

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE AISLADOS
BACTERIANOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ALBAHACA
(*Ocimum basilicum*).”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO AGRÍCOLA

PRESENTA

MARÍA GUADALUPE GONZÁLEZ SÁNCHEZ

DIRIGIDA POR

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar.

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS
SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ALBAHACA (*Ocimum basilicum*).”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO AGRÍCOLA

PRESENTA

MARÍA GUADALUPE GONZÁLEZ SÁNCHEZ

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN RAMIRO PACHECO AGUILAR

SINODALES

Dr. JUAN RAMIRO PACHECO AGUILAR
DIRECTOR

ING. ALEJANDRO CAMACHO MORALES
SINODAL

M. en C. AURORA MARIANA ALVARADO
SINODAL

Q.A. FRANCISCO ROMERO GONZÁLEZ
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL.	i
ÍNDICE DE CUADROS.	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.	v
RESUMEN.	
1. ANTECEDENTES.	
1.1. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV).	1
1.1.1 Mecanismos de las BPCV en la promoción del crecimiento vegetal.	4
1.2. Plantas aromáticas.	5
1.2.1. Situación económica.	6
1.2.2. Albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>).	7
1.3. Aceites esenciales.	8
1.3.1 Breve historia sobre el uso de aceites esenciales.	8
1.3.2 Composición de los aceites esenciales.	9
1.3.3 Aceite esencial de albahaca.	11
1.3.4 Importancia económica de los aceites esenciales.	13
1.4 Actividad antioxidante.	15
1.4.1 Compuestos fenólicos.	18
1.5 Medición de la capacidad antioxidante.	20
1.5.1 Determinación de fenoles totales.	20
1.5.2 Poder reductor/ antioxidante de hierro férrico, FRAP.	21
2. HIPÓTESIS.	22
3. OBJETIVOS.	
3.1 General.	23
3.2 Específicos.	23

4. METODOLOGÍA.	
4.1. Materiales.	24
4.1.1 Material biológico.	24
4.1.2 Medios de cultivo.	25
4.1.3 Reactivos.	25
4.2. Métodos.	25
4.2.1 Inoculación de semillas.	27
4.2.1.1 Preparación del inóculo.	27
4.2.1.2 Preparación de goma arábica, desinfección e inoculación de semillas.	27
4.2.2 Metodología para la siembra y producción de albahaca.	28
4.2.2.1 Siembra de semillas.	28
4.2.2.2 Trasplante de plántulas.	29
4.2.2.3 Inoculación de plantas para ensayo 1.	30
4.2.2.4 Inoculación de plantas para ensayo 2.	30
4.2.2.5 Cosecha de plantas para ensayo 1.	30
4.2.2.6 Poda y cosecha de plantas para ensayo 2.	31
4.2.3 Determinación de parámetros agronómicos de producción.	32
4.2.3.1 Determinación de biomasa para ensayo 2.	32
4.2.3.2 Medición de la altura de planta para ensayo 1.	33
4.2.3.3 Determinación del peso de las raíces para ensayo 1.	33
4.2.4 Determinación de capacidad antioxidante en plantas de albahaca.	33
4.2.4.1 Preparación de la muestra para ensayo 1.	33
4.2.4.1 Preparación de la muestra para ensayo 2.	34
4.2.4.3 Determinación de fenoles totales mediante el uso del Reactivo de Folin-Ciocalteu.	35
4.2.4.4 Determinación del Poder Reductor Antioxidante (FRAP).	36

5. RESULTADOS.	37
5.1 Determinación de biomasa.	37
5.2 Medición de la altura de plantas.	38
5.3 Determinación del peso de raíces.	40
5.4 Determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante para ensayo 1.	41
5.5 Determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante para ensayo 2.	42
6. DISCUSIÓN.	45
7. CONCLUSIONES.	49
8. REFERENCIAS.	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Comercio mundial de especias y aromáticas	6
2 Partes de plantas empleadas en la obtención de aceite esencial	12
3 Producción mundial de algunos aceites esenciales	14
4 Propiedades bioquímicas de las cepas de estudio	24
5 Descripción de actividades durante ensayo 1	25
6 Descripción de actividades durante ensayo 2	26
7 Solución nutritiva para cultivo de albahaca	29
8 Cantidad de biomasa en plantas de albahaca	37
9 Datos de altura de plantas de albahaca	39
10 Datos del peso de raíces secas	40
11 Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en planta completa de albahaca	41
12 Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en la etapa floral 2 de albahaca	42
13 Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en la etapa vegetativa 2 de albahaca	43
14 Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en la etapa floral 3 de albahaca	43
15 Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en la etapa floral 3 de albahaca	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales componentes de aceite esencial de <i>Ocimum</i> spp	13
2	Acción de los antioxidantes sobre los radicales libres	17
3	Estructuras químicas de diferentes compuestos fenólicos	19
4	Estructura de la 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ)	21
5	Germinación de semillas y plántulas de albahaca	28
6	Primera poda y corte de ápices	31
7	Plantas identificadas en etapa 2	31
8	Plantas identificadas en etapa 3	32
9	Plantas de albahaca durante el secado	33
10	Identificación de la parte floral, vegetativa y raíz	34
11	Curva estándar de ácido gálico para la determinación de fenoles totales	35
12	Curva estándar de ácido ascórbico para la determinación de poder reductor antioxidante.	36
13	Plantas testigo sin inocular	38
14	Plantas inoculadas con P12	38
15	Plantas inoculadas con M6	38
16	Plantas inoculadas con P12XM6	38

RESUMEN

En la actualidad el empleo de bacterias promotoras de crecimiento en la agricultura como biofertilizantes y agentes de control biológico ha tenido gran auge, estos microorganismos actúan en la planta mediante diversos mecanismos: fijación de nitrógeno, producción de sideróforos e inducción de resistencia sistémica a patógenos entre otras. En el presente trabajo, se inocularon dos aislados bacterianos del género *Bacillus* en plantas de albahaca (*Ocimum basilicum*, cv Nufar), para determinar el efecto sobre el crecimiento, desarrollo de la planta y en la capacidad antioxidante. Para ello se inocularon semillas de albahaca con las cepas P12, M6 y una interacción P12XM6. Después de emerger, las plántulas se trasplantaron en macetas y se llevaron a condiciones de invernadero, donde se realizaron tres cosechas, en la primera se evaluó la cantidad de biomasa, se midió la altura de plantas, se cuantificó la cantidad de fenoles totales y se evaluó la capacidad para neutralizar radicales libres. Para la segunda y tercera cosecha, cada planta se dividió en dos partes: floral y vegetativa. Los resultados indican que la cepa M6 incrementó el contenido de biomasa un 39.3%, aumentó la altura 6.4%, 5.42% en contenido de fenoles totales y 12% en capacidad antioxidante con respecto al testigo, sin embargo para éste último la interacción M6XP12 mostró ser mayor en un 54.2% respecto a M6, se concluye que los inoculantes utilizados en este estudio son promotores de crecimiento vegetal, aumentan el contenido de fenoles totales y la capacidad para neutralizar radicales libres por lo que pueden ser usados para la producción de plantas aromáticas.

1. ANTECEDENTES

1.1 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Un número amplio de microorganismos se encuentran en la rizósfera el suelo. La diversidad y el número de los mismos depende en gran medida de la composición y concentración de los nutrientes exudados por las raíces de las plantas (Soroa y col., 2009) Existen algunos microorganismos que suelen tener efectos benéficos para las plantas, con un potencial como agentes de control o biofertilizantes, distinguiéndose tres grandes grupos: microorganismos fijadores de nitrógeno, hongos micorrízicos y bacterias promotoras de crecimiento (BPCV). La definición de este último grupo fue introducida por Kloepper en 1978 (Hernández y Escalona, 2003) como bacterias habitantes de la raíz que estimulan significativamente el crecimiento de las plantas (Peña y Reyes, 2007).

La relación planta-microorganismo es mutualista y es conocida como simbiosis. Si se forman estructuras especializadas, dentro de las células de las plantas (nódulos, vesículas, etc.) se denomina simbiosis obligada o estricta, y cuando el microorganismo sobrevive sin la planta y se asocia en beneficio de ambos, la simbiosis se conoce como asociativa o facultativa (Aguirre y col., 2009).

Los mecanismos del efecto de las BPCV no son bien comprendidos, sin embargo, se ha sugerido un amplio rango de posibilidades que incluye efectos directos e indirectos (Vargas y col., 2001). El primero ocurre cuando los metabolitos producidos por algunas cepas de rizobacterias son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de éstos por parte de la planta. Mientras que en los mecanismos indirectos, los metabolitos producidos por las BPCV pueden funcionar como determinantes antagónicos, involucran aspectos de control biológico, suprimen o inhiben el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta, vía producción de sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas

(glucanasas, quitinasas) o inducción de mecanismos de resistencia (Jiménez y col., 2001; Vargas y col., 2001).

La conjunción de ambos mecanismos de acción, ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas; se ha observado un incremento en la germinación, el vigor y el peso de plántulas (Hernández y Escalona, 2003). Un mayor desarrollo en sistemas radicales y un incremento hasta de 30 % en la producción de cultivos de interés comercial, tales como papa, rábano, jitomate, trigo y soya (Jiménez y col., 2001).

Dado a que a lo largo de los años se ha presentado cierta controversia con respecto a saber hasta qué punto puede ser considerada una rizobacteria como BPCV, se han establecido cuatro características para definir a este grupo de microorganismos: 1. Que no requieran de la invasión interna de tejidos en plantas, como en el caso de la formación de nódulos por parte de hongos micorrícicos. 2. Que tengan una elevada densidad de población en la rizósfera después de ser inoculadas, de no ser así la competitividad con la microflora del suelo se vería afectada. 3. Que presenten una capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz y, como consecuencia puedan influir positivamente en el crecimiento de la planta. 4. Que no produzcan daño al hombre ni a otros microorganismos (Jiménez y col., 2001). Las bacterias promotoras de crecimiento pueden ser de vida libre o asociativas, aerobias, anaerobias o anaerobias facultativas (Loredo y col., 2004).

En años recientes se ha retomado el interés de utilizar este tipo de bacterias en la producción de cultivos. Se han aplicado a semillas, tubérculos o raíz, y son capaces de colonizar las raíces de las plantas así como estimular el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Vargas y col., 2001). La aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en cultivos de importancia agrícola, es una alternativa viable, sobre todo en los países con una agricultura subdesarrollada que carecen de fertilizantes (Acebo y col., 2007). En la agricultura se postulan como alternativa prometedora para reducir el uso de agroquímicos.

El conocimiento de los beneficios de los microorganismos en el desarrollo de las plantas se remonta a la edad media, en la Roma antigua, pero su evolución y progreso aumentaron con el invento del microscopio y las técnicas microbianas durante el periodo de 1891-1910 (Aguirre y col., 2009). En el año de 1985 fue cuando se propuso por primera vez el empleo de dichas bacterias en forma comercial, sin embargo para entonces los agricultores chinos ya utilizaban rutinariamente estos microorganismos en aproximadamente 20 millones de hectáreas de cultivo.

Algunos de los géneros bacterianos más estudiados como promotores de crecimiento son: *Azospirillum*, *Azobacter*, *Klebsiella*, *Beijerinckii*, *Pseudomonas*, *Bacillus* (Loredo y col., 2004; Vargas y col., 2001), *Rhizobium*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Anabena*, *Nostoc* y *Arthrobacter* (Rives y Hernández, 2007). Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, son microorganismos que viven en la rizósfera en estrecho contacto entre raíces- suelo-microorganismos. Estas bacterias tienen algunas funciones dentro de la planta, como estimular la síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento, fijar nitrógeno, solubilizar nutrientes, producir sideróforos así como también pueden ser agentes de control de fitopatógenos del suelo (Loredo y col., 2004; Aguirre y col., 2009). Pueden ser inoculadas a las semillas, induciendo la germinación colonizando las raíces, transforman los exudados radicales en sustancias promotoras del crecimiento vegetal, con lo cual hay un aumento de pelos radicales y un incremento en la absorción mineral de nutrientes (nitrógeno, fósforo, hierro, etc.), entre otros efectos (Farid y col., 2009).

