



**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

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C, MAYO DE 2018**



**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 de la 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
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C, MAYO DE 2018**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mis padres y hermana por su apoyo para culminar este proceso. A mi docente el Dr. Silvio Alejandro López Pazos por su dedicación y paciencia, por guiarme y enseñarme el proceso de la investigación. A la docente MSc. Sandra Mónica Estupiñan, quien asesoró mi proceso en la realización de este trabajo de grado. Y por último a Colciencias, por financiar este proyecto de investigación mediante la convocatoria jóvenes investigadores e innovadores en alianza SENA 2016-2017.

TABLA DE CONTENIDO

1. ANTECEDENTES.....	14
2. MARCO REFERENCIAL	19
2.1. Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	19
2.1. Microorganismos promotores de crecimiento vegetal	20
2.2. Auxinas.....	24
2.3. Solubilización de fosfatos.....	27
2.4. Sideróforos	30
2.5. Fijación de nitrógeno.....	31
2.6. Proteasas.....	33
2.7. Catalasa	34
2.8. Motilidad.....	35
3. DISEÑO METODOLÓGICO	37
3.1. Población y muestra.....	37
3.2. Hipótesis, variables e indicadores	37
3.3. Técnicas y procedimientos.....	38
4. RESULTADOS	41
4.1. Determinación cualitativa de producción de ácido indolacético.....	41
4.2. Determinación cualitativa de capacidad solubilizadora de fosfatos	41
4.3. Determinación cualitativa de producción de sideróforos.....	42
4.4. Determinación cualitativa de capacidad de fijar nitrógeno.....	43
4.5. Determinación cualitativa de producción de proteasas	44
4.6. Determinación cualitativa de actividad catalasa	45
4.7. Determinación cualitativa de motilidad.....	45
4.8. Ensayo biológico en frijol	47
4.8.1 Análisis estadístico.....	51
5. DISCUSIÓN.....	55
6. CONCLUSIONES.....	63

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
------------------------------------	----

INDICE DE FIGURAS

Fig.1 Estructura del ácido indolacético	24
Fig. 2 Vías de biosíntesis de ácido indolacético en bacterias	26
Fig.3. Vía metabólica de fijación de nitrógeno	32
Fig.4 Evaluación de la producción de AIA	40
fig .5 Evaluación de la capacidad de solubilización de fosfatos	41
Fig.6 Evaluación de la producción de sideróforos	42
Fig.7 Evaluación de la capacidad de fijación de nitrógeno	43
Fig.8 Evaluación de la producción de proteasas	43
Fig.9. Evaluación de la producción de catalasa	44
Fig.10 Prueba de motilidad en medio LB semisolido	45
Fig.11 Etapas de germinación plántulas de frijol	47
Fig.12 semillas de frijol en tratamiento con <i>B.subtilis</i> ATCC 6633 y control día 1	48
Fig.13 Plántulas de frijol en tratamiento con <i>B.subtilis</i> ATCC 6633 y control 10 días después de la siembra	48
Fig.14 Plántulas de frijol en tratamiento con <i>B.subtilis</i> ATCC 6633 y control 20 días después de la siembra	49
Fig.15 Plántulas de frijol inoculadas con <i>B.subtilis</i> ATCC 6633 para determinación de las variables de longitud de raíz y tallo, peso húmedo y seco	49
Fig.16 Plántulas de frijol en tratamiento con <i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515 y <i>P. aeruginosa</i> PAO1, 10 días después de la siembra	50
Fig.17 Plántulas de frijol en tratamiento con <i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515 y <i>P. aeruginosa</i> PAO1, 20 días después de la siembra	50
Fig.18. Plántulas de frijol inoculadas con <i>P. extremaustralis</i> CMPUJ U515 para determinación de las variables	51
Fig.19 Evaluación del fenotipo peso húmedo total y peso húmedo de la raíz.....	52
Fig.20 Evaluación del fenotipo longitud del tallo y longitud de la raíz	53
Fig.21 Evaluación del fenotipo Peso seco tallo y peso seco raíz	54



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

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

RESUMEN

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es una planta leguminosa ampliamente difundida por el mundo, de gran impacto nutricional y económico, se destaca por ser una fuente importante de proteínas. Los mayores productores están en Norte América y Europa, y los mayores consumidores se ubican en Latino América. Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal representan un grupo que se asocia con las plantas produciendo efectos benéficos por medio de mecanismos directos como la fijación de nitrógeno, o la solubilización de fosfatos, e indirectos como el biocontrol de patógenos. *Bacillus subtilis* es una bacteria esporuladora, que posee capacidad de promover el crecimiento en diversos cultivos como tomate, maíz, y espinaca entre otros. *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa que se ha descrito ampliamente para la promoción de crecimiento vegetal. *P. extremaustralis* es una bacteria psicrófila cuyo genoma ha sido secuenciado, se caracteriza por la producción de biopolímeros, que sería una estrategia para soportar bajas temperaturas. En este trabajo se evaluó la capacidad de *B. subtilis* ATCC 6633 y

P. extremaustralis CMPUJ U515 para la promoción de crecimiento en fríjol. Se determinó que estas bacterias poseen características relacionadas con promoción de crecimiento como solubilización de fosfato, síntesis de la enzima catalasa y motilidad entre otros. Cuando se realizaron bioensayos con semillas de fríjol se encontró que *B. subtilis* ATCC 6633 tiene efecto benéfico sobre la longitud del tallo, mientras que *P. extremaustralis* CMPUJ U515 favorece el desarrollo de la raíz. Este trabajo es un primer acercamiento del uso de estas bacterias para la cadena productiva del fríjol.

Palabras clave: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, promoción de crecimiento vegetal, fríjol.

YULI MARCELA BALLESTEROS ROJAS

Estudiante

SILVIO ALEJANDRO LÓPEZ PAZOS

Asesor externo de la Universidad Antonio Nariño

SANDRA MÓNICA ESTUPIÑAN

Asesor interno

INTRODUCCIÓN

El estado mundial del recurso suelo se encuentra en malas condiciones y altamente degradado. El impacto del crecimiento demográfico, la urbanización y el cambio climático (sequías, inundaciones, tormentas, altas temperaturas) afectan la fertilidad del suelo causando erosión, pérdida de carbono orgánico, desequilibrio de nutrientes, acidificación del suelo, contaminación, compactación del suelo, salinización y pérdida de biodiversidad. Estos factores afectan la productividad comercial agrícola y la economía de las naciones, generando aumento de precios y consecuencias sociales como hambrunas y pobreza (1).

Con el incremento significativo de la población mundial, se estima que llegará a 10 mil millones de personas en las próximas dos décadas, aumenta la demanda de alimentos y de fertilizantes químicos (2). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que el uso de fertilizantes químicos sobrepasará las 200 millones de toneladas para el 2018, y se espera que en América Latina crezca un 3.3% anual (3). El uso indiscriminado de estas sustancias implica graves problemas para el medio ambiente, disminuye la biodiversidad y genera impacto negativo en la salud humana (4). Sin embargo, esta tendencia puede revertirse siempre que los países tomen la iniciativa en la promoción de prácticas de manejo sostenible y el uso de tecnologías apropiadas, con mejores políticas encaminadas a crear una agricultura sostenible con la capacidad para adaptarse al cambio climático (1).

Una alternativa al uso de los agroquímicos son los biofertilizantes que minimizan el impacto ambiental, son elaborados a base de microorganismos o sus productos, y ayudan al proceso natural de nutrición de las plantas. Para ello se ha propuesto el uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR del inglés Plant Growth Promotion Rhizobacteria) que estimulan el desarrollo de la planta

(mediante la producción de sustancias orgánicas como fitohormonas tipo auxinas), además actúan en la regulación de la producción de hormonas por parte de la planta, e intervienen en procesos como la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, o producción de sideróforos, entre otros (5).

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es una leguminosa que se cultiva en todo el mundo hace muchos años. En la actualidad existen más de 40.000 variedades, y es considerada la leguminosa alimentaria más importante para el consumo directo en el mundo (6). Tiene propiedades nutricionales importantes, especialmente un alto nivel proteico, es fuente de carbohidratos, fibra, nutrientes como calcio, hierro, fósforo, magnesio, zinc y vitaminas como tiamina, niacina y ácido fólico (7). Ésta leguminosa se adapta a climas variados y es fuente alimenticia en países de todo el mundo, entre ellos Colombia siendo un producto con buen consumo interno y externo (8).

El uso del grupo de bacterias *Bacillus* sp., en procesos de biotecnología, ha ganado interés debido a que estas forman esporas (a diferencia de las células vegetativas) lo que las hace resistentes a condiciones adversas como altas temperaturas, desecación y cambios de pH, por lo cual pueden permanecer viables durante periodos prolongados. Entre las aplicaciones, de algunas especies de este género, es la capacidad de promover el crecimiento en plantas y su actividad de biocontrol de patógenos (9).

Se ha demostrado a través de diversos estudios que el género *Pseudomonas* en representación de *P. aeruginosa*, *P. corrugata*, *P. fluorescens* y *P. vancouverensis* tiene actividad como PGPR, mediante mecanismos como la síntesis de ácido indolacético (AIA), proteasas, fosfatasas, sideróforos (sustancias que ayudan a la planta) y también con actividad de biocontrol de fitopatógenos (10).

Estas características abren campo a la investigación en *B. subtilis* y *P. extremaustralis*, respecto a su capacidad de promoción de crecimiento vegetal en el modelo fríjol, como candidatos que pueden dar solución al deterioro de los suelos, y al problema de baja productividad de los mismos; para ser usados en la síntesis de fertilizantes orgánicos que puedan mejorar las condiciones de suelos alterados por fenómenos físicos y meteorológicos extremos, con la visión de implementar técnicas de inoculación artificial de estos microorganismos, sin que se generen impactos negativos en la salud y/o el ambiente.

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*).

Específicos:

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

1. ANTECEDENTES

1. La cepa de *B. subtilis* PTS-394 coloniza raíces y apoya el crecimiento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), lo cual se evidenció por un aumento del peso fresco de la raíz y de la longitud de la planta respecto al control, esta cepa contrarresta la infección por *Fusarium oxysporum* y *Ralstonia solanacearum*, considerados el principal obstáculo para el cultivo de tomate en invernadero. Qiao et al. revelaron que la promoción de crecimiento de las plantas y el biocontrol por *B. subtilis* PTS-394 no es perjudicial hacia la microbiota endógena de la rizófora del tomate, incluyendo representantes eucariotas, y tiene solamente un impacto transitorio en la composición de la comunidad. Además tiene efecto benéfico sobre el crecimiento y la salud de las plantas, razones por las que *B. subtilis* PTS-394 es un candidato prometedor como bioagente basado en PGPR (11).
2. Huang et al. 2015 Examinaron aislamientos bacterianos de suelo de la selva tropical peruana para determinar si promovían el crecimiento de plantas de *Arabidopsis* sp., tomate y maíz (*Zea mays*). Se seleccionaron cuatro cepas del género *Bacillus*: una de *B. subtilis*, dos de *B. atrophaeus* y una de *B. pumilus*. Pasadas dos semanas de la inoculación bacteriana se determinaron variables como: altura de la planta, peso fresco y peso seco de la biomasa de cada planta. Se determinó que los cuatro aislamientos promovieron significativamente el crecimiento de maíz y tomate bajo condiciones de invernadero. Los datos obtenidos sugieren que los aislamientos de PGPR de los suelos de selva tropical podrían tener efectos de promoción del crecimiento en un grupo más amplio de cultivos. Cabe señalar que los suelos de la selva tropical de Tambopata experimentan cambios dramáticos en el contenido de humedad, incluido inundaciones. Por lo tanto, es posible que las cepas aisladas en este estudio puedan tener

efectos de promoción del crecimiento incluso bajo diferentes condiciones ambientales (12).

3. En el año 2008, se compararon las potencialidades promotoras de crecimiento vegetal de las bacterias *P. aeruginosa* y *B. subtilis* sobre tomate, okra (*Abelmoschus esculentus*) y espinaca africana (*Amaranthus* sp.). Ambas cepas mejoraron la aparición de plántulas, altura de los brotes, días de producción de primer fruto y biomasa seca, respecto al control que fue agua destilada. A pesar de que se observaron pequeñas variaciones en la eficacia bacteriana entre los parámetros y tipos de vegetales, las diferencias no fueron significativas entre los inoculantes, pero ambos fueron estadísticamente mayores que el control. No hubo diferencias significativas entre el rendimiento general de *P. aeruginosa* y *B. subtilis*, sin embargo la capacidad de *B. subtilis* para formar endosporas lo puede convertir en un microorganismo más versátil que *P. aeruginosa*, pues las esporas le otorgan capacidad de conservar la viabilidad largos periodos de tiempo. Los autores no aconsejan el uso de *P. aeruginosa* debido a sus propiedades patógenas oportunistas, sin embargo sugieren que se pueden estudiar otras especies de este género (13).
4. Un estudio realizado por el Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados IPN (México), evaluó el efecto de la inoculación de raíces de tomate con *B. subtilis* BEB-ISbs para identificar el rendimiento y la calidad del fruto (forma, tamaño y color), teniendo en cuenta las siguientes variables: el rendimiento por planta, el rendimiento comercializable, así como el peso y la longitud de los frutos, los cuales se incrementaron con el tratamiento con *B. subtilis* cuando se compararon con el tratamiento control, o sin inoculo. La textura de los frutos (fuerza máxima media por fruto) también fue mejorada por el tratamiento con *B. subtilis* en comparación con el control. Estos resultados demostraron

que *B. subtilis* tiene efectos positivos sobre los atributos de calidad de los frutos de tomate, particularmente sobre el tamaño y la textura (14).

5. Un estudio realizado en el 2006 por el Departamento de Microbiología Agrícola de la Universidad Musulmana de Aligarh (India) tuvo como objetivo identificar el potencial de *B. subtilis* SJ-101 como un bioinoculante para la promoción del crecimiento de plantas, y la acumulación de níquel en la planta de mostaza (*Brassica juncea*). Esta cepa de *B. subtilis* se seleccionó debido a su capacidad de resistencia al níquel. Se determinó que esta cepa facilitaba la acumulación de níquel en *B. juncea* en un 0.147% frente a un 0.094% en las plantas cultivadas en suelo no inoculado, mostrando efecto protector contra la fitotoxicidad de níquel, además esta cepa mostró capacidad para producir ácido índol acético (AIA), y solubilizar fosfato inorgánico, por lo cual se sugiere que *B. subtilis* SJ-101 tiene capacidad de promoción de crecimiento de las plantas y atenuación del níquel del suelo por bioabsorción y bioacumulación, y podría ser usada como agente protector ante la fitocontaminación por metales pesados (15).

6. Durante los años 2003 y 2005, se evaluaron los efectos promotores del crecimiento de dos cepas de *Bacillus*: *B. subtilis* OSU-142 con capacidad de fijación de nitrógeno y *B. megaterium* M3 con capacidad de fijación de nitrógeno y de solubilización de fosfatos. Los microorganismos se usaban solos o combinados, en plantas de frambuesa. Se identificaron variables como: rendimiento, crecimiento, composición de nutrientes en las hojas, y variación de la composición del elemento nutriente del suelo. Los resultados mostraron que la inoculación de raíces de frambuesas y rizósfera con *B. megaterium* M3, o con *B. subtilis* OSU-142 + *B. megaterium* M3, incrementó significativamente el rendimiento (33,9% y 74,9%), la longitud de la caña (13,6% y 15,0%), el número de racimos por caña (25,4% y 28,7%) y el número de bayas por caña (25.1% y 36.0%), respectivamente,

en comparación con el control. A la vez la inoculación mejoró significativamente los contenidos de nitrógeno, fósforo, calcio, hierro y manganeso en hojas de frambuesa, aumentó el contenido total de nitrógeno en el suelo, y los contenidos disponibles de fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, manganeso, y zinc. Esto sugiere que *B. megaterium* M3, solo o en combinación con *B. subtilis* OSU-142, tiene el potencial de aumentar el rendimiento, crecimiento y nutrición de frambuesa en condiciones de crecimiento orgánico, y tienen potencial para ser utilizados en el desarrollo de biofertilizantes (16).

