



**Evaluación del efecto de *Bacillus subtilis*  
EA-CB0575 en la promoción de  
crecimiento de *Zea mays* y *Solanum  
lycopersicum* a nivel de invernadero**

**Ana Carolina Pulido Jiménez**

Universidad EAFIT  
Escuela de Ingeniería

Departamento de Ingeniería de Procesos  
Medellín, Colombia

2016

**Evaluación del efecto de *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento de *Zea mays* y *Solanum lycopersicum* a nivel de invernadero**

**Ana Carolina Pulido Jiménez**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Ingeniero de Procesos**

Asesora

I.P., Msc y Cand. PhD. Luisa Fernanda Posada Uribe

Universidad EAFIT  
Escuela de Ingeniería  
Departamento de Ingeniería de Procesos  
Medellín, Colombia

2016

*A mis padres, por su apoyo e incondicionalidad a lo largo de este camino.*

# Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi asesora **Cand. PhD Luisa Posada**, por inculcarme su amor a la investigación y enseñarme todo lo que sé acerca del mundo de los bioprocesos, por su apoyo, exigencia y ánimos a dar siempre lo mejor de mí, un excelente ser humano, gran maestra y amiga, ¡Gracias por tanto!. A la profesora **Valeska Villegas** por abrirme las puertas de semillero **BIOQUIP**, aportar con su conocimiento y ser una guía constante en mi formación como Ingeniera de Procesos y en la realización de este proyecto.

Al **FONDO EPM**, a la **Universidad EAFIT** y al pregrado en **Ingeniería de Procesos** por contribuir a la realización de mis sueños y a mi formación personal y académica. Al personal de los laboratorios de la Universidad EAFIT, **Sigifredo Cárdenas**, Auxiliar de laboratorio de Biotecnología, por su ayuda y disposición constante en todo lo que necesitaba, a **Edgar Arbeláez**, Coordinador de los laboratorios de ingeniería de procesos por su guía y ayuda en las técnicas instrumentales utilizadas, a **John Jairo Estrada**, Auxiliar de laboratorio de química orgánica por su excelente actitud y ánimos en las mediciones de los ensayos en invernadero.

A **Simón**, por estar siempre ahí y ayudarme en el montaje y mediciones de los ensayos en el invernadero y a **mi familia** por apoyarme durante toda mi vida universitaria, por inculcarme la responsabilidad como eje fundamental y darme las alas para alcanzar todo lo que me proponga.

# Tabla de contenido

Agradecimientos .....	4
Tabla de contenido .....	5
Lista de Tablas .....	9
Lista de Figuras .....	10
Lista de Anexos .....	11
Resumen .....	12
Introducción .....	14
Objetivos.....	16
Objetivo general .....	16
Objetivos específicos .....	16
Capítulo 1: Marco Teórico.....	17
1.1. Cultivo de Maíz.....	17
1.2. Cultivo de Tomate.....	18
1.3. La Rizósfera y las Rizobacterias.....	19
1.4. Las Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal .....	20
1.5. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	21
1.5.1. Mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal .....	21
1.5.2. Métodos indirectos de promoción de crecimiento vegetal .....	23
1.6. <i>Bacillus spp.</i> Promotor del crecimiento vegetal.....	24
1.7. Metabolitos secundarios producidos por <i>B. subtilis</i> .....	25
1.8. Antecedentes del proyecto de investigación .....	28
1.8.1. Antecedentes de trabajos en el tema a nivel mundial .....	28
1.8.2. Trabajos realizados por el grupo de investigación .....	29