El empleo de microorganismos no está bien establecido en la agricultura mundial y mucho menos lo está en nuestro país. Cabe mencionar que su uso como control de plagas y enfermedades principalmente, representa sólo el 1.4 % del mercado global. Siendo los productos generados a partir de *Bacillus thuringiensis* para el control de plagas los más abundantes en el mercado debido a su facilidad para formularse, a

diferencia de los biofungicidas que requieren del manejo de los microorganismos vivos para obtener resultados benéficos (Jiménez y col., 2004).

1.1.1 Mecanismos de las BPCV para la promoción de crecimiento vegetal.

Son diversos los mecanismos que presentan las bacterias para promover el crecimiento vegetal. Los que se mencionan más frecuentemente son: fijación de nitrógeno, producción de sustancias reguladoras de crecimiento o fitohormonas, incremento en el desarrollo de la raíz, producción de compuestos sideróforos que incrementan la disponibilidad de Fe en la rizósfera, alteraciones en el potencial de la membrana de la raíz, inducción de resistencia sistémica a patógenos, inhibición del crecimiento de organismos antagónicos e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Loredo y col., 2004; Farid y col., 2009).

Las sustancias reguladoras del crecimiento en las plantas, son sustancias que son producidas en un tejido y transportadas a otro, desde donde ejercen efectos muy específicos y producen respuestas fisiológicas determinadas. Algunas son: auxinas, citoquininas y giberelinas (García y col., 2006). Las auxinas están involucradas en diversos procesos fisiológicos como el crecimiento, respuesta a la luz y a la gravedad (tropismos), dominancia apical, senescencia, diferenciación de xilema y floema, diferenciación de yemas axilares y raíces, crecimiento de frutos, regeneración de tejido vascular y la inducción de raíces adventicias. Su síntesis se concentra en el meristemo apical y hojas jóvenes, su transporte es siempre de las partes superiores a las inferiores (dirección basipetal). Este tipo de movimiento tiene una influencia directa en el crecimiento y diferenciación de la planta. La auxina más común es el ácido indolacético (AIA). Las citoquininas están involucradas en una serie grande de actividades fisiológicas en las plantas: división celular, formación de órganos, alargamiento celular, retraso en la degradación de la clorofila, desarrollo de cloroplastos, retraso de la senescencia y translocación de nutrientes (Meléndez y Molina, 2002). Mientras que las giberelinas tienen actividad en los procesos de crecimiento del tallo, en la floración, en la germinación, la dormancia, la expresión

sexual, la senescencia, el amarre y crecimiento de los frutos, y la partenocarpia. Son sintetizadas en semillas en desarrollo y en brotes en activo crecimiento (García y col. 2006).

Existen otras sustancias como el ácido absícico (ABA) y el etileno, que en contraste con las mencionadas anteriormente, actúan como inhibidores del crecimiento y de procesos metabólicos. El ABA se encuentra presente en todas las plantas vasculares, se transporta por el xilema y el floema. Induce la dormancia de yemas y semillas e inhibe el crecimiento inducido por auxinas, además promueve el cierre estomático bajo condiciones de estrés, lo que permite a la planta mantener su control hídrico. Finalmente, el etileno el compuesto inorgánico insaturado más sencillo (C_2H_4), cuyo movimiento es pasivo y la distribución es sistémica y rápida, pues esta ocurre a través de los espacios intercelulares y además es soluble en agua y lípidos. Es sintetizado en todos los órganos de la planta pero en mayor grado en tejidos senescentes y frutos inmaduros. Su actividad fisiológica está relacionada con: maduración de los frutos, abscisión, rotura de la dormancia en semillas, promoción del crecimiento, inducción de la formación de raíces, inducción/inhibición de la floración dependiendo del cultivo, e inducción de la senescencia. (Meléndez y Molina, 2002).

1.2 Plantas aromáticas

El hombre ha hecho uso de las plantas aromáticas desde la antigüedad, usándolas inicialmente a imitación de los animales, guiado por su instinto, posteriormente de manera empírica y más tarde de forma racional, conociendo sus propiedades terapéuticas de manera progresiva mediante los avances tecnológicos en el área de química analítica principalmente (Muñoz, 1996). Por plantas aromáticas podemos entender que son aquellas plantas medicinales cuyos principios activos están constituidos, de manera total o parcial por esencias. Constituyen el 0.66 % del total de las plantas medicinales (Muñoz, 1996; Fundación para la Innovación Agraria, 2008).

1.2.1 Situación económica de plantas aromáticas

En los últimos decenios, la utilización de plantas y hierbas para fines farmacéuticos ha sufrido un proceso de reducción, a pesar de la creciente preferencia de los consumidores por los productos naturales, sobre todo en la medicina. No obstante, en la actualidad esta situación ha comenzado a revertirse.

El crecimiento anual esperado es del 4 %, es decir que a nivel mundial, cada 15 años se duplica su consumo (Berzins, 2011).

Según información publicada por el centro de comercio internacional, agencia conjunta de cooperación técnica de la conferencia de las naciones unidas sobre comercio y desarrollo (UNCTAD) y la organización Mundial del comercio (OMC), se estimó que en el año 2010 la cifra de negocios del mercado mundial de productos naturales fue de unos \$ 100.000 millones, donde los medicamentos constituirían alrededor del 80 % de este mercado (Fundación para la Innovación Agraria, 2008). En el cuadro 1 se muestra la producción mundial de especias y aromáticas, así como el aporte económico que tienen.

Cuadro 1. Comercio mundial de especias y aromáticas (Berzins, 2011).

	Mil toneladas	Millones de Dólares
Especias	780	2 340
Aromáticas	310	1 500

Los principales compradores finales de partes de plantas aromáticas y medicinales son la industria de fitofármacos en Europa y los Estados Unidos (suplementos dietarios), la industria de las infusiones (tés), la industria de alimentos y la cosmética. En todos los casos, las adquisiciones obedecen a una rigurosa programación de los procesos industriales a que será sometida la materia prima, y en consecuencia resulta

crítica tanto la regularidad y seguridad de su abastecimiento, como la calidad del producto. En esta última cuenta no sólo su contenido de principios activos (o esencias), sino que también las prácticas bajo las cuales fueron producidas (Fundación para la Innovación Agraria, 2008).

1.2.2 Albahaca (*Ocimum basilicum*)

Pertenece a la familia de las lamiáceas, junto con otras plantas aromáticas como lo es la salvia, lavanda, menta, tomillo y orégano, el género *Ocimum* L. incluye aproximadamente 150 especies con una gran variación en fenotipo así como contenido y composición de aceite esencial, Holy basil (*Ocimum sanctum* L. y *Ocimum tenuiflorum* L.) y sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) son las dos especies que son consideradas con mayor cantidad de aceites esencial (Zheljazkov y col., 2008; Jeba y Vaidyanathan, 2011).

El nombre del género *Ocimum* proviene del griego *ókimon* y significa “labio perfumado, oloroso” en alusión al aroma de sus hojas. El nombre del epíteto *basilicum* viene de *basilikon* o *basiléus*, que significa rey, real o regio, por su característica de principal (Fonnegra y Jiménez, 2007). La albahaca es una planta perenne, originaria de Asia Meridional, principalmente de la India.

Es una planta herbácea anual de hasta 50 cm de altura. Su tallo es anguloso, cuadrangular, muy ramificado. Sus hojas son opuestas, aovadas, anchas hasta lanceoladas, con glándulas de aceite. El color de su follaje va desde verde pálido hasta intenso, puede haber también colores amarillentos, e incluso púrpura. La textura varía de un sedoso brillante a opaco y rizado (Fonnegra y Jiménez, 2007). Las flores aparecen en verano como verticilos en los extremos de las ramas y son de color blanco o lavanda. Su fruto es tipo cápsula, valvoso y dehiscente. Hay más de 40 variedades conocidas, siendo *basilicum* una variedad dulce, la más conocida y cultivada (Contreras y Gómez, 2008).

La composición química del extracto de *O. basilicum* revela la presencia de taninos, flavonoides, saponinas y terpenos volátiles como alcanfor, timol, metilchavicol, linalol, eugenol y pinenos (May y col., 2008).

La planta de albahaca ha sido cultivada y usada durante miles de años en medicina y culinaria. Se han encontrado reportes sobre su uso en el antiguo Egipto, Roma y Grecia. Comercialmente se cultiva principalmente en Estados Unidos, la Región Mediterránea y en muchas otras partes del mundo. Su uso es tanto en fresco como en seco en el área alimentaria como aditivo, así como en la medicina tradicional, en donde es considerada estimulante, tónico, carminativo, febrífugo, expectorante, diurético, analgésico, antibacterial, antidiarreico, antiemético, antiespasmódico, sedante, ayuda en el parto, calmante de las picaduras de insectos, también se le atribuyen propiedades afrodisíacas (Fonnegra y Jiménez, 2007; Ibrahim y col., 2011).

En México el cultivo de esta planta se distribuye en casi todo el país y es ampliamente usada en desórdenes digestivos, problemas inflamatorios y enfermedades respiratorias. Actualmente se le reconoce al aceite esencial de la planta entera una cierta acción sobre el sistema digestivo y el sistema neurovegetativo (González-Zúñiga y col., 2011).

1.3 Aceites esenciales

1.3.1 Breve historia sobre el uso de aceites esenciales

Respecto a la historia de la extracción de esencias, podemos decir que su uso también es bastante remoto. El término de “aceite esencial” fue utilizado por primera vez en el siglo XVI por Paracelso (médico y farmacéutico), quien los usaba como medicamentos, los consideró como la “quinta esencia”, haciendo referencia a Aristóteles (Ortuño, 2001).

En China, India y Persia la destilación de plantas se practica desde hace milenios. No obstante las primeras fuentes históricas de las esencias se remontan a Egipto, donde 40 siglos antes de Jesucristo ya preparaban aceites de cedro (Muñoz, 1996). Existen referencias en manuscritos egipcios, chinos y hay alrededor de 200 citas en la Biblia relacionadas con estas sustancias (Ortuño, 2001). No fue sino hasta la Edad Media cuando los árabes perfeccionaron la destilación de plantas aromáticas, favoreciendo así el desarrollo de la naciente farmacia. Para el siglo XIII los alquimistas vendían aceites esenciales, siendo la de romero de las primeras extraídas (Muñoz, 1996; Marinoff, 2011).

Para el siglo XV eran conocidas las esencias de almendras amargas, espliego, canela, ginebra, rosa, salvia, lavanda, entre otras. Un siglo después, más de sesenta esencias eran conocidas. En 1511 se publica en Barcelona la “Concordia Pharmacopolarum”, la primera farmacopea territorial del mundo (Marinoff, 2011). Ya para el siglo XVII, se había logrado aislar todas las esencias de Europa y del próximo Oriente. Un siglo más tarde se controlan y mezclan las esencias y aparece el agua de colonia, inventada por Feminis y es distribuida en París por Farina. En el siglo XIX se comienzan a realizar los primeros análisis químicos de esencias y otros principios activos de los vegetales, con la aplicación del microscopio y la química analítica, naciendo así la farmacoquímica (Ortuño, 2001; Marinoff, 2011).

1.3.2 Composición de los aceites esenciales.

Comprende las esencias vegetales y las resinas. Las esencias son compuestos terpénicos, los cuales a su vez están formados por cadenas largas de un hidrocarburo, isopreno. Dado que éste último puede unirse entre sí de muchas formas, el número de esencias es muy alto. Por otro lado, las resinas normalmente se encuentran disueltas en esencias y aparecen como residuos viscosos o sólidos cuando aquellos se evaporan. Generalmente los aceites esenciales se presentan en emulsiones que tienden a formar gotitas. A menudo la planta los vierte al exterior, por medio de los canales excretores. Las esencias vegetales que son volátiles, se

difunden a través de la epidermis de las hojas y flores, expandiendo a menudo un olor bastante pronunciado, siendo estos compuestos los que dan el aroma a los vegetales (Muñoz, 1996).

Los aceites esenciales son mezclas de sustancias obtenidas de plantas, que presentan como características principales una composición química compleja y un carácter fuertemente aromático. Se conocen alrededor de 4000 aceites esenciales distintos. No son compuestos puros, sino mezclas de una gran cantidad de sustancias que se encuentran en distintas proporciones. Entre los componentes mayoritarios de los aceites esenciales encontramos a los terpenos, quienes llegan a alcanzar concentraciones que van del 75 al 90 % del peso total en el aceite como los de cítricos.