7. Yadav et al. 2016 (17) estudiaron especies de bacilos psicrótróficos procedentes de diferentes sitios del noroeste del Himalaya para identificar si eran promotores de crecimiento de plantas con el objetivo de desarrollar inoculantes microbianos que pudieran actuar eficazmente a bajas temperaturas. A todas las especies aisladas se les hizo determinación de características promotoras del crecimiento de las plantas como producción de AIA, amoníaco, sideróforos, ácido giberélico y cianuro de hidrógeno, solubilización de zinc, fosfato, etc. y actividad de biocontrol contra *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina* a bajas temperaturas entre 5-15 C°. Entre todas las cepas se encontró que *Bacillus licheniformis*, *B. muralis*, *Desemzia incerta*, *Paenibacillus tylopili* y *Sporosarcina globispora* eran potentes candidatos a ser desarrollados como inoculantes, ya que exhiben múltiples rasgos promotores de crecimiento vegetal a baja temperatura.
8. En el año 2013, se realizó un estudio cuyo objetivo fue determinar la capacidad de promoción de crecimiento de las rizobacterias en suelos hipersalinos en Túnez (África). Se estableció una colección de 475 bacterias halófilas y halotolerantes a partir de rizosfera de *Salicornia* (planta halófito) y el suelo circundante, las bacterias se caracterizaron por la resistencia a la

temperatura, estrés osmótico y salino, y por tener capacidad de promoción de crecimiento de plantas. Sus estudios demostraron que bacterias extremófilas halófilas/halotolerantes cultivables que habitan ecosistemas salinos y áridos tienen el potencial de contribuir a promover el crecimiento de plantas bajo condiciones de severa salinidad y sequía, y que podrían ser explotadas en producción de biofertilizantes para sostener la producción de cultivos en tierras degradadas y áridas (18).

9. Mishra et al. 2008 (10) caracterizaron una cepa de *Pseudomonas* sp. psicrotolerante aislada del Himalaya. Hicieron secuenciación del gen 16S rRNA y se identificó la cepa como *P. vancouverensis*, la cual es tolerante a varios factores como pH entre 5 y 12 y concentraciones de sal de hasta 5%; se determinó que era capaz de producir AIA, de solubilizar fosfato, de producir ácido cianhídrico (HCN) y sideróforos. La cepa de *P. vancouverensis* fue usada como inóculo de plántulas de trigo, y fue capaz de aumentar la germinación y la longitud radical en comparación con controles sin inóculo.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. Fríjol (*Phaseolus vulgaris*)

El fríjol es una leguminosa de la familia Fabaceae, orden Fabales, reino Plantae. En la actualidad existen más de 40000 variedades, y es considerada la leguminosa alimentaria más importante para el consumo directo en el mundo. El fríjol se produce en regiones muy diversas como América Latina, África, Medio Oriente, China, Europa, Estados Unidos y Canadá. Es componente principal de la dieta principalmente en Centro y Sur América, en regiones como Brasil, México, la zona andina, América Central y el Caribe. Debido al interés que generó en las culturas precolombinas se le reconoce con diversos nombres como fríjol, poroto, alubia, judía, nuña, vainita, habichuela, caraota y feijao (6). Sin embargo la producción en América Latina es notoriamente baja en rendimiento, en comparación con el rendimiento promedio en las regiones templadas de América del Norte y Europa (19).

Generalmente los países productores de fríjol clasifican las variedades según las características del grano, especialmente haciendo alusión al tamaño y color. El tamaño distingue pequeños, medianos y grandes teniendo en cuenta el peso en g/100 semillas. El color de las semillas varía entre blanco, crema, amarillo, marrón, rosado, morado, negro entre otros. El fríjol tiene propiedades nutricionales importantes, especialmente un alto nivel proteico entre 14 y 33%. Se dice que la proteína de fríjol cocido puede ser de hasta 70%, comparada con proteína animal a la que se asigna 100%. Esta leguminosa es fuente de carbohidratos, representados en mayor proporción por el almidón, donde 100 g de fríjol crudo aportan 52 a 76 g de carbohidratos. También es buena fuente de fibra, representando de 14 a 19 g/100 g de fríjol crudo, constituido principalmente por pectinas, hemicelulosa, celulosa y lignina. Este alimento aporta nutrientes como calcio, hierro, fósforo, magnesio, zinc y vitaminas como tiamina, niacina y ácido fólico. En menor proporción contiene lípidos entre 1.5-6.2 g/100g de fríjol crudo

(7).

Esta leguminosa se adapta a climas variados, y es fuente alimenticia en países de todo el mundo, entre ellos Colombia, donde acompaña la gastronomía hace muchos años, es un producto con buen consumo interno y externo gracias a la calidad de sus semillas y a su variedad. Se siembra en tierras templadas a frías, los suelos deben ser profundos, fértiles con buen drenaje con rangos de pH entre 5.5-6.5. Los departamentos que cumplen estas características, y que son mayores productores, son Valle del Cauca, Antioquia y Cundinamarca, en donde se producen las variedades más destacadas: cargamanto, bola roja, mortño y calima. El cargamanto tiene gran difusión en el país, se siembra a 1800-2500 metros, y principalmente es producido en Antioquia (8).

2.1. Microorganismos promotores de crecimiento vegetal

La población mundial aumenta significativamente y con ella aumenta la demanda de alimentos y de fertilizantes químicos (2). Estos agroquímicos son usados en la agricultura cumpliendo funciones como insecticidas, herbicidas y fertilizantes que pueden mejorar las características químicas, físicas y microbiológicas del suelo, permitiendo que la producción de alimentos satisfaga la demanda. Sin embargo el uso indiscriminado de estas sustancias implica graves problemas para el medio ambiente y genera impacto negativo en la salud (4). Una alternativa al uso de estos productos es la producción de biofertilizantes que minimizan el impacto ambiental, son elaborados a base de microorganismos como las PGPR, las cuales estimulan el desarrollo de la planta mediante diversos mecanismos como la fijación de nitrógeno, mejoran la solubilización y la absorción de nutrientes como el fósforo, brindan protección a la planta ante microorganismos patógenos del suelo, estimulan el crecimiento radicular de la planta, entre otros (20).

Las PGPR mejor conocidas como rizobacterias están presentes generalmente en la rizosfera de la planta, donde representan una fuente nutritiva para la planta y mejoran la fertilidad del suelo. Estas bacterias se clasifican según su función en dos grupos: las que promueven el crecimiento de las plantas a través de mecanismos como la producción de fitohormonas tipo auxinas, solubilización de minerales como el fósforo, fijación de nitrógeno, producción de sideróforos, entre otros, y las que actúan como agentes de control biológico. Para que las bacterias interactúen y generen simbiosis con la planta se requiere una colonización bacteriana eficiente de las raíces de las plantas, y a la vez depende de las condiciones rizosféricas que confieren los exudados de la raíz de la planta, de este modo la disponibilidad y concentración de nutrientes en los exudados radiculares influyen en la abundancia de microorganismos en la rizosfera, ya que son fuente de energía para las rizobacterias que a la vez facilitan la absorción de agua, nutrientes, disponibilidad de minerales, secreción de sustancias promotoras de crecimiento vegetal y pueden actuar como agentes de control biológico, además hay evidencia de que estas bacterias estimulan la síntesis de proteínas que ayudan a las plantas a tolerar diversos tipos de estrés (21).

El suelo es un sustrato rico en nutrientes en el que habitan variedad de microorganismos, algunos géneros destacados son: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum* y *Bacillus*. De este último, las especies aisladas con mayor frecuencia de cultivos como papa, trigo, maíz entre otros son: *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. circulans* y *B. cereus*. El género *Bacillus* fue descrito por primera vez por Ferdinand Cohn, un bacteriólogo y botánico alemán. En la actualidad hay más de 100 diversas especies de este género, distribuidas en variedad de hábitats como suelo, asociaciones con plantas, agua dulce, agua salada, entre otros (9). Se caracterizan por tener una afinidad positiva a la coloración de Gram, presentan morfología bacilar, son aerobios o facultativos y tienen capacidad para formar endosporas en periodos de escasez de nutrientes y condiciones adversas. La endospora puede permanecer largos

periodos de tiempo viable en el ambiente y resistir condiciones de pH, temperatura y desecación. La descripción del género pone énfasis en la formación de la espora teniendo en cuenta la forma (esféricas, ovaladas, elipsoides o cilíndricas) y la ubicación dentro de la célula (central, subterminal o terminal), además los cambios que esta induce en la forma celular (células tumefactas o no tumefactas) (22).

Se ha demostrado a través de diversos estudios que el género *Bacillus* tiene la capacidad de promover el crecimiento vegetal y que posee actividad de biocontrol de patógenos, razón por la que se han estudiado sus potencialidades en procesos de biotecnología agrícola. La promoción de crecimiento vegetal por este género se lleva a cabo de forma directa o indirecta: de forma directa presenta potencial en la producción hormonas reguladoras de crecimiento vegetal, solubilizar fosfatos y tiene efecto en la fijación biológica de nitrógeno. De forma indirecta es capaz de producir sustancias antagónicas de patógenos (9).

B. subtilis, nombre científico *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 es un bacilo Gram positivo, facultativo, de habitud terrestre, mesófilo, su temperatura óptima de crecimiento va de 25-35°C, es móvil por presencia de flagelos, positivo para producción de catalasa y oxidasa variable. Fue una de las primeras bacterias estudiadas, y en la actualidad es un organismo modelo para el estudio de la diferenciación y desarrollo celular. Fue llamada *Vibrio subtilis* en 1835, y renombrada *B. subtilis* en 1872. Es capaz de producir endospora en situaciones de estrés nutricional, esta estructura le confiere resistencia a factores ambientales como temperatura, ambientes ácidos y salados donde puede persistir por largos periodos de tiempo, hasta que las condiciones sean favorables (23).

El género *Pseudomonas* fue descrito por primera vez por el botánico alemán Walter Migula en 1894, quien lo describió como células con órganos polares de motilidad, ya que tienen movilidad por flagelos. Presentan morfología bacilar, afinidad negativa a la coloración de Gram, no son fermentadores de glucosa y son

oxidasa positiva (24). El género actualmente comprende una gran cantidad de especies caracterizadas por su versatilidad metabólica y su ubicuidad en la naturaleza, tienen diversas funciones, y se ha demostrado la potencialidad de algunos géneros en promoción de crecimiento vegetal y biocontrol de patógenos, tal es el caso de *P. aeruginosa* que posee actividad de control biológico contra patógenos bacterianos de plantas, mediante acción directa e indirecta, ya que produce AIA, proteasas, fosfatasas y sideróforos (25). *P. corrugata* es un agente efectivo de protección y control del estrés abiótico y biótico y promueve el crecimiento de las plantas (26). *P. fluorescens* es una bacteria colonizadora de la rizósfera que produce compuestos que participan en las actividades de promoción del crecimiento de las plantas, y posee capacidad de control biológico contra patógenos fúngicos (27). Por el contrario otras especies como *P. syringae* son reconocidas por causar marchitez bacteriana en las plantas (25). Constantemente se describen nuevas especies del género que habitan en diferentes tipos de ambientes, incluidas especies de áreas extremas como la Antártida o el Himalaya tal es el caso de *P. extremaustralis* y *P. vancouverensis* (10).

El primer aislamiento de *P. extremaustralis* cepa 14-3 se realizó de un estanque temporal en la Antártida. Es una bacteria no patógena, de morfología bacilar, Gram negativa, móvil, no formadora de esporas, con capacidad de crecimiento de 4-37°C, pero no a 42°C. Tiene alta resistencia al calor y al estrés oxidativo y gran tolerancia al frío. Presenta metabolismo no fermentativo, es oxidasa positivo, sintetiza pigmento fluorescente en medio King B, y las colonias son lisas, circulares y no pigmentadas (28). Tiene capacidad de acumular grandes cantidades de polihidroxibutirato (PHB) un tipo de polihidroxialcanoato (PHA). Los PHAs son polímeros de reserva de energía producidos por bacterias para sobrevivir períodos de inanición en hábitats naturales. Se ha demostrado que la rizósfera es un reservorio para los productores de PHAs (29). La acumulación de PHB es esencial durante el crecimiento en condiciones de frío, y además este compuesto aumenta la motilidad y la supervivencia de las células planctónicas de

P. extremaustralis (como unidades independientes) cuando forman biopelículas, desarrolladas en condiciones de frío. Los autores proponen que PHB puede constituir una ventaja adaptativa para la colonización de nuevos nichos ecológicos en entornos estresantes (30).

P. extremaustralis CMPUJ U515, es una cepa aislada de los suelos de los ecosistemas de superparamo septentrionales de los andes, aislada del Cráter La Olleta, en el Parque Nacional Natural Los Nevados- Colombia. Desde su aislamiento se almacenó en la Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana como cepa de *P. extremaustralis* CMPUJ U515 (CMPUJ, WDCM857). Tolera rangos de temperatura de 4-35°C, temperatura óptima 30°C. Es capaz de tolerar condiciones microaerólicas y formar biofilm. Esta especie resiste altos niveles de estrés oxidativo y resistencia al frío junto con la producción de altos niveles de polihidroxibutirato (PHB). También es capaz de tolerar y degradar hidrocarburos, lo que permite su uso en ambientes extremos para la biorremediación de hidrocarburos (31).

2.2. Auxinas

Los reguladores de crecimiento vegetal son sustancias naturales o sintéticas de bajo peso molecular, que en pequeñas concentraciones pueden influir en el metabolismo de las plantas, sea por promoción o por inhibición, estimulando el crecimiento del tallo, desarrollo y elongación radical, división y diferenciación celular, germinación, desarrollo de frutos, senescencia, abscisión de hojas entre otros. Hay siete tipos de reguladores de crecimiento vegetal: auxinas, giberelinas, citoquinas, brasinosteroides, etileno, ácido jasmónico y ácido abscísico, y sus efectos varían según la interacción con otros reguladores (9).

Las auxinas son un tipo de fitohormonas que promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas, pueden actuar a bajas concentraciones y son responsables de la

mayoría de patrones de desarrollo, promueven el crecimiento de las raíces aumentando el área superficial y la absorción de nutrientes (32). Se han descrito cuatro tipos de auxinas sintetizadas por las plantas: AIA, ácido indol3-butírico, ácido 4-cloroindol-3-acético y ácido fenilacético. La auxina más conocida es AIA ($C_{10}H_9NO_2$) y su acción se asocia al desarrollo y regulación de la planta. A pesar de que estas fitohormonas son producidas principalmente por la planta, también hay bacterias capaces de producirlas por distintas vías metabólicas y se ha observado un alto grado de similitud en las vías de síntesis de AIA en plantas y bacterias (33).

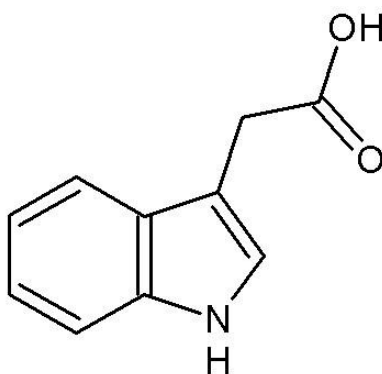


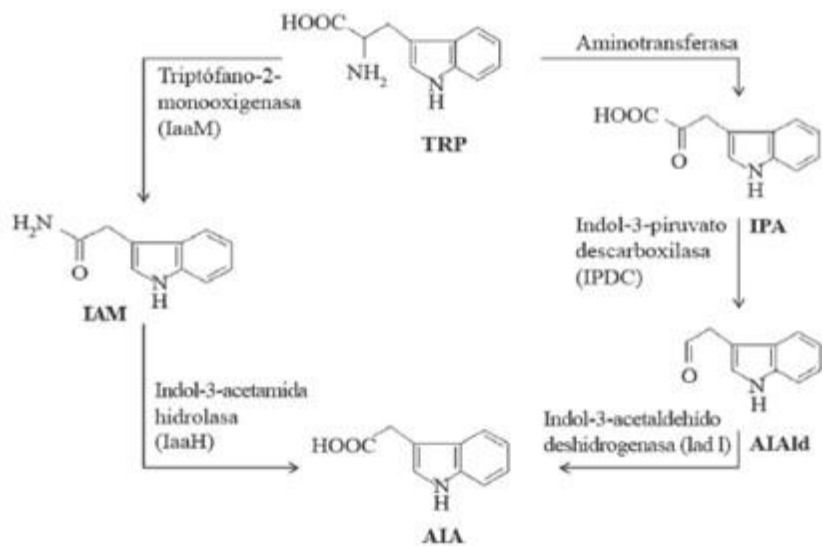
Figura 1. Estructura del ácido indolacético

La mayoría de las PGPR producen AIA, aunque también hay reportes de producción de otras fitohormonas como citoquinas y giberelinas. Las auxinas secretadas por las bacterias actúan como moléculas de señalización y comunicación bacteriana. Es fundamental tener en cuenta la fase de crecimiento en que se encuentren las bacterias, pues esto juega un rol importante en la cantidad de AIA producida, generalmente el pico máximo de producción se da durante la fase estacionaria de crecimiento. La producción de auxinas bacterianas puede ser una potenciada para mejorar el crecimiento de plantas, y reducir los efectos negativos de los fertilizantes químicos. En las plantas inoculadas con bacterias productoras de auxinas se puede evidenciar modificación de la morfología y del desarrollo de raíces mediante el aumento superficial de la raíz, lo que a su vez promueve la absorción de nutrientes, e indirectamente estimula el crecimiento de las plantas (21).

