



**IDENTIFICACIÓN DE FACTORES ASOCIADOS A PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL
EN *Bacillus subtilis* ATCC 6633 Y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515
EN EL MODELO DE FRÍJOL**

YULI MARCELA BALLESTEROS ROJAS

SILVIO ALEJANDRO LÓPEZ PAZOS
Asesor externo Universidad Antonio Nariño

SANDRA MÓNICA ESTUPIÑAN
Asesor interno

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

Introducción



- EL ESTADO MUNDIAL DEL RECURSO SUELO SE ENCUENTRA EN MALAS CONDICIONES.
- INCREMENTO SIGNIFICATIVO DE LA POBLACIÓN MUNDIAL AUMENTA LA DEMANDA DE ALIMENTOS Y DE FERTILIZANTES QUÍMICOS.
- EL USO DE FERTILIZANTES QUÍMICOS SOBREPASARÁ LAS 200 MILLONES DE TONELADAS PARA EL 2018



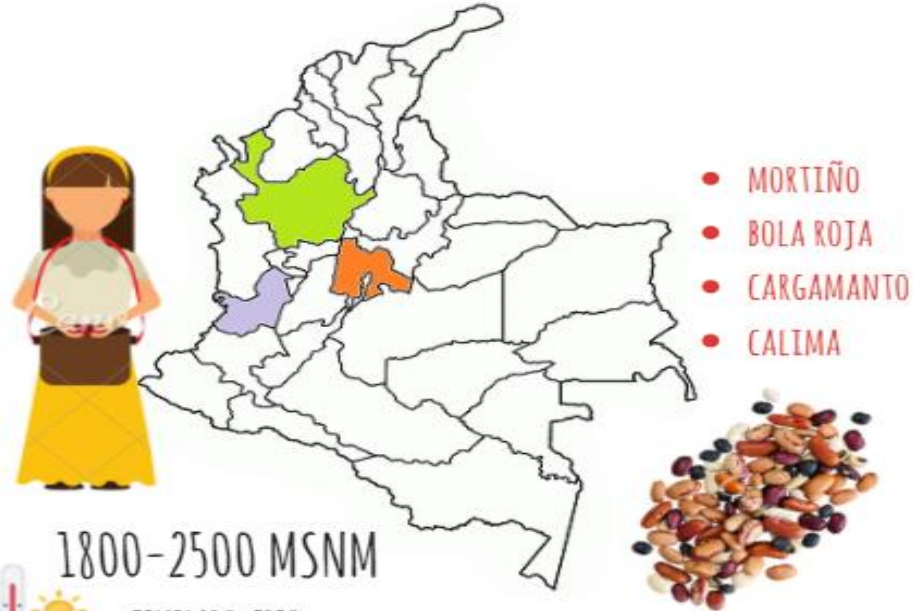
Esta tendencia puede revertirse siempre que los países tomen la iniciativa en el desarrollo de políticas encaminadas a crear una agricultura sostenible.

Fríjol (*Phaseolus vulgaris*)



Características del grano	
Tamaño	Color
propiedades nutricionales	
Proteínas	14-33%
carbohidratos	32-76 g/100 g fríjol
Fibra	14-19 g/ 100 g fríjol crudo
Nutrientes	Calcio, hierro, fósforo, magnesio y zinc
Vitaminas	Tiamina, niacina y ácido fólico
Lípidos	1.5-6.2 g/ 100 g fríjol crudo