Paradójicamente, los terpenos o son inodoros o contribuyen muy poco al aroma global y simplemente constituyen la base diluyente del aceite esencial, proporcionando a éste su carácter volátil e inflamable, además de sus propiedades físicas como densidad, viscosidad, entre otras (Ortuño, 2001). Los componentes responsables del aroma suelen ser los de menor concentración, compuestos orgánicos con grupos funcionales del tipo cetona, éster, alcohol, aldehído y éter principalmente. La compleja composición de estas sustancias aromáticas es la responsable de que tengan un elevado precio en el mercado, ya que es muy difícil realizar una síntesis artificial de ellos.

La mayoría de los aceites esenciales poseen una densidad menor que la del agua, excepto en algunas esencias como la del clavo, generalmente son líquidos, la mayoría incoloros o amarillentos, los hay muy viscosos o semisólidos, denominados bálsamos u oleorresinas como la de pimentón, la paprika o el chicle. Presentan una alta volatilidad, inestabilidad frente a factores como luz, oxígeno, pH extremos o a la presencia de trazas de metales, que pueden catalizar reacciones de descomposición. Son solubles en medios polares y son más liposolubles cuanto mayor sea el contenido de hidrocarburos monoterpénicos. Son altamente solubles

en etanol, lo cual es aprovechado en la industria de fragancias (Reyes y Patiño, 2007). Debido a su heterogeneidad química, presentan una amplia gama de propiedades biológicas, por ejemplo pueden ser antisépticos, sedantes, antiespasmódicos, diuréticos, digestivos, e incluso como estimulantes de la respiración y la circulación (Reyes y Patiño, 2007; Maguna 2006). Las plantas aromáticas son las que concentran una mayor cantidad de esencias, por lo que constituyen la materia prima para su obtención, ya sea empleando toda la planta, solo hojas, flores, frutos o raíces, dependiendo de la planta de la que se trate.

1.3.3 Aceite esencial de Albahaca.

El cultivo de *Ocimum basilicum* es de suma importancia económica global, con una producción mundial anual de 100 Ton de aceites esenciales sintetizados y almacenados en tricomas glandulares especializados, ubicados en diversos órganos de la planta (flores, hojas, brotes, tallos y semillas) con una calidad que depende de factores externos (climáticos y agronómicos) e internos del cultivo como la variedad, edad de la planta y órgano utilizado (Chirinos y col., 2009).

El aceite esencial de la albahaca se obtiene generalmente de las hojas y flores, y se realiza durante la etapa de floración de la planta. Existen aproximadamente 150 especies de *Ocimum*, de las cuales la mayor parte posee aceites esenciales. Aunque solo los aceites de *O.basilicum* y *O.gratissimum* son producidos comercialmente (Reyes y Patiño, 2007; Zheljazkov y col., 2008; Jeba y Vaidyanathan, 2011). En el cuadro 2 se presenta una lista de plantas aromáticas con la parte que es utilizada de cada una de ellas para la obtención de aceites esenciales.

Cuadro 2. Partes de plantas empleadas en la obtención de aceite esencial (Ortuño, 2006).

Aceite esencial	Parte de la planta utilizada
Ciprés, jara	Ramas
Lavanda, lavandín	Sumidades floridas
Menta, hierba limón, eneldo	Planta entera
Geranio	Hojas
Neroli, rosa ylang ylang	Flor
Limón, naranja, mandarina	Capa externa del fruto
Romero, tomillo, ajedrea, mejorana	Panta entera con flor
Melissa	Planta fresca
Abeto de Siberia	Acículas
Manzanilla	Flor seca
Canela	Corteza
Cedro	Madera
Lima	Fruto entero
Clavo	Botones florales
Vetiver	Raíz
Mostaza	Semillas
Albahaca	Hojas

Los principales compuestos que conforman el aceite esencial son: metil chavicol (85.5 %), linalool (1.1 %), y limoneno (2.6 %). Los componentes minoritarios son: α -pineno (0.18 %), alcohol fenchílico (1.2 %), citronelol (0.65 %), geraniol (0.03 %), cinamato de metilo (0.5 %) y eugenol (0.78 %), entre otros (Reyes y Patiño, 2007). En la figura 1 se muestran los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de *Ocimum* spp.

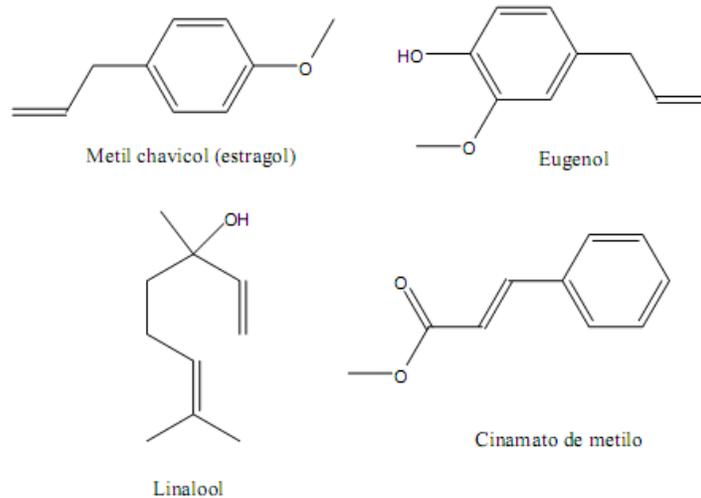


Figura 1. Principales componentes de aceite esencial de *Ocimum* spp (Ortuño, 2006).

La variación de la composición química del aceite esencial de albahaca es grande, esto debido a que esta planta crece en diferentes partes del mundo, lo cual dificulta también la estandarización internacional de su aceite (Reyes y Patiño, 2007; González- Zúñiga, y col., 2011).

El aceite esencial de albahaca es utilizado contra la depresión, el agotamiento nervioso y la fatiga mental; se recomienda como antiséptico; es usado también como repelente de insectos y como refrescante, añadiendo 5 gotas al baño (Fonnegra y col., 2007).

1.3.4 Importancia económica de los aceites esenciales

La importancia económica que representan los aceites esenciales en el mundo es alta, debido al cultivo de las plantas aromáticas usadas para su obtención. Es un mercado dinámico competitivo y en continua expansión, debido a la gran y variada aplicación de esencias naturales en las industrias tanto alimenticia como cosmética principalmente (Reyes y Patiño, 2007). La producción mundial de aceites esenciales

es de miles de toneladas anuales, es decir nos encontramos ante un mercado de indudable importancia económica y de tamaño considerable (Ortuño, 2006). En el Cuadro 3 se muestran algunos datos relacionados con la producción global de aceites esenciales más importantes

Cuadro 3. Producción mundial de algunos aceites esenciales
(Ortuño 2006)

Aceite esencial	Producción mundial (ton)
Rosa	5
Albahaca	10
Jazmín	10
Laurel	50
Madera de sándalo	125
Mandarina	150
Bergamota	200
Lavanda	1500
Menta	5000
Naranja	10000
Trementina	300000

En la actualidad, se pretende introducir este tipo de cultivos en países subdesarrollados, donde las condiciones climáticas y las características del terreno permitan el cultivo de cualquier planta aromática, como una forma de aumentar las perspectivas de la población y la riqueza general del país. En

Marruecos se exportan alrededor de 60 toneladas de aceite esencial de romero, obtenido a partir de la destilación artesanal de 15 000 toneladas de romero.

1.4 Actividad antioxidante

En los últimos años se ha despertado un gran interés por los radicales libres y su relación con el envejecimiento celular. La teoría de los radicales libres, propuesta por Harman a mediados de los 50, es la que mejor explica el envejecimiento aunque en él se encuentran implicados numerosos factores fisiológicos, genéticos y sociales (López y col., 2007).

Los radicales libres son especies químicas que pueden ser tanto átomos como moléculas que tienen un electrón desapareado en su último orbital (Kotz y Treichel, 2003), lo cual hace que sean muy inestables y altamente reactivos, pudiendo alterar estructuras biológicas fundamentales como lípidos de membrana, ácidos nucleicos y proteínas, lo cual se traduce en un aumento del estrés oxidativo, que está directamente relacionado con el envejecimiento celular y algunos procesos fisiopatológicos como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y determinadas formas de cáncer (Adedapo y col., 2009).

Estos radicales pueden formarse en el interior de las células como producto de los procesos fisiológicos propios del organismo, como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio (Velázquez y col., 2004), o bien pueden generarse también a partir de fuentes exógenas como factores ambientales, las radiaciones ionizante, ultravioleta, visible y térmica, así como algunos productos químicos carcinogénicos, aditivos químicos en alimentos, pesticidas y humo del cigarro entre otros (González Torres y col., 2000).

Los radicales derivados del oxígeno son altamente tóxicos y son capaces de reaccionar con diversas moléculas orgánicas, mecanismo a través del cual provocan daño a nivel celular y tisular, con la consiguiente alteración de su función. Las

especies reactivas de oxígeno se forman por la reducción secuencial del oxígeno (O_2), que primero produce el radical superóxido (O_2^-), y el radical perhidroxilo (HO_2), posteriormente genera el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y finalmente el radical hidroxilo (OH) (González-Torres y col., 2000; Adedapo, y col., 2009). Estos radicales pueden además inducir daños oxidativos a biomoléculas como lípidos, ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos, pudiendo causar daños que puede desencadenar en cáncer, entre otras enfermedades (Huda-Faujan y col., 2007).

Para neutralizar este efecto, las células de nuestro organismo presentan mecanismos de protección, de manera que los radicales libres derivados de la activación del oxígeno pueden ser transformados a productos menos tóxicos o no tóxicos. No obstante, el estilo de vida actual está inclinado hacia un aumento de estrés oxidativo, por lo que es recomendable el aporte de antioxidantes exógenos ya sea a través de la dieta, suplementos de vitaminas y minerales o bien mediante el consumo de plantas medicinales (López y col., 2007; González Torres y col., 2000).

Los antioxidantes son un grupo de sustancias que tienen la capacidad de reducir o evitar la intensidad de las reacciones de oxidación, a través de un mecanismo que suele conllevar su propia oxidación. Pueden ser enzimas producidas por el organismo o sustancias que provienen de los alimentos (Youngson, 2003; Badui y Dergal, 1999).

Por otra parte, los propios antioxidantes pueden oxidarse, polimerizarse y generar complejos ligeramente oscuros, esta transformación se acelera con la luz, las altas temperaturas, pero generalmente no disminuye su poder protector (Badui y Dergal, 1999).

En la Figura 2 se muestra cómo el efecto de los antioxidantes evitan que los componentes celulares se oxiden y de esta manera puedan proteger al organismo.

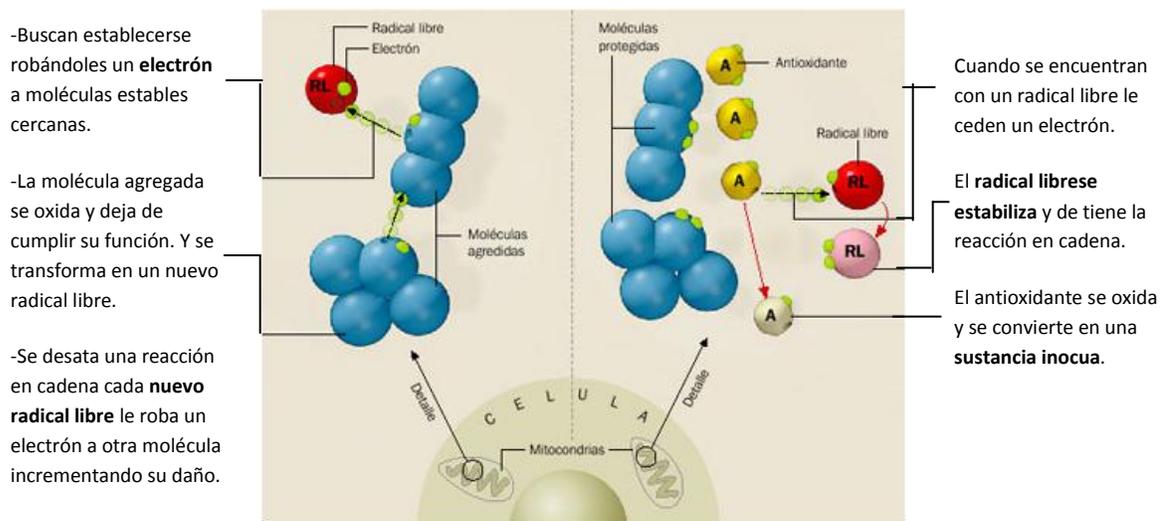


Figura 2. Acción de los antioxidantes sobre los radicales libres (Youngson, 2003).