Las bacterias son capaces de sintetizar AIA mediante tres vías metabólicas distintas:

- Vía indol -3- acetamida (IAM) □ Vía indol -3- acetonitrilo (IAN)
- Vía ácido indol -3- pirúvico (IPyA).

Las bacterias fitopatógenas generalmente sintetizan AIA por la vía IAM. Por el contrario las bacterias benéficas que promueven el crecimiento de las plantas, sintetizan AIA mediante la vía IPyA, esta vía implica el gen *ipdC* que codifica la indol-3-piruvato Descarboxilasa (IPDC), enzima que cataliza la conversión de IPyA en indol -3- acetaldehído. En esta vía, el triptófano se convierte en ácido IPyA por una aminotransferasa, el IPyA se descarboxila a ácido indol-3-acetaldehído por la enzima IPDC, este ácido es oxidado a AIA por la enzima indol-3-acetaldehído deshidrogenasa. El triptófano presente en los exudados de la raíz, actúa como un precursor de AIA, y afecta su síntesis en la mayoría de bacterias que producen auxina. Sin embargo la síntesis de auxina por las rizobacterias no siempre procede del triptófano, algunas sintetizan AIA mediante mecanismos independientes al triptófano. Hay estudios que demuestran que la producción de AIA por bacterias es una vía para la desintoxicación del triptófano, y las auxinas son secretadas como metabolitos secundarios por las cepas bacterianas (21).



lado derecho, vía indol-3-piruvato (IPA) lado izquierdo, vía indol-3-acetamida (IAM) TRP: triptófano AIA: ácido indol-3-acético
 IPA: ácido indol-3-pirúvico AIAld: ácido indol-3-acetaldehído IAM: indol-3-acetamida.

Figura 2. Vías de biosíntesis de ácido indolacético en bacterias (33).

2.3. Solubilización de fosfatos

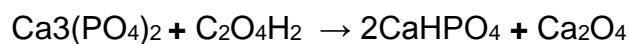
El fósforo es uno de los principales macronutrientes, es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo biológico. El fósforo presente en el suelo se clasifica en orgánico e inorgánico, o mineral, este último considerado como la principal reserva de fósforo y está presente en rocas y minerales primarios como apatita, hidroxapatita y oxapatita, y su principal característica es su insolubilidad, sin embargo en condiciones adecuadas pueden solubilizarse, y así quedar disponible para plantas y microorganismos. Por otra parte, las formas orgánicas de fósforo pueden constituir entre 30-50% del total de este elemento en los suelos, su forma orgánica está principalmente como fosfato de inositol, considerado más estable en el suelo, otros compuestos orgánicos están en forma de fosfomonoésteres, fosfodiésteres y fosfotriésteres. El mecanismo principal para la solubilización del fosfato mineral es la producción de ácidos orgánicos, y en el proceso de mineralización del fósforo orgánico en el suelo intervienen las enzimas fosfatasas ácidas (34).

Este elemento es un factor limitante del desarrollo de las plantas, ya que 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 (35). Hay numerosas bacterias con capacidad solubilizadora de fosfato, principalmente aquellas asociadas con la rizosfera de la planta. De esta manera la solubilización del fosfato inorgánico y la mineralización del fosfato orgánico, por parte de las PGPR permiten que el fósforo esté disponible para las plantas. En la actualidad se ha evidenciado que su uso como inoculantes de cultivos aumenta significativamente la capacidad de absorción de fósforo por la planta. Entre los géneros bacterianos potencialmente solubilizadores destacan *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Rhizobium* (34).

Actualmente se distinguen dos mecanismos para la solubilización de fosfatos:

□ *Producción de ácidos orgánicos como mecanismo de solubilización de fósforo inorgánico.*

En las bacterias se lleva a cabo un mecanismo de producción extracelular de ácidos como el butírico, succínico, málico entre otros, que cumplen funciones en procesos como la quimiotaxis. Estos ácidos actúan sobre compuestos insolubles de fosfato inorgánico como fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y fosfato de roca. Estos ácidos permiten la acidificación del suelo, facilitando su absorción, y mediante reacciones químicas las bacterias son capaces de convertir el fosfato tricálcico en fosfato di y monobásico asimilable por plantas. Los géneros de bacterias asociadas a este proceso son *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia* entre otros (34).



Fosfato tricálcico + ácido oxálico → fosfato dicálcico + oxalato de calcio

Solubilización de fosfato tri-cálcico en fosfato di-cálcico asimilable por las plantas.

□ *Producción de enzimas fosfatasas como mecanismo de solubilización o mineralización de fósforo orgánico.*

La solubilización o mineralización del fósforo orgánico, se lleva a cabo mediante enzimas fosfatasas también conocidas como fosfohidrolasas, las cuales son producidas por algunos microorganismos como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, entre otros, estimulados por condiciones como la disponibilidad de materia orgánica, residuos vegetales, bajos niveles de fósforo en el suelo, e incluso por factores ambientales como la alcalinidad moderada que favorece la mineralización del fósforo orgánico. Este es un proceso de desfosforilación que consiste en la hidrólisis de enlaces éster del fósforo orgánico que se divide en mono, di y tri éster. Las fosfatasas se clasifican en ácidas y alcalinas según el pH al que actúan, a la vez las fosfatasas ácidas se clasifican en específicas o no específicas, en el grupo de las específicas encontramos 3' y 5'-nucleotidasas, hexosa fosfatasas y fitasas, estas últimas producidas por algunos microorganismos como *Bacillus* sp. se caracterizan por degradar los fitatos que se encuentran en el ácido fítico o fosfato de inositol presente en el suelo (34).

El género *Bacillus* es el más representativo de los solubilizadores de fosfato, se destacan especies potencialmente solubilizadoras como *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis* y *B. brevis*. De estas especies *B. subtilis* y *B. megaterium* tienen la capacidad de excretar ácidos orgánicos como mecanismo de solubilización de fosfato inorgánico, aunque también hay evidencia de que son productores de enzimas como las fitasas tal es el caso de *B. subtilis* (9). Estas bacterias son capaces de usar el fitato como única fuente fósforo, debido a que poseen genes que codifican para las enzimas fitasas, capaces de hidrolizar el (mio-inositol) fitato para liberar el fósforo que contiene este ácido. Los genes involucrados en estos procesos son el gen *Phy* aislado de dos cepas de *B. subtilis* NCDC-070 y la NCIM-2712, en otros estudios se ha encontrado la expresión de los genes *PhoA* y *PhoB* en este mismo microorganismo cuando este estaba en condiciones de insuficiencia

de fósforo (36). Se presume que los microorganismos que colonizan las raíces de las plantas y que sean capaces de solubilizar el fósforo inorgánico, haciéndolo accesible a la planta serán capaces de generar impacto positivo en la promoción de crecimiento vegetal.

2.4. Sideróforos

El hierro es un elemento esencial para los seres vivos, es fundamental en varias vías metabólicas y en el correcto desarrollo de las funciones celulares como por ejemplo la síntesis de ADN. Este elemento en su mayoría se encuentra en el suelo en forma de hierro férrico (Fe^3) no asimilable por algunos organismos. La disponibilidad de este elemento en forma asimilable es fundamental para el desarrollo y participación de organismos en procesos patogénicos como la invasión de un huésped, o en procesos simbióticos en la colonización de determinado ambiente. Es por ello que ante la falta de este elemento, organismos como plantas, bacterias y hongos son capaces de sintetizar moléculas de bajo peso molecular de alta afinidad por el hierro conocidas como sideróforos, capaces de captar el Fe^3 y reducirlo a hierro ferroso (Fe^2), una forma soluble y asimilable por estos organismos (37).

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular, solubles en condiciones acuosas de pH neutro, que forman complejos extracelulares de Fe^3 , el complejo es absorbido por transportadores específicos de quelatos férricos. El Fe^3 ligado al sideróforo experimenta una reducción a Fe^2 (38).

Son producidos por plantas y por microorganismos y en el mundo microbiano representan el mecanismo más exitoso de adquisición de hierro. Son producidos en condiciones de deficiencia de hierro para secuestrarlo del entorno y formar complejos que son asimilados eficientemente por el microorganismo productor como por otros organismos que habitan en cercanías. Se ha demostrado que la

concentración de este complejo es suficiente para beneficiar la nutrición de las plantas quienes requieren el hierro como elemento esencial para su metabolismo (37). Las plantas y algunos microorganismos son capaces de utilizar sistemas de absorción de xenosideróforos (sideróforos no sintetizados por ellas mismas) como fuente de hierro, lo cual es una ventaja pues significa que poseen reductasas de quelatos férricos o sistemas de absorción de sideróforos ajenos (38).

La adquisición de hierro dependiente de sideróforos puede ser llevada a cabo por algunos microorganismos como bacterias, levaduras e incluso por algunas plantas, mediante distintos mecanismos, sin embargo, tienen en común la producción de uno o varios sideróforos por la célula cuando esta se encuentra expuesta a periodos de deficiencia de hierro, generalmente cuando la concentración de hierro intracelular decae a niveles críticos para el desarrollo celular. El sideróforo secretado forma complejos extracelulares de Fe^3 , el complejo Fe^3 -sideróforo es absorbido por transportadores específicos y posteriormente experimenta una reducción a Fe^2 catalizada por reductasas de quelatos férricos extracelulares o membranales. Cuando el sideróforo no ha sido liberado al medio extracelular el hierro debe ser eliminado del complejo Fe^3 -sideróforo en el citoplasma, en este proceso intervienen enzimas como las reductasas Fe -sideróforo intracelulares, o en menor proporción por hidrolasas Fe -sideróforo (38).

2.5. Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento esencial para mantener la vida en la tierra, es crítico para el crecimiento y desarrollo de las plantas, pues compone la clorofila, proteínas y ácidos nucleicos, razones que lo convierten en un factor limitante de la producción agrícola mundial. Se encuentra en abundancia en la atmósfera terrestre en forma de gas dinitrógeno (N_2), esta forma no es asimilable por la mayoría de organismos, por lo cual el (N_2) debe ser convertido a amoníaco (NH_3), una forma asimilable por distintos organismos como las plantas, las cuales

requieren las formas reducidas de este elemento que adquieren mediante diversos mecanismos (39, 40):

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

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso fundamental en el ciclo del nitrógeno, se considera la ruta metabólica más importante después de la fotosíntesis, y se estima que el 60% del nitrógeno usado por las plantas proviene de la FBN (9). Además, la utilización del nitrógeno fijado por la planta es cercana al 100%, en comparación con sólo 50-60% con los fertilizantes químicos (41). Este proceso se lleva a cabo por un grupo de microorganismos como cianobacterias, bacterias de vida libre y en asociación a plantas, que tienen la enzima nitrogenasa encargada de catalizar la conversión de nitrógeno molecular (N_2) en amoníaco (NH_3). Las plantas pueden asimilar el NH_3 para sintetizar sus biomoléculas. La nitrogenasa es capaz de romper el triple enlace de la molécula de N_2 , para que se unan tres átomos de hidrogeno a cada átomo de nitrógeno, los microorganismos que fijan el nitrógeno necesitan ~16 moles de ATP para reducir cada mol de N_2 , esta energía la obtienen de la degradación de materia orgánica (Figura 2). En el caso de las bacterias de vida libre, estos la obtienen de otros organismos, y los microorganismos que hacen simbiosis con plantas obtienen la energía de la rizosfera de su hospedador. La actividad nitrogenasa se ve limitada por diversos factores tales como humedad, nivel de luz, y temperatura entre otros (39, 40).

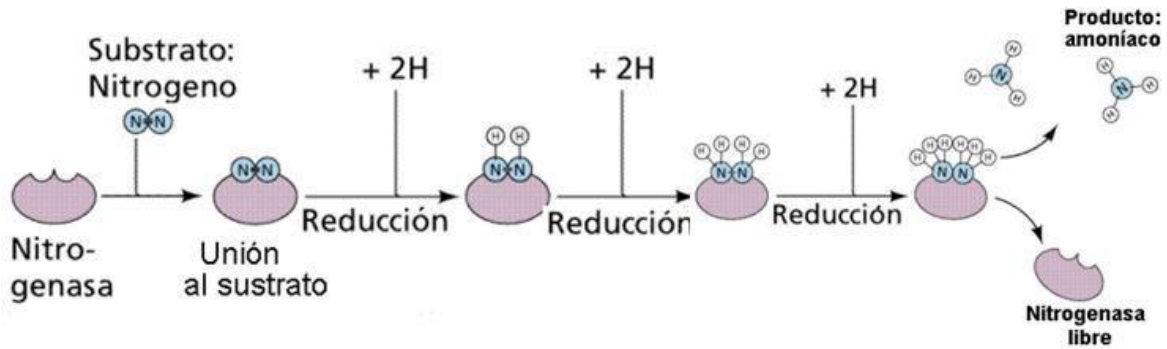


Figura 3. Vía metabólica que fija el nitrógeno atmosférico N_2 y lo convierte en amoníaco NH_3 . Tomado de (42)

- *Fijación de nitrógeno por bacterias de vida libre:*

Gran variedad de microorganismos heterótrofos habitan en el suelo, llamados comúnmente bacterias de vida libre, tal es el caso de *Bacillus*, *Clostridium*, *Klebsiella*, ó *Azotobacter* entre otros. Estos organismos son capaces de fijar nitrógeno sin la interacción directa con otros microorganismos, para realizar este proceso deben obtener energía mediante la descomposición u oxidación de moléculas orgánicas, o de moléculas inorgánicas en el caso de organismos quimiolitotrofos. A pesar de que estos microorganismos no representan las tasas globales más elevadas de fijación biológica de nitrógeno, son capaces de contribuir ampliamente en este proceso (39).

- *Fijación de nitrógeno por bacterias en simbiosis con plantas:*

En este proceso la planta aporta los nutrientes (azúcares de la fotosíntesis) a las bacterias con las que se encuentra en simbiosis, a cambio el microorganismo proporciona el nitrógeno fijo a la planta para su desarrollo. Las asociaciones simbióticas más importantes en el proceso de FBN son las relaciones entre leguminosas y *Rhizobium*, que pueden proporcionar cantidades sustanciales de nitrógeno reduciendo la necesidad de usar fertilizantes químicos (39).

2.6. 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, en todos ellos cumpliendo diversas funciones. En los microorganismos algunas de estas enzimas proteolíticas se producen con fines nutricionales, con el inicio de la degradación proteica a nivel extracelular para la posterior obtención de aminoácidos y péptidos, que pueden ser usados como nutrientes. Los microorganismos patógenos producen proteasas como factor de virulencia, un ejemplo de ello es *P. aeruginosa*, que produce proteasas y elastasas para degradar proteínas asociadas a la inmunidad innata, y fibras de las paredes vasculares de sus huéspedes. En plantas las proteasas cumplen funciones en síntesis o degradación de proteínas implicadas en distintas etapas de su desarrollo, y en seres humanos, las proteasas desempeñan funciones en diversos procesos como la digestión de proteínas de la dieta, modulación y liberación de hormonas entre otros (43).

