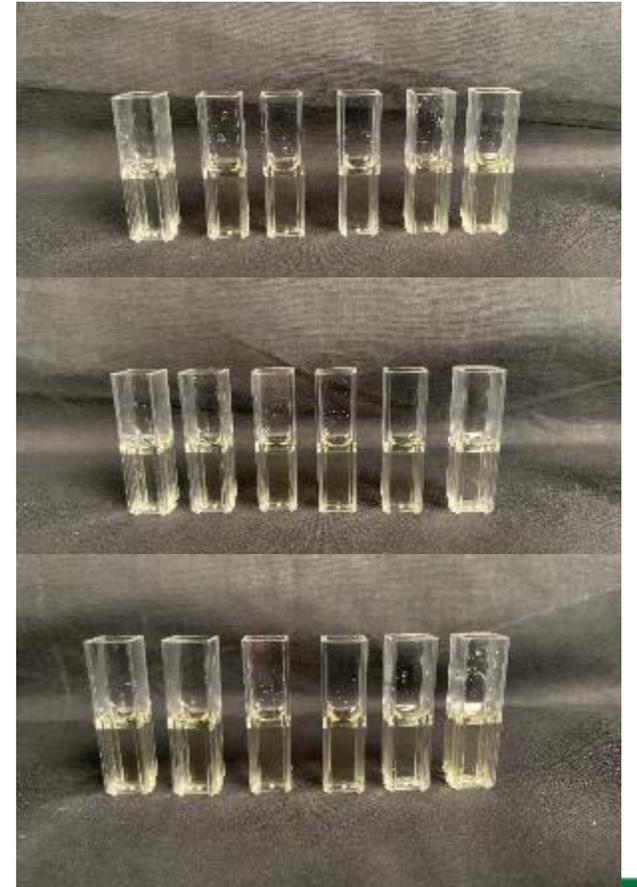
METODOLOGÍA

VARIABLES A MEDIR

Cuantificación de auxinas



Raíces previamente lavadas
Adición de acetona (80%)
Reposo -4°C/5 días
1 g de raíz
Macerado
1 ml de la muestra y 3 ml del reactivo (Salkowski)
Vortex
1000 ul de la muestra
Lectura: 530 nm



METODOLOGÍA

VARIABLES A MEDIR

Acción enzimática fitasas y nitrogenasas



Agar Pikovskaya

Detecta microorganismos que solubilizan fosfatos

ASHBY Manitol

Agar libre de nitrógeno, facilita la identificación de microorganismos con capacidad para fijar nitrógeno atmosférico.

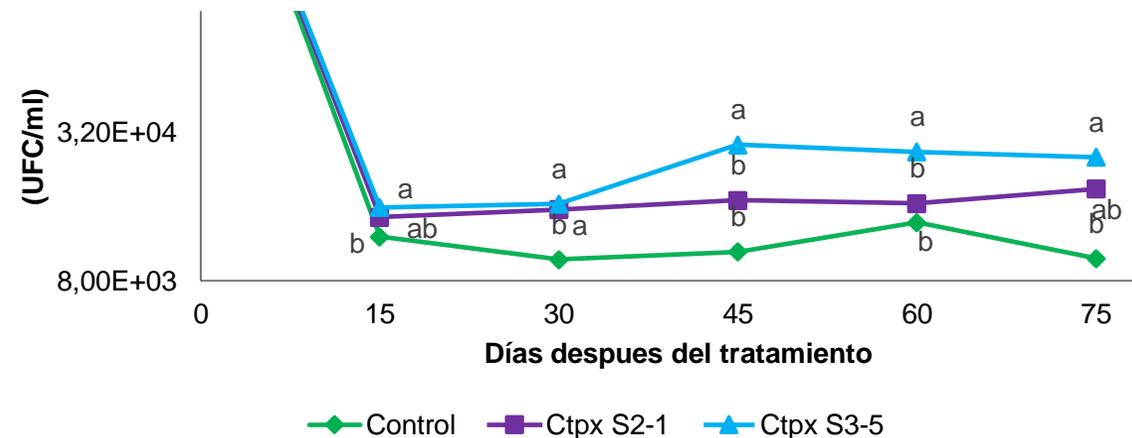


Dinámica poblacional

Tabla 5. Dinámica poblacional de dos cepas de *B. subtilis* en la rizosfera de *O. basilicum* a lo largo de 75 días luego del trasplante