La aplicación de compuestos antioxidantes no solo están restringidas a la industria alimentaria y farmacéutica, también suelen ser usados para evitar la degradación oxidativa de polímeros, como gomas y plásticos para evitar la oxidación de gasolinas, decoloración de pigmentos naturales y sintéticos, así como aditivos en la industria cosmética (Birjees y col., 2008).

Las plantas son fuentes naturalmente potenciales de antioxidantes (Huda-Faujan y col., 2007). Algunas plantas aromáticas y especias, por lo general son usadas para dar sabor a algunos platillos, sin embargo son una excelente fuente de compuestos fenólicos y por lo tanto se ha mostrado que poseen capacidad antioxidante y pueden ser usados como conservadores de alimentos (Hinneburg y col., 2006; Birjees y col., 2008). La familia Lamiaceae es una de las más empleadas en el mundo como fuente de especias y de extractos con propiedades antibacteriales y antioxidantes. Dentro de ella, el género *Ocimum* comprende varias especies, principalmente la albahaca, con actividades biológicas reconocidas científicamente.

1.4.1 Compuestos fenólicos

Las plantas producen una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol, grupo funcional hidroxilo en un anillo aromático. Estas sustancias se clasifican como compuestos fenólicos. Los fenoles son compuestos químicos, metabolitos secundarios presentes en las plantas, que se caracterizan por poseer al menos un anillo aromático sustituido con uno, o varios, grupos hidroxilo, provenientes de dos rutas principalmente: la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico (Taiz y Zeiger, 2006). La combinación de ambas rutas principales da lugar a la formación de los flavonoides que es el subgrupo de compuestos fenólicos que presenta mayor diversidad y una distribución más amplia en el reino vegetal (Castillo y Martínez, 2007).

Los compuestos fenólicos de las plantas forman un grupo químicamente heterogéneo de unos 10 000 compuestos, algunos de los cuales son solubles sólo en solventes orgánicos, otros en ácidos carboxílicos y glicósidos solubles en agua, mientras que otros son grandes polímeros muy insolubles (Taiz y Zeiger, 2006). De acuerdo con su diversidad química, los fenoles tienen funciones muy diversas en las plantas. Pueden clasificarse en cinco grupos diferentes: antocianinas (pigmentos), flavonoides menores, flavonas y flavonoles, isoflavonoides y taninos condensados (Castillo y Martínez, 2007). A continuación en la Figura 3 se puede observar la estructura química de algunos de los compuestos fenólicos mencionados anteriormente.

La ruta del ácido shikímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de fenoles en las plantas, convierte los precursores de carbohidratos derivados de la glicólisis y de la ruta de las pentosas fosfato en aminoácidos aromáticos. Uno de los intermediarios de la ruta es el ácido shikímico, del cual proviene el nombre, (Taiz y Zeiger, 2006). La vía del ácido malónico, aunque es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, es poco empleada en plantas superiores.

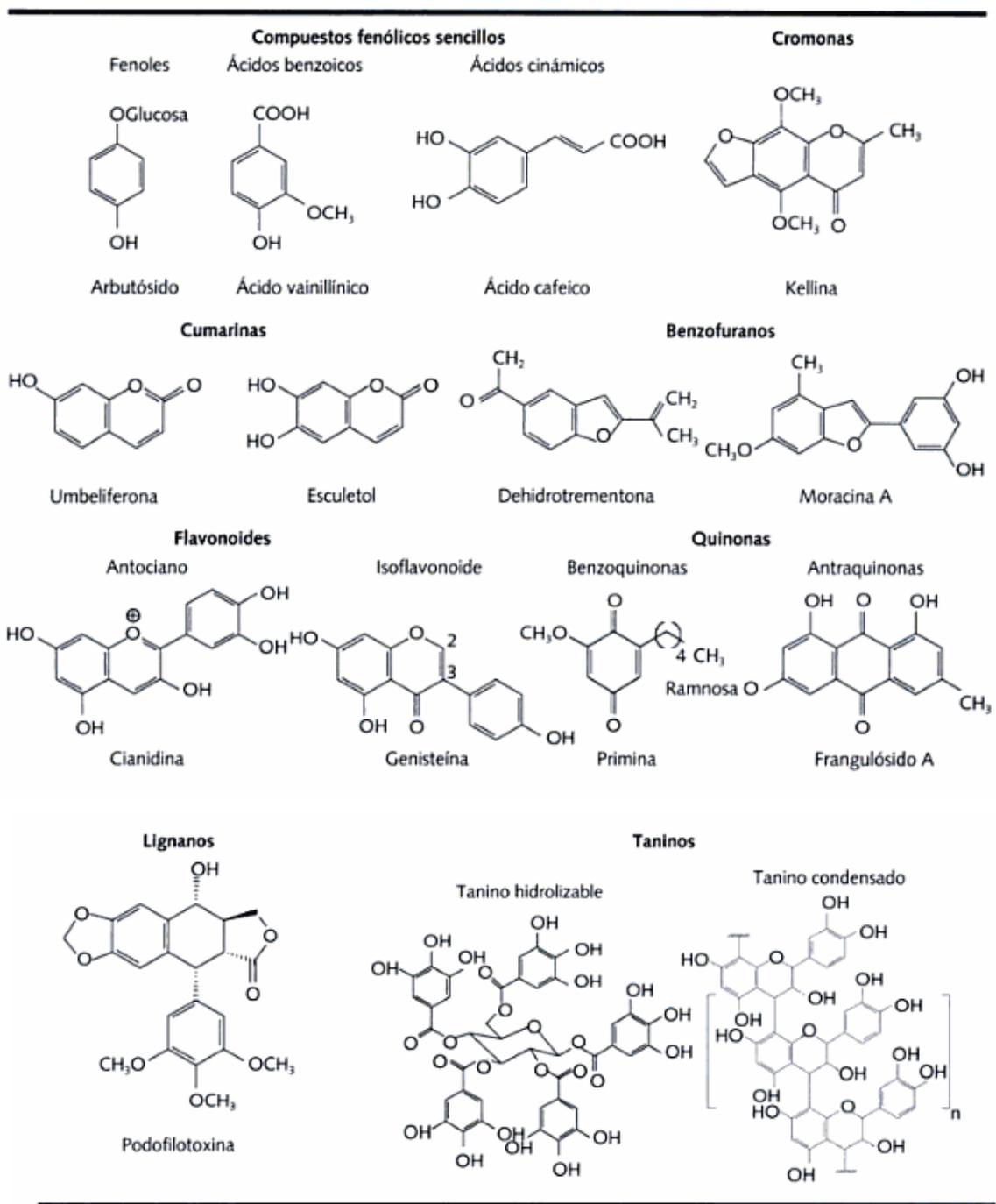


Figura 3. Estructuras químicas de diferentes compuestos fenólicos (Castillo y Martínez, 2007).

Estos compuestos que conforman uno de los grupos fitoquímicos más grandes, son de gran importancia fisiológica y morfológica en las plantas. Presentan una amplia

gama de propiedades tales como antialérgico, antiaterogénico, antiinflamatorios, antimicrobianos y antioxidantes. Se ha encontrado que también poseen efectos vasodilatadores y cardioprotectores (Aberoumand y Deokule, 2008).

El ácido rosmárico es uno de los ácidos caféicos más abundantes presentes en *Ocimum* spp. Se ha encontrado que el ácido rosmárico y sus derivados tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y tiene actividad inhibitoria de la ciclooxigenasa, que es comparable con el ibuprofeno, naproxeno y la aspirina. Otro ácido similar es el litospérmico, el cual se sabe que es un constituyente fenólico muy común en la mayoría de las lamiáceas. Presenta efectos vasodilatadores e hipotensores, con lo cual se ha encontrado que puede servir como un compuesto de defensa contra varios patógenos de las plantas, así como para *Pseudomonas aeruginosa* (Javanmardi y col., 2002).

1.5 Medición de la capacidad para neutralizar radicales libres.

1.5.1 Determinación de Fenoles Totales

Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales son el ensayo de la vainillina y el de Folin-Ciocalteu. Éste último se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez y col., 2008).

1.5.2 Poder reductor/ antioxidante de hierro férrico, FRAP

Benzie y Strain propusieron en 1996 un método para determinar la capacidad del plasma sanguíneo para reducir iones férricos: “Ferric Reducing Ability of Plasma” (FRAP). La aplicación de este método a la estimación de la capacidad antioxidante de todo tipo de muestras ha dado lugar a una redefinición de las siglas FRAP (por las que comúnmente se conoce este ensayo), pasando a denominarse también este ensayo como Poder férrico reductor/antioxidante (Ferric-Reducing Antioxidant Power).

El ensayo FRAP mide directamente la capacidad de los antioxidantes para reducir un complejo de Fe (III) con una tripiridiltriazina, la 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Ver Figura 4), al correspondiente complejo de Fe (II) en medio ácido. El color azul resultante puede medirse espectrofotométricamente a 593 nm y se considera que está directamente relacionado con la capacidad reductora total de los antioxidantes dadores de electrones presentes en la muestra ensayada.

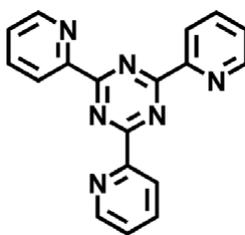


Figura 4. Estructura de la 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Fernández y col., 2007).

La utilización de este método se ha ido extendiendo por la facilidad en la obtención de los resultados, y se ha aplicado a muchos tipos de muestras biológicas.

2. HIPÓTESIS

Las plantas de *Ocimum basilicum* cultivar Nufar inoculadas con dos aislados bacterianos del género *Bacillus*, mejoran la producción de biomasa, contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar el efecto de la inoculación de dos cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal del género *Bacillus* sobre la producción y el efecto antioxidante en plantas de albahaca.

3.2 Específicos

- Inocular semillas de albahaca Cv Nufar con cepas de *Bacillus* identificadas como P12 y M6, y una interacción P12XM6, y llevarlas a condiciones de invernadero.
- Determinar el efecto de la inoculación sobre los parámetros agronómicos: altura, biomasa y peso de las raíces secas.
- Cuantificar el contenido de fenoles totales tanto en la planta completa como la parte floral y vegetativa por medio del uso del Reactivo de Folin- Ciocalteu.
- Determinar la capacidad antioxidante en la planta completa, así como en la parte floral y vegetativa de plantas de *Ocimum basilicum* mediante el método FRAP.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1. Material biológico

Semillas de albahaca (*Ocimum basilicum*) cultivar Nufar, la cual es la primer variedad resistente a *fusarium*. Es un tipo de albahaca genovesa con gran sabor. Es una planta arbustiva, de hojas ovaladas, de color verde brillante, las flores son blancas. Se utiliza para cocinar principalmente platillos italianos y tailandeses (Backyard Gardener, 2011).

Aislados bacterianos identificados como M6 y P12, de las cuales a continuación en el Cuadro 4 se muestran sus principales propiedades bioquímicas y las capacidades microbianas relacionadas con el efecto promotor del crecimiento vegetal.

Cuadro 4. Propiedades Bioquímicas de las cepas de estudiorelacionadas con el efecto promotor del crecimiento vegetal (Mora, 2010).

Cepa	Eficiencia de solubilización %	[P] ^{mg L⁻¹}	pH	[índoles] ^{mg L⁻¹}	Tinción Gram
M6	1.39.058 ± 0.844	55.817 ± 1.73	4.85 ± 0.057	4.216 ± 0.41	+
P12	140	13.59 ± 2.67	5.1	6.81 ± 2.037	+

Cuadro 4. Propiedades bioquímicas de las cepas de estudio relacionadas con el efecto promotor del crecimiento vegetal (Mora, 2010). (Continuación).