Algunos microorganismos son capaces de producir enzimas que actúan contra otros microorganismos que coexisten en un mismo hábitat, entre estas enzimas encontramos las quitinasas, proteasas e hidrolasas, capaces de actuar sobre hongos, muchos de ellos fitopatógenos que representan pérdidas económicas significativas para los cultivos. Se ha demostrado que *B. subtilis* es capaz de producir lipasas, proteasas y beta-glucanasas que tienen actividad de biocontrol sobre *Fusarium oxysporum* (12). Las enzimas proteolíticas son de importancia en procesos industriales, especialmente las proteasas microbianas, debido a su mayor estabilidad y bajo costo de producción, son usadas en la industria de detergentes, textil, farmacéutica, alimenticia (43).

2.7. 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 superóxido O_2^- , radical hidroxilo OH y peróxido de hidrógeno H_2O_2) que pueden causar daño celular, el superóxido puede oxidar cualquier compuesto celular. Para contrarrestar esta problemática las plantas han desarrollado mecanismos como el reclutamiento de enzimas antioxidantes y compuestos que desintoxican. Ej. Catalasa, peroxidasa y la súperóxido dismutasa. (44, 45)

- Catalasa: $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
- Peroxidasa: $H_2O_2 + NADH + H^+ \rightarrow 2H_2O + NAD^+$
- Superóxido dismutasa: $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

2.8. Motilidad

La movilidad 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. Los flagelos son las principales estructuras de movilidad, son apéndices largos y finos que se encuentran en un extremo unidos a la célula. Están compuestos por una proteína llamada flagelina, unida a la base del flagelo (gancho) que conecta el filamento con el motor del flagelo, constituido por un eje central que atraviesa un sistema de anillos. En bacterias Gram negativas como *Pseudomonas* sp. existe anillo externo anclado a la capa de lipopolisacáridos, anillo medio en la capa de peptidoglicano de la pared celular y anillo interno en la membrana citoplasmática. En Gram positivas como *Bacillus* sp. que carecen de membrana de lipopolisacárido, solo existe un par de anillos internos. En ambos casos se presentan las proteínas Mot que controlan el motor flagelar, permitiendo girar el filamento (45).

La capacidad para moverse hacia un estímulo determinado o para huir de él resulta un beneficio para la célula, muchas veces estos estímulos se dan por gradientes

de concentración, y las células procariotas han desarrollado mecanismos para responder de modo positivo o negativo, dirigiéndose hacia la molécula señal, o en sentido contrario. La respuesta a agentes químicos es denominada quimiotaxis, un fenómeno ampliamente estudiado en bacterias flageladas, pues la maquinaria flagelar es capaz de percibir la composición del ambiente extracelular (45).

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Población y muestra.

Población: Microorganismos con capacidad de promoción de crecimiento vegetal.

Muestra: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515 con posible actividad promotora de crecimiento vegetal.

3.2. Hipótesis, variables e indicadores

Hipótesis

- Nula: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515 no promueve crecimiento en plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*)
- Alterna: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515 promueve crecimiento en plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*)

Variables

- Independiente: concentración de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515 en unidades formadoras de colonia (UFC)/ml.
- Dependiente: crecimiento de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) por el efecto de inoculación de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515.

Indicadores

- Medidas de longitud de raíz, tallo, peso seco y peso húmedo.

3.3. Técnicas y procedimientos

Se utilizó una cepa de *B. subtilis* ATCC 6633 y una cepa de *P. extremaustralis* CMPUJ U515, las cuales fueron caracterizadas para AIA, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, fijación de nitrógeno, producción de proteasas, actividad catalasa y motilidad. Se determinaron sus etapas de crecimiento para establecer una concentración de UFC/ml con la que se inocularon las semillas de frijol.

Ácido indolacético: el AIA fue evaluado cualitativamente. La cepa se inoculó en agar nutritivo suplementado con triptófano durante 72 horas, pasado este tiempo se agrega sobre la colonia reactivo Salkowsky (solución de FeCl_3 , H_2SO_4 y H_2O), y se confirma por viraje de color de la colonia a rosado después de tres horas de incubación.

Solubilización de fosfatos: se determinó la capacidad de solubilización de fosfatos cualitativamente mediante la inoculación bacteriana en medio SRS ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl, glucosa, extracto de levadura, purpura de bromocresol, agar, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -fosfato tricálcico, pH 7.07.2), se incubó por 5 días. Este medio permite evidenciar la formación de halos de acidificación que se evidencian por cambio de color del medio (viraje a amarillo), y halo de solubilización claro alrededor de las UFC es indicador de la utilización del fosfato tricálcico.

Sideróforos: la producción de sideróforos se determinó cualitativamente usando el medio CAS (Cromo-Azul-S) (CAS, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1mM, HCl 10mM, HDTMA, agar) el cual se agrega sobre la colonia bacteriana de 48 horas, y se revela después de 3 horas de incubación. Básicamente la prueba se basa en complejos del sideróforo con el hierro externo, si la bacteria produce dicho metabolito el medio virara de color por el indicador CAS. Dependiendo del sideróforo producido la tonalidad será

diferente: catecoles de color rosado, hidroxamatos de color amarillo y los hidroxicarboxilatos naranjas.

Fijación de nitrógeno: la fijación de nitrógeno se determinó cualitativamente inoculando la bacteria en medio NFb (nitrogen free bromothymol blue) libre de nitrógeno (ácido málico, KOH, K_2HPO_4 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, $CaCl_2$, Na_2MoO_4 , extracto de levadura, azul de bromotimol, agar-agar, pH 6.6-7.0) la positividad se evidencia por el cambio de color del medio a azul o amarillo.

Proteasas: la determinación de proteasas se realizó mediante la inoculación de la cepa bacteriana en medio Skim milk + agar, se incuba por tres días, y el resultado positivo se evidencia por la formación de un halo transparente alrededor de la zona inoculada, debido a la hidrólisis de la caseína del medio, producto de las enzimas proteolíticas.

Catalasa: se realizó prueba en lámina, tomando la colonia con un hisopo estéril y frotándolo sobre la lámina portaobjetos, posteriormente se añadió 2 gotas de peróxido de hidrogeno (H_2O_2). El resultado positivo se evidencia por la aparición de burbujas en los primeros 20 segundos producto de la actividad enzimática de la catalasa al desdoblar en H_2O_2 en agua y oxígeno

Motilidad: esta prueba se realizó en tubo, en 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 $37^\circ C$. Se interpreta como resultado positivo si pasada la incubación se aprecia una zona de crecimiento que se difunde por el medio formando turbidez, y negativo cuando solo hay crecimiento en la línea de inoculación.

Ajuste de Inoculo bacteriano: el ajuste del inoculo se realizó inoculado con una unidad formadora de colonia (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 600 nm hasta alcanzar una medida DO₆₀₀ ~1.0, para establecer la concentración adecuada de microorganismo (UFC/ml), y posteriormente inocular las semillas de frijol

Ensayo biológico: la determinación de la capacidad de promoción de crecimiento en plántulas de frijol variedad Cargamanto rojo por parte del microorganismo se realizó según el protocolo de Qiao et al. 2017 (11).

- *Inoculación de las semillas:* Las semillas de frijol fueron desinfectadas en hipoclorito de sodio al 3.0% durante 5 minutos, seguido de tres lavados con agua destilada estéril, posteriormente se inocularon las semillas de frijol sumergiéndolas por máximo 1 hora en 100ml de caldo LB con una concentración de ~10⁵ hasta 10⁹ UFC/ml, DO₆₀₀ 1.0, (10 semillas por unidad experimental con tres réplicas, por tratamiento, en total 120 plantas).
- *Siembra:* las semillas ya inoculadas se sembraron en materas individuales, con suelo previamente esterilizado en autoclave a 121°C, 15 libras de presión durante 15 minutos. Se mantuvieron bajo condiciones de invernadero, se regaban con agua destilada estéril (10ml) cada 3 días por 20 días.
- *Determinación de las variables:* pasados 20 días después de la siembra, cuando la plántula obtenía las primeras hojas verdaderas se midieron 6 variables: longitud de raíz, longitud del tallo, peso húmedo total, peso húmedo de la raíz, peso seco del tallo y peso seco de la raíz, y se hizo comparación con control sin inocular (absoluto) y control positivo con la cepa de *P. aeruginosa* PAO1.
- *Análisis estadístico:* el diseño experimental fue completamente aleatorizado, se hizo prueba de comparación de medias con ANOVA y se determinó el mejor tratamiento con la prueba de TUKEY (p<0.05).

4. RESULTADOS

4.1. Determinación cualitativa de producción de ácido indolacético

El trabajo inicio con la evaluación de la producción de AIA, de forma cualitativa en medio nutritivo suplementado con triptófano, se revela adicionando sobre la colonia 3 gotas de reactivo de Salkowsky, el cual lleva en su composición ácido perclórico o sulfúrico, el ácido oxida las moléculas de indol presentes en el AIA, generando una coloración que va de rosado a fucsia (46) (Figura 4)

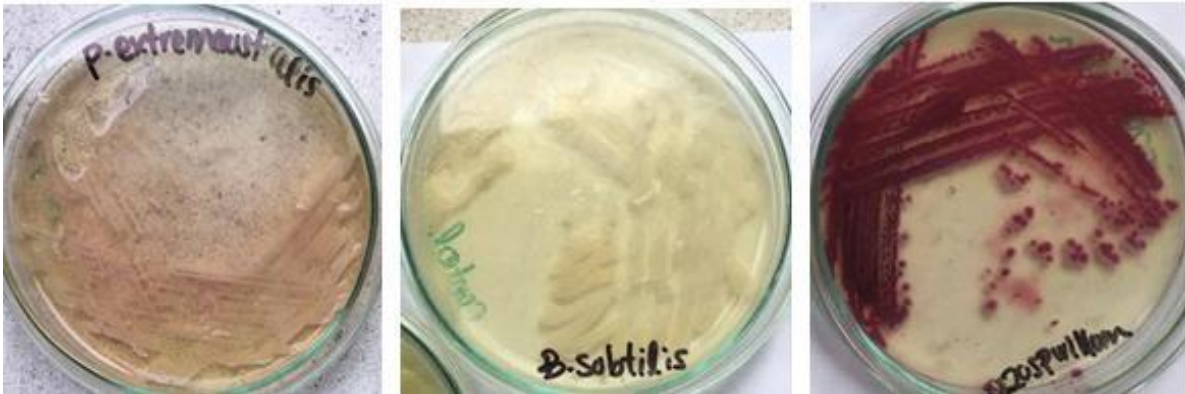


Figura 4. Evaluación de la producción de AIA en *P.extremaustralis* y *Bacillus subtilis*. (A) *P.extremaustralis*, (B) *Bacillus subtilis*, (C) *Azospirillum* sp.(control positivo). No se evidencian cambios de color en las colonia de *B. subtilis* comparado con el control positivo y con *P. extremaustralis* en donde se evidencia viraje de color de las colonias a una tonalidad rosa.

4.2. Determinación cualitativa de capacidad solubilizadora de fosfatos

Las plantas pueden utilizar fósforo del suelo solo en la forma disponible libre. Los fosfatos del suelo se vuelven disponibles ya sea por las raíces de las plantas o por los microorganismos del suelo. Por lo tanto, los organismos del suelo que solubilizan fosfato desempeñan un rol en la corrección de deficiencia de fósforo de plantas de cultivo. En el presente estudio se evaluó la capacidad solubilizadora de

fosfato en medio solido Pikovskaya modificado, o Sundara Rao y Sinha (SRS). Las bacterias solubilizadoras crecerán en este medio y formarán una zona clara alrededor de la colonia, formada debido a la solubilización de fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, y acidificación del medio por la producción de ácidos orgánicos (47) (Figura 5).



Figura 5. Evaluación de la capacidad de solubilización de fosfatos en *P. extremaustralis* y *Bacillus subtilis*. (A) *P. extremaustralis*, (B) *B. subtilis*, (C) *P. aeruginosa* (control positivo). Se evidencia la formación de halo de solubilización y acidificación en todas las cepas. Se interpreta como resultado positivo respecto a la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico por *P. extremaustralis* y *B. subtilis*.

4.3. Determinación cualitativa de producción de sideróforos

Se determinó la producción cualitativa de sideróforos en medio CAS (Cromo-AzulS) esta prueba detecta la presencia de sustancias con actividad quelante de hierro mediante un complejo ferri-cromogénico que cambia de color cuando pierde iones de hierro. Como los sideróforos son más afines por el hierro que el cromógeno, capturan el hierro del complejo ferri-cromógeno, generando un cambio del color del colorante de azul a amarillo-naranja (48) (Figura 6).

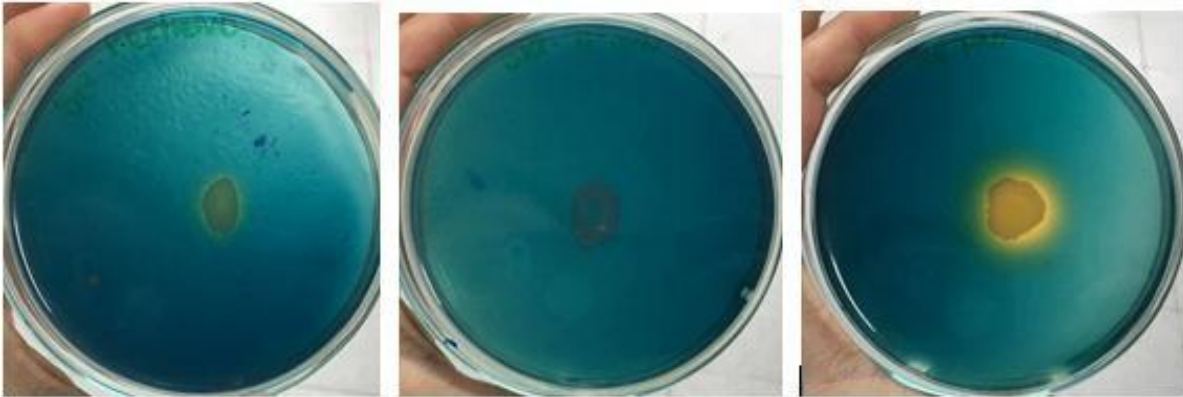


Figura 6. Evaluación de la producción de sideroforos en *P.extremaustralis* y *Bacillus subtilis*. (A) *P. extremaustralis*, (B) *B. subtilis*, (C) *P. aeruginosa* (control positivo). Se interpreta como resultado positivo para producción de sideroforos por *P. extremaustralis* y negativo por *B. subtilis*.

4.4. Determinación cualitativa de capacidad de fijar nitrógeno

El potencial para la capacidad de fijación del nitrógeno biológico se puede detectar inicialmente cultivando los microorganismos en medios libres de nitrógeno como el NFb (nitrogen free bromothymol blue) en los cuales sólo crecen los organismos que poseen el sistema enzimático que les permita reducirlo y utilizarlo en su metabolismo (49). El medio contiene azul de bromotimol como indicador de pH, es color amarillo en medio ácido, color verde en medio neutro y color azul en medio básico. durante la fijación de nitrógeno, el nitrógeno atmosférico libre se transforma en amoníaco (50) (figura 7).



Figura 7. Evaluación de la capacidad de fijación de nitrógeno en *P.extremaustralis* y *Bacillus subtilis*. (A) *P.extremaustralis*, (B) *B. subtilis*, (C) *P. aeruginosa* (control positivo). Se interpreta como resultado positivo respecto a la capacidad de fijar nitrógeno por *P.extremaustralis* y negativo por *B. subtilis*.

4.5. Determinación cualitativa de producción de proteasas

Las bacterias proteolíticas hidrolizan la caseína en medios suplementados con leche como el skim milk, para formar compuestos nitrogenados solubles indicados como zona clara que rodea las colonias. El halo es más claro en el agar, si las bacterias producen ácido a partir de carbohidratos fermentables en el medio. La hidrólisis de caseína proporciona aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas complejas (51) (figura 8).