Capítulo 2: Evaluación del efecto de la inoculación de esporas y células vegetativas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 sobre las variables fisiológicas de <i>Zea mays</i> a nivel de invernadero	30
2.1. Resumen .....	30
2.2. Introducción .....	31
2.3. Materiales y métodos.....	32
2.3.1. Localización del ensayo.....	32
2.3.2. Microorganismo y proceso de activación .....	32
2.3.3. Medios de cultivo .....	32
2.3.4. Fermentación del microorganismo a nivel de matraz .....	33
2.3.5. Material vegetal .....	33
2.3.6. Inoculación del <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en las plantas de <i>Zea mays</i> a nivel de invernadero.....	34
2.3.7. Análisis estadístico de los datos .....	35
2.4. Resultados y discusión .....	37
2.4.1. Efecto de la aplicación de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en los tratamientos de esporas y células vegetativas en dos concentraciones de aplicación en plantas de maíz. ....	37
2.4.2. Efecto de la aplicación de dos concentraciones de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en plantas de maíz. ....	39
2.4.3. Efecto de la aplicación de esporas y células vegetativas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en plantas de maíz.....	43
2.5. Conclusiones .....	47
3. Evaluación del efecto de la inoculación de esporas y células vegetativas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 sobre las variables fisiológicas de <i>Solanum lycopersicum</i> a nivel de invernadero.....	48
3.1. Resumen .....	48
3.2. Introducción .....	48
3.3. Materiales y métodos.....	49
3.3.1. Localización del ensayo.....	49
3.3.2. Microorganismo y proceso de activación .....	50
3.3.3. Medios de cultivo y fermentación del microorganismo a nivel matraz .....	50
3.3.4. Material vegetal y siembra a nivel de invernadero .....	50

3.3.5.	Análisis estadístico de los datos .....	50
3.4.	Resultados y discusión .....	51
3.4.1.	Efecto de la aplicación de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en los tratamientos de esporas y células vegetativas en dos concentraciones de aplicación en plantas de tomate. ....	51
3.4.2	Efecto de la aplicación de dos concentraciones de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en plantas de tomate.....	53
3.4.3	Efecto de la aplicación de esporas y células vegetativas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en plantas de tomate.....	57
3.5.	Conclusiones .....	60
4.	Determinación del efecto de la aplicación del sobrenadante del cultivo del <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en la promoción de crecimiento de <i>Zea mays</i> y <i>Solanum lycopersicum</i> a nivel de invernadero.....	61
4.1.	Resumen .....	61
4.2.	Introducción .....	62
4.3.	Materiales y métodos.....	63
4.3.1.	Localización.....	63
4.3.2.	Microorganismo y proceso de activación .....	63
4.3.3.	Preparación de los medios de cultivo .....	63
4.3.4.	Determinación del efecto de la aplicación del sobrenadante del cultivo del <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en la promoción de crecimiento en <i>Zea mays</i> y <i>Solanum lycopersicum</i>	64
4.3.5.	Evaluación de la cinética de crecimiento y consumo de sustrato del <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 de los medios de cultivo TSB y SBM a nivel de matraz .....	66
4.4.	Resultados y discusión .....	67
4.4.1.	Determinación del efecto de la aplicación del sobrenadante del cultivo del <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 en la promoción de crecimiento en <i>Zea mays</i> y <i>Solanum lycopersicum</i> .....	67
4.4.2.	Cinética de crecimiento y consumo de sustrato del <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 en los medios de cultivo para la producción de esporas y células vegetativas. ....	71
4.5.	Conclusiones .....	76

5.	Identificación de los lipopéptidos reportados para la promoción de crecimiento presentes en el sobrenadante del cultivo del <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en medios de cultivo para producción de esporas y células vegetativas. ....	77
5.1.	Resumen .....	77
5.2.	Introducción .....	78
5.3.	Materiales y Métodos.....	79
5.3.1.	Localización.....	79
5.3.2.	Microorganismo y proceso fermentativo .....	79
5.3.3.	Extracción de los compuestos presentes en el sobrenadante de los cultivo de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575.....	80
5.3.4.	Purificación e identificación de los compuestos presentes en el sobrenadante de los cultivos de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 .....	81
5.4.	Resultados y discusión .....	82
5.4.1.	Análisis preliminar de los extractos crudos obtenidos del sobrenadante del cultivo de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575.....	82
5.4.2.	Cuantificación de los metabolitos presentes en el sobrenadante del cultivo de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 para la producción de esporas y células vegetativas.....	84
5.5.	Conclusión.....	87
6.	Bibliografía .....	88
	Anexos .....	105