Fríjol en Colombia



- MORTIÑO
- BOLA ROJA
- CARGAMENTO
- CALIMA

1800-2500 MSNM



TEMPLADO-FRÍO

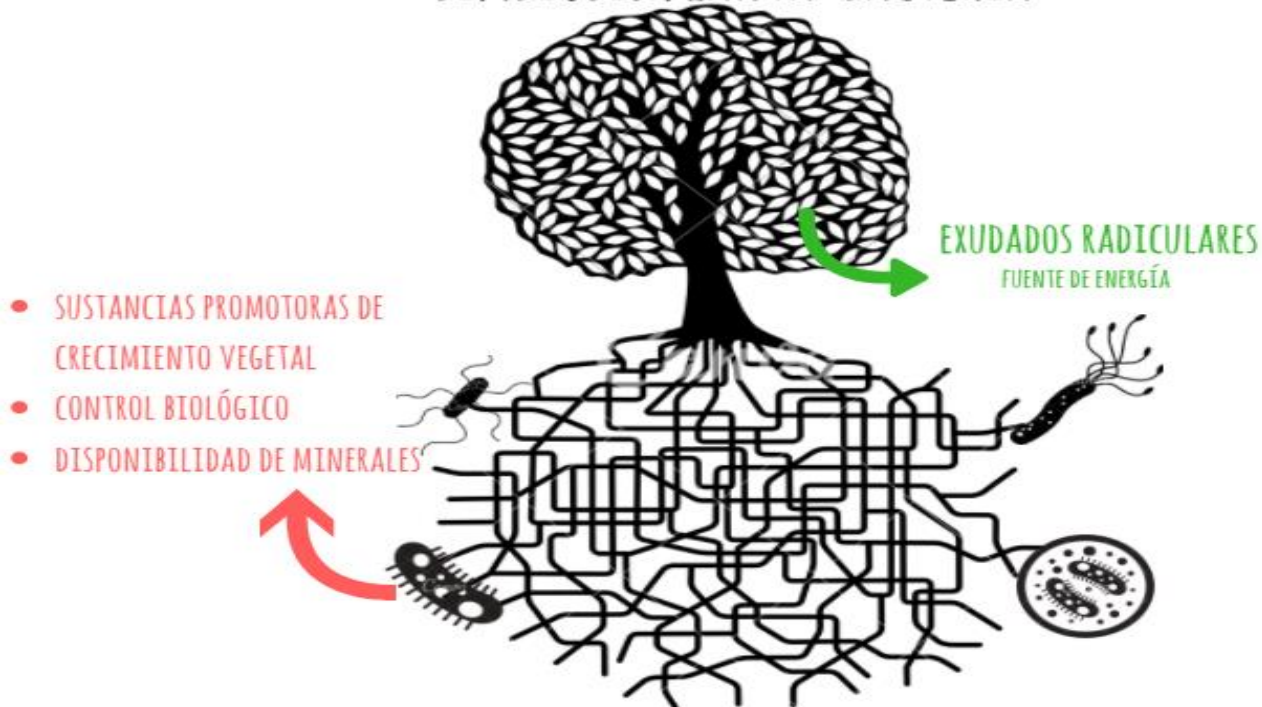
SUELOS PROFUNDOS, FÉRTILES CON BUEN

DRENAJE

PH 5.5-6.5.

Rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR)

SIMBIOSIS PLANTA-BACTERIA



Bacillus sp. como PGPR

MAS DE 100 ESPECIES



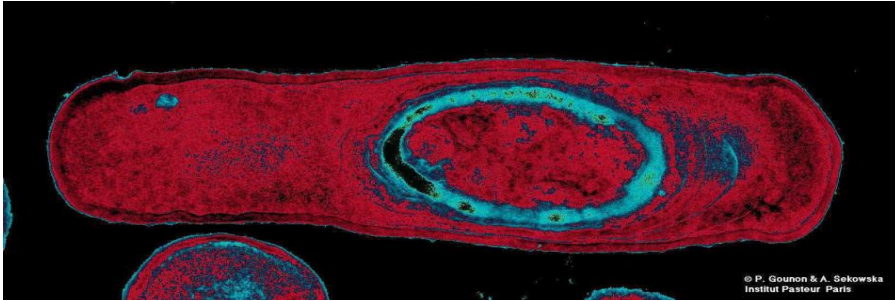
- *B. subtilis*
- *B. megaterium*
- *B. licheniformis*
- *B. circulans*



Bacillus subtilis subsp. *spizizenii*

ATCC 6633

- El uso de *Bacillus* sp. en procesos de biotecnología, ha ganado interés debido a que forman esporas que les confiere resistencia a condiciones adversas como altas temperaturas, desecación y cambios de pH, y pueden permanecer viables durante periodos prolongados.



<http://www.normalesup.org/~adanchin/archives-REG-GGB/Microbes.html>

Pseudomonas sp. como PGPR.

<i>P. aeruginosa</i>	control biológico contra patógenos bacterianos de plantas
<i>P. corrugata</i>	protección y control del estrés abiótico y biótico y PCV
<i>P. fluorescens</i>	produce compuestos de PCV y tiene capacidad de control biológico contra patógenos fúngicos
<i>P. vancouverensis</i>	capaz de aumentar la germinación y la longitud radical de plántulas de trigo.