Figura 8. Evaluación de la producción de proteasas en *P.extremaustralis* y *Bacillus subtilis*. (A) *P. extremaustralis*, (B) *B. subtilis*, (C) *P. aeruginosa* (control positivo). Se evidencia la formación de halo transparente alrededor de la zona inoculada en *B. subtilis* y *P.aeruginosa*, debido a la hidrólisis de la caseína del medio, producto de las enzimas proteolíticas. Se interpreta como resultado negativo respecto a la capacidad de *P. extremaustralis* de producir proteasas y positivo para *B. subtilis*.

4.6. Determinación cualitativa de actividad catalasa

La prueba de catalasa se realizó en lamina portaobjetos, adicionando 2 gotas de peroxido de hidrogeno H_2O_2 , la catalasa descompone el H_2O_2 en agua y oxigeno que se evidencia por la formacion de burbujas (figura 9).

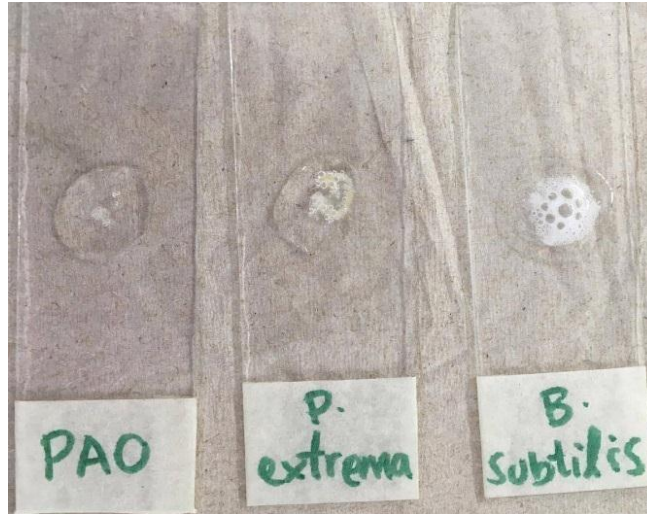


Figura 9. Evaluación de la producción de catalasa en *P.extremaustralis* y *Bacillus subtilis*. Se interpreta como resultado positivo respecto a la capacidad de *P. extremaustralis* y *B. subtilis* de producir enzima catalasa.

4.7. Determinación cualitativa de motilidad

La motilidad está relacionada con la capacidad de colonización de un microorganismo en un entorno específico para el aprovechamiento de una fuente de nutrientes, siendo positivo un desplazamiento a partir de la línea de siembra (figura 10).

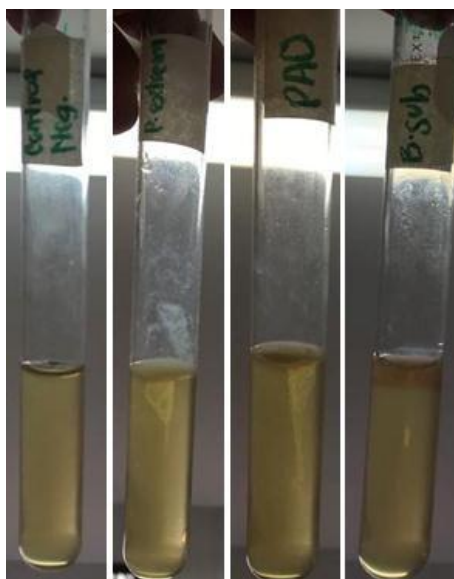


Figura 10. Prueba de motilidad en medio LB semisolido en *P.extremaustralis* y *Bacillus subtilis*. (A) medio sin inocular bacteriano, (B) *P. extremaustralis*, (C) *P. aeruginosa*, (D) *B. subtilis*. Se interpreta como motilidad positiva para *P. extremaustralis* y *B. subtilis*.

La tabla 1 resume los resultados de las pruebas de determinación de factores asociados a promoción de crecimiento vegetal en *P. extremaustralis*, *B. subtilis* y *P.aeruginosa* (control positivo).

Tabla 1. Atributos de promoción de crecimiento vegetal en *P. extremaustralis*, *B. subtilis* y *P. aeruginosa* a 37°C. Pruebas cualitativas.

	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

4.8. Ensayo biológico en frijol

Para las pruebas biológicas de promoción de crecimiento se usó el modelo del frijol, en primer lugar se realizó una prueba de germinación de la semilla para obtener plantas completas, y poder identificar las etapas de desarrollo. Hubo desarrollo de hipocótilo y de cotiledones a los 10 días aproximadamente, y emergencia de las primeras hojas el día 12 (figura 11). El porcentaje de germinación en los tratamientos con *P. extremaustralis* CMPUJ U515 y *B. subtilis* ATCC 6633 fue de 93.3% y en tratamiento con *P. aeruginosa* PAO1 y control fue de 96.7%.



Figura 11. Etapas de germinación plántulas de frijol. (A, B) hipocotilo, cubierta seminal. (C, D) cubierta seminal, hipocotilo, epicotilo, cotiledones, primeras hojas. (E, F) hipocotilo, epicotilo, cotiledones, primeras hojas. (G, H) hipocotilo, epicotilo, cotiledones marchitos, hojas verdaderas.

Las semillas de frijol fueron inoculadas con las bacterias, y luego sembradas en suelo esteril a 3.0 cm de profundidad. Se regaron con agua destilada esteril cada

tercer día, los recipientes contenían aberturas en la base para permitir la salida del exceso de agua, y así evitar contaminación por exceso de humedad. Las plantas tuvieron un buen desarrollo incluyendo los controles (Figura 12, 13 y 14).

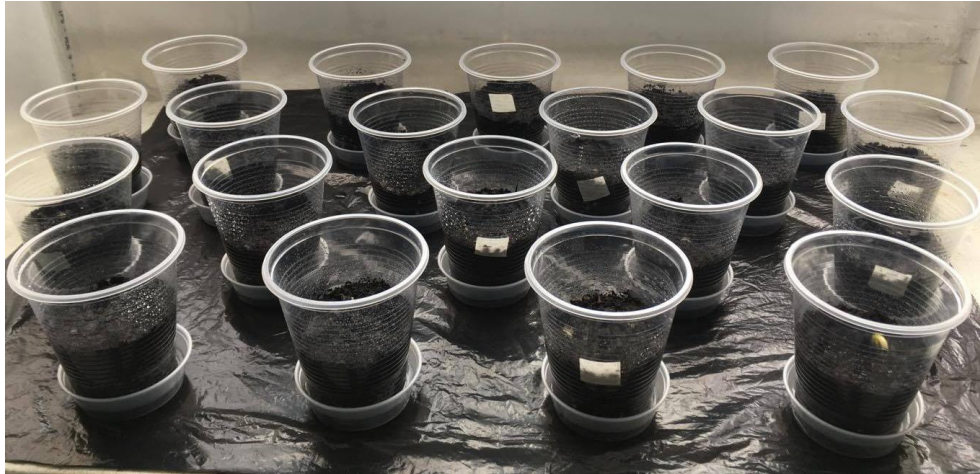


Figura 12. semillas de frijol en tratamiento con *B.subtilis* ATCC 6633 y control día 1. Recipientes marcados con cinta blanca contienen semillas inoculadas con la bacteria.



Figura 13. Plántulas de frijol en tratamiento con *B.subtilis* ATCC 6633 y control 10 días después de la siembra. Recipientes marcados con cinta blanca contienen semillas inoculadas con la bacteria.



Figura 14. Plántulas de fríjol en tratamiento con *B.subtilis* ATCC 6633 y control 20 días después de la siembra. Recipientes marcados con cinta blanca contienen semillas inoculadas con la bacteria.

Al final del proceso de desarrollo a los 20 días, se procedió a retirar las plantas de los recipientes con suelo para evaluar sus características fenotípicas asociadas a promoción de crecimiento (tamaño de la raíz y tallo, peso húmedo, y peso seco) (Figura 15).



Figura 15. Plántulas de fríjol inoculadas con *B.subtilis* ATCC 6633 para determinación de las variables de longitud de raíz y tallo, peso húmedo y seco.

En el caso de *P. extremaustralis*, se siguió un esquema similar de trabajo que con *B. subtilis*, evaluando al final las mismas variables fenotípicas asociadas a promoción de crecimiento en plantas (Figura 16, 17 y 18).



Figura 16. Plántulas de fríjol en tratamiento con *P. extremaustralis* CMPUJ U515 y *P. aeruginosa* PAO1, 10 días después de la siembra. Recipientes marcados con cinta verde contienen semillas inoculadas con *P. extremaustralis*, y los marcados con cinta azul tienen inoculación con *P. aeruginosa* PAO1.



Figura 17. Plántulas de fríjol en tratamiento con *P. extremaustralis* CMPUJ U515 y *P. aeruginosa* PAO1, 20 días después de la siembra. Recipientes marcados con cinta verde contienen semillas inoculadas con *P. extremaustralis*, y los marcados con cinta azul tienen inoculación con *P. aeruginosa*.



Figura 18. Plántulas de frijol inoculadas con *P. extremaustralis* CMPUJ U515 para determinación de las variables (peso húmedo, longitud y peso seco).

4.8.1 Analisis estadístico

Los ensayos en plántulas de frijol, sembradas bajo condiciones de invernadero, demostraron que los tratamientos bacterianos con *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 sobre las semillas de frijol generan algunos cambios significativos en los parámetros evaluados en este estudio (longitud de tallo y raíz, peso húmedo y seco).

El promedio de peso húmedo total de plántulas de frijol fue significativamente inferior ($p < 0.05$) inoculadas con *P. aeruginosa* PAO1 (4.43 g), con respecto a aquellas tratadas con *P. extremaustralis* CMPUJ U515 (4.65 g) y *B. subtilis* ATCC 6633 (5.49 g), sin embargo los últimos dos microorganismos no presentaron diferencia estadísticamente significativa respecto al control (agua) (5.1 g), ni entre estos (Figura 19A) a pesar de que los valores fueron mayores en tratamiento con *B. subtilis*. Se evidenció un incremento significativo en el peso húmedo de la raíz cuando hubo tratamiento con *P. extremaustralis* CMPUJ U515 y con *P. aeruginosa* PAO1 (1.47 y 1.28 g respectivamente) con respecto al tratamiento con *B. subtilis*

ATCC 6633 y el control de agua, no hubo diferencias significativas entre *B. subtilis* ATCC 6633 y el control (0.97 g en ambos tratamientos) (Figura 19B).

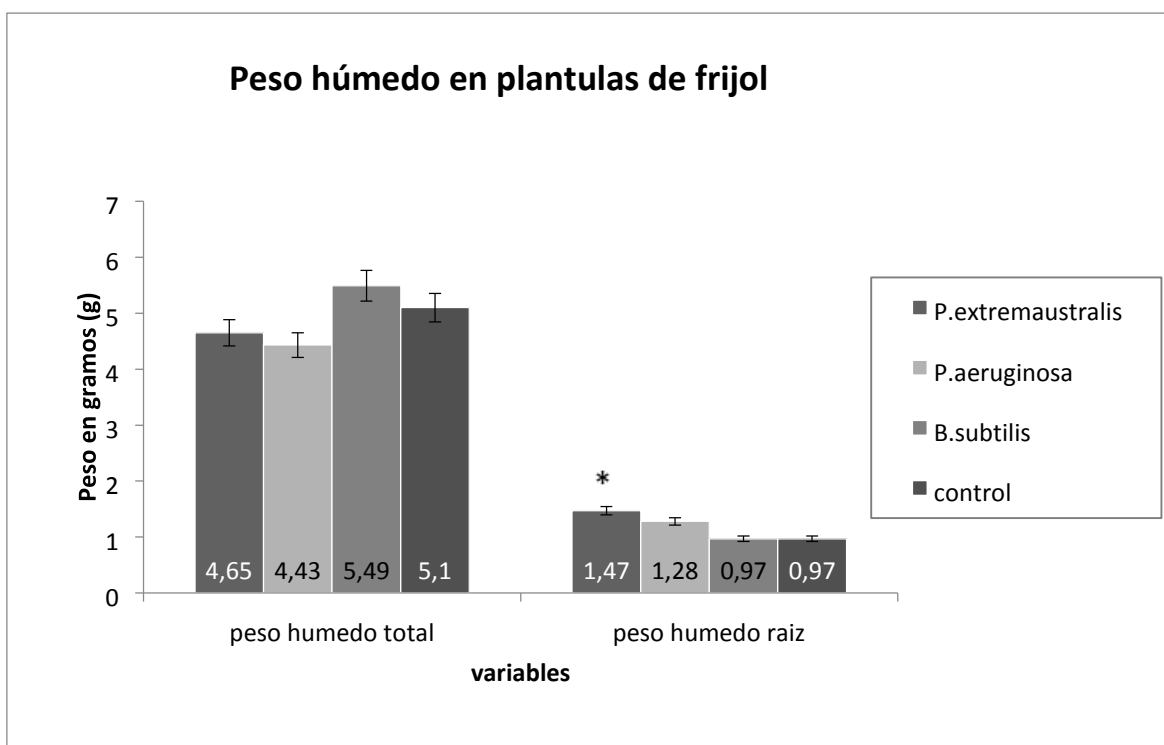


Figura 19. Evaluación del fenotipo asociado a promoción de crecimiento en frijól después del tratamiento con *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 con respecto al peso húmedo. Peso húmedo total (A) y peso húmedo de la raíz (B) de las plántulas de frijól, 20 días después de la siembra. Barras con asterisco son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Se obtuvo un aumento significativo de la longitud del tallo cuando fue aplicado el tratamiento con *B. subtilis* ATCC 6633 (41.95 cm), en comparación con *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *P. aeruginosa* PAO1 y control de agua (25.9, 25.21 y 36.49 cm respectivamente) (Figura 20A). En cuanto a la longitud de la raíz se evidenció que fue mayor en los tratamientos con *P. extremaustralis* CMPUJ U515,

P. aeruginosa PAO1 y *B. subtilis* ATCC 6633 (23.09, 23.10 y 22.39 cm) frente al control de agua (20.2 cm), no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con las bacterias (Figura 20B).

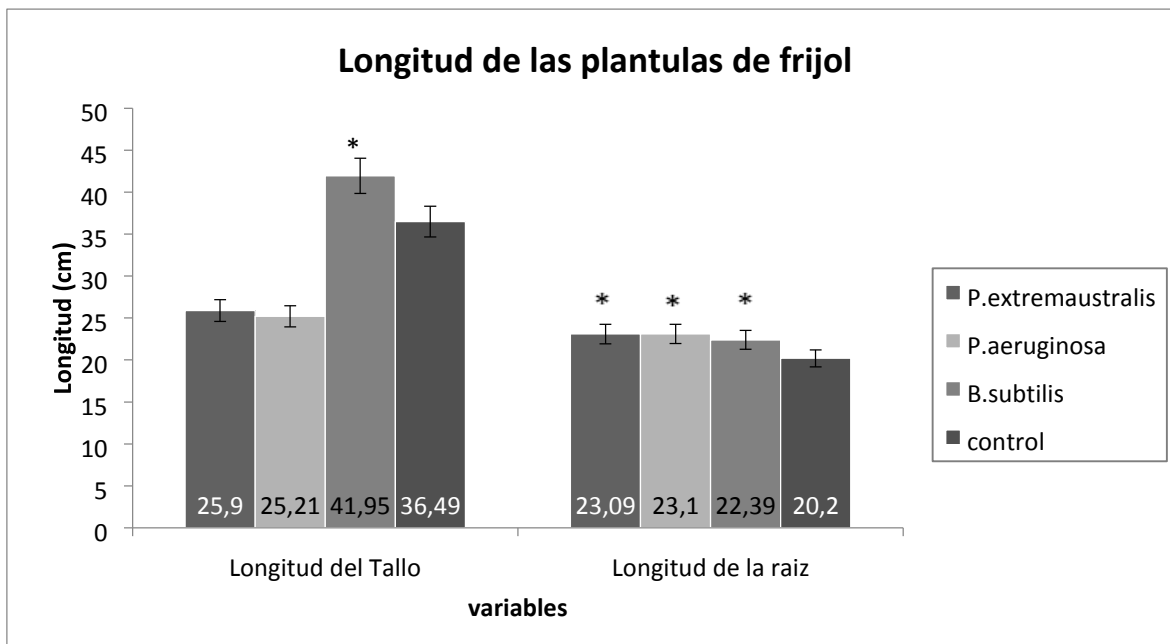


Figura 20. Evaluación del fenotipo asociado a promoción de crecimiento en frijol después del tratamiento con *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 con respecto a la longitud del tallo y la raíz. Longitud del tallo (A) y longitud de la raíz (B) de las plantulas de frijol, 20 días después de la siembra. Barras con asterisco son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Por último, se evaluó el promedio de peso seco para lo cual se obtuvo los siguientes resultados: el peso seco del tallo tuvo un aumento significativo cuando se usó tratamiento con *B. subtilis* ATCC 6633 (0.53 g) respecto a *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *P. aeruginosa* PAO1 (0.33, 0.37 g respectivamente), pero no frente al control (0.44 g) (Figura 21A). De manera similar el promedio de peso seco de la raíz fue inferior en *P. extremaustralis* CMPUJ U515 (0.09 g) y en *P. aeruginosa* PAO1 (0.10 g) con respecto a *B. subtilis* ATCC 6633 (0.13 g), no obstante éste último no fue estadísticamente significativo respecto al control (0.12 g) (Figura 21B).