Tratamiento	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60	Día 75
	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Control	1,21E+04 ± 1530,80 b	9,77E+03 ± 725,14 b	1,05E+04 ± 305,51 b	1,38E+04 ± 1212,44 b	9,87E+03 ± 750,56 b
Ctpx S2-1	1,45E+04 ± 850,49 ab	1,56E+04 ± 472,58 a	1,70E+04 ± 4064,89 b	1,65E+04 ± 4981,30 b	1,89E+04 ± 3458,32 ab
Ctpx S3-5	1,59E+04 ± 568,62 a	1,64E+04 ± 305,51 a	2,85E+04 ± 2888,48 a	2,67E+04 ± 3547,30 a	2,54E+04 ± 1452,58 a

Medias seguidas por letras distintas dentro de las columnas difieren significativamente, Tukey (p>0,05).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Altura

Tabla 2. Altura en plantas de *O. basilicum* por efecto de inoculaciones con dos cepas de *B. subtilis* a lo largo de 75 días después del trasplante

Tratamiento	Día 0	Día 15	Día 30	Día 45	Día 55	Día 60	Día 75
	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Control	9,5 ± 0,0 a	12,73 ± 1,40 a	16,33 ± 0,65 b	20,80 ± 0,85 b	29,40 ± 0,10 c	14,93 ± 1,83 a	17,60 ± 1,28 a
Ctpx S2-1	9,5 ± 0,5 a	14,13 ± 0,85 a	18,87 ± 0,98 ab	23,43 ± 0,51 a	31,10 ± 0,72 b	15,90 ± 1,15 a	18,47 ± 1,37 a
Ctpx S3-5	9,33 ± 0,29 a	15,03 ± 0,84 a	19,77 ± 1,97 a	24,43 ± 1,40 a	38,00 ± 0,30 a	16,33 ± 1,46 a	19,10 ± 0,85 a

Nota. Medias seguidas por letras distintas dentro de las columnas difieren significativamente, Tukey ($p > 0,05$). Media ± desviación estándar de la variable.

Saha *et al.* (2016)

Cultivos acuapónicos la albaca alcanza alturas de hasta 89,9 cm

Mehrafarin *et al.* (2013)

Bioestimulantes y biofertilizantes albahaca, los estudios alcanzan medias entre 57,66 y 80 cm

Rasouli-Sadaghiani *et al.* (2010)

Efecto de hongos micorrícicos arbusculares de 33,05 y 52,25 cm

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clorofila

Tabla 4. Índice de clorofila mediante la cuantificación por espectrofotometría de plantas de albahaca inoculadas con dos cepas de *B. subtilis*.

Tratamiento	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60	Día 75
	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Control	15,63 ± 0,81 b	15,77 ± 0,72 b	18,43 ± 0,32 c	20,77 ± 0,57 c	19,37 ± 1,72 b
Ctpx S2-1	16,67 ± 0,57 ab	20,97 ± 1,64 a	22,00 ± 0,89 b	24,40 ± 0,95 b	24,87 ± 1,72 a
Ctpx S3-5	17,53 ± 0,65 a	24,13 ± 1,58 a	24,10 ± 1,05 a	26,90 ± 0,53 a	26,67 ± 1,08 a

Nota. Medias seguidas por letras distintas dentro de las columnas difieren significativamente, Tukey ($p > 0,05$). Media ± desviación estándar.