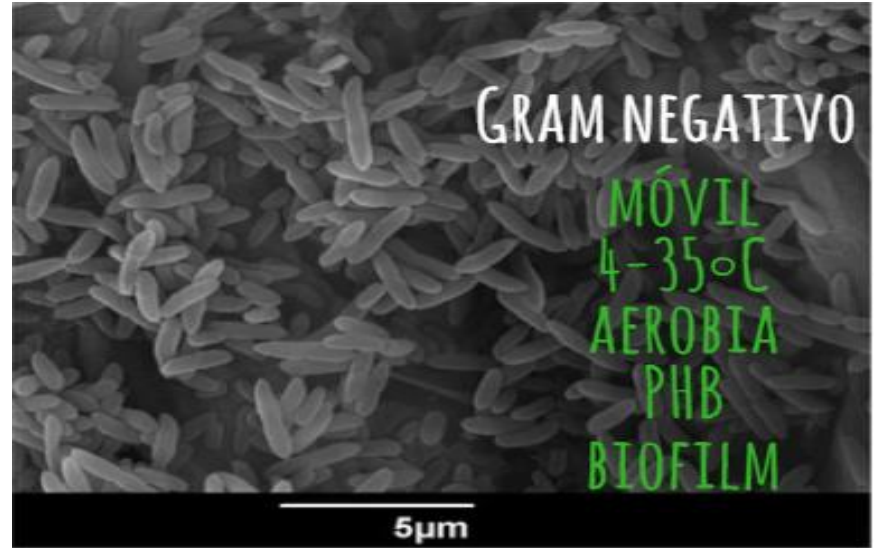
Pseudomonas extremaustralis

CMPUJ U515

Cráter La Olleta, Parque Nacional Natural
Los Nevados-Colombia.



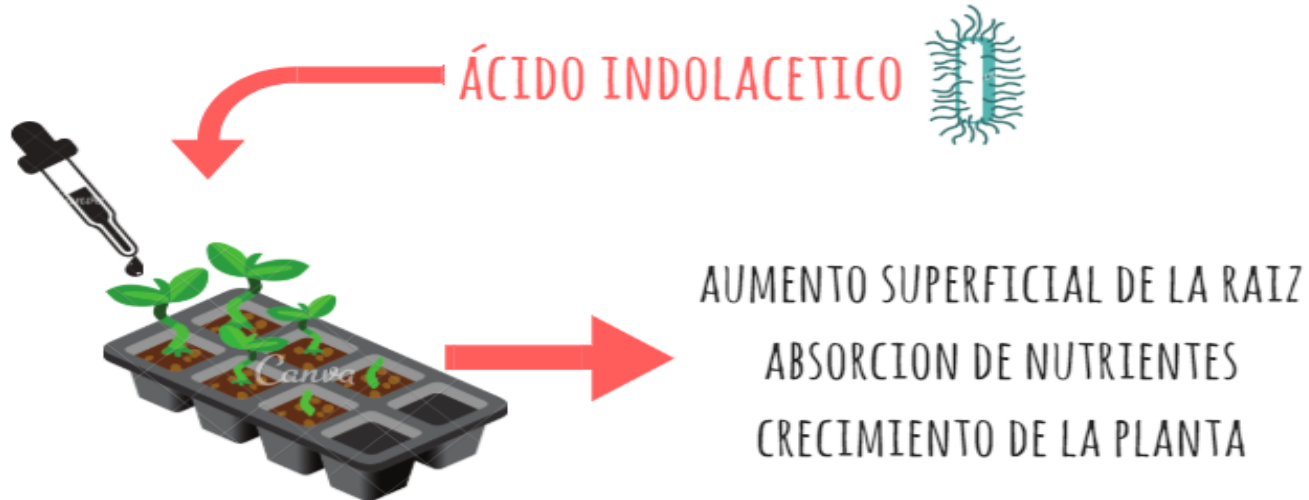
<https://www.google.com.co/maps/>



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5731063/>

Auxinas

fitohormonas que promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas, pueden actuar a bajas concentraciones, promueven el crecimiento de las raíces aumentando el área superficial y la absorción de nutrientes



Solubilización de fosfatos

FÓSFORO

factor limitante del desarrollo de las plantas, representa el segundo nutriente inorgánico más importante, participa en procesos como la fotosíntesis, desarrollo radicular y floración, y las plantas deben tomarlo del suelo donde se encuentra en baja concentración

ORGÁNICO

*fosfato de insosilol
fosfoésteres*

mineralización
mediante enzimas
fosfatasas



INORGÁNICO

*Rocas y
minerales primarios*

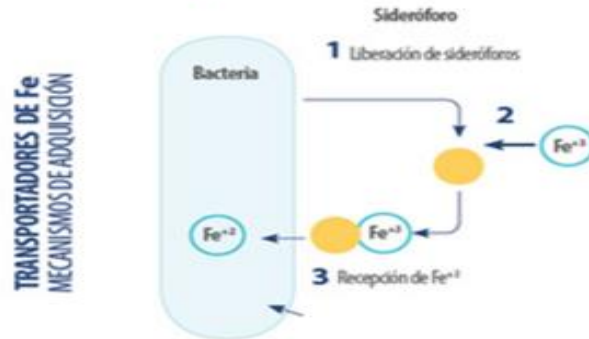
solubilización
mediante ácidos
orgánicos

Sideróforos

Moléculas de bajo peso molecular, que forman complejos extracelulares de Fe^{3+} , el complejo es absorbido por transportadores específicos de quelatos férricos. El Fe. ligado al sideróforo experimenta una reducción a Fe^{2+} : una forma soluble y asimilable.