# Lista de Tablas

Tabla 1-1. Descripción de los LPs producidos por <i>B.subtilis</i> : Surfactinas, Iturinas y Fengicinas .....	27
Tabla 1-2. Publicaciones relacionadas con PGPR en cultivos de Maíz y Tomate. ....	28
Tabla 2-1. Tratamientos para la evaluación de la inoculación de esporas y células vegetativas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en las variables fisiológicas de <i>Zea mays</i> a nivel de invernadero.....	34
Tabla 2-2. Variables de crecimiento en evaluación para determinar el efecto de la inoculación de esporas, células vegetativas y sobrenadante libre de células en los cultivos de <i>Zea mays</i> a nivel de invernadero .....	35
Tabla 2-3. Resumen de los resultados de los tres ensayos realizados para determinar el efecto promotor de crecimiento <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 sobre las variables fisiológicas de <i>Zea mays</i> a nivel de invernadero. ....	37
Tabla 2-4. Resumen de los resultados para determinar la concentración de las células vegetativas y esporas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 sobre las variables fisiológicas de <i>Zea mays</i> a nivel de invernadero.....	40
Tabla 2-5. Resumen de los resultados para determinar la estructura de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en una concentración de $10^7$ UFC/mL y $10^8$ UFC/mL sobre las variables fisiológicas de <i>Zea mays</i> a nivel de invernadero. ....	44
Tabla 3-1. Resumen de los resultados de los tres ensayos realizados para determinar el efecto promotor de crecimiento <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 sobre las variables fisiológicas de <i>Solanum lycopersicum</i> a nivel de invernadero. ....	51
Tabla 3-2. Resumen de los resultados para determinar la concentración de las células vegetativas y esporas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 sobre las variables fisiológicas de <i>Solanum lycopersicum</i> a nivel de invernadero .....	54
Tabla 3-3. Resumen de los resultados para determinar la estructura de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en una concentración de $10^7$ UFC/mL y $10^8$ UFC/mL sobre las variables fisiológicas de <i>Solanum lycopersicum</i> a nivel de invernadero. ....	57
Tabla 4-1. Tratamientos para la determinación del efecto de la aplicación del sobrenadante del cultivo del <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en la promoción de crecimiento en <i>Zea Mays</i> y <i>Solanum lycopersicum</i> .....	65

Tabla 4-2. Resumen de los resultados de los ensayos realizados para determinar el efecto promotor de crecimiento del sobrenadante libre de células de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 sobre las variables fisiológicas de <i>Zea mays</i> y <i>Solanum lycopersicum</i> a nivel de invernadero. .	68
Tabla 4-3. Parámetros cinéticos modelados mediante el modelo exponencial, para la cinética de crecimiento y consumo de sustrato de <i>B.subtilis</i> EA-CB 0575 en el medio SBM .....	72
Tabla 4-4. Parámetros cinéticos de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 obtenidos por el modelo Logístico, Ludeking Piret y experimentalmente .....	73
Tabla 5-1. Modo de operación en gradiente de HPLC en fase reversa para la observación preliminar de los extractos obtenidos de los medios TSB, SBM y MOLP y la cuantificación de los extractos obtenidos del medio TSB y SBM. ....	81
Tabla 5-2. Rendimientos y áreas promedio obtenidas en SPE 100% de los extractos obtenidos a partir de los medios TSB y SBM. ....	86

## Lista de Figuras

Figura 1-1. Ciclo de esporulación de <i>B. subtilis</i> (Errington, 2003). ....	25
Figura 2-1. Peso seco radical de las plantas de maíz inoculadas con células vegetativas y esporas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en dos concentraciones ( $10^7$ y $10^8$ UFC/mL) en los ensayos 1 y 2.....	39
Figura 2-2. Peso seco total de las plantas de maíz inoculadas con células vegetativas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en dos concentraciones ( $10^7$ y $10^8$ UFC/mL) en los ensayos 1 y 2. ...	42
Figura 2-3. Peso seco total de las plantas de maíz inoculadas con las esporas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en concentraciones de $10^7$ y $10^8$ UFC/mL en el ensayo 2. ....	43
Figura 2-4. Longitud aérea de las plantas de maíz inoculadas con células vegetativas y esporas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en una concentración $10^7$ UFC/mL en los ensayos 1 y 2. ....	46
Figura 2-5. Longitud aérea de las plantas de maíz inoculadas con células vegetativas y esporas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en una concentración $10^8$ UFC/mL en los ensayos 1 y 2. ....	47
Figura 3-1. Peso seco aéreo de las plantas de tomate inoculadas con células vegetativas y esporas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en dos concentraciones ( $10^7$ y $10^8$ UFC/mL) en los ensayos 1 y 2 .....	52