Tabla 5. Clorofila (SPAD) en plantas de *O. basilicum* por efecto de inoculaciones con dos cepas de *B. subtilis* a lo largo de 75 días después del trasplante

Tratamiento	Día 15	Día 75
	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Control	7,43 ± 0,15 b	13,47 ± 1,84 a
Ctpx S2-1	9,83 ± 1,10 ab	15,40 ± 0,80 a
Ctpx S3-5	11,93 ± 1,59 a	16,48 ± 1,25 a

Nota. Medias seguidas por letras distintas dentro de las columnas difieren significativamente, Tukey ($p > 0,05$). Media ± desviación estándar.

Mehrafarin *et al* (2013)

Bioestimulantes y biofertilizantes albahaca obtuvieron 39,96 SPAD

Rasouli *et al.*, (2010)

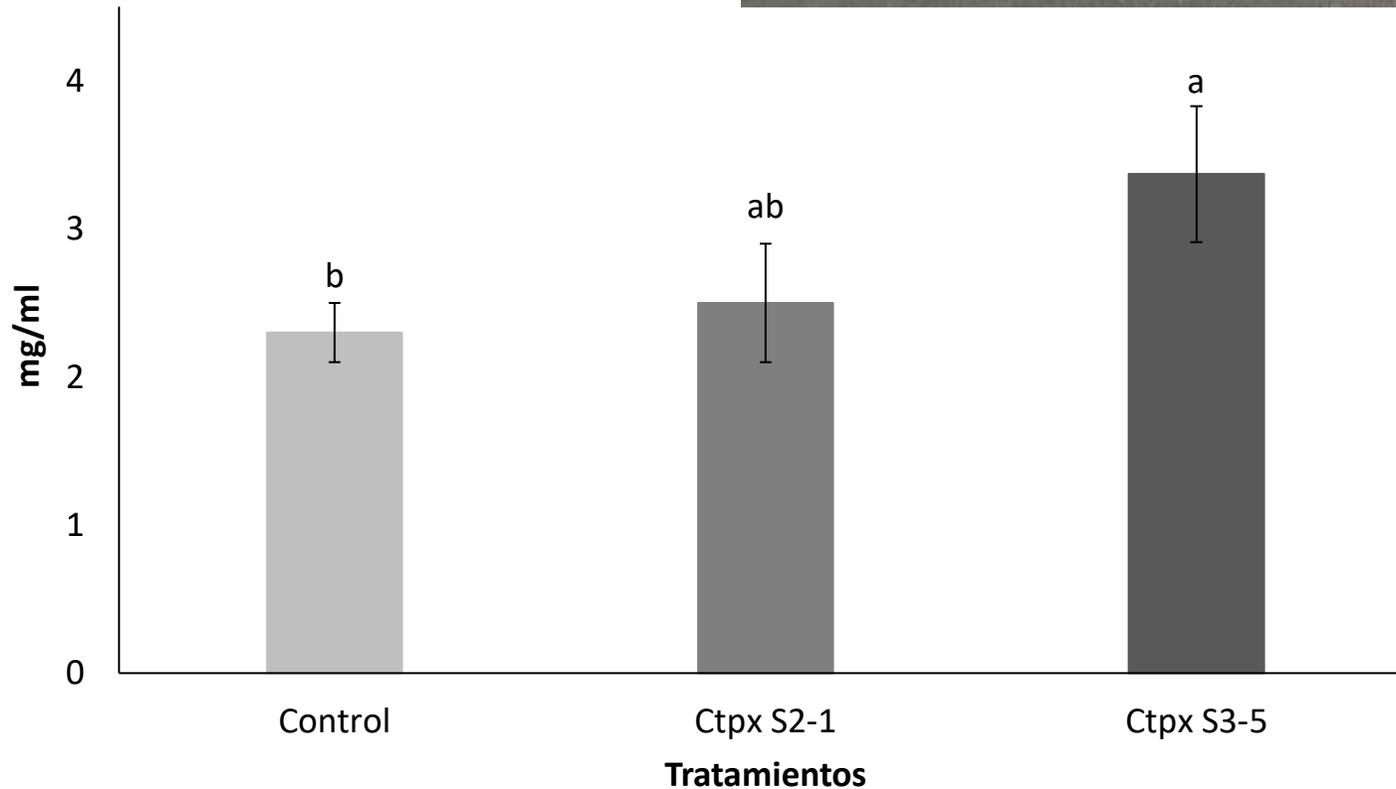
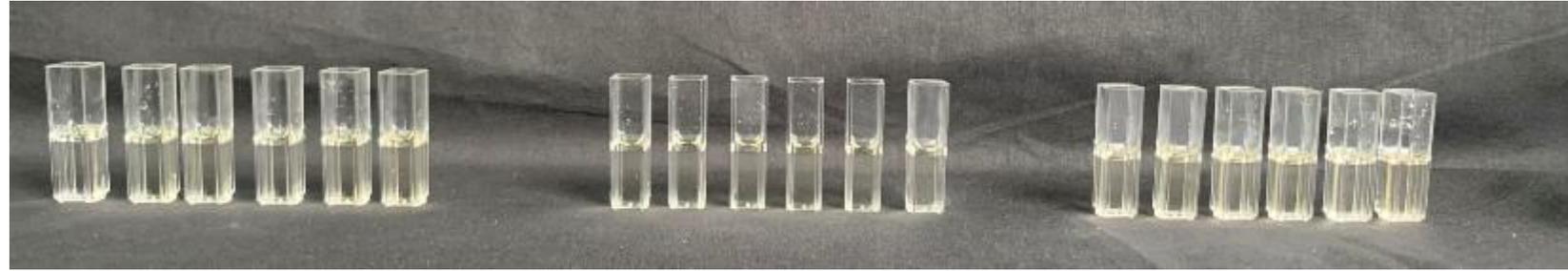
El efecto de hongos micorrícicos arbusculares presentó resultados favorables para índice de clorofila significativamente más altos que el control.