La adquisición de hierro dependiente de sideróforos puede ser llevada a cabo por:

BACTERIAS, LEVADURAS Y PLANTAS



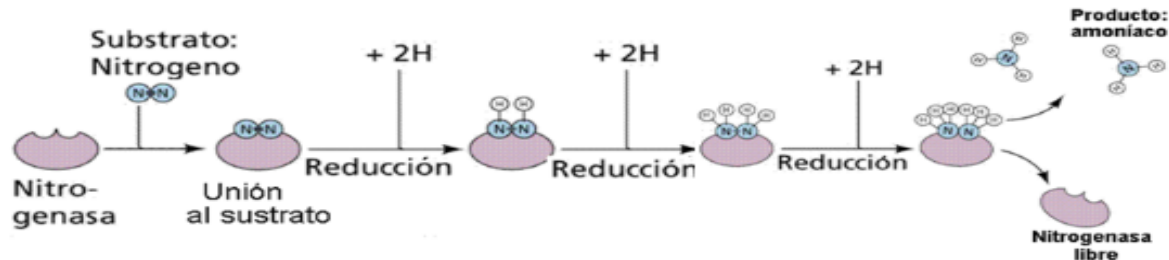
Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento esencial para mantener la vida en la tierra, factor limitante de la producción agrícola mundial.



- Adición de fertilizantes al suelo.
- compuestos nitrogenados de la degradación de materia orgánica.
- Conversión de nitrógeno en compuestos asimilables, por procesos naturales.
- Fijación biológica de nitrógeno (FBN).

60% DE NITRÓGENO USADO POR PLANTAS PROVIENE DE FBN



Proteasas

Las enzimas proteolíticas son capaces de degradar proteínas mediante la hidrólisis de los enlaces peptídicos que las conforman, estas enzimas se encuentran presentes en

MICROORGANISMOS, PLANTAS, Y EN EL HOMBRE



- OBTENCIÓN DE AMINOACIDOS Y PEPTIDOS USADOS COMO NUTRIENTES
- ACCIÓN CONTRA OTROS MICROORGANISMOS



SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN
DE PROTEÍNAS DE
SU DESARROLLO



DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS DE LA
DIETA, MODULACIÓN Y
LIBERACIÓN DE HORMONAS

Catalasa

Cuando las plantas están bajo condiciones de estrés, como la salinidad, son vulnerables a toxicidad iónica, estrés osmótico y sobreproducción de especies reactivas de oxígeno

- ANIÓN SUPEROXIDO O_2^-
 - RADICAL HIDROXILO-OH
 - PERÓXIDO DE HIDROGENO H_2O_2
- DAÑO CELULAR

Para contrarrestar esta problemática las plantas han desarrollado mecanismos como el reclutamiento de enzimas antioxidantes y compuestos que desintoxican



Motilidad

Es la capacidad que le permite a la célula **alcanzar distintas zonas de su entorno**, y es fundamental para su supervivencia, ya que puede significar la diferencia entre la vida y la muerte.



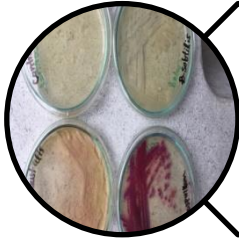
Objetivos

GENERAL: Determinar los factores asociados a promoción de crecimiento vegetal en *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515 y evaluar su efecto en plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

ESPECIFICOS

- Implementar el proceso de caracterización cualitativa de factores asociados a promoción de crecimiento vegetal.
- Caracterizar las cepas bacterianas *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515 para producción de factores asociados a promoción de crecimiento en plantas.
- Comprobar el efecto de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515 sobre crecimiento de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

Metodología



Caracterización cualitativa para AIA, Solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, fijación de nitrógeno, proteasas, catalasa y motilidad.



Ajuste de Inoculo bacteriano: una UFC en 100 ml de caldo LB (peptona, NaCl, extracto de levadura), y se incubó a 30°C, 150 rpm, se midió la absorbancia a 600nm hasta $DO \sim 1.0$, para establecer la concentración adecuada (UFC/ml), y posteriormente inocular las semillas de frijol.

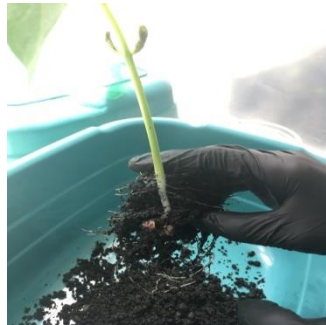
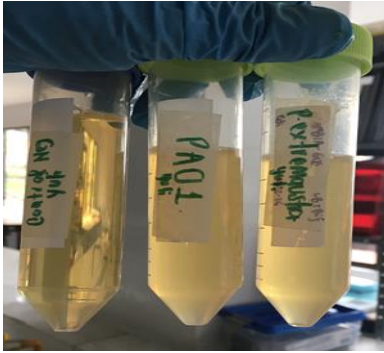


Ensayo biológico: determinación de los efectos de la inoculación de los microorganismos en plántulas de frijol Cargamanto rojo. se realizó según el protocolo de Qiao et al 2017.