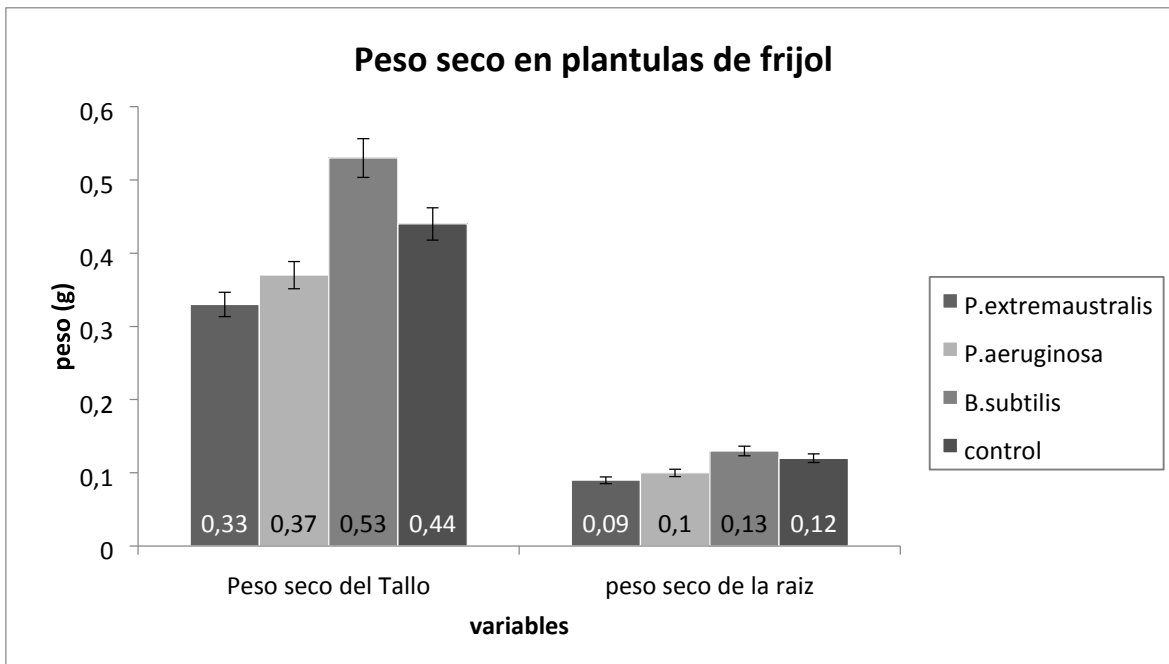


Figura 21. Evaluación del fenotipo asociado a promoción de crecimiento en frijol después del tratamiento con *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 con respecto al peso seco del tallo y la raíz. Peso seco del tallo (A) y peso seco de la raíz (B) de las plantulas de frijol, 20 días después de la siembra.

5. DISCUSIÓN

En las plantas inoculadas con bacterias productoras de auxinas como AIA, se puede evidenciar modificación de la morfología y desarrollo de las raíces mediante aumento superficial de la raíz, lo que a su vez promueve la absorción de nutrientes e indirectamente estimula el crecimiento de las plantas (21). El aumento en el área de la superficie de la raíz mejora el potencial de absorción agua y nutrientes por parte de la planta (10). Se ha informado que una gran proporción (80%) de las bacterias que colonizan la rizósfera son positivas para la producción de AIA (52). Los resultados de esta investigación mostraron que *B. subtilis* ATCC 6633 no fue productor de AIA, a diferencia del resultado obtenido por Sánchez et al. 2012 (2) quienes determinaron la producción de AIA en dos cepas de *Bacillus* sp. con una producción de 18.43 Y 19.97 µg/ml. Por otra parte en este estudio *P. extremaustralis* CMPUJ U515 fue productora de AIA, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Yadav et al. 2016 (17) quienes demuestran que una cepa psicotolerante de *Pseudomonas*, produjo de 20 a 29.6 µg de AIA/día. De igual manera Mishra et al. 2008 (10) determinaron la capacidad de producir AIA de una cepa psicotolerante de *P. vancouverensis*, aislada del Himalaya, con valores de hasta 13.1 µg/ml de AIA. Lo que demuestra que la cepa que usamos obtuvo resultados similares a los obtenidos por autores en otras cepas de *Pseudomonas* sp. psicotolerantes. Es importante tener en cuenta que la determinación de producción de AIA en el presente estudio se realizó cualitativamente en medio nutritivo suplementado con triptófano, y que el resultado se evidenció por cambio de color en las colonias, y en los estudios mencionados se realizó determinación de AIA cuantitativamente por técnica colorimétrica. Por esta razón se sugiere en próximos estudios evaluar la capacidad de estas cepas de producir AIA cuantitativamente mediante técnicas espectrofotométricas, las cuales son capaces de detectar niveles de auxina más bajos.

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular de alta afinidad por el hierro capaces de formar complejos Fe₃-siderofo. La síntesis de estos compuestos se

considera el mecanismo más exitoso de adquisición de hierro para los microorganismos, se ha demostrado que la concentración de este complejo es suficiente para beneficiar la nutrición de las plantas las cuales requieren hierro como elemento esencial para su metabolismo (37). En la presente investigación se determinó la capacidad de las cepas *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 para producir sideróforos, mediante técnica cualitativa en agar CAS. Los resultados demostraron que *B. subtilis* no es productor de sideróforos, lo cual difiere con los resultados de Sánchez et al. 2012 (2) quienes demostraron que las cepas de *Bacillus* sp. BEOO2 y BEOO3 y la cepa de *P. putida* PSO14 fueron capaces de producir este grupo de compuestos, evidenciando un incremento asociado al tiempo de incubación. Sin embargo es importante tener en cuenta que aunque se ha descrito la producción de sideroforos por *Bacillus* sp. no hay reportes de este metabolito en la cepa ATCC 6633. En nuestro caso la cepa de *P. extremaustralis* CMPUJ U515 fue productora de sideróforos, lo cual se correlaciona con los datos obtenidos por Mishra et al. 2008 (10) con una cepa de *Pseudomonas* psicrotolerante, evaluada con el mismo método cualitativo que se usó en el presente estudio. Tejera et al. 2011 (9) afirman que la producción de sideróforos está mejor caracterizada en el género *Pseudomonas* sp. lo cual concuerda con los resultados obtenidos para *P. extremaustralis* en esta investigación; aunque también se ha demostrado capacidad de producción de estos metabolitos por *Bacillus* sp.

El fosfato es un factor limitante del desarrollo de las plantas, representa el segundo nutriente inorgánico más importante, y participa en procesos como la fotosíntesis, desarrollo radicular, o floración; las plantas deben tomarlo del suelo donde se encuentra en baja concentración (35). La disponibilidad de fósforo en la superficie de la raíz está influenciada por la raíz y por procesos microbianos. Se ha demostrado que la adición microorganismos solubilizantes de fosfatos aumenta el contenido de fósforo del suelo (52). En esta investigación se determinó la capacidad de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 para

solubilizar fosfato inorgánico (tricálcico) en medio SRS, el cual permite identificar la formación de halos de acidificación que se evidencian por viraje del medio a amarillo debido a la producción de ácidos orgánicos y halo de solubilización claro alrededor de las colonias indicador de solubilización del fosfato tricálcico. Los resultados fueron positivos para ambas cepas *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Mishra et al. 2008 (10) en una cepa de *Pseudomonas* psicrotolerante que produjo 42.3, 66.3 y 74.1 µg/ml de fosfato tricálcico a 4, 15 y 28 °C, respectivamente, después de siete días de incubación, mediante prueba cualitativa en agar Pikovskaya y prueba cuantitativa en medio líquido. Igualmente Sánchez et al. 2012 (2), determinaron la capacidad solubilizadora de fosfato en cepas de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp., obteniendo niveles de fósforo soluble desde 127 a 133 mg/L, y 133 a 144 mg/L respectivamente. Yadav et al. 2016 (17) demostraron que *B. subtilis* IARI-AR49 fue capaz de solubilizar 26, 38 y 45 µg de fosfato/día. Estos resultados demuestran que estos microorganismos pueden mejorar la disponibilidad de fósforo para las plantas.

El nitrógeno es el elemento mineral esencial que con mayor frecuencia limita el crecimiento de las plantas (52). Las leguminosas son las plantas que mayoritariamente realizan fijación simbiótica de nitrógeno, y además pueden obtener nitrógeno atmosférico (41). Se ha demostrado que la vía de ingreso de nitrógeno a las plantas proviene del suelo, y debe estar mineralizado previamente por microorganismos para ser absorbido. Las bacterias fijadoras de nitrógeno son el grupo de microorganismos más importantes presentes en la rizósfera del suelo (5). Se estima que 175 millones de toneladas de nitrógeno por año se adicionan al suelo a través de la FBN, y se calcula que el 60% del nitrógeno usado por las plantas proviene de su fijación biológica (9, 16). En este trabajo se analizó la capacidad de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 para fijar nitrógeno en medio NFb, el resultado positivo se evidenció por cambio de color del medio a azul o amarillo. *B. subtilis* ATCC 6633 fue negativo y *P. extremaustralis*

CMPUJ U515 fue positiva para FBN. En la investigación de Tejera et al. (9) se hace énfasis en la versatilidad metabólica del género *Bacillus sp.* y en su capacidad de llevar a cabo el proceso de FBN.

Durante esta investigación se confirmó la capacidad de la cepa de *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 para producir proteasas, estas enzimas tienen buena estabilidad. En los microorganismos algunas enzimas proteolíticas se producen con fines nutricionales, iniciando con la degradación proteica a nivel extracelular para la posterior obtención de aminoácidos y péptidos, que pueden ser usados como nutrientes, y pueden ser producidas como mecanismo para combatir especies patógenas (control biológico) tal como el fitopatógeno *F. oxysporum*. También se confirmó la capacidad *B. subtilis* ATCC 6633 y *P. extremaustralis* CMPUJ U515 de producir catalasa, una enzima antioxidante, que contrarresta la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, que causan daño celular (44, 45). Y se determinó la capacidad de desplazamiento de ambos microorganismos (prueba de motilidad) ya que este proceso le permite a la célula alcanzar distintas zonas de su entorno, y es fundamental para su supervivencia (45). Los resultados que se obtuvieron en esta investigación confirman que *P. extremaustralis* CMPUJ U515 produce enzima catalasa y es positiva para motilidad, pero no para proteasas. Y que *B. subtilis* ATCC 6633 produce las enzimas proteasas y catalasa, y tiene capacidad de movimiento. Estas características le permiten a estos microorganismos adaptarse a distintos ambientes, captar nutrientes ambientales, contrarrestar efectos como la toxicidad por especies reactivas de oxígeno, capacidad de desplazarse para colonizar nichos ecológicos, y tal vez realizar procesos de control biológico de fitopatógenos. Estos resultados concuerdan con la información publicada en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) (23) y por López et al. 2017 (31).

Huang et al. 2015 (12) demostraron que la inoculación de cuatro cepas de *Bacillus sp.* tiene efecto en el aumento el peso de la biomasa fresca de maíz (*Zea mays L*)

(8.02 hasta 8.43g) en comparación con el control (6.86 g), y aumenta el peso de biomasa fresca para tomate (*Solanum lycopersicum*) (desde 4.0 hasta 4.92 g) en comparación con el control (2.62 g). En la presente investigación se determinó que el promedio de peso húmedo total de plántulas de frijol fue significativamente inferior ($p < 0.05$) en *P. aeruginosa* PAO1, con respecto a *P. extremaustralis* CMPUJ U515 y *B. subtilis* ATCC 6633, sin embargo los últimos dos microorganismos no presentaron diferencia estadísticamente significativa respecto al control. *B. subtilis* obtuvo los valores más altos sobre la biomasa fresca de frijol, sin embargo este resultado no fue estadísticamente diferente frente al control. Por lo tanto los microorganismos evaluados en este estudio no tuvieron efecto significativo sobre el peso fresco o húmedo de las plántulas de frijol. Este resultado se puede atribuir a varios factores como la concentración de PGPR inoculada en las semillas, o el tipo de cultivo (53). Es importante resaltar que no hay estudios que demuestren el efecto de *B. subtilis* o *P. extremaustralis* en frijol.

El aumento de la superficie de la raíz de la planta mejora el potencial de absorción de agua y nutrientes minerales de un volumen de suelo. Mena et al. 2007 (14) demostraron que *B. subtilis* BS13 incrementó la longitud de la raíz de plantas de tomate en un 13 a 15% respecto al tratamiento control (longitud radical 42 cm y 44.5cm respectivamente). Mishra et al. 2008 (10) identificaron que plántulas de trigo inoculadas con *P. vancouverensis* tuvieron una longitud de la raíz 30.2% mayor frente al control no inoculado (22.73 y 17.03 cm respectivamente). Durante este estudio se evidenció un incremento significativo en el peso húmedo de la raíz cuando hubo tratamiento con *P. extremaustralis* CMPUJ U515 y *P. aeruginosa* PAO1 (1.47 y 1.28 g respectivamente), sin embargo, no hubo diferencia significativa entre *B. subtilis* ATCC 6633 y el control. También se evidenció que la longitud de la raíz fue mayor en los tratamientos con *P. extremaustralis* CMPUJ U515 y *B. subtilis* ATCC 6633 frente al control. Lo cual demuestra que la inoculación de *P. extremaustralis* y *B. subtilis* si tiene efecto sobre la raíz de las plantas de frijol aumentando el peso fresco y longitud de las mismas, lo que podría

generar un efecto positivo sobre la planta mejorando el potencial de absorción de agua y nutrientes del suelo. Es posible que este resultado se relacione con la producción de fitohormonas; en floricultura es reconocido su empleo para inducir o mejorar el enraizamiento y la floración (54)

En esta investigación se obtuvo un aumento significativo de la longitud del tallo cuando fue aplicado el tratamiento con *B. subtilis* ATCC 6633 en comparación con *P. extremaustralis* CMPUJ U515, *P. aeruginosa* PAO1 y control. Adesemoye et al. 2009 (13) aplicaron tratamientos a semillas de tomate, okra y espinaca africana inoculadas con *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, y agua destilada (control). Tanto *B. subtilis* como *P. aeruginosa* mejoraron significativamente el crecimiento de las plantas (altura promedio de los brotes) desde un 30 hasta un 80%, según la especie de la planta respecto al control, y entre ambas cepas no hubo diferencia estadísticamente significativa. Huang et al. 2015 (12) demostraron que la inoculación cuatro cepas de *Bacillus* sp. aumentó significativamente la altura de la planta de maíz (*Zea mays* L) (desde 57.83 hasta 59.00 cm) en comparación con el control (51.44 cm). Los inóculos de *Bacillus* sp. también aumentaron la altura de tomate (desde 24.39 cm hasta 26.82 cm) en comparación con el control (19.32 cm). Mishra et al. 2008 (10) identificaron que plántulas de trigo inoculadas con *P. vancouverensis* obtuvieron una longitud 27.5% mayor, en comparación con el control no inoculado (27.2 cm y 21.30 cm) respectivamente. Nuestros resultados demuestran que la inoculación de *B. subtilis* ATCC 6633 en semillas de frijol, tiene efecto en la planta, aumentando su longitud, y este resultado concuerda con los estudios mencionados previamente. Por el contrario en el tratamiento con *P. extremaustralis* las plantas fueron de tamaño inferior al control, pero similares al tratamiento con *P. aeruginosa*. Esta última descrita ampliamente para promoción de crecimiento vegetal. Este resultado puede asociarse a que los estudios con *B. subtilis* y control y *P. extremaustralis* y PAO1 se realizaron en meses distintos y aunque se siguió el mismo protocolo las condiciones atmosféricas como temperatura y humedad pueden variar y afectar las condiciones del cultivo. De

igual manera sugerimos probar el inoculo de *P. extremaustralis* a diferentes concentraciones en ufc/ml ya que no se ha descrito su uso en estudios previos.