Producción de sideróforos	Producción de HCN	Actividad ACC-deaminasa	NFB
+	-	+	+
-	-	+	+

NFB=Fijación Biológica de Nitrógeno

HCN= ácido cianhídrico

4.1.2. Medios de cultivo

Caldo nutritivo (Bioxon, México).

4.1.3. Reactivos

Solución salina (NaCl) 0.085 %, solución hipoclorito de sodio (NaClO) al 3 %, goma arábica al 5 %, sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄), metanol al 80 %, reactivo de Folin-Ciocalteu, solución de carbonato de sodio al 15 % (Na₂CO₃), buffer de fosfatos 0.2 M y pH de 6.6, solución de ferrocianuro de potasio al 1 % (K₃Fe (CN)₆), solución de ácido tricloroacético al 10 %, solución de cloruro férrico al 0.1 % (FeCl₃).

4.2. Métodos

Cuadro 5. Descripción de actividades durante el ensayo 1

Fecha 2011	Actividad
03-mar	Preparación del inóculo
04-mar	Desinfección e inoculación de semillas
06-mar	Germinación de semillas
17-mar	Inicio de fertilización con solución de Hoagland al 25%
11-abr	Preparación de suelo
12-abr	Trasplante de 21 plántulas por tratamiento
17-abr	Comienzo de fertilización con solución de Hoagland al 50%
20-abr	Primera inoculación de plantas
08-jul	Segunda inoculación de plantas
12-jul	Tercera inoculación de plantas
14-jul	Medición de altura de plantas
15-jul	Cosecha de plantas
	Secado de plantas
30-ago	Preparación de la muestra
05-sep	Determinación de fenoles totales y FRAP

El experimento se realizó en dos ocasiones, para lo cual fueron identificados como ensayo 1 y 2, a continuación en los Cuadros 5 y 6 se muestran las actividades realizadas durante cada uno de los ensayos, posteriormente se irán describiendo cada una de las actividades que se llevaron a cabo en cada caso.

Cuadro 6. Descripción de actividades durante el ensayo 2

Fecha	Actividad
30-mar	Preparación del inóculo
31-mar	Desinfección e inoculación de semillas
02-abr	Germinación de semillas
12-abr	Inicio de fertilización con solución de Hoagland al 25%
02-may	Preparación de suelo
03-may	Trasplante de 12 plántulas por tratamiento
08-may	Comienzo de fertilización con solución de Hoagland al 50%
06-jun	Poda (corte de ápices hasta el tercer nudo)
	Primera inoculación de plantas
8-jul	Segunda inoculación de plantas
2-sep	Tercera inoculación de plantas
	Cosecha de plantas, dividiendo en parte vegetativa y floral (Figura 8).
12-oct	Determinación de biomasa de plantas de albahaca
	Secado de plantas
	Preparación de la muestra
21-oct	Determinación del peso de raíces
25-oct	Determinación de fenoles totales y FRAP

Como puede observarse, la diferencia entre el ensayo 1 y 2 es el tiempo de duración, siendo de 5 y 7 meses respectivamente, así como la determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante que se determinaron en planta completa

para ensayo 1, mientras que para ensayo 2 las plantas se dividieron en parte floral y vegetativa en el ensayo 2.

4.2.1 Inoculación de semillas de albahaca.

4.2.1.1 Preparación del inóculo

Se sembraron los aislados bacterianos identificados como M6 y P12 (Inoculadas previamente con fecha de 17 de enero de 2011), se colocó cada cepa en tubos con 5 mL de caldo nutritivo previamente esterilizados. Se dejó en incubación a 180 rpm y 30°C durante 16 h. Después de este tiempo, los cultivos se inocularon en frascos con 150 mL de caldo nutritivo (estériles), se dejaron en incubación bajo las condiciones antes mencionadas durante 4 h aproximadamente, hasta que el caldo nutritivo mostró turbidez, lo cual indica el crecimiento de la bacteria en el medio. Posteriormente se llevó a refrigeración durante 30 min aproximadamente y se llenaron tubos falcon con 14 mL cada uno. Se centrifugaron los tubos durante 10 min, se tiró el sobrenadante y se hicieron dos lavados con solución salina, resuspendiendo en cada ocasión la solución con ayuda del vortex. Al final se juntaron en un solo tubo por cepa, se llevó a 14 mL y se volvió a centrifugar durante 10 min. Se mantuvo en refrigeración la pastilla que quedó, finalmente se resuspendió la pastilla en 2 mL de solución salina, de la cual se tomaron 25 μ L más 500 μ L de solución salina. Se colocaron en un tubo eppendorf, resuspendiéndose en el vortex. De esta solución se tomaron 50 μ L y se colocaron en la cámara de Neubauer para su conteo. De esta manera se obtuvieron soluciones bacterianas de 2×10^9 ufc.

4.2.1.2 Preparación de goma arábica, desinfección e inoculación de semillas

Para realizar la inoculación se desinfectaron 50 semillas de albahaca variedad Nufar por cada tratamiento (P12, M6 y M6XP12) y se incluyó también un tratamiento control.

Para la desinfección de semillas, se sumergieron en solución de NaClO al 3 % durante cinco min. Se lavaron 2 veces con agua destilada para retirar el exceso de cloro y se dejaron secar.

Se colocaron 2 mL de cada solución bacteriana más 2 mL de goma arábica (al 5 %) en vasos de precipitados. Para la interacción se hizo una mezcla de ambas cepas (1:1). Posteriormente se les adicionaron las semillas correspondientes a cada tratamiento. Se dejaron durante 1 h en agitación a 160 rpm a 30 °C.

4.2.2 Metodología para la siembra y producción de albahaca

4.2.2.1 Siembra de semillas.

Se llenó una charola de germinación con peat moss previamente humedecido, posteriormente se procedió a la siembra de las semillas de albahaca inoculadas, colocando una semilla por cavidad, identificando debidamente cada tratamiento. Se colocó una capa delgada de peat moss sobre las semillas para taparlas, se introdujeron en una bolsa negra de plástico, para mantener la humedad y evitar la luz para así favorecer la germinación. Ya que germinaron se sacaron, procurando mantenerlas en buenas condiciones de luz y humedad. Después de diez días se comenzaron a fertilizar con la solución nutritiva de Hoagland recomendada por Succop y Newman, 2004 al 25 % cada tercer día (Ver Cuadro 7).



Figura 5. Germinación de semillas y plántulas de albahaca

4.2.2.2 Trasplante de plántulas

Para el trasplante se prepararon macetas con suelo agrícola de textura arcillosa con arena en proporción 9:1 perfectamente homogeneizado. El suelo se tamizó en una malla de poro grande, del No. 5. Se llenaron las macetas con la mezcla humedeciendo el suelo previo al trasplante. Se seleccionaron las plántulas de aquellos tratamientos en los que se observó un mejor resultado en cuanto a porcentaje de germinación, así como mayor vigor visual en las plántulas, siendo los tratamientos P12 y M6 los que presentaron dichas características. Se extrajeron las plántulas de la charola con mucho cuidado procurando no dañar el cepellón, se colocaron en el sustrato de la maceta, cuidando que quedara bien acomodada, sin voltearse y con las raíces completamente cubiertas por el sustrato. Al finalizar se les dio un riego profundo a todas las macetas, y se llevaron al vivero. Cinco días posteriores al trasplante comenzó la fertilización de las plantas con la solución nutritiva antes mencionada pero ahora al 50 %, cada tercer día.

Cuadro 7. Solución nutritiva de Hoagland
(Succop y Newman, 2004)

Reactivos	g L ⁻¹
KNO ₃	0.75
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.297
Ca(NO ₃) ₂	1.062
MgSO ₄	0.396
FeSO ₄	0.0186
MnSO ₄	0.00077
CuSO ₄	0.0014
HBO ₃	0.0034
ZnSO ₄	0.0011
(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄	0.00077

4.2.2.3 Inoculación de plantas para ensayo uno

Después de ocho días posteriores al trasplante se llevó a cabo la inoculación de las plantas, agregando 5 mL a cada maceta de una solución bacteriana de concentración 2×10^6 ufc, los cuales fueron distribuidos en la base de la planta.

Transcurridas cuatro y ocho semanas posteriores al trasplante se realizó una segunda y tercer inoculación respectivamente de 100 mL de una solución bacteriana de misma concentración, sobre la base de la planta.

4.2.2.4 Inoculación de plantas para ensayo dos

Después de ocho días posteriores al trasplante se llevó a cabo la primera inoculación de las plantas, agregando 5 mL a cada maceta de una solución bacteriana de concentración 2×10^6 ufc, los cuales fueron distribuidos en la base de la planta.

Se realizaron dos inoculaciones más, la primera a las 4 semanas posteriores a la anterior inoculación y la tercera 8 semanas después a la anterior, para cada caso se inocularon 100 mL de una solución bacteriana de misma concentración, sobre la base de la planta.

4.2.2.5 Cosecha de plantas para ensayo uno

Una vez iniciado el periodo de floración, después de 12 semanas posteriores al trasplante se llevó a cabo la cosecha de las plantas, de tal manera que se extrajeron las plantas completas de la maceta y se llevaron al laboratorio para su posterior análisis.

4.2.2.6 Poda y cosecha de plantas para ensayo dos

Cuatro semanas posteriores al trasplante se llevó a cabo la poda (al mismo tiempo que la primera inoculación de plantas), la cual consistió en cortar al tercer nudo todos los ápices de las plantas dejándolo a una altura de 11 cm aproximadamente de la raíz hacia el ápice (Figura 6), esto para estimular la ramificación de las plantas.



Figura 6. Poda y corte de ápices.

La cosecha se realizó a los cuatro meses posteriores a su trasplante, se hizo una clasificación a las plantas de cada tratamiento, separándolas como plantas a media floración, o bien plantas con inflorescencias (etapa 2, ver Figura 7) y plantas en completa floración (etapa 3, ver Figura 8), posteriormente cada planta fue dividida en dos partes: floral y vegetativa. La primera consistió en inflorescencias y la segunda compuesta por las hojas y tallos. Se colocaron en bolsas debidamente identificadas y se llevaron al laboratorio.



Figura 7. Plantas identificadas en etapa 2.



Figura 8. Plantas identificadas como en etapa 3.

4.2.3 Determinación de parámetros de producción

4.2.3.1 Determinación de biomasa para ensayo 2

Para las primeras plantas, una vez obtenidas de la maceta, se lavaron las raíces perfectamente, evitando que quedaran restos de sustrato en ellas, se enjuagaron las hojas y tallos de las plantas, se secaron con papel y se pesaron, tomando este peso como peso húmedo. Se colocaron sobre hojas de papel de estraza y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 72 h (Ver Figura 9). Después se volvieron a pesar (peso seco) y se anotó.





Figura 9. Plantas de albahaca durante el secado

4.2.3.2 Medición de la altura de planta para ensayo 1

Previo a la primera cosecha, se registró la altura de cada una de las plantas correspondientes a cada tratamiento, midiendo desde el nivel del suelo hasta la yema terminal de la planta con ayuda de un flexómetro.

4.2.3.3 Determinación del peso de raíces para ensayo 1

Para las plantas de la segunda cosecha, una vez que se lavaron y se secaron durante 72 h, se pesó también la raíz de cada una de las plantas correspondientes a cada tratamiento.

4.2.4 Determinación de la capacidad antioxidante en albahaca

4.2.4.1 Preparación de la muestra para ensayo 1

Una vez que se ha pesado la planta seca se pulverizó toda la planta incluyendo hojas, raíz e inflorescencias con ayuda de un molino y se guardaron en recipientes cerrados hasta su posterior análisis.

4.2.4.2 Preparación de la muestra para ensayo 2

Posterior a la cosecha y una vez que las muestras fueron llevadas al laboratorio se lavaron con agua de la llave, se secaron con papel absorbente, se dividieron en dos partes: la parte floral que incluye flores e inflorescencias, y en parte vegetativa la cual está conformada por tallos y hojas, como se muestra a continuación en la Figura 10. Se dejaron secar sobre papel de estraza bajo condiciones ambientales durante 72 h. Posteriormente se molieron y se guardaron en recipientes cerrados debidamente identificados para su posterior análisis.