Caracterización cualitativa

Ácido indolacético:	Inoculo en agar nutritivo +triptófano durante 72 h. Se agrega sobre la colonia reactivo Salkowsky . Viraje de color de la colonia a rosado después de 3 h de incubación.
Solubilización de fosfatos	Inoculo en medio SRS por 5 días. formación de halos de acidificación (viraje a amarillo), y halo de solubilización claro alrededor de las UFC es indicador de la utilización del fosfato tricalcico.
Sideróforos	El medio CAS se agrega sobre la colonia de 48 horas, y se revela después de 3 h de incubación. El medio vira de color.
Fijación de nitrógeno	Inoculación en medio NFb (nitrogen free bromothymol blue). Se evidencia cambio de color del medio a azul o amarillo.
Proteasas	Inoculación en medio Skim milk + agar, se incuba por 3 días. Formación de halo transparente alrededor de la zona inoculada
Catalasa	Se añaden 2 gotas de peróxido de hidrogeno a la colonia. Se evidencia aparición de burbujas en los primeros 20 segundos.
Motilidad	Medio LB semisólido, se sembró por punción centrada con asa recta a una profundidad de 1.5 cm y se incubo por 24 h a 37°C. formación de turbidez.

Ensayo biológico



- longitud de raíz
- longitud del tallo
- peso húmedo total
- peso húmedo raíz
- peso seco tallo
- peso seco raíz

Prueba de comparación de medias con ANOVA y se determinó el mejor tratamiento con la prueba de TUKEY ($p < 0.05$).

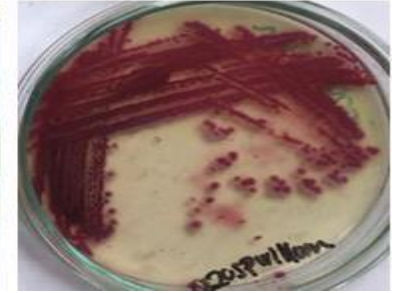
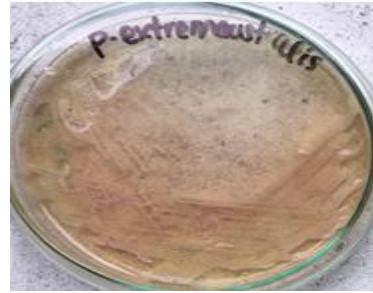
Resultados

P. extremaustralis

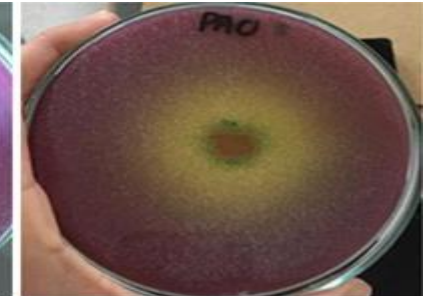
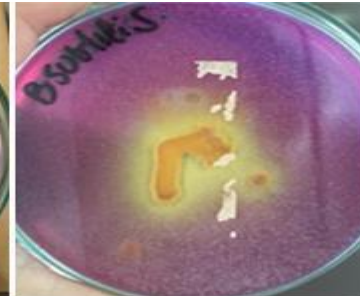
B. subtilis

Control

Determinación cualitativa
de producción de ácido
indolacético



Determinación cualitativa
de capacidad
solubilizadora de fosfatos

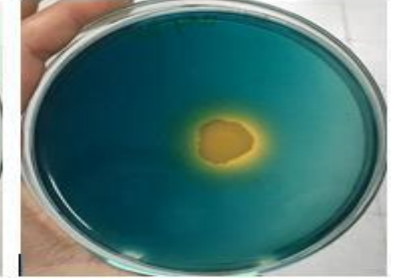
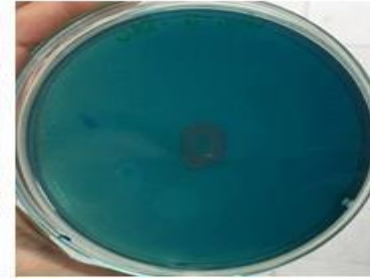
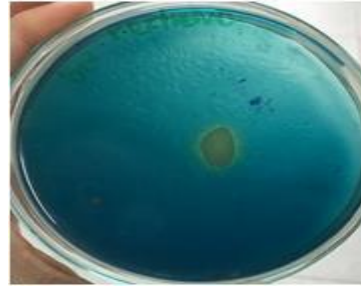


