

Efecto de las PGPR en la producción y vida útil del berro (*Nasturtium officinale*) cultivado en bandejas flotantes

D. Niñirola⁽¹⁾, S. Nicola⁽²⁾, G. Pignata⁽²⁾, C. Egea-Gilabert⁽³⁾, J.A. Fernández⁽¹⁾

⁽¹⁾ Producción Vegetal, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, C/Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, España. dianicax@hotmail.com

⁽²⁾ Dept. AGROSELVITER, VEGMAP, Università degli Studi di Torino, Via L. da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO), Italia.

⁽³⁾ Ciencia y Tecnología Agraria, E.T.S. Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena, C/Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena, España.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de bacterias promotoras del crecimiento (PGPR) sobre el rendimiento y la calidad de berro cultivado en bandejas flotantes. Para la obtención de las PGPR (*Bacillus subtilis*) se utilizó un producto comercial denominado Larminar®. El experimento consistió en cuatro tratamientos: Tratamiento 1 (T1) semillas y sustrato estéril inoculados con *B. subtilis*, Tratamiento 2 (T2) semillas y sustrato no estéril inoculado con *B. subtilis*, Tratamiento 3 (T3) semillas y sustrato estéril sin inocular y Tratamiento 4 (T4) las semillas y el sustrato no estéril sin inocular. En el momento de la cosecha se midieron diferentes parámetros agronómicos como el peso fresco y seco de parte aérea, el número de hojas, la altura de la planta, el área foliar, el color de las hojas, el contenido relativo en clorofila y el peso fresco y seco de las raíces. También se analizaron parámetros relacionados con la calidad, como la vitamina C, la capacidad antioxidante, el contenido de fenoles totales, el contenido de pigmentos, el pardeamiento y el contenido en o-quinona soluble, la actividad enzimática, el contenido de iones y contenido microbiano. La utilización de *B. subtilis* no afectó a la producción ni al desarrollo de la planta pero si aumentó la capacidad antioxidante y disminuyó el contenido en clorofilas a y b.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*; *babyleaf*; Larminar®.

1. Introducción

El berro es considerado un alimento valioso en la industria de ensaladas frescas por su alto contenido de compuestos beneficiosos para la salud, tales como antioxidantes y compuestos fenólicos [1]. El sistema de cultivo en bandejas flotantes es una técnica de cultivo fácil y rentable. El uso de rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) está ganando importancia y aceptación, debido al aumento significativo en el crecimiento y rendimiento de los cultivos en respuesta a la inoculación con PGPR[2]. Entre las cepas de PGPR, las especies pertenecientes a *Pseudomonas* y *Bacillus* son las más ampliamente estudiadas, en particular, algunas cepas de *Bacillus subtilis* que se utilizan como agentes de control biológico. El método de aplicación de las PGPR es esencial para evitar el fracaso en la colonización de la rizosfera. La inoculación directamente de semillas es el método más común de aplicación para los agentes bacterianos. Hasta el momento se ha prestado muy poca atención a los efectos de la

aplicación de PGPR sobre la vida útil de las hortalizas *babyleaf* producidas en el sistema de cultivo sin suelo. La mejora de la calidad del producto producida por las PGPR se puede asociar a cambios que favorecen la conservación del producto durante la etapa de post-cosecha[3].

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la aplicación de PGPR (*Bacillus subtilis*) sobre el rendimiento y calidad del berro cultivado en un sistema de bandejas flotantes a lo largo de su vida útil como un producto de IV Gama.

2. Materiales y Métodos

2.1 Cepa bacteriana e inoculación

La cepa bacteriana utilizada en este estudio fue *Bacillus subtilis* AP-01, obtenida del producto comercial Larminar® (Agrimor).