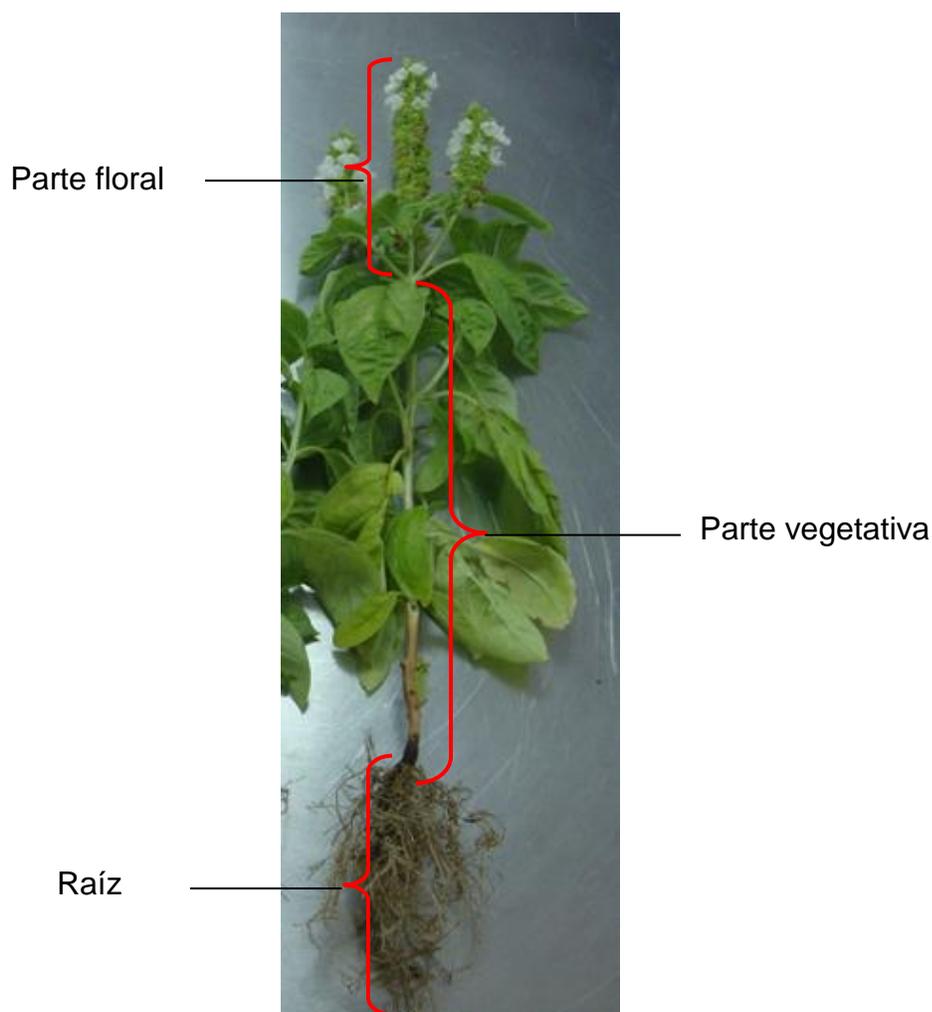


Figura 10. Identificación de parte floral, vegetativa y raíz

Se tomó 0.1 g de cada muestra pulverizada y se colocaron en matraces aforados de 10 mL, debidamente identificados. Se añadieron 8 mL de metanol al 80 % y se dejaron macerar durante 16 h en un agitador mecánico a 160 rpm. Finalmente se aforó cada matraz con metanol al 80 % y se filtró.

4.2.4.2 Determinación de fenoles totales mediante el uso del Reactivo de Folin- Ciocalteu

En un tubo de ensayo de 15x100 se pusieron 100 μL del extracto metanólico, 1150 μL de agua destilada y 250 μL de Reactivo de Folin-Ciocalteu, los cuales se dejaron reaccionar durante tres minutos, después se agregó 1 mL de Na_2CO_3 al 15 % y 2.5 mL de H_2O , se agitó la solución durante 15 s en el vortex y se dejó incubar en un baño de agua durante 15 min a 45 °C, la mezcla fue leída en el espectrofotómetro a 760 nm, para determinar la concentración de fenoles totales se empleó una curva estándar de ácido gálico con concentraciones que van desde 2.98 hasta 14.9 mgL^{-1} , como a continuación se muestra en la Figura 11.

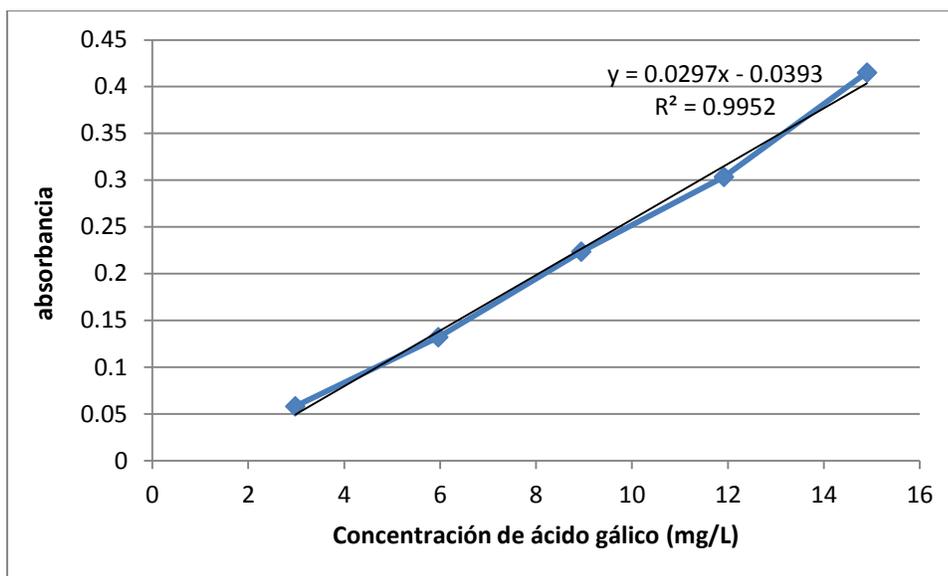


Figura 11. Curva estándar de ácido gálico para determinación de fenoles totales

4.2.4.3 Determinación del Poder Reductor Antioxidante, por el método FRAP

En un tubo de ensayo de 15x100 se colocaron 100 μL del extracto metanólico, 2.5 mL de solución buffer de fosfatos y 2.5 mL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ al 1 %, se dejó incubar en un baño de agua durante 30 min a 50 $^\circ\text{C}$, después se le agregaron 2.5 mL de ácido tricloroacético al 10 % y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. Se tomaron 0.4 mL del sobrenadante y se le añadieron 3.6 mL de H_2O y 1 mL de FeCl_3 al 1 %. Se leyó en el espectrofotómetro a 700 nm. Para determinar la actividad antioxidante se empleó una curva estándar de ácido ascórbico en concentraciones que van de 40 a 200 μM , a continuación se muestra en la Figura 12 la curva estándar obtenida.

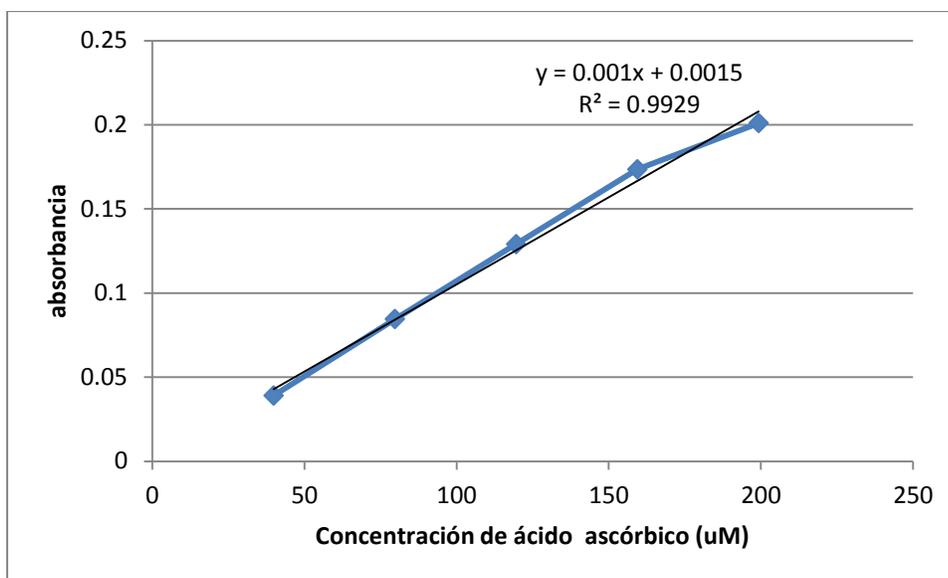


Figura 12. Curva estándar de ácido ascórbico para determinación de poder reductor antioxidante.

5. RESULTADOS

5.1 Determinación de biomasa, ensayo 2

El primer parámetro agronómico que fue evaluado en este estudio es el contenido de biomasa en las plantas de albahaca, cuyos resultados pueden observarse en el Cuadro 8. Se encontró que el tratamiento M6 fue el de mayor contenido de biomasa, al tener un aumento de 39.31 % sobre el tratamiento control, con una diferencia en peso fresco de 14.04 g y 2.66 g en peso seco entre ellos, se observa también que presentan diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 95 %.

Cuadro 8. Cantidad de Biomasa en plantas de albahaca

MUESTRA	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Testigo	35.71 a	6.55 a
P12	40.24 a	7.52 ab
M6	49.75 b	9.21 b
M6XP12	48.23 b	8.85 ab

Medias con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$).

Los resultados obtenidos en este análisis pudieron comprobarse al comparar visualmente todos los tratamientos, observando claramente que las plantas inoculadas con M6 se veían más vigorosas con respecto a las de los demás tratamientos, como puede observarse en las Figuras 13, 14, 15 y 16 que se muestran a continuación.



Figura 13. Plantas testigo



Figura 14. Plantas tratamiento P12



Figura 15. Plantas tratamiento M6



Figura 16. Plantas tratamiento P12 X M6 (Interacción).

5.2 Medición de la altura de plantas, ensayo 1

El siguiente parámetro agronómico evaluado fue la altura de las plantas. A continuación en el Cuadro 9 se muestran los resultados obtenidos de la medición que se obtuvo de cada planta.

Cuadro 9. Datos de altura de plantas de albahaca

Altura (cm)			
Testigo		P12	M6
34		32	37
36		33	34
37		21	37
36		28	37
36		37	38
39		40	35
35		36	34
31		30	36
25		27	35
39		39	34
29		39	33
32		36	39
34		40	32
34		36	34
36		41	37
37		33	51
32		40	35
36		36	36
36		36	36
33		36	34
31		21	40
\bar{x}	34.19	34.14	36.38
σ	3.27	5.71	3.80
% c.v	9.6	16.7	10.4

Se observó que las plantas con mayor altura son las correspondientes a la inoculación con la cepa M6, con un 6.4 % sobre el tratamiento control, mientras que el tratamiento P12 presenta un comportamiento muy similar al del testigo, aunque el análisis de varianza no muestra una diferencia significativa entre los tratamientos.

5.3 Determinación del peso de raíces, ensayo 2

El último parámetro agronómico a evaluar fue el peso de las raíces de las plantas de albahaca. En el Cuadro 10 podemos observar los resultados obtenidos de este análisis.

Cuadro 10. Datos de peso de raíces secas.

Peso de raíces (g)				
Testigo	P12	M6	M6 X P12	
5.625	3.801	5.364	5.353	
5.361	5.428	3.676	4.293	
4.807	4.891	4.329	5.01	
6.244	5.123	5.748	5.343	
5.303	4.16	5.671	4.36	
4.536	6.859	5.47	3.87	
2.761	4.091	2.86	5.491	
5.1	4.077	3.999	3.799	
4.896	3.739	3.489	4.75	
4.632	4.248	3.288	5.575	
4.744	4.05	4.603	4.939	
4.025	4.728	5.95	5.831	
\bar{x}	4.836	4.600	4.537	4.885
σ	0.867	0.889	1.081	0.677
% c.v	17.936	19.330	23.823	13.857

Al realizar la comparación de los resultados obtenidos para el peso de raíces, se pudo observar que las plantas inoculadas con la interacción entre cepas fueron las que se mostraron más homogéneas, por lo que este tratamiento presentó una mayor cantidad de raíces en peso con 4.885 g, lo cual equivale a un aumento del 1.01 % sobre el tratamiento testigo, seguida del tratamiento P12 y M6. Sin embargo estos dos últimos tratamientos se encuentran por debajo del valor que presenta el testigo, sin presentar diferencia significativa entre tratamientos.