P. extremaustralis

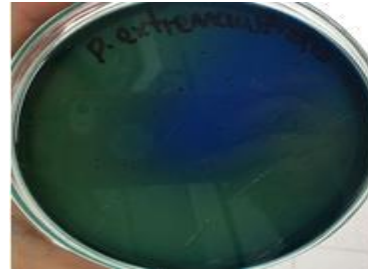
B. subtilis

Control

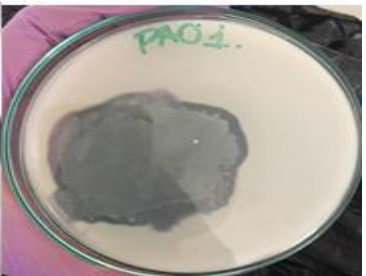
Determinación cualitativa de producción de sideróforos



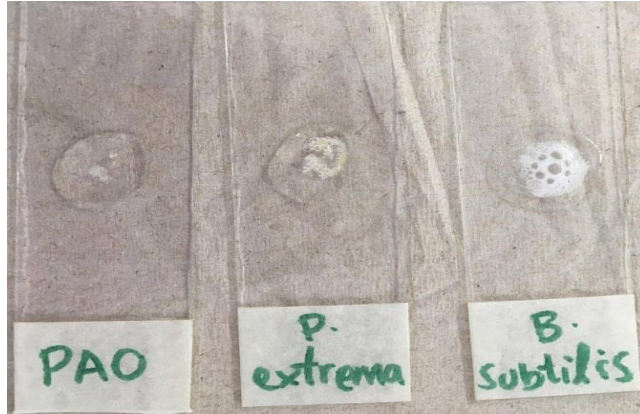
Determinación cualitativa de capacidad de fijar nitrógeno



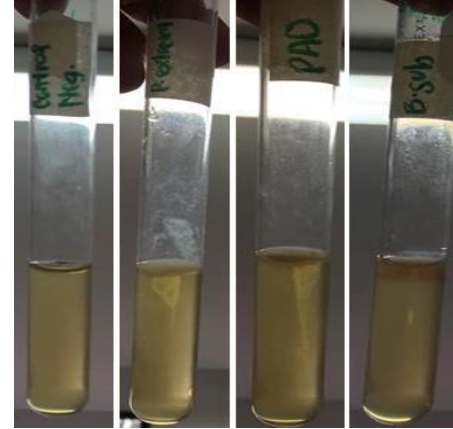
Determinación cualitativa de producción de proteasas



Actividad Catalasa



Motilidad



	Producción de AIA	Producción de sideróforos	Solubilización de fosfatos	Fijación de nitrógeno	Producción de proteasas	Producción de catalasa	Motilidad
<i>P. extremaustralis</i>	++	+	++	++	-	+++	+++
<i>B. subtilis</i>	-	-	+++	-	+++	+++	+
<i>P. aeruginosa</i> PAO 1	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++