La inoculación bacteriana se llevó a cabo en dos veces, la primera antes de la siembra por

inoculación de las semillas y el sustrato, y la segunda, dos semanas después de la siembra, remojando las bandejas en una suspensión del producto comercial, en ambos casos, se siguieron las instrucciones del fabricante. La suspensión bacteriana se obtuvo del crecimiento de las esporas de *B. subtilis* (Larminar® en polvo Agrimor, Agricultura Moderna SA, Madrid, España) en PlateCount Agar (PCA) (FlukaAnalítica, Sigma- AldrichSrl, Milán, Italia) que posteriormente se disolvieron en una solución salina de 9 g/l NaCl a una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) ml^{-1} . Antes de la inoculación, las semillas fueron desinfectadas en superficie mediante una dilución al 20 % de NaClO durante 3 minutos, se lavaron tres veces con agua destilada estéril, y se inocularon por inmersión durante 1 hora en la suspensión bacteriana (T1 y T2) o en solución salina (T3 y T4). Para secarlas completamente, las semillas se dispusieron en la cabina de flujo laminar para completar el proceso de desecación.

Para inocular el sustrato, cinco días antes de la siembra, $0,5 \text{ kg m}^{-3}$ de Larminar® se mezclaron con sustrato esterilizado en el caso de T1 y T2. En ambos tratamientos una re-inoculación se realizó 15 días después de la siembra por inmersión de las bandejas en una solución que contenía $1,67 \text{ gl}^{-1}$ de Larminar®.

2.2 Material vegetal, condiciones del cultivo y de la poscosecha

El experimento se llevó a cabo en el verano de 2012 en el Centro Experimental de la Facultad de Agricultura de Turín (Carmagnola (TO), Italia) en un invernadero de cristal con control automático de la temperatura ambiental. La temperatura máxima, mínima y media durante el ciclo de cultivo fueron del 43, 17 y 29,1°C, respectivamente.

El material vegetal utilizado fue un cultivar comercial de berros (*Nasturtiumofficinale* R. Br.) "LargeLeaf" (TozerSeeds Co., Cobham, Reino Unido). En el experimento las plantas crecieron en bandejas de espuma de poliestireno de 60 alveolos (cada alveolo tenía 44 mm de diámetro en la parte superior y 25 mm en la inferior), flotando de forma continua en una solución nutritiva.

La siembra se realizó el 22 de junio de 2012. Las bandejas de espuma de poliestireno se llenaron a mano con sustrato comercial a base de turba (NeuhausHuminsubstrat N17, Klasmann-Deilmann, Geeste-Gross, Hesepe, Alemania). El sustrato se desinfectó a 100°C durante 45 min para ser utilizado en los tratamientos T1 y T3. Las

bandejas sembradas se regaron por aspersión 2 veces al día hasta la germinación de las semillas, después se dispusieron en las mesas de flotación con la solución nutritiva. La densidad de plantación fue de $2400 \text{ plantas m}^{-2}$. La solución nutritiva consistió en un ratio 40/60 $\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4$, compuesto por 12 mM de N, 6 mM K, 2 mM P, 2 mM Mg y 2,5 mM Ca. Para el NS se añadió un compuesto enriquecido con microelementos (INTRACHEM LysodinMultimix). El pH y la conductividad eléctrica de la solución se verificó semanalmente y se mantuvieron cerca de 5,5 (usando $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 1N}$) y 2.000 mS cm^{-1} , respectivamente. La solución nutritiva se aireó manteniendo el nivel de oxígeno disuelto en 5 ppm durante todo el ciclo.

Para el almacenamiento, el berro fue empacado (125g) y termosellado en bolsas de 4 l de volumen, permeabilidad al O_2 y al CO_2 de 1990 y $7800 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ bar}^{-1}$, respectivamente; espesor de película de 20 micras (AlvapackS.rl, Bologna, Italia). Las muestras envasadas fueron almacenadas en cámaras frigoríficas, sin luz y a 4°C durante 11 días.