Figura 3-2. Peso seco total de las plantas de tomate inoculadas con células vegetativas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en dos concentraciones ( $10^7$ y $10^8$ UFC/mL) en los ensayos 1 y 2. ....	55
Figura 3-3. Peso seco total de las plantas de tomate inoculadas con las esporas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en concentraciones de $10^7$ y $10^8$ UFC/mL en el ensayo 2. ....	56
Figura 3-4. Peso seco aéreo de las plantas de tomate inoculadas con células vegetativas y esporas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en una concentración $10^7$ UFC/mL en el ensayo .....	58
Figura 3-5. Peso seco aéreo de las plantas de tomate inoculadas con células vegetativas y esporas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en una concentración $10^8$ UFC/mL en los ensayos 1 y 2. ....	60
Figura 4-1. Peso Seco Total de las plantas inoculadas con el medio TSB y SBM fresco y el SLC del cultivo de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en medios específicos para la producción de células vegetativa y esporas (TSB y SBM) en los cultivos en evaluación.....	70
Figura 4-2. Cinética de crecimiento (DO600) y consumo de sustrato de <i>B.subtilis</i> EACB-0575 en los medios TSB y SBM .....	71
Figura 4-3. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato y modelos ajustados para <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 en los medios de cultivo. ....	75
Figura 5-1. Perfil cromatográfico del extracto SPE 100% de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en el gradiente por etapas 50%, 100% en los medios MOLP, TSB y SBM. ....	83
Figura 5-2. Análisis por HPLC del sobrenadante libre de células separados por extracción en fase sólida a 100% MeOH en el gradiente por etapas 70%, 100% del sobrenadante del cultivo de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 en los medios TSB y SBM.....	85

## Lista de Anexos

<b>Anexo 1.</b> Composición de los Medios de cultivo.....	105
<b>Anexo 2.</b> Curva de calibración Absorbancia vs UFC/mL del microorganismo <i>B. subtilis</i> EA-CB0575. <b>A.</b> Células Vegetativas, <b>B.</b> Esporas .....	106

# Resumen

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) se han descrito como una alternativa para mitigar los problemas asociados al uso de fertilizantes y pesticidas químicos en la agricultura gracias a su capacidad para favorecer la nutrición y salud de las plantas mediante una amplia gama de mecanismos directos e indirectos. Sin embargo, previo a su inoculación a los cultivos se hace necesario determinar la concentración y estructura bacteriana eficiente. El presente trabajo evaluó el efecto de la aplicación de esporas y células vegetativas del microorganismo *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en diferentes concentraciones ( $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL), el sobrenadante libre de células proveniente de los cultivos de esporas y células vegetativas, en cultivos de maíz y tomate, mediante las variables respuesta: longitud aérea (LA), peso seco aéreo (PSA), peso seco radicular (PSR) y peso seco total (PST). Se encontró que la inoculación del microorganismo, ya sea como esporas o células vegetativas, en ambas concentraciones evaluadas y el sobrenadante proveniente de su cultivo incrementa el crecimiento y desarrollo de las plantas de maíz y tomate respecto al control absoluto sin inocular. Adicionalmente, se estudiaron los compuestos reportados para la promoción de crecimiento presente en dicho sobrenadante libre de células mediante la identificación preliminar de los metabolitos por HPLC en fase reversa y la cuantificación de las áreas de los picos observados en los cromatogramas obtenidos, se evidenció la posible presencia de fengicinas y surfactina. Además el rendimiento y la producción de estos metabolitos es mayor cuando el microorganismo está en estado vegetativo.

**Palabras Claves:** *Bacillus subtilis*, Promoción de crecimiento, *Zea mays*, *Solanum lycopersicum*, sobrenadante libre de células, células vegetativas, esporas, lipopéptidos.

# Abstract

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) has been described as an alternative to reducing the problems associated with the use of chemical fertilizers and pesticides in agriculture due to its ability to promote nutrition and plant health through a broad range of direct and indirect mechanisms. However, prior to inoculation to crops, it is necessary to determine the bacterial concentration and its efficient structure. This study assesses the effect of the *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spores and vegetative cells application in different concentrations ( $10^7$  and  $10^8$  CFU / mL), the cell-free supernatant from the spores and vegetative cell cultures in two crops of national interest by the response variables: shoot length, shoot dry weight, root dry weight and total dry weight. It was found that inoculation of microorganism, either as vegetative cells or spores, in both concentrations and the supernatant evaluated from cultivation increases the growth and development of plants, corn, and tomato in respect to absolute uninoculated control. Additionally, the compounds reported to promote growth on the cell-free supernatant were studied by preliminary identification of metabolites by reverse phase HPLC and quantification of the areas of peaks observed in the chromatograms. The results showed that the fengycins may be present between the retention times 10 and 20 minutes, surfactins are present between 25 and 30 minutes, and the yield of the metabolite produced is greater when the microorganism are in a vegetative state. The possible presence of fengycins and surfactins was evident. Also, the yield and production of metabolites it is greater when the microorganism is in a vegetative state.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, Plant growth promoting, *Zea mays*, *Solanum lycopersicum* cell-free supernatant, vegetative cells, spores, lipopeptides.