+: Débil

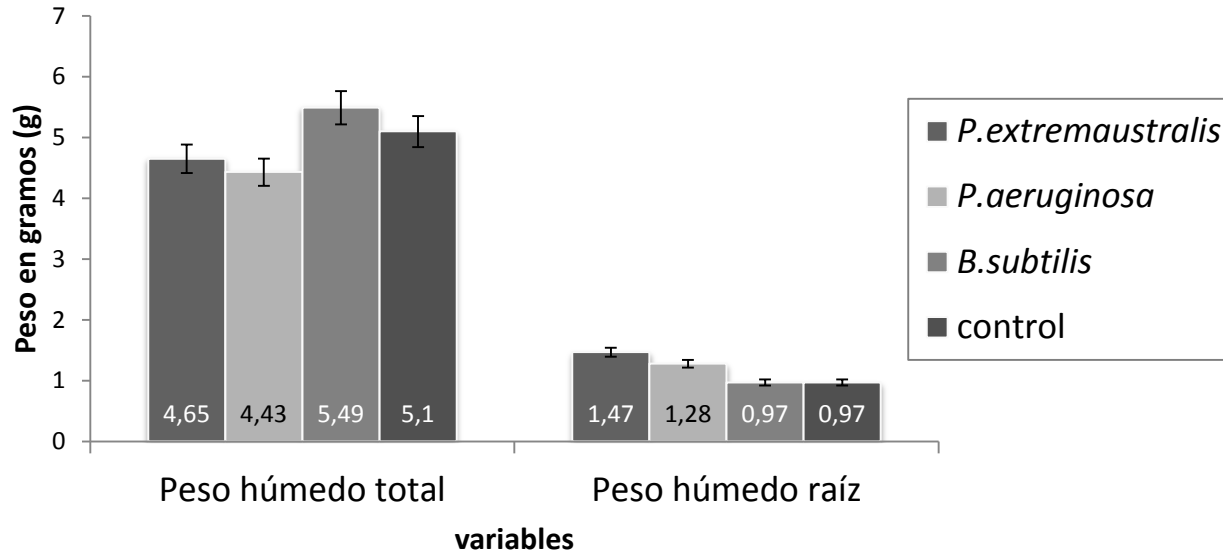
++: Moderado

+++ : Fuerte

-: Negativo

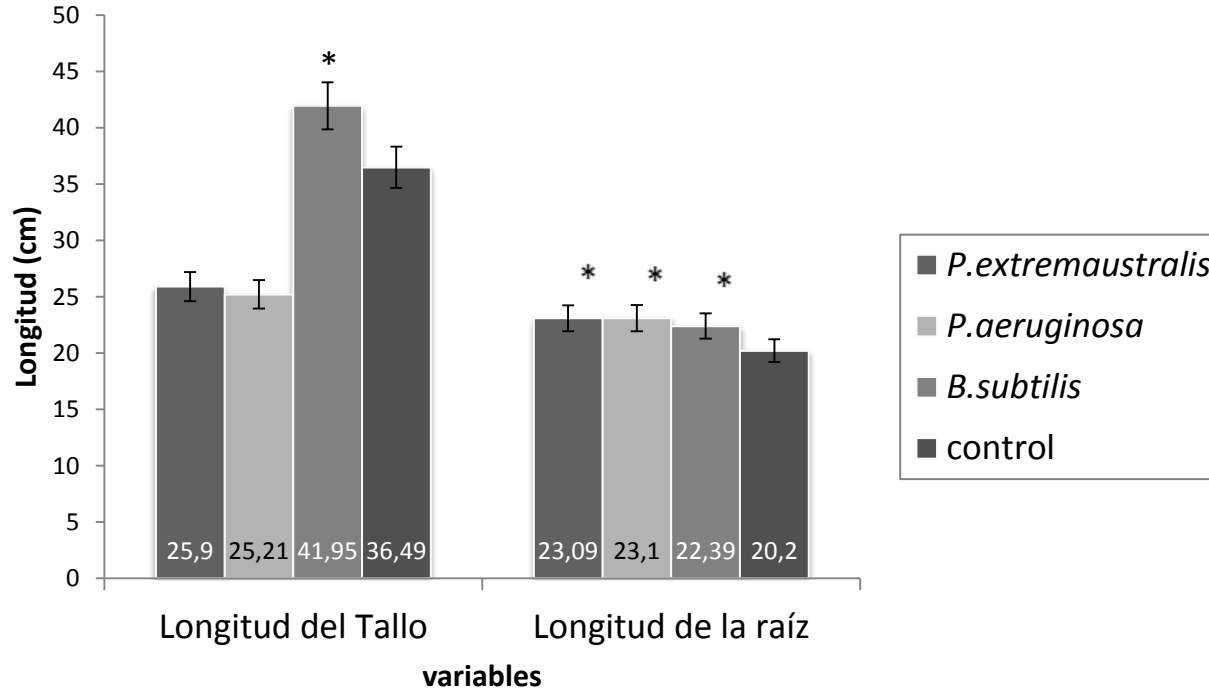
Ensayo biológico

Peso húmedo en plántulas de frijol



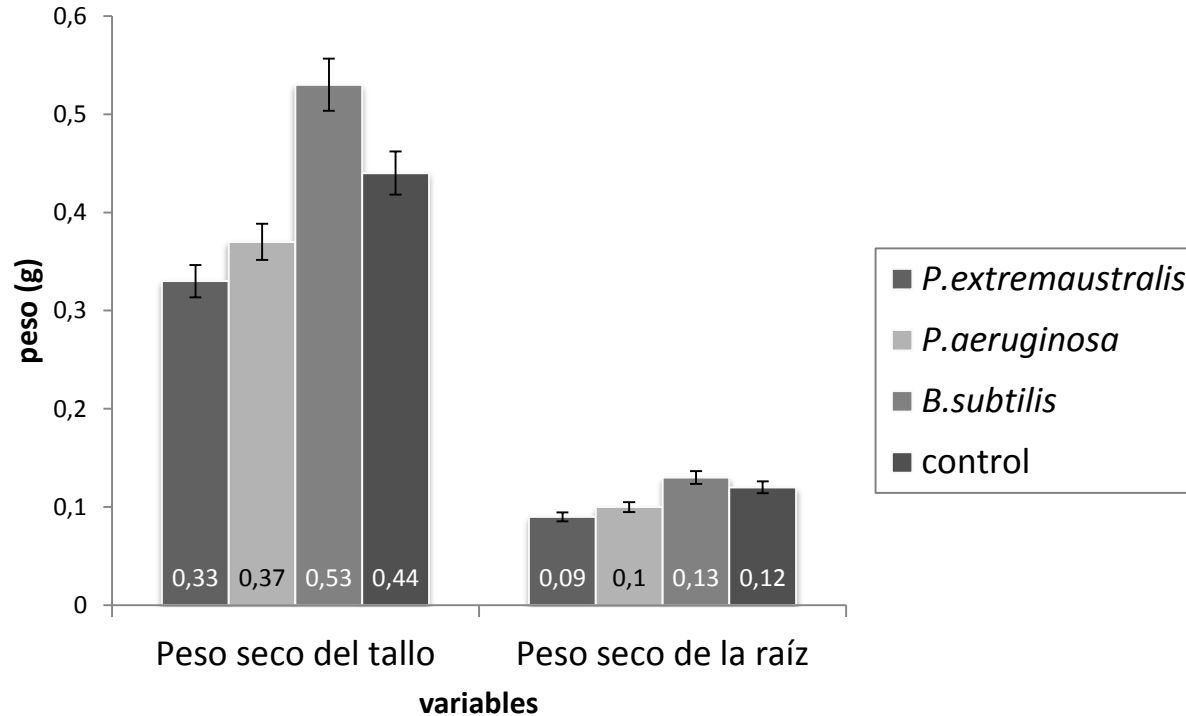
Ensayo biológico

Longitud de las plántulas de frijol



Análisis estadístico

Peso seco en plántulas de fríjol



Conclusiones

- 1. *B. subtilis* ATCC 6633 fue positivo para actividad solubilizadora de fosfatos, proteasas, catalasa y motilidad. *P. extremaustralis* CMPUJ U515 fue positiva para todos los factores asociados a promoción de crecimiento vegetal, excepto para proteasas.**
- 2. La inoculación de *B. subtilis* ATCC 6633 en plántulas de frijol fue similar al control, sin embargo el tratamiento con este microorganismo generó aumento significativo ($p < 0.05$) en longitud de tallo y raíz. Con *P. extremaustralis* CMPUJ U515 se generó aumento significativo del peso húmedo y longitud de la raíz.**

Conclusiones

3. Este es el primer estudio donde se evalúa a *B. subtilis* ATCC 6633 en promoción de crecimiento en frijol, y es la primera vez que se evalúa a *P. extremaustralis* CMPUJ U515 para promoción de crecimiento vegetal.
4. Estos resultados permiten entrever el potencial de *B. subtilis* y *P. extremaustralis* para uso en procesos agrícolas, por su efecto en el desarrollo del frijol en el caso de *B. subtilis*, y capacidad de favorecer el progreso de raíces posiblemente a bajas temperaturas en *P. extremaustralis*.

Bibliografía

- Centro Internacional de Agricultura Tropical. Phaseolus bean: Post-harvest Operations [Internet]. AGSI/FAO Danilo Mejia, Beverly Lewis; 1999 p. 1-25. Available from: <http://www.fao.org/3/a-av015e.pdf>
- Ulloa J, Ulloa P, Ramírez J, Ulloa B. El frijol (Phaseolus vulgaris): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. Fuente. 2011;3(8):5-9.
- El frijol colombiano: tan variado como sus regiones [Internet]. Colombiaexpomilan.co. 2018 [cited 22 February 2018]. Available from: <http://www.colombiaexpomilan.co/info/conoce-colombia/el-frijol-colombiano-tan-variado-como-sus-regiones.html>