Larimi *et al.*, (2014)

La fijación de nitrógeno, aumenta el contenido de nitrógeno en los tejidos vegetales, el área foliar y la concentración de clorofila en las hojas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de Auxinas



Nota. Las barras de error representan la desviación estándar. Letras distintas dentro de las columnas difieren significativamente, Tukey ($p > 0,05$).

Walia *et al.*, (2014)

La cepa CKT1 de *B. subtilis* presentó la capacidad para producir una cantidad apreciable de AIA (0,03 mg/ml)

Kudoyarova *et al.*, (2017)

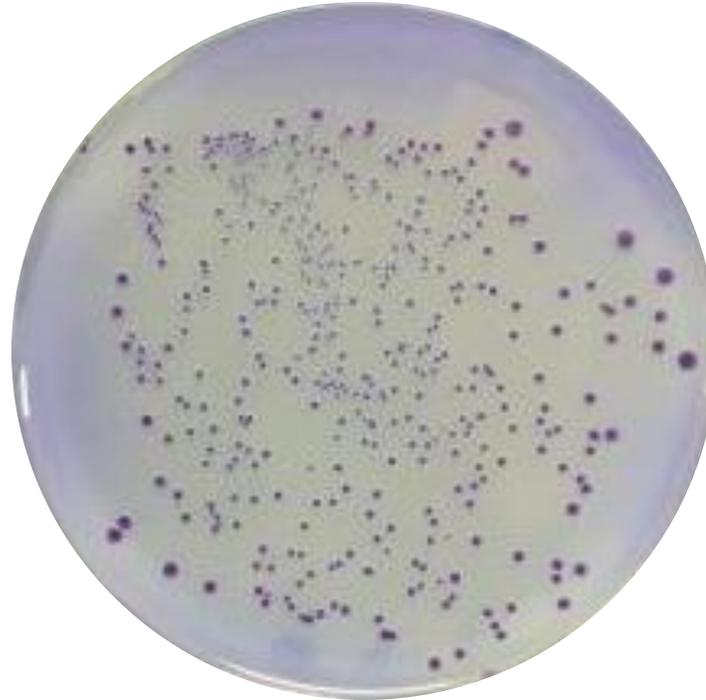
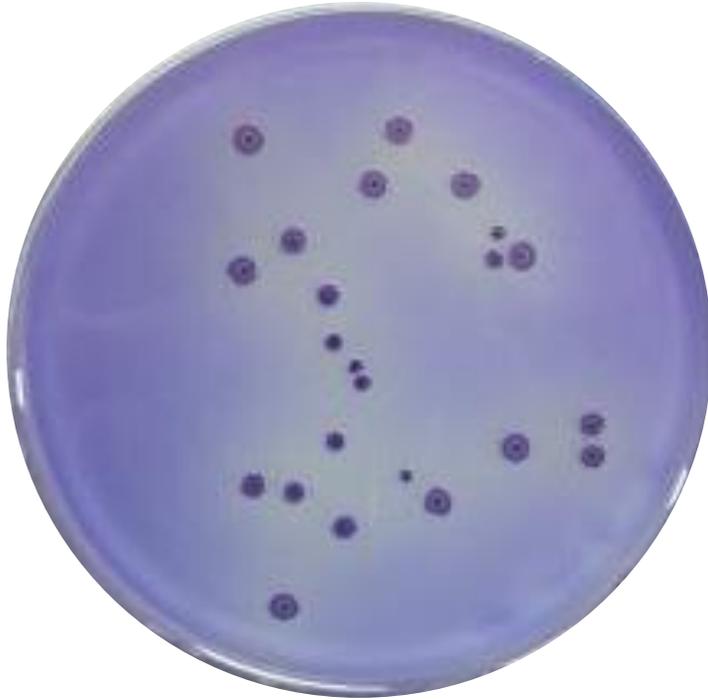
Contenido de AIA en las raíces de las plantas tratadas aumentó 2,5 veces en comparación con las plantas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Acción enzimática de fitasas