# Introducción

La agricultura ha jugado un papel importante en el desarrollo económico de las naciones (Banco Mundial, 2008; FAO, 2009b), ha sido el motor de crecimiento de la economía, tanto en países desarrollados como de las economías emergentes (Pingali, 2007) y actualmente se enfrenta a múltiples retos, debido a la creciente demanda de alimentos por el aumento en la población, así como el aumento de los requerimientos energéticos para el desarrollo de las actividades humanas (FAO, 2009a).

Hoy en día, la forma de abastecer de alimento a la población y lograr altas productividades en los cultivos es el uso de fertilizantes químicos. El uso de estos productos genera un impacto ambiental debido a que para su fabricación, se emplea el petróleo o sus derivados, agotando recursos no renovables, además generan problemas en el ambiente como acidificación de los suelos, erosión y afecciones a la fauna y flora de los ecosistemas (Altieri and Nicholls, 2000). Por lo anterior, se tiene como reto satisfacer la demanda de un mercado creciente, asegurando la sostenibilidad económica y ambiental de nuestro entorno, adoptando métodos de producción eficaces y de menor impacto ambiental (FAO, 2009b; Posada Londoño and Pimineto Vargas, 1997).

Una alternativa para frenar el deterioro ambiental asociado a los fertilizantes químicos, es el uso de biofertilizantes, los cuales se definen como productos que contienen microorganismos vivos y que al aplicarse a las semillas, superficie de las plantas o al suelo, colonizan la planta y promueven su crecimiento aumentando la disponibilidad de los nutrientes y la sanidad vegetal en la misma (Armenta Bojórquez et al., 2010; Prashar et al., 2013; Vessey, 2003). El empleo de productos basados en rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR, por sus siglas en inglés), constituye una alternativa biotecnológica para mejorar la producción de especies de interés hortícola (Martínez, 2002) y es una posibilidad para el manejo sostenible de cultivos como cereales y hortalizas, los cuales son recursos de gran importancia a nivel nacional (DANE, 2009).

El tomate (*Solanum lycopersicum*) hace parte de las solanáceas con mayor importancia económica en Colombia. La producción nacional de esta fruta es común en casi todas las zonas del país, y es parte importante de la canasta familiar (Miranda et al., 2009). Por su parte, el maíz (*Zea mays*) es uno de los renglones más importantes de la producción agrícola nacional y se encuentra difundido en todas las regiones naturales del país, gracias

a su especial adaptación a diversas condiciones agroclimáticas y socioeconómicas (FENALCE, 2010). Debido a la importancia de estos cultivos para la economía nacional, se evaluó el efecto de *Bacillus subtilis* EA-CB0575, promotor de crecimiento vegetal, en diferentes concentraciones  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL y el sobrenadante libre de células proveniente de la fermentación del microorganismo, en cultivos de maíz y tomate. Además, se analizaron y estudiaron los compuestos presentes en los sobrenadantes libres de células evaluados. Esto con el fin de determinar si la inoculación ayuda a mejorar el crecimiento de las especies vegetales en estudio y permiten un mejor desarrollo del cultivo a nivel de invernadero.

# Objetivos

## Objetivo general

Evaluar el efecto del *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento vegetal de maíz (*Zea Mays*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) a nivel de invernadero.

## Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la inoculación de esporas y células vegetativas de *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en dos concentraciones de aplicación sobre las variables fisiológicas de *Zea Mays* a nivel de invernadero
- Evaluar el efecto de la inoculación de esporas y células vegetativas de *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en dos concentraciones de aplicación sobre las variables fisiológicas de *Solanum lycopersicum* a nivel de invernadero.
- Determinar el efecto de la aplicación del sobrenadante del cultivo del *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento en *Zea Mays* y *Solanum lycopersicum* a nivel de invernadero.
- Identificar lipopéptidos reportados para la promoción de crecimiento presentes en el sobrenadante del cultivo del *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en medios de cultivo para producción de esporas y células vegetativas.