2.3 Análisis agronómicos y bioquímicos

La recolección se llevó a cabo el 17 de julio 2012 después de un ciclo de cultivo de 26 días. Se midieron el peso fresco y seco de parte aérea, número de hojas, altura de la planta, área foliar (utilizando un análisis de imágenes con ImageJ 1.47v, NIH), color de las hojas usando un colorímetro CR10 (Konica-Minolta Sensing Inc., Osaka, Japón), el contenido relativo en clorofila RCC (Minolta SPAD -502; Konica -Minolta Sensing Inc., Osaka, Japón) y peso fresco y seco de las raíces.

También se analizaron la vitamina C que fue determinada como describen Zapata y Dufour (1992). Capacidad antioxidante siguiendo los procedimientos de Benzie y Strain (1996) (FRAP). Los fenoles totales (TP) se determinaron usando el procedimiento de Folin-Ciocalteu basado en el método de Singleton y Rossi (1965). La clorofila a, clorofila b y carotenoides (Chl. a, Chl b y Car, respectivamente) se determinaron según el método Lichtenthaler y Wellburn (1983). El pardeamiento y la o-quinona soluble (BP y So- Q, respectivamente) se determinaron de acuerdo con el método Tardelli et al. (2013). La actividad peroxidasa (POD) se determinó como se describe en Nickel and Cunningham (1969). La actividad de polifenol oxidasa (PPO) se determinó como describe Degl'Innocenti et al. (2005). La actividad fenilalanina amonio liasa (PAL) se determinó como se describe en Campos et al.

(2004) y Degl'Innocenti et al. (2005). Todos los análisis espectrofotométricos se llevaron a cabo usando un espectrofotómetro Beckman DU®-65 espectrofotómetro (BeckmanCoulter Inc., Fullerton, CA, EE.UU.). El contenido de iones se determinó usando un kit refractométrico (Merck Reflectoquant RQflex2©, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Recuento total de bacterias (TBC) se determinó mediante un cultivo en agar (PCA) (Fluka Analítica, Sigma-Aldrich Srl, Milán, Italia), mientras que la levadura y el recuento de mohos (YC y MC) se determinaron utilizando el agar cloranfenicol glucosa extracto de levadura (Fluka Analítica, Sigma-Aldrich Srl, Milán, Italia). La enumeración de TBC se realizó después de la incubación a 30°C durante 48h. La enumeración de TA y MC se realizaron después de la incubación a 30°C durante 5 días. Los resultados se expresaron como CFUg⁻¹ FW.

2.4 Análisis estadístico

El experimento incluyó los siguientes tratamientos: Tratamiento 1 (T1) las semillas y sustrato estéril (SE) inoculado con Larminar® (SB), Tratamiento 2 (T2) semillas y sustrato no estéril (NE) inoculado con Larminar® (SB), Tratamiento 3 (T3) semillas y sustrato estéril (SE) sin inocular (NB) y Tratamiento 4 (T4) las semillas y el sustrato no estéril (NE) sin inocular (NB).

El experimento consistió en bloques aleatorios con 3 réplicas por tratamiento, cada réplica se situó en una mesa de flotación, cada mesa de flotación tenía 12 bandejas.

3. Resultados y Discusión

Los resultados de los parámetros medidos de la parte agronómica que mostraron diferencias significativas se recogen en la Tabla 1. Los valores mayores se dieron en el tratamiento de sustrato esterilizado (SE) para la altura de las plantas, el número de hojas y el contenido relativo en clorofila (SPAD). Por el contrario, para el croma los valores más elevados se dieron en el tratamiento del sustrato no esterilizado (NE).

En relación a la actividad microbiana no hubo diferencias significativas para los conteos de bacterias y levaduras (datos no mostrados) pero se obtuvieron diferencias significativas para los hongos entre los tratamientos con NE y SE dando un valor mayor en el NE. Además, destaca la interacción entre los factores Esterilidad y Bacteria para la altura de la planta (Gráfica 1A).

Tabla 1. Resultados agronómicos y microbiológicos.

Los valores dentro de la misma fila seguidos por una letra minúscula diferente son significativamente diferentes para P≤0,05. Los asteriscos indican la significancia: * P ≤ 0,05; ** P ≤ 0,01; *** P ≤ 0,001; ns= no significativa.