Formación de un halo amarillo claro alrededor de las colonias de *B. subtilis*

Procesos de producción de fitasas, fosfatasa y ácidos orgánicos.



Ahmad *et al.* (2019)

Mayor crecimiento de las plantas, mejora el estado nutricional de los cultivos, incrementa la concentración de nitrógeno (N), de fósforo (P) y de potasio (K) en brotes de los cultivos.

(Yu *et al.*, 2012)

Capacidad de los microorganismos de producir y liberar ácidos orgánicos, los cuales reaccionan con los compuestos fosfatados y facilitan la solubilización y liberación del P

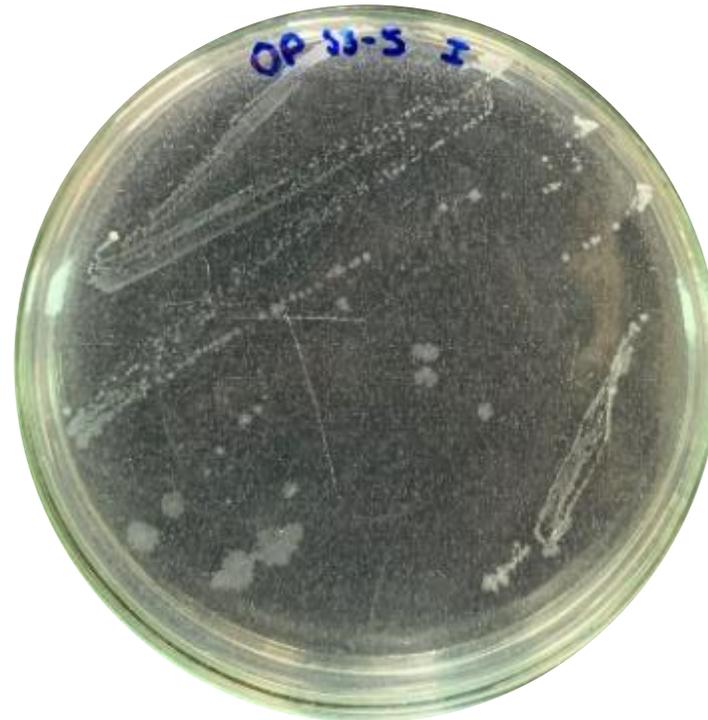
Nota. Formación del halo de solubilización de las cepas CtpxS3-5 (izquierda) y Ctpx S2-1 (derecha) de *B. subtilis* en medio Pikovskaya.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Acción enzimática de nitrogenasas