# Capítulo 1: Marco Teórico

## 1.1. Cultivo de Maíz

El maíz, *Zea mays* es considerado uno de los cereales más importantes y populares a nivel mundial gracias a sus múltiples beneficios y usos (FAO, 2011). Perteneciente a la familia de las gramíneas, es originario del continente americano y aporta proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas A, B, y C, fibra y sales minerales como potasio, calcio y fósforo (Jiménez, 2012). Puede ser utilizado para consumo humano o animal y para la elaboración de productos industriales, como: harinas, espesantes, jarabes, endulzantes, licores, pegantes, medicamentos, entre otros (Polania Fierro, 2014).

La estructura de la planta está constituida por un tallo erecto principal alto, de consistencia interior filamentosa, carnosa y gran cantidad de agua. Las hojas están dispuestas en posición alterna al tallo y su estructura es lanceolada. La planta puede tener entre 15 y 30 hojas con longitud y ancho variable (FENALCE, 2010; Freeling et al., 1994). El sistema radicular, se compone de una raíz primaria, la cual suministra el anclaje y los nutrientes a la planta, para posteriormente configurar un sistema de raíces adventicias fasciculadas, cuyo desarrollo dependerá de factores como la humedad y las condiciones del suelo (FAO, 2011).

En los países de climas templados y subtropicales son obtenidos los mayores rendimientos por hectárea de este cereal, ya que estas condiciones son las más adecuadas para su desarrollo. En Colombia existen genotipos con alta productividad para ambientes tropicales (Polania Fierro, 2014). Se cultivan dos tipos de maíz, amarillo y blanco, el primero se emplea para el consumo animal e industrial y el segundo para consumo humano (DANE, 2004). En ambos casos es un monocultivo, Se destacan dos sistemas de producción: el tecnificado y el tradicional (DANE, 2004). El sector tecnificado, hace uso de fertilizantes, plaguicidas y semillas certificadas (FENALCE, 2010); mientras que el sector tradicional, se localiza en suelos pobres, dispone de áreas pequeñas para el cultivo, no se realizan planes de fertilización y no usa semillas certificadas, lo que se traduce a rendimientos bajos, y producción para el autoconsumo (DANE, 2004).

*Zea mays*, es la única especie de las Maydeas de importancia económica (Aldrich and Leng, 1965). En Colombia en 2011 se cosecharon 363.693 hectáreas con una producción de 985.567 toneladas, siendo Córdoba y Valle del Cauca los principales productores con un rendimiento de 4,50 y 4,54 toneladas por hectárea respectivamente (DANE, 2011a). De acuerdo con las expectativas de siembra de Fenalce (Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas), para el 2022 habrá un incremento en el área cultivada, alcanzando la 591. 0000 hectáreas cosechadas. A nivel mundial, Se encuentra ampliamente distribuido y lo mayores productores mundiales son EE.UU., China, Brasil, la Unión Europea, Ucrania y México (FENALCE, 2012).

## 1.2. Cultivo de Tomate

*Solanum lycopersicum* es una de las hortalizas de alto valor económico y gran importancia en la alimentación mundial (Escalona et al., 2009; Esquinas-Acazar and Nuez Viñals, 1995)). Representa una fuente de vitaminas y minerales y su demanda aumenta continuamente (Esquinas-Acazar and Nuez Viñals, 1995). Su fruto se destina para el consumo en fresco y como materia prima para elaborar sopas, pastas, entre otros (Corfo, 1986). En Colombia es posible encontrar diversas formas, tamaños y colores de tomates. Los tipos más comunes son, riñón, milano y chonto (Jaramillo et al., 2006).

La estructura de la planta está constituida por un tallo principal grueso, del cual se desarrollan hojas, tallos secundarios e inflorescencias. Su sistema radicular consta de una raíz principal, varias raíces secundarias y raíces adventicias (Jaramillo et al., 2006; Miranda et al., 2009). El fruto es una baya de pulpa tierna y alcalina gracias a su contenido mineral, que puede ser de color rojo, rosado, amarillo o verde y de forma redonda, achatada o alargada. Es cultivado en muchas zonas del mundo, con variedad de climas y suelos. Sin embargo, es una especie sensible a bajas temperaturas (Miranda et al., 2009).