De estos resultados agronómicos podemos destacar que la adición del Larminar® no influyó

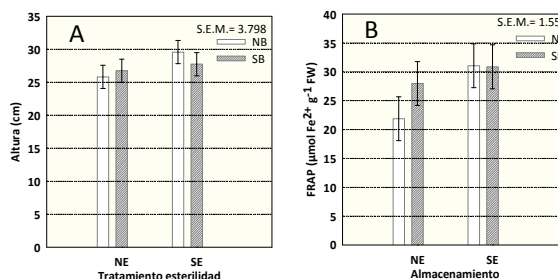
	Esteril (A)		Larminar®(B)		Interacción		
	NE	SE	NB	SB	A	B	AxB
Altura (cm)	26,3 a	28,7 b	27,7	27,2	**	ns	*
Hojas/planta	10,7 a	12,0 b	11,3	11,4	***	ns	ns
Chroma	38,0 b	36,6 a	37,5	37,1	*	ns	ns
SPAD	33,9a	36,6 b	34,6	35,8	**	ns	ns
MC (Log UFC)	2,3 b	2,1 a	2,2	2,2	*	ns	ns

en ninguno de los parámetros medidos. Por el contrario, la esterilización del sustrato dio lugar a plantas más desarrolladas, con un color menos saturado y mayor contenido relativo en clorofila.

También se observó que la esterilización evitó una mayor proliferación de hongos en la parte aérea de la planta al final del cultivo. De la explicación de la interacción entre la esterilización y la adición del Larminar® con respecto a la altura se puede apreciar que las plantas con tratamiento NE y NB fueron significativamente más bajas que las plantas con los tratamientos SE y NB.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para cada parámetro según el factor de almacenamiento (inicio o final), esterilidad del sustrato. Durante el almacenamiento los valores de O₂ fluctuaron entre 18,8 kPa del inicio del almacenamiento a 1,63 para T1, 1,65 para T2, 1,15 para T3 y 0,7 para T4. Los valores

Figura 1. Efecto de la inoculación con Larminar® sobre la altura (A) según el tratamiento de esterilidad y sobre el FRAP (B) según el almacenamiento. Los valores son la media de tres repeticiones y las líneas verticales son la



diferencia menos significativa intervalos (LSD) a P ≤ 0.05.

Tabla 2: Influencia del almacenamiento, el tratamiento de esterilidad y la adición de Larminar® sobre los parámetros bioquímicos.

	FRAP ($\mu\text{molFe}^{2+} \text{g}^{-1}$ FW)	TP (mg ac. Gálico g^{-1} FW)	Chl. a (mg g^{-1} FW)	Chl. b (mg g^{-1} FW)	Vitamina C ($\text{mg}/100\text{g}$ FW)	BP (raw abs. units FW)	So-Q (raw abs. units FW)	POD ($\Delta\text{A min}^{-1} \text{g}^{-1}$ FW)	PPO (PPO Unit g^{-1} FW)	PAL (μmol cinnamic acid $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ FW)	Nitratos ($\text{mg g}^{-1} \text{NO}_3$)
Inicio	24,9 a	0,9 b	0,5 b	0,2 b	2,6	0,7 a	0,4	3,2 a	6,5 a	0,1 a	2,2 b
Final	30,9 b	0,7 a	0,4 a	0,1 a	2,3	1,0 b	0,4	4,7 b	31,4 b	0,2 b	1,7 a
NE	24,9 a	0,7 a	0,4 a	0,1 a	2,0 a	0,9	0,5	4,2	19,5	0,1	2,5 b
SE	30,8 b	0,8 b	0,5 b	0,2 b	2,9 b	0,9	0,3	3,7	18,4	0,1	1,4 a
NB	26,5 a	0,8	0,5 b	0,1 b	2,2	0,9	0,4	3,8	19,2	0,1	1,8
SB	29,3 b	0,9	0,4 a	0,1 a	2,7	0,9	0,4	4,1	18,7	0,1	2,0
Almacen. (A)	**	***	***	***	ns	**	ns	*	***	***	*
Esteril (B)	**	**	**	***	*	ns	ns	ns	ns	ns	***
Larminar®(C)	*	ns	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AxB	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AxC	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
BxC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AxBxC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Los valores dentro de la misma columna seguidos por una letra minúscula diferente son significativamente diferentes para $P \leq 0,05$. Los asteriscos indican la significancia: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; ns= no significativa.