5.4 Determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante para ensayo 1

Para la primera cosecha se realizó la determinación de Fenoles Totales y de FRAP usando la planta completa. En el Cuadro 11 se muestran los resultados obtenidos, donde se observó que el testigo es superior a los demás tratamientos con un contenido de fenoles totales de 55.83mgAG/g de muestra. Mientras que para FRAP el tratamiento P12 es superior a los demás con 93.89 mg AA/g muestra.

Cuadro 11. Fenoles totales y capacidad antioxidante en planta completa.

MUESTRA	FT (mg AG/gmuestra)	FRAP (mg AA/gmuestra)
Testigo	55.83a	81.66 b
P12	53.91a	93.89 a
M6	48.19a	91.88 a
M6XP12	43.34b	84.65 b

Medias con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$).

Sin embargo no existe diferencia significativa a un nivel de confianza del 95 % en el contenido de fenoles totales entre el testigo y los tratamientos P12 y M6, no obstante el tratamiento M6XP12 sí presenta diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos.

5.5 Determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante para ensayo 2

Para la segunda cosecha se observó que el contenido de FT es superior en la parte floral para todos los tratamientos donde va desde los 33.12 hasta los 48.54 mgAG/g muestra, en los que, no existe diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 95 %.

Se observa también en el Cuadro 12, que los resultados del contenido de FRAP son superiores en la parte floral con respecto a la parte vegetativa (Ver Cuadro 13). Siendo 52.84 mg AA/gmuestra el valor más bajo en el testigo y 133.45mg AA/gmuestra el valor más alto en etapa vegetativa y floral respectivamente.

Cuadro 12. Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en etapa floral 2

MUESTRA	FT (mg AG/gmuestra)	FRAP (mg AA/gmuestra)
Testigo	48.54 ^a	130.35a
P12	34.05 ^a	112.69a
M6	37.15 ^a	133.45a
M6XP12	33.12 ^a	119.08a

Medias con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$).

Cuadro 13. Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en etapa vegetativa 2

MUESTRA	FT (mg AG/gmuestra)	FRAP (mg AA/gmuestra)
Testigo	20.42a	52.84a
P12	23.62a	61.50a
M6	23.98a	64.92a
M6XP12	23.78a	68.98a

Medias con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$).

En la etapa 3 se pudo observar que para fenoles totales el mejor tratamiento es M6, tanto para la parte floral como para la parte vegetativa con valores de 33.26 y 22.59 mg AG/g muestra respectivamente, teniendo un incremento de 5.42 % sobre el tratamiento testigo (Ver Cuadro 14).

Cuadro 14. Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en etapa floral 3

MUESTRA	FT (mg AG/gmuestra)	FRAP (mg AA/gmuestra)
Testigo	31.55a	756.60a
P12	32.62a	823.37a
M6	33.26a	847.35a
M6XP12	32.48a	954.53a

Cuadro 15. Fenoles totales y capacidad antioxidante en etapa vegetativa 3

MUESTRA	FT (mg AG/gmuestra)	FRAP (mg AA/gmuestra)
Testigo	20.28a	214.09 b
P12	21.54a	263.53 b
M6	22.59a	318.27 a
M6XP12	24.41a	331.45 a

Medias con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$).

Para el contenido de FRAP la interacción es la que representa el mejor tratamiento, encontrándose que existe diferencia significativa a un nivel de confianza del 95% entre tratamientos. El tratamiento M6 es significativamente igual a la interacción, siendo significativamente diferentes en comparación al testigo y P12 (Ver Cuadro 15).

6. DISCUSIÓN

Las bacterias del género *Bacillus* sintetizan fitohormonas como el ácido indolacético y giberelinas que promueven el desarrollo vegetal y estimulan el crecimiento del tallo de las plantas mediante la división y elongación celular, así como la influencia en la formación de flores (Pérez, 2012), en este estudio se encontró que la inoculación de la cepa identificada como M6 promueve el crecimiento vegetal y por lo tanto incrementa la cantidad de biomasa, lo cual puede deberse precisamente a la síntesis y producción de las fitohormonas mencionadas anteriormente. Uno de los parámetros que podemos considerar más importantes dentro de la producción de una planta sin duda es la cantidad de biomasa. En este caso específico, la albahaca al ser una planta aromática cuyo principal uso es culinario, la parte aprovechable son las hojas, componente mayoritario de la biomasa. Aquí la relevancia de realizar éste análisis a nuestras plantas,

No existen estudios previos sobre el empleo de las BPCV en plantas aromáticas, sin embargo han sido usadas en diversas especies de hortalizas de gran interés agronómico como lo es el tomate (*Lycopersicon esculentum*), cebolla (*Allium cepa* L.), y maíz (*Zea mays* L.) en las que se demostró que mejoran la disponibilidad de nutrientes como el nitrógeno. Luna y col., (2013) realizaron un estudio en el que inocularon cepas del género *Bacillus* en plántulas de tomate y pimiento, encontrando que la cepa MA12 tuvo un incremento del 20 y 37 % de biomasa respectivamente; para la altura la cepa MA06 mostró un incremento del 14 % con respecto a su tratamiento control, no obstante para las plantas de albahaca de este estudio se obtuvo un incremento de 39.31 % en biomasa y 6.4 % en altura, con lo cual podemos percatarnos de que la efectividad de las bacterias en ambas especies es similar, teniendo en cuenta que tanto el tipo de especie como las condiciones ambientales diferentes son un factor determinante para la respuesta de las plantas frente a la inoculación de bacterias. En otro estudio se inocularon bacterias del género *Rhizobium* en plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), se encontró que

éstas aumentaron su peso seco en un 32.3 % debido a la producción de ácido indolacético (AIA), hormona vegetal que promueve el desarrollo radical o vegetativo y la producción de frutos (Peña y Reyes, 2007).

Otro de los objetivos que se planteó inicialmente fue el de cuantificar el contenido de Fenoles Totales, mediante el uso del Reactivo de Folin- Ciocalteu, para lo cual se dividió la planta en dos partes: floral y vegetativa, reflejándose un mayor contenido en el área floral en todos los tratamientos, incluso en el tratamiento control, con lo cual se concluye que la parte de la planta de albahaca que tiene mayor contenido de compuestos fenólicos son las flores y al hacer la comparación en cuanto a efectividad de las cepas usadas, se observó que la cepa M6 fue la mejor con un incremento de 5.42 % sobre el tratamiento control.

Se han realizado estudios de contenido de fenoles totales en plantas de albahaca, sin embargo en ninguno de estos se han empleado microorganismos promotores de crecimiento, un estudio realizado con 23 variedades Iraníes de *Ocimum basilicum* (Javanmardi y col., 2003) muestra valores que van de 23 a 65.5 mg AG/gmuestra rango en el que entran los obtenidos para nuestras plantas, sin embargo hay que considerar que ninguna variedad es Nufar y las diversas condiciones bajo las cuales fueron cultivadas.

Existen otros microorganismos promotores de crecimiento como los hongos con los cuales se han realizado estudios para verificar la efectividad que estos tienen sobre el aumento en la cantidad de fenoles totales, Rivera Chávez y col., (2012) inocularon hongos micorrícicos en plantas de fresas, encontrando que estos microorganismos aumentan el contenido de fenoles totales, específicamente la acumulación de antocianinas y flavonoides, así como mejoran en general la calidad del fruto.

Finalmente se midió la capacidad antioxidante que poseen las plantas de *Ocimum basilicum* mediante el método FRAP, el cual permite saber qué tan eficiente es el extracto de la planta en cuestión para atrapar o captar radicales libres, ya que en los últimos años se ha despertado un gran interés por ellos y su relación con el

envejecimiento celular, aquí la importancia de realizar este tipo de análisis a una planta aromática ampliamente buscada y usada por su aceite esencial siendo éste uno de los de mayor renombre en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.

El análisis de FRAP se realizó fue con la finalidad de medir la capacidad que poseen los compuestos fenólicos, entre otros compuestos presentes en nuestras plantas de *Ocimum basilicum* para captar los radicales libres generados durante el ensayo, encontrándonos que en la etapa tres fue donde se encontraron los valores más altos, con lo cual podemos decir que la capacidad antioxidante que posee nuestra planta en estudio aumenta conforme el tiempo de cosecha se prolonga, la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es debida principalmente a sus propiedades redox, que les permite actuar como agentes reductores donantes de hidrógeno.

Se encontró en la interacción M6XP12 un mayor aumento, siendo de 26.16 % (954.5 mg AA/gmuestra) y 35.4 % (331.95 mg AA/gmuestra) sobre el testigo en la parte floral y vegetativa respectivamente. La actividad antioxidante (FRAP) en otras especies como Sweet basil se ha reportado que va de 106 a 140 mg AA/gmuestra (Juliani y Simon, 2002), lo cual tal vez no pueda ser comparable por tratarse de diferentes especies, sin embargo demuestra que *O. basilicum* cv. Nufar posee alta actividad antioxidante en sus extractos; cabe mencionar que Juliani y Simon no emplearon BPCV para el crecimiento y producción de sus plantas, por lo cual puede decirse que la inoculación de *Bacillus* incrementa la capacidad antioxidante de las plantas aromáticas.

Dado que el aceite esencial es la principal fuente de antioxidantes de la albahaca, existen numerosos estudios en los que se determina la capacidad para neutralizar radicales libres, como el que realizaron Kiendrebeogo, y col., (2011) en el que encontraron hasta 531.75 mg AA/g, sin embargo no se puede decir que dicha actividad sea debida a los compuestos fenólicos presentes, ya que también existen ciertos componentes del aceite esencial de albahaca que pudieran también tener

capacidad antioxidante, tal es el caso del metil chavicol, linalool, limoneno y eugenol (May y col., 2008), así como de otros metabolitos secundarios antioxidantes tales como aceites volátiles, carotenoides, vitaminas entre otros.

En base a lo anterior se puede decir que el efecto promotor que tienen las bacterias varía dependiendo de la especie a la que se inocule, de las condiciones ambientales y de la competencia microbiológica que exista en la rizósfera así como la quimioatracción que ejercen los distintos exudados radicales producidos por las plantas que además promoverían la interacción planta-microorganismo (Luna y col., 2013).

7. CONCLUSIONES

- La cepa M6 promueve la producción de biomasa de las plantas de albahaca, al tener un aumento de 39.31 % sobre el tratamiento control.
- Las plantas con mayor altura son las correspondientes a la inoculación con la cepa M6, con un 6.4% sobre el tratamiento control, mientras que el tratamiento P12 presenta un comportamiento muy similar al del testigo, no existiendo diferencia mínima significativa.
- En la determinación de peso de raíces secas, no existe diferencia significativa, no obstante la interacción presentó un mayor peso de raíces con un aumento del 1.01 % sobre el tratamiento testigo, seguida del tratamiento P12 y M6. Sin embargo estos dos últimos tratamientos se encuentran por debajo del valor que presenta el testigo.
- Para fenoles totales en planta completa, no se observa diferencia mínima significativa, siendo el testigo superior a los demás tratamientos.
- Para la determinación del poder férrico reductor/antioxidante (FRAP) en planta completa el tratamiento P12 es superior a los demás con 2.14 % mayor que M6 y 14.97 % más sobre el testigo.
- Para la segunda cosecha, en la etapa 2 no se observó diferencia significativa entre tratamientos, sin embargo los resultados de la parte floral fueron superiores a los de la parte vegetativa en todos los tratamientos.
- En la etapa 3 para fenoles totales, el mejor tratamiento es M6, tanto para la parte floral como para la parte vegetativa, teniendo un incremento de 5.42 % sobre

el tratamiento testigo, encontrando que existe diferencia significativa a un nivel de confianza del 95% entre tratamientos

- Para el contenido de FRAP, la interacción M6XP12 es la que representa el mejor tratamiento, con un aumento de 26.16 % y 35.4 % sobre el testigo en parte floral y vegetativa respectivamente.
- Los inoculantes utilizados en este estudio son promotores de crecimiento vegetal, aumentan el contenido de fenoles totales así como la capacidad para neutralizar radicales libres por lo que pueden ser usados para la producción de plantas aromáticas y mejorar sus características nutraceuticas.