Adesemoye et al. 2008 (13) determinaron los pesos secos de la biomasa de okra, tomate y espinaca africana, inoculados con *B. subtilis* y *P. aeruginosa*, y no encontraron diferencias significativas entre los inoculantes, pero ambos fueron estadísticamente mayores (29-83%) que el control no bacteriano. Huang et al. 2015 (12) demostraron que la inoculación de cuatro cepas de *Bacillus* sp. aumentó significativamente el peso de la biomasa seca de maíz (1.03 hasta 1.17 g) en comparación con el control (0.89 g), y aumentaron el peso de biomasa seca para tomate (0.42-0.51 g) en comparación con el control (0.29 g). Mena et al. 2007 (14) determinaron que el peso seco de la raíz de plantas de tomate aumentó 1826% cuando eran tratadas con inóculos de *B. subtilis*. El presente trabajo evaluó el peso seco del tallo y el peso seco de la raíz de plántulas de frijol. El peso seco del tallo tuvo un aumento significativo cuando se usó tratamiento con *B. subtilis* ATCC 6633, respecto a *P. extremaustralis* CMPUJ U515 y *P. aeruginosa* PAO1, pero no frente al control. El promedio de peso seco de la raíz fue inferior en *P. extremaustralis* CMPUJ U515 y en *P. aeruginosa* PAO1, con respecto a *B. subtilis* ATCC 6633. No obstante éste último no fue estadísticamente significativo respecto al control. Estos resultados demuestran que *B. subtilis* tuvo efecto ligero en el aumento del peso seco, pero no se correlaciona con los estudios mencionados anteriormente donde esta bacteria promovía aumentos significativos de estas variables. Benedetto et al. (55) sugieren que se requiere precaución durante la aplicación de análisis integrados a los cultivos como granos, hortalizas, entre otros, pues estas características pueden variar según el cultivo y factores ambientales de manejo.

Las técnicas de análisis de crecimiento brindan la posibilidad de comparar respuestas frente a modificaciones de las características aéreas y radicales. Los análisis alométricos pueden realizarse en términos de peso fresco y seco, sin embargo ambas formas no son equivalentes. El peso fresco suele tener mayor

significancia comercial que la del peso seco pues da idea del crecimiento relativo y es buen estimador del volumen debido a que el agua es el componente principal de la mayoría de órganos y tejidos y en general las variaciones en el peso específico de los tejidos vegetales son bajas. Por otra parte el peso seco es un muy buen estimador del carbono total de la planta, lo que permite analizar aspectos de la fisiología de la planta (55).

6. CONCLUSIONES

1. *B. subtilis* ATCC 6633 fue positivo para actividad solubilizadora de fosfatos, producción de proteasas, actividad catalasa y motilidad. Por otra parte, *P. extremaustralis* CMPUJ U515 fue positiva para todos los factores asociados a promoción de crecimiento vegetal, excepto para producción de proteasas.
2. En general, la inoculación de *B. subtilis* ATCC 6633 en plántulas de frijol fue muy similar al control, sin embargo el tratamiento con este microorganismo generó un aumento significativo ($p < 0.05$) en la longitud del tallo y de la raíz. El tratamiento de plantas de frijol con *P. extremaustralis* CMPUJ U515 generó aumento significativo del peso húmedo de la raíz y longitud de la raíz.
3. Este es el primer estudio donde se evalúa a *B. subtilis* ATCC 6633 en promoción de crecimiento en frijol, así mismo 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, teniendo en cuenta su efecto positivo en el desarrollo del frijol en el caso de *B. subtilis*, y la capacidad de favorecer el progreso de raíces posiblemente a bajas temperaturas en *P. extremaustralis*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pennock D, McKenzie N. FAO - Noticias: Los suelos están en peligro, pero la degradación puede revertirse [Internet]. Fao.org. 2015 [cited 15 August 2017]. Available from: <http://www.fao.org/news/story/es/item/357165/icode/>
2. 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.
3. 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/>
4. Avalos C. El polémico uso de los agroquímicos. *Generacion*. 2017;134(1):10-14.
5. 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.
6. 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>
7. 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.
8. El frijol colombiano: tan variado como sus regiones [Internet]. Colombiaexpomilan.co. 2018 [cited 22 February 2018]. Available from: <http://www.colombiaexpomilan.co/info/conocecolombia/el-frijol-colombiano-tan-variado-como-sus-regiones.html>
9. 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.
10. Mishra P, et al. Characterisation of a psychrotolerant plant growth promoting *Pseudomonas* sp. strain PGERs17 (MTCC 9000) isolated from North Western Indian Himalayas. *Annals of Microbiology*. 2008;58(4):561-568.
11. 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.

12. Huang X, Guo J, Manter D, Reardon K, Vivanco J, Zhou D. *Bacillus* spp. from rainforest soil promote plant growth under limited nitrogen conditions. *Journal of Applied Microbiology*. 2015;118(3):672-684.
13. Adesemoye A, Obini M, Ugoji E. Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008;39(1):423-426.
14. Mena H, Olalde V. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growthpromoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae*. 2007;113(1):103-106.
15. Zaidi S, Usmani S, Singh B, Musarrat J. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere*. 2006;64:991-997.
16. Orhan E, Esitken A, Ercisli S, Turan M, Sahin F. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae*. 2006;111(1):38-43.
17. Yadav A, et al. Bioprospecting of plant growth promoting psychrotrophic Bacilli from the cold desert of north western Indian Himalayas. *Indian Journal Of Experimental Biology*. 2016;54(2):142-50.
18. Mapelli F, et al. Potential for Plant Growth Promotion of Rhizobacteria Associated with *Salicornia* Growing in Tunisian Hypersaline Soils. *BioMed Research International*. 2013;2013:1-13.
19. FAOSTAT [Internet]. FAO. 2016 [cited 12 March 2018]. Available from: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
20. Biogea. ¿Qué son los biofertilizantes? [Internet]. Biogea.mx. 2017 [cited 19 September 2017]. Available from: <http://www.biogea.mx/index.php/features/que-son-los-biofertilizantes>
21. Ahmed A, Hasnain S. Auxins as One of the Factors of Plant Growth Improvement by Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Polish Journal of Microbiology*. 2013;63(3):261-266.
22. Koneman E. *Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color*. 6th ed. Buenos Aires: Panamericana; 2008.
23. *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>
24. Viedma E. Etymologia: *Pseudomonas*. *Emerging Infectious Diseases*. 2012;18(8):1241

25. 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
26. 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.
27. 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.
28. Lopez N, Pettinari M, Stackebrandt E, Tribelli P, Potter M, Steinbuchel A et al. *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a Poly(3-hydroxybutyrate) Producer Isolated from an Antarctic Environment. *Current Microbiology*. 2009;59:514-519.
29. Gasser I, Müller H, Berg G. Ecology and characterization of polyhydroxyalkanoateproducing microorganisms on and in plants. *FEMS Microbiology Ecology*. 2009;70(1):142150.
30. Tribelli P, López N. Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. *Extremophiles*. 2011;15:541-547
31. López G, Diaz C, Shapiro N, Woyke T, Kyrpides N, Alzate J et al. Draft genome sequence of *Pseudomonas extremaustralis* strain USBA-GBX 515 isolated from Superparamo soil samples in Colombian Andes. *Standards in Genomic Sciences*. 2017;12(78):1-12.
32. Celis L, Gallardo I. Estandarizacion de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos. [pregrado]. Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
33. Vega P, Canchignia H, González M, Seeger M. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*. 2016;37(Especial):33-39.
34. Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 1999;17:319-339.
35. Fernández L, Zalba P, Gómez M, Sagardoy M. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencia del Suelo*. 2005;23(1):31-37.
36. Corrales L, Arévalo Z, Moreno V. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 2014;12(21):67-79.

37. Aguado G, Moreno B, Jiménez B, García E, Preciado R. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Mexicana*. 2012;35(1):9-11. Fitotecnia
38. Miethke M, Marahiel M. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology reviews*. 2007;71(3):417-451.
39. Wagner S. Biological Nitrogen Fixation | Learn Science at Scitable [Internet]. *Nature.com*. 2017 [cited 14 August 2017]. Available from: <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/biological-nitrogen-fixation-23570419>
40. Jochum T, Fastnacht A, Trumbore S, Popp J, Frosch T. Direct Raman Spectroscopic Measurements of Biological Nitrogen Fixation under Natural Conditions: An Analytical Approach for Studying Nitrogenase Activity. *Analytical Chemistry*. 2016;89(1):1117-1122.
41. Urzúa H. Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile. *Ciencia e Investigacion Agraria*. 2005;32(2):133-150.
42. Raisman J, Gonzalez A. Nutrición bacteriana [Internet]. *Hipertextos del área de la Biología*. 1998 [cited 14 March 2018]. Available from: <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/nutric~2.htm>
43. Fullana N. Producción y caracterización parcial de una proteasa bacteriana activa a baja temperatura [maestría]. *universidad de la república*; 2014.
44. Santos A, Gomes da Silveira J, Bonifacio A, Cerqueira A, Barreto M. Antioxidant response of cowpea co-inoculated with plant growth-promoting bacteria under salt stress. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2018;:1-9.
45. Madigan M, Martinko J, Parker J. *Biología de los microorganismos*. 10th ed. Illinois: Pearson Prentice hall; 2004.
46. Rodríguez C. Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad santa clara, aislados de residuos lignocelulósicos de higuera (*Ricinus communis*) [posgrado]. *Universidad Católica de Manizales*; 2013.
47. Balado M. Caracterización de un nuevo sistema de asimilación de hierro mediante sideróforos en "*Vibrio anguillarum*" [Doctorado]. *Universidade de Santiago de Compostela*; 2009.
48. Pikovskayas Agar [Internet]. *himedialabs*. 2015 [cited 12 March 2018]. Available from: <http://himedialabs.com/TD/M520.pdf>
49. González F. Bacterias fijadoras de nitrógeno en el comportamiento agronómico del tomate *Lycopersicon esculentum* var. Río Grande. *Cuadernos del Caribe* [Internet]. 2006 [cited 12

March 2018];7:129. Available from:
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/ccaribe/article/view/41726>

50. Dobereiner J, Day J, Dart P. Nitrogenase Activity and Oxygen Sensitivity of the Paspalum notatum-Azotobacter paspali Association. Journal of General Microbiology. 1972;71:103116.
51. Skim Milk Agar [Internet]. himedialabs. 2015 [cited 12 March 2018]. Available from: <http://himedialabs.com/td/m763.pdf>
52. Kumar A, Prakash A, Johri B. Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems-Bacillus as PGPR in Crop Ecosystem. D.K. Maheshwari; 2011.
53. Bashan Y, de-Bashan L. Fresh-weight measurements of roots provide inaccurate estimates of the effects of plant growth-promoting bacteria on root growth: a critical examination. Soil Biology & Biochemistry. 2005;37:1795–1804.
54. Orozco M. importancia de los estudios fisiológicos en los cultivos de flores de exportación. Agronomía Colombiana. 1992;9(2):221-229.
55. Di Benedetto A, Tognetti J. Técnicas de análisis de crecimiento de plantas: su aplicación a cultivos intensivos. Revista de investigaciones agropecuarias. 2016;42(3):258-282.

ANEXO 1

SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO

PRUEBA CUALITATIVA EN MEDIO SRS

Utilizado para la valoración de la eficiencia relativa de solubilización de los aislamientos, empleando el método propuesto por Sundara Rao y Sinha (1963) sobre el medio SRS, basado en la medición del diámetro de halos de transparencia alrededor de colonias bacterianas que crecen en un medio de cultivo sin formas solubles de PO_4^{3-} pero con fosfato de calcio o hierro, el cual puede ser solubilizado por bacterias que presenten esta capacidad. La eficiencia relativa de solubilización de fosfatos se expresa haciendo una relación del diámetro del halo de solubilización con respecto al diámetro de la colonia.

PROCEDIMIENTO

1. Realizar el medio SRS
2. Sembrar en el centro de la caja una colonia tomada de un cultivo a partir de colonias de 48 horas de crecimiento, se hacen 3 réplicas para cada aislamiento y se incuban a 30 °C por 5 días
3. Registrar el diámetro de las colonias y el diámetro de los halos de solubilización (transparencia en el medio de cultivo).

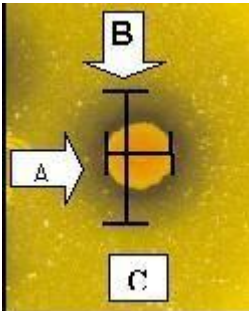
Para valorar la actividad solubilizadora se empleó la relación:

$$\text{ACT SOLUBILIZADORA} = \frac{\text{Diámetro de solubilización}}{\text{diámetro de la colonia bacteriana}}$$

Donde el valor mínimo del índice de solubilización es de 1. Esto corresponde a una colonia que no presenta halo de solubilización evidente y se asume que este es igual al diámetro de la colonia.



Aspecto inicial del medio de cultivo SRS, con partículas de fosfato de calcio tribásico, poco solubles. El indicador de pH (púrpura de bromocresol) torna el medio de color morado a pH neutro.



Crecimiento de colonias bacterianas solubilizadoras de fosfato en medio SRS: A, diámetro de la colonia. B, diámetro del halo de solubilización de fosfatos. C, acidificación del medio de cultivo (el indicador de pH vira a amarillo).

COMPOSICIÓN DEL MEDIO SRS (Sundara-Rao, y Sinha. 1963)

Para cuantificación y aislamiento de colonias solubilizadoras de fosfatos. Componentes g/L

Componentes	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
KCl	0,2
Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	0,3
Mn SO ₄ . H ₂ O	0,004
Fe SO ₄ . 7 H ₂ O	0,002
NaCl	0,2
Glucosa	10,0
Extracto de levadura	0,5
Purpura de Bromocresol	0,1
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5,0
Agar	18,0

*El fosfato tricálcico se esteriliza aparte y luego antes de dispensar se añade en cabina de flujo al medio.

* El resto de componentes se pesan y disuelven; pero antes de esterilizar se ajusta el pH (7-7.2), si es necesario con una solución de (Na OH) 0.1N.

ANEXO 2

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO INDOLACÉTICO (AIA) (Basado en Glickmann y Dessaux, 1995).

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos de suelos son capaces de producir una amplia variedad de metabolitos, entre los que se encuentran las hormonas vegetales (fitohormonas) que son reguladores de crecimiento de las plantas (RCP) y en bajas concentraciones son capaces de influenciar los procesos fisiológicos. El regulador cuantitativamente más importante en *Azospirillum* es la producción de auxinas, en particular el ácido indol-3-acético (AIA). La producción bacteriana de RCP es la causa de los cambios morfológicos de la raíz luego de la inoculación con *Azospirillum*, que a su vez puede relacionarse con un aumento en la captación mineral (Dobbelaere *et al.*, 1999). La detección del AIA se puede establecer por el método colorimétrico de Salkowsky (Glickmann y Dessaux, 1995), que se caracteriza por ser una técnica rápida, fácil y sensible en el cual las cepas son incubadas con de triptófano, precursor del AIA.

Medio de cultivo: La evaluación se puede realizar en caldo nutritivo o en medio específico suplementado con triptófano (3mM).