del CO_2 se iniciaron en 0,4 y al final de los 11 días de almacenamiento tuvieron valores de 8,47 para T1, 8,6 para T2, 8,1 para T3 y de 8,8 para T4.

Con respecto al almacenamiento, los valores significativamente mayores se dieron al inicio en TP, Chl. a, Chl. b y en el contenido en nitratos. Por el contrario FRAP, BP, POD, PPO y PAL, mostraron los valores significativamente mayores para el final del almacenamiento. En relación a la esterilidad del sustrato, los valores significativamente más elevados se dieron en el tratamiento SE para FRAP, TP, Chl.a, Chl.b y en el contenido en vitamina C. Por el contrario, el contenido en nitratos mostró el valor significativamente mayor con el tratamiento de NE. En el caso de la adición de bacterias, se obtuvo el valor significativamente más elevado en el tratamiento SB para el FRAP y los valores significativamente mayores de NB en las Chl a y b. Las clorofilas se comportaron de forma contraria a los resultados obtenidos por Han y Lee (2005) para lechuga bajo estrés tratada con PGPR. Cabe destacar las dos interacciones dobles entre el Almacenamiento y las Larminar® para el FRAP (Gráfica 1B) y entre Almacenamiento y la Esterilidad para el TP (no mostrada). La interacción de la Gráfica 1B muestra que los resultados de FRAP para las plantas con sustrato sin esterilizar (NE) y sin Larminar® (NB) fueron significativamente menores a los de los tratamientos de sustrato estéril (SE) con (SB) y sin Larminar® (NB). El aumento de la capacidad antioxidante con el uso de las PGPR concuerda con los resultados obtenidos por Olalde-Portugal y Mena-Violante(2008) y Ordookhani et al.,(2010) en frutos de tomate.

4. Conclusiones

La inoculación mediante el producto Larminar no produjo efecto sobre el desarrollo del berro, aunque si se vieron sus efectos sobre la capacidad antioxidante y las clorofilas a y b. La planta se vio beneficiada por la esterilización del sustrato ya que favoreció su desarrollo y el aumento de FRAP, TP, clorofilas a y b y vitamina C. Con el almacenamiento aumentó el FRAP, el pardeamiento y la actividad enzimática.

5. Agradecimientos

Department of Agricultural, Forest and Food Sciences. Università di Torino.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Martínez-Sánchez A., Gil-Izquierdo A., Gil M.I., Ferreres F. 2008. A Comparative Study of Flavonoid Compounds, Vitamin C, and Antioxidant Properties of Baby Leaf Brassicaceae Species. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 2330–2340.
- [2] Kloepper J.W., Leong J., Teintze M., Schroth M.N. 1980. Enhancing plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature* 286:885–886.
- [3] Olalde-Portugal, V., and H. G. Mena-Violante. 2008. Symbiotic associations with bacteria and fungi and its effect on fruit quality. *Postharvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables and Flowers*. Wiley-BlackWell, Canada. Pag: 360-372.
- [4] Han H.S., Lee K.D. 2005. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Effect on Antioxidant Status, Photosynthesis, Mineral Uptake and Growth of Lettuce under Soil Salinity. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1(3): 210-215.
- [5] Ordookhani K., Khavazi K., Moezzi A., Rejali F. 2010. Influence of PGPR and AMF on antioxidant activity, lycopene and potassium contents in tomato. *African Journal of Agricultural Research* Vol. 5(10), pp. 1108-1116.