- FAOSTAT [Internet]. FAO. 2016 [cited 12 March 2018]. Available from: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Sánchez D, Gómez R, Garrido M, Bonilla R. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2012;3(7):1401-1415.
- Emsden C. FAO - Noticias: El uso de fertilizantes sobrepasará los 200 millones de toneladas en 2018 [Internet]. Fao.org. 2017 [cited 14 August 2017]. Available from: <http://www.fao.org/news/story/es/item/277654/icode/>
- Avalos C. El polémico uso de los agroquímicos. Generacion. 2017;134(1):10-14.
- Qiao u, Borriss R, Yu X, Liang X, Liu Y, Liu Y. Addition of plant-growth-promoting Bacillus subtilis PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. BMC Microbiology. 2017;17(131):1-12.
- Camelo M, Vera S, Bonilla R. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 2011;12(2):159-166.
- Tejera B, Rojas M, Heydrich M. Potencialidades del género Bacillus en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2011;42(3):131-138.
- Bacillus subtilis (ID 665) - Genome - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 12 March 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/665>
- Viedma E. Etymologia: Pseudomonas. Emerging Infectious Diseases. 2012;18(8):1241
- Durairaj K, Velmurugan P, Park J, Chang W, Park Y, Senthilkumar P et al. Characterization and assessment of two biocontrol bacteria against Pseudomonas syringae wilt in Solanum lycopersicum and its genetic responses. Microbiological Research. 2018;206:43-49.
- Zachow C, Müller H, Laireiter C, Tilcher R, Berg G. Complete genome sequence of Pseudomonas corrugata strain RM1-1-4, a stress protecting agent from the rhizosphere of an oilseed rape bait plant. Standards in Genomic Sciences. 2017;12(66):1-7.
- Hernández J, Moreno G, Santoyo G. Genome Comparison of Pseudomonas fluorescens UM270 with Related Fluorescent Strains Unveils Genes Involved in Rhizosphere Competence and Colonization. Journal of Genomics. 2017;5:91-98.

GRACIAS