8. REFERENCIAS

Aberoumand, A., Deokule. S.S. Comparison of Phenolic Compounds of Some Edible Plants of Iran and India. *Pakistan Journal of Nutrition*, **2008**; vol.7 (4):582-585.

Acebo, Y., Rives, N., Heydrich, M.,Hernández, A. Efecto promotor del crecimiento vegetal de cepas de *Azospirillum* sp. en el cultivo de arroz. *Cultivos tropicales*, **2007**;vol. 28(3):29-32.

Adedapo, A.A., Jimoh, F.O., Afolayan, A.J., Masika, P.J., Antioxidant Properties of the Methanol Extracts of the Leaves and Stems of *Celtis Africana*.*Rec. Nat. Prod.*, **2009**; vol. 3(1):23-39.

Aguirre, M. J.F., Irizar-Garza, M.B., Durpan-Prado, A., Grajeda-Cabrera, O.A., Peña-del río, M.A., Loredó-Osti, C. y Gutiérrez-Baeza, A. Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y pecuarias. Campo experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, México. Folleto Técnico Núm. 5, **2009**: 11-30

BackyardGardener. *Ocimum basilicum* (Nufar sweet Basil). [monografía en internet]. Tacoma Washington, 2011 [consultado 2011 enero 26]. Disponible en: http://www.backyardgardener.com/plantname/pd_8a69.html.

Badui, D.S. Química de los Alimentos. 3a. ed., Prentice Hall. México, **1999**: 259-265.

Berzinz. Comercio Mundial de especias y aromáticas Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [monografía en internet]. Argentina,2011 [consultado 2011 junio 10]. Disponible en:

http://www.inta.gov.ar/altovalle/info/biblo/rompecabezas/pdfcs/fyd47_oreg.pdf

Birjees, B.S., Iqbal, B.M., Memon, S. Oxidative Activity of Extracts from Fenugreek Seeds (*Trigonella foenum-graecum*). *Pak. J. Annual. Environ. Chem.*, **2008**; vol. 9 (2): 78-83.

Castillo, G.E., Martínez, S.I. Manual de Fitoterapia. 1ra ed., Elsevier Masson. Madrid, **2007**: 33-34.

Chirinos, M., Velásquez, R., Ascanio, C., Mata, J., Carrasqueño, A. Obtención de aceites esenciales de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) a partir de tejidos cultivados in vivo e in vitro. *Revista de la Facultad de Agronomía UCV*, **2009**; vol. 35 (1): 28-33.

Contreras, A., Gómez, C. Evaluación de tres variedades de albahaca y dos dosis de fertilización en producción hidropónica y en suelo. Zamorano, Honduras. Carrera de Ciencia y Producción agropecuaria. Tesis para obtener el título de licenciatura en Ingeniero Agrónomo, **2008**:2-7

Farid, A.H., Razi, I.M., Anamul, H.M.D., Zaharul, I.M., Shahidullah, S.M., Meon, S. Efficiency of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) for enhancement of rice growth. African Journal of Biotechnology, **2009**; vol. 8(7):1247-1252.

Fernández, K., Viña, P.A., Murillo, P.E., Méndez, J.J. Actividad Antioxidante y Antimicrobial de los Volátiles de Cuatro Variedades de Albahacas Cultivadas en el Departamento del Tolima. Scientia Et Technica, **2007**; vol. XIII (033):401-403.

Fonnegra, R.G., Jiménez, R.S.L. Plantas Medicinales Aprobadas en Colombia. 2da. ed., Universidad de Antioquía. Colombia, **2007**: 35-37

Fundación para la Innovación Agraria. Resultados y Lecciones en Plantas Medicinales y Aromáticas. Proyectos de Innovación en Regiones V, VII, VIII y X. Experiencias de Innovación para el Emprendimiento Agrario [serie en internet] Santiago de Chile, **2008**. Disponible en: http://aplicaciones.fia.cl/valorizacion/docs%5C14_7_Libro_PlantasMedicinales.pdf

García, B.F.J., Roselló, C.J., Santamarina, S. Introducción al funcionamiento de las plantas. Ed. Universidad politécnica de Valencia, **2006**: 81-96.

González-Zúñiga, J.A., González, S.H.M., González, P.S., Rosales, R.T., Andrade, G.I. Microextracción en fase sólida de compuestos volátiles en albahaca (*Ocimum basilicum* L.). Redalyc, **2011**; vol. 21 (1):17-22.

González-Torres, M.A., Betancourt, R.M.C., Ortiz, M.R. Daño Oxidativo y Antioxidantes. Redalyc Bioquímica, **2000**; vol. 25(1):3-9.

Gutiérrez, A.D.M., Ortiz, G.C.A., Mendoza, C.A. Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. Simposio de Metrología 2008. SM2008-M220-1108, **2008**: 1-5.

Hernández, M.L.G, Escalona A.A. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. La Ciencia y el Hombre, **2003**; vol. 16(1):29-32.

Hinneburg, I., Damien, H.J.D., Hiltunen, R. Antioxidant Activities of Extracts from Selected Culinary Herbs and Spices. Food Chemistry, **2006**; vol. 97:122-129.

Huda-Faujan, N., Nor23-65.5iham, A., Norrakia, A.S., Babji, A.S. Antioxidative Activities of Water Extracts of Some Malaysian Herbs. ASEAN Food Journal, **2007**; vol. 14(1):61-68.

Ibrahim, M.M., Aboud, K.A., Hussein, R.M. Genetic variability and path coefficient analysis in sweet basil for oil yield and its components under organic agriculture conditions. Journal of American Science, **2011**; vol. 7(6): 150-157.

Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H.P., Vivanco, J.M. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Iranian *Ocimum*. Food Chemistry, **2003**; vol. 83: 547-550.

Jeba, C., Vaidyanathan, R. Volatile Oils of *Ocimum* species from South India. International Journal of Biological Technology. **2011**; vol. 2(1): 11-13.

Jiménez, D.R., Virgen, C.G., Tabares, F.S., Olalde, P.V. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. Avance y perspectiva, **2001**; vol. 20: 395-400.

Juliani, H.R., Simon, J.E. Antioxidant Activity of Basil. Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA. **2002**: 575-579.

Kiendrebeogo, M., Coulibaly, A. Y., Nebie, R. C. H., Zeba, B., Lamien, C. E., Lamien-Med, A., Nacoulma, O.G. Antiacetylcholinesterase and Antioxidant Activity of Essential Oils from Six Medicinal Plants from Burkina Faso. Revista Brasileira de Farmacognosia, **2011**; vol. 21(1): 63-69

Kotz, J.C., Treichel, P. M. Química y reactividad química. 5ta. ed., Thompson, 2003: 344:346.

López, V., Akarreta, S., Cavero, R.Y., Calvo, M.I. Actividad Antioxidante de Plantas Empleadas en la Medicina Tradicional Navarra. Revista de Fitoterapia, **2007**; vol. 7 (1):43-47.

Loredo, O.C., López, R.L., Espinoza, V.D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. Una Revisión TERRA Latinoamericana, **2004**; vol. 22 (2): 225-239.

Luna, M.L., Martínez, P.R.A., Hernández, I.M., Arvizu M.S.M., Pacheco, A.J.R. Caracterización de Rizobacterias Aisladas de Tomate y su Efecto en el Crecimiento de Tomate y Pimiento. Revista de Fitotecnia. Mex. Vol. 36 (1): 63 - 69, **2013**.

Maguna, F.P., Romero, A.M., Garro, O. A., Okulik, N.B. Actividad Antimicrobiana de un Grupo de Terpenoides. Universidad Nacional del Nordeste. [serie en internet] **2006**. [consultado agosto 2011]; E-057:[aprox. 4 pp]. Disponible en:<http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-057.pdf>

Marinoff, M.A. Las Plantas Medicinales desde la Biblia a la Actualidad. Universidad Nacional del Nordeste. [serie en internet] **2006**. [consultado agosto 2011]; E-057:[aprox. 4 pp]. Disponible en:<http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-053.pdf>

May, A., Alves, B.O., Borlina, M. N., Soares, B. L.E, Zacardi, R de C., Matosso, R de S. E., Rocha, A de M.A., Quaglia, P.M., Basil Plants Growth and Essential Oil Yield in a Production System with Successive Cuts. Revista de Ciencias Agronómicas, **2008**. vol. 67: 385-389.

Meléndez, G., Molina, E. Fertilización foliar: principios y aplicaciones. Centro de investigaciones Agronómicas. Laboratorio de suelos foliares. Universidad de Costa Rica, **2002**.

Mora, M. Aislamiento y Caracterización de Rizobacterias de suelos Agrícolas con potencial de ser empleados como biofertilizantes en la producción de hortalizas. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis que para obtener el título de Biólogo, **2010**.

Muñoz, F. Plantas Medicinales y Aromáticas. Estudio, Cultivo y Procesado. 1ra. ed., Mundi-Prensa, Madrid, **1996**: 15-18, 20-24.

Ortuño, S.M.F., Manual Práctico de Aceites Esenciales, Aromas y Perfumes. 1ra. ed., Aiyana. España, **2006**: 8-14, 23, 122-125.

Peña, B.H, Reyes, I., Aislamiento y Evaluación de bacterias Fijadoras de Nitrógeno y Disolventes de Fosfatos en la Promoción del Crecimiento de la Lechuga (*Lactuca sativa* L.). Interciencia, **2007**; vol. 32(8):560-565.

Pérez, R. E. Inoculación de Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal en Pepino (*Cucumis sativus* L.). Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Colegio de Postgraduados, postgrado de edafología. Tesis que para obtener el grado de Maestría en Ciencias, **2012**.

- Reyes, B.J.A., Patiño, P.J.G.** Comparación de los Metabolitos Secundarios Volátiles de dos Especies de *Ocimum* sp. (labiatae), en Función del Método de su Extracción y Estudio de las Actividades Antioxidante, Citotóxica y Antifúngica. Santander, España. Universidad Industrial de Santander. Tesis para obtener el título de licenciatura en Químico. **2007**; 28-72.
- Rives, N., Acebo, Y., Hernández, A.** Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Perspectivas de su uso en Cuba. Cultivos Tropicales, **2007**; 28 (2): 29–38.
- Sartoratto, A., Machado, A.M., Delarmelina, C., Mara, G.F., Duarte, M.C., Rehder, V.L.** Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Aromatic Plants Used in Brazil. Brazillian Journal of Microbiology; **2004**, vol. 35: 275–280.
- Soroa, M. R., Hernández, F.A., Soto, C.F., Terry, E.** Identificación de algunas especies de microorganismos benéficos en la rizósfera de gerbera y su efecto en la productividad. Chapingo Serie Horticultura, **2009**; vol. 15(2):41-48.
- Succop, E., Newman, S.E.** Organic Fertilization of Fresh Market Sweet Basil in a Greenhouse. Hortechology, **2004**; vol. 14(2): 235-239.
- Taiz, L., Zeiger, E.,** Fisiología Vegetal. Vol. I. Colección “Ciencias Experimentales”. 3ª ed., Publicaciones de la Universitat Jaume, **2006**: 542-545.
- Vargas, D.P., Ferrera, C.R., Almaraz, S.J.J., Alcántar, G.G.** Inoculación de Bacterias Promotoras de Crecimiento en Lechuga. Terra, **2001**; 19(4): 327-335.
- Velázquez, P.M., Prieto, G.B., Contreras, P.R.** El Envejecimiento y los Radicales Libres. Ciencias, **2004**; vol. 75: 36-43.
- Youngson, R.** Antioxidantes y Radicales Libres. EDAF. Madrid, **2003**: 113-114.
- Zheljazkov, V.D., Cantrell, C.L., Tekwani, B., Khan, S.I.** Content, Composition, and bioactivity of the Essential Oils of Tree Bassil Genotypes as a Function of Harvesting. Journal of Agricultural Food Chemistry, **2008**; vol. 56 (2):380-385.