L-triptófano: Preparar una solución stock de L-triptófano a una concentración de 3mM y esterilizar con membrana de 0.22 μ m bajo condiciones estériles. Almacenar a -20°C en frasco ámbar. Descongelar y adicionar 1 mL de esta solución a 9 ml de caldo LB para obtener una concentración final de triptófano de 0.3mM.

Cálculos:

1 mol de Trp= 204,23g
0,003M X=0,612g/1000ml.

SOLUCIÓN DE SALKOWSKY PARA DETERMINAR AIA.

1. Preparar una solución de FeCl_3 (12 g/l) ó $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (19,98 g/l) con agua destilada en un vaso precipitado.
2. Lentamente, agregar la solución de ácido sulfúrico (7.9 M) al vaso precipitado que tiene la solución de FeCl_3 bajo cámara de extracción.
3. Dejar enfriar la solución y transferir a un balón aforado y completar con agua destilada.
4. Almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente por un período no mayor de un mes.
5. Cálculos para 100ml de reactivo de Salkowsky:

H_2SO_4 : densidad 1.84g/l, pureza 0,975.

1 Mol de H_2SO_4 = 98,08g

7.9 M x= 774,83g de H_2SO_4 /l

77,48 g para 100ml.

1ml de H_2SO_4 = 1,84g/l * 0,975 = 1,794g de H_2SO_4

1,794g = 1ml H_2SO_4

77,48g x= 43 ml de H_2SO_4 en 57 ml de agua con la solución de FeCl_3 .

PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA CUALITATIVA

1. Dejar crecer las bacterias en agar nutritivo suplementado con Triptofano, durante 48 horas.
2. Después de las 48 horas y en condiciones de total oscuridad se adiciona sobre la superficie de la colonia dos gotas de reactivo de Salkowsky para evidenciar la reacción colorimétrica positiva. Esperar hasta 2 horas para ver el resultado.
3. Control positivo: *Azospirillum sp.*

ANEXO 3
PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS
Protocolo según Pérez-Miranda et al. 2007, con modificaciones

INTRODUCCIÓN:

Siendo el hierro (Fe^{+2}) elemento involucrado en muchos procesos biológicos, su disponibilidad en el medio para los organismos es necesaria, por lo tanto, se necesitan compuestos que permitan obtener el hierro del medio externo para adquirirlo e incorporarlo a los organismos y uno de estos tipos de transportadores los constituyen los llamados Sideróforos.

En general, los Sideróforos se pueden agrupar de acuerdo a los siguientes criterios: las fracciones o motivos de la molécula que permiten una coordinación que unen el oxígeno con el hierro; estas moléculas generalmente son: catecolatos, hidroxamatos o grupos α -hidroxicarboxilatos.

Básicamente la prueba se basa en complejos del sideróforo con el hierro externo, si la bacteria produce dicho metabolito el medio virara de color por el indicador CAS (Cromo-Azul-S). Dependiendo del siderofofo producido la tonalidad será diferente: Catecoles de color rosado, hidroxamatos de color Amarillo y los hidroxicarboxilatos anaranjado.

CONTROL NEGATIVO: Medio de cultivo sin inocular con adición de solución CAS

CONTROL POSITIVO: PAO1

Todos los ensayos se realizarán por duplicado con tres replicas.

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN CAS

Para un litro de agar + CAS:

1. Pesar 0.065g de CAS (Cromo-Azul-S) y disolverlo en 50 ml de agua HPLC.
2. Por otro lado, pesa 0,0027g de cloruro de hierro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1mM) y disolverlo en Ácido clorhídrico (HCl) 10 mM (**ver preparación ↓**).
3. Luego pesar 0.073g de HDTMA y disolverlo en 40 ml de agua HPLC,

Hasta el momento se deben tener tres soluciones diferentes

4. Mezclar las tres soluciones para obtener 100ml de solución final (Solución CAS), quedando como resultado un líquido púrpura.
5. La solución CAS se debe autoclavar a 121°C por 15 min a 15 libras de presión. (Después de autoclavada tomara un color azul oscuro)
6. Aparte, preparar agar-agar a concentración 0,9% (**ver preparación ↓**) y autoclavar.
7. Finalmente, se mezcla la solución CAS con el agar-agar, escurriendo la solución colorada (azul oscuro) por las paredes del medio, evitando la formación de espuma.

PREPARACIÓN DE ÁCIDO CLORHÍDRICO (HCL) 10MM

Preparar 10ml de HCl 10Mm a partir de un HCl al 37%

$$\frac{37\text{g}/\%}{12\text{M}} \times \frac{1,18\text{g (densidad de HCl)}}{100\text{g}/\%} \times \frac{1 \times 10^3 \text{ cm}^3}{1\text{cm}_3} \times \frac{1 \text{ mol HCl}}{36,46\text{g}} =$$

$$\frac{1\text{M}}{12\text{M}} = \frac{1000\text{Mm}}{X} \quad = \quad X = 12.000\text{Mm}$$

$$V1 * C1 = V2 * C2$$

$$V1 * 12.000\text{M} = 10\text{ml} * 10\text{Mm}$$

$$10\text{ml} * 10\text{Mm}$$

$$V1 = \frac{10\text{ml} * 10\text{Mm}}{12.000\text{M}} = 0,0083\text{ml}$$

$$\frac{1\text{ml}}{0,0083\text{ml}} = \frac{1000\text{ul}}{X}$$

X: 8,3ul de HCl al 37% y aforar a 10ml con H2O destilada (frasco ámbar esteril)

PREPARACIÓN DE AGAR- AGAR 0,9%

Para que un medio de cultivo sea solido significa que en 1 litro de agua destilada hay 15g de agar-agar en su composición lo que indica a su vez que el medio está a una concentración de agar del 1,5%, explicando:

15g de agar-agar ----- 1,5% concentración
X ----- 0,9% concentración

X= 9g de agar-agar para un litro de agua destilada

PROCEDIMIENTO SIDEROFOROS

1. Preparar agar nutritivo y servir una capa delgada en cada caja de Petri previamente estériles.
2. De la cepa conservada a -20°C, tomar una asada e inocularla tocando el medio de cultivo en la mitad (no hacer estría)
3. Llevar a incubación durante 48 horas a 30°C
4. Preparar solución CAS (reactivo CAS más agar-agar al 0,9%) Esta debe ser preparada el mismo día que se revelará la prueba, es decir después de las 48h de crecimiento de la cepa de interés.
5. Una vez hayan crecido las cepas bacterianas de interés, tomar 10ml de la solución CAS y adicionarlo suavemente con pipeta de 10 ml esteril, sobre la colonia que se encuentra sembrada en agar nutritivo, tapizando con la solución CAS la caja de Petri.
6. Dejar solidificar e incubar durante 3 horas a 30°

LECTURA DE LA PRUEBA:

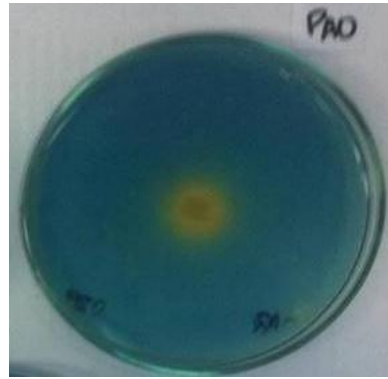
Serán positivas las cepas que presenten viraje del medio alrededor de la colonia bacteriana:

- Catecoles: rosado
- Hidroxamatos: Amarillo
- Hidrocarboximatos: Naranja

Serán negativas aquellas cepas que solo que vea crecimiento sin cambio de color.



Negativo



positivo

ANEXO 4

COMPOSICIÓN DEL MEDIO Nfb, LIBRE DE NITRÓGENO

Con fuente combinada de carbono, para aislamiento de diferentes bacterias fijadoras de nitrógeno

COMPOSITION OF USED MEDIA AND CHEMICAL REAGENTS :

NITROGEN FREE BROMOTHYMOLO BLUE (NFB) MEDIUM :

Dobereiner *et al* (1976)

Same media was also used to check the effect of temperature and pH.

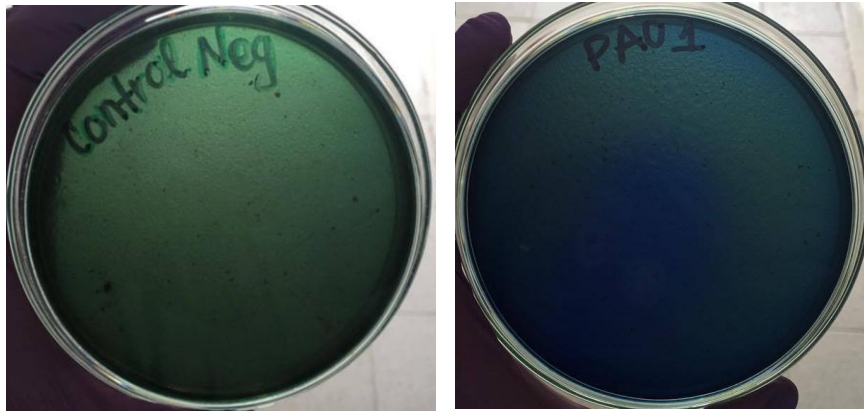
Semi solid medium

Ingredients	G/LITRE
Malic acid	- 5.0 g
KOH	- 4.0 g
K ₂ HPO ₄	- 0.5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	- 0.05 g
MnSO ₄ 7H ₂ O	- 0.01 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	- 0.01 g
NaCl	- 0.02 g
CaCl ₂	- 0.01 g
Na ₂ MoO ₄	- 0.002 g
D/W	- 1000 ml
Bromothymol blue 0.5% alcoholic solution	- 2.0 ml
Agar Agar	- 1.75 g
pH adjusted to 6.6 to 7.0	
For solid NFB medium	
Semi solid NFB medium	
Agar	- 2 %
Yeast extract	- 0.005 %

Fuente: http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/48486/24/24_appendix%20viii.pdf

- Los componentes se pesan y se agregan uno a uno a un Erlenmeyer que ya tenga la mitad del volumen de agua total, es importante que todo el tiempo este el medio en la plancha y con agitación magnética, el agar se agrega después de medir el pH, y luego se esteriliza.
- Al salir el medio del autoclave agitar en la plancha, revisar que no esté precipitado y servir.
- Sembrar en las cajas de Petri por estría pequeña en el medio de la caja.

Interpretación de resultados



viraje del medio a azul.

Dudas

Usé los medios libres de nitrógeno y agregué BTB (Bromothymol blue) como indicador. Pero tuve un cambio de color de verde a amarillo después de 5 días, pero esperaba verde a azul

-Si su medio es de color verde después de la esterilización en autoclave y cambia a color amarillo después de 5 días de incubación, significa que su bacteria no puede fijar el exceso de amoníaco del medio. Quiere decir que sus bacterias pueden fijar el nitrógeno para su supervivencia, pero no pueden reparar el exceso de amoníaco para cambiar el color del medio.

Pero, si es posible, un ensayo de actividad de la nitrogenasa estándar de las cepas mediante el uso de un cromatógrafo de gases y acetilén le dará resultados más precisos.

Fuente:

https://www.researchgate.net/post/How_can_I_study_the_nitrogen_fixation_ability_by_rhizocateria_directly_on_solid_media

ANEXO 5 PROTOCOLO DE SIEMBRA SEMILLAS DE FRIJOL

Materiales

- Vasos plásticos de 12 onzas transparentes con agujeros por debajo
- Portavasos desechables
- Suelo
- Pinzas estériles
- Mechero de alcohol
- Agua destilada estéril
- Jeringa de 10ml
- Bolsas de aluminio
- Semillas de frijol
- Falcón de 50 ml estériles
- Hipoclorito de sodio al 3% DIA 1.

1. Esterilizar el suelo en bolsas de aluminio (doble bolsa)
2. Esterilizar en una fiola de 1L agua destilada.
3. Esterilizar pinzas
4. Esterilizar frasco para desinfectar semillas

DIA 2

1. Preparar 100 ml de caldo Lb, esterilizar, envasar de a 30 ml en falcón de 50ml, e inocular una UFC de la bacteria con la que se van a inocular las semillas, dejar en Shaker a 150 RPM, 30-35°C por 24 horas.

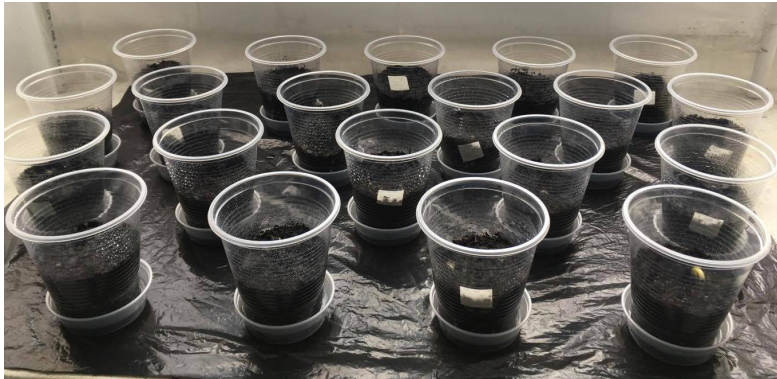


2. Esterilizar nuevamente el suelo

DIA 3

1. Esterilizar las semillas así: poner las semillas en frasco estéril y agregar hipoclorito de sodio al 3% durante 5 minutos, posteriormente hacer 3 lavados con agua destilada estéril.
2. Agregar las semillas ya estériles al caldo LB inoculado el día anterior por un tiempo máximo de 1 hora.
3. Llenar los vasos plásticos de 12 onzas con 1/3 de suelo, poner la semilla ya inoculada con las pinzas estériles, y posteriormente cubrir con suelo las semillas hasta alcanzar 2/3 del vaso de 12 onzas.
4. Una vez terminado el proceso con la totalidad de semillas, marcar cada vaso y ponerlo en el portavasos con 10 ml de agua destilada, y rociar el suelo con el spray.

Nota: las plantas de frijol se riegan cada tercer día con el spray y con los 10 ml de agua destilada estéril en los portavasos, importante todos los viernes deben quedar con agua para el fin de semana.



PROTOCOLO PARA MEDIR VARIABLES A LAS PLANTULAS DE FRIJOL.

Pasados 10 días de la siembra de las semillas de frijol, empezaran a germinar.



A los 20 días después de la siembra las plántulas de frijol tienen las primeras hojas verdaderas, y están listas para tomar registro del peso húmedo y del peso seco.



Protocolo

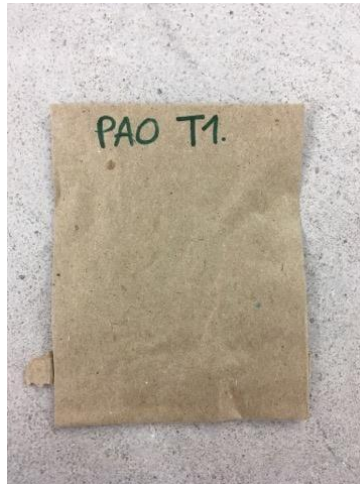
1. Sacar las plantas del vaso de 12 onzas con mucha precaución pues sus raíces son delicadas, depositar el suelo en una bandeja plástica y lavar cuidadosamente la raíz de cada planta con agua de chorro.



2. Una vez se haya lavado la raíz de cada planta se procede a cortar la raíz del tallo, es importante marcar el tallo con cinta de enmascarar y tener precaución de no confundir las raíces de cada planta.



3. Medir con una regla la longitud del tallo y la longitud de la raíz.
4. Una vez se tenga en registro de las longitudes, se pesa la planta en la balanza analítica, primero el peso húmedo total (Raíz + tallo) y luego el peso húmedo de la raíz (solo raíz).
5. Almacenar cada raíz y cada tallo en bolsas de papel, debidamente marcadas (importante no confundir ningún tallo ni raíz).



Nota: hasta ahora es importante que cada paso se lleve a cabo el mismo día, de lo contrario las medidas del peso húmedo no serán verídicas pues la planta desde que se retira del suelo pierde humedad.

6. Llevar al horno durante tres días a 60°C.
7. Tomar registro del peso seco de cada tallo y de cada raíz.