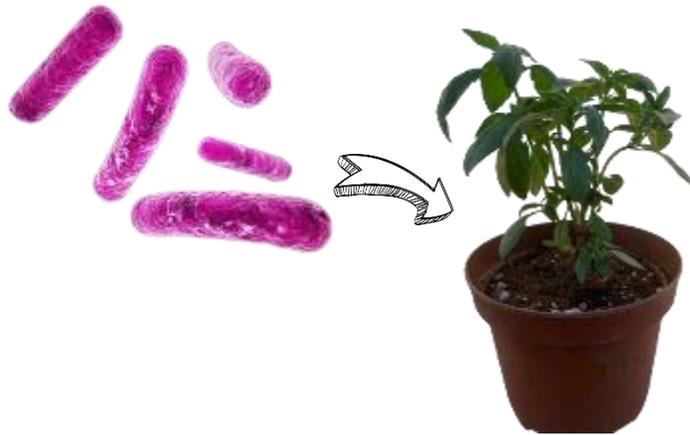
(Yu *et al.*, 2012)

La inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno (N), incrementa la altura de la planta, peso seco y la absorción de nitrógeno.



Nota. Crecimiento de colonias en medio ASHBY (libre de nitrógeno). Control (izquierda) Cepa CtpxS3-5 (centro) y cepa Ctpx S2-1 (derecha) de *B. subtilis* en medio ASHBY.

CONCLUSIONES



CtpxS3-5 (T2), fue la cepa que mayor efecto tuvo en cuanto a promoción de crecimiento, producción de auxinas y acción enzimática de fitasas y nitrogenasas en plantas de albahaca respecto a las plantas tratadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 (T1).

Se evidenció mediante el análisis de la variable altura tanto de plantas testigo como de plantas inoculadas con *B. subtilis* CtpxS2-1 y CtpxS3-5 obteniendo alturas de 17,60 cm, 18,47 cm y 19,10 cm respectivamente

Las plantas de albahaca inoculadas con *B. subtilis* CtpxS3-5 (T2) mostraron contenidos de auxinas en la raíz de 3,37 mg/ml, lo cual infiere la acción efectiva de la cepa bacteriana en el desarrollo y crecimiento de las plantas.

El uso de medios de cultivo Pikovskaya agar y Ashby demostraron la capacidad de la bacteria para solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno respectivamente, lo cual resulta en la promoción de crecimiento en plantas de albahaca.

La población de *B. subtilis*, siendo la CtpxS3-5 la cepa que mayor cuantificación obtuvo en el tiempo ($2,54E+04$), esto se relaciona directamente con la promoción de crecimiento vegetal que alcanzaron las plantas a lo largo de tres meses, lo cual se constata con los resultados obtenidos en las variables agronómicas y fisiológicas.

- Probar dosis más altas de inóculo de la cepa CtpxS3-5 para comprobar si tiene mayor influencia sobre el desarrollo vegetal en plantas de albahaca.
- Cuantificar el contenido de nitrógeno y fósforo de plantas tratadas con *B. subtilis*
- Utilizar diferentes microorganismos (PGPR) en combinación con *B. subtilis* para potenciar su efecto en el desarrollo de las plantas.

Gracias