A nivel nacional, existe un área sembrada de 8.383 hectáreas y se producen cerca de 470.000 toneladas anuales siendo Boyacá el principal productor de tomate con 1.385 hectáreas de área sembrada, y un rendimiento del cultivo de 133,8 toneladas por hectárea. A nivel mundial, se cultiva en más de cien países, tanto para consumo fresco como para la industria. Colombia, ocupa el lugar 34 en el mundo en cuanto a producción con 470.000

toneladas anuales y exporta a países como Costa Rica, Panamá, Francia y Cuba (CCI, 2009; DANE, 2011b).

### **1.3. La Rizósfera y las Rizobacterias**

La rizósfera es la región de suelo que rodea y está influenciada por las raíces de las plantas. Es un complejo entorno donde las raíces interactúan con las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Prashar et al., 2013; Richardson et al., 2009). Esta subdividida en tres zonas, la primera, Endorizósfera, que consiste en el tejido de la raíz, incluyendo la endodermis y las capas corticales; la segunda, el rizoplano, la cual es la superficie de la raíz, donde las partículas del suelo y los microbios se adhieren y la Ectorizósfera, es aquella que consiste en el suelo inmediatamente adyacente a la raíz (Prashar et al., 2013). En la rizósfera, se presentan interacciones entre la planta, el suelo y la microfauna. Estas interacciones pueden tener influencias significativas en el crecimiento y desarrollo de las plantas y en el rendimiento de las cosechas. Las plantas pueden liberar compuestos orgánicos como, carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, flavonoides, enzimas, hormonas, lípidos y vitaminas a través de sus raíces los cuales crean un entorno dinámico estimulando el desarrollo de un gran número de microorganismos y la actividad de los mismos en el suelo (Denef et al., 2009; Habibi et al., 2014; Lugtenberg et al., 1999; Siddiqui et al., 2006). Las bacterias que tienen la capacidad de colonizar las raíces de las plantas son denominadas rizobacterias, han tenido una evolución conjunta con las plantas, desarrollando interacciones que pueden generar efectos positivos, neutros o deléteros en el proceso de crecimiento vegetal y el efecto de su aplicación a la planta puede diferir entre especies de planta y prácticas de manejo de cultivos (Habibi et al., 2014; Kloepper et al., 1999).

Los efectos negativos o deletéreos que generan estos microorganismos pueden relacionarse con el retraso del crecimiento aéreo y radicular de las plantas debido a la secreción de fitotóxicas, fitohormonas o a la competencia de nutrientes con otros microorganismos nativos (Siddiqui et al., 2006). Las neutras son aquellas cuya presencia en la planta no afecta ni positiva ni negativamente el desarrollo de la misma (Kloepper et al., 1999; Prashar et al., 2013; Vessey, 2003). Y aquellas que poseen efectos positivos en el desarrollo de la planta son conocidas como PGPR, *rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal*, las cuales permiten la productividad de los cultivos y el mejoramiento de la nutrición de la planta (Siddiqui et al., 2006).

## 1.4. Las Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

PGPR, por sus siglas en inglés, fueron definidas por primera vez por Kloepper y Schroth (1978) para describir las bacterias del suelo que colonizan la rizósfera de las plantas, las cuales, mejoran las características biológicas y químicas de cultivos hortícolas y estimulan su crecimiento (Kloepper and Schroth, 1978; Perez-Montano et al., 2014). Las PGPRs, incluyen un amplio grupo de géneros bacterianos, como, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Burkholdaria*, *Rhizobium* y *Erwinia* (Habibi et al., 2014; Lucy et al., 2004). De los cuales, *Pseudomonas* y *Bacillus* son los microorganismos mayormente utilizados para la producción de inoculantes bacterianos a nivel comercial (Gobelak et al., 2015).

Las PGPR pueden estimular el crecimiento de las plantas mediante diferentes mecanismos como los son, la fijación de nitrógeno, la producción de sustancias como compuestos volátiles o fitohormonas (fitoestimulación), adquisición de nutrientes por parte de la planta (biofertilización) por medio de la solubilización de fosfatos, la secreción de sideróforos o la reducción del daño causado por enfermedades mediante la inhibición del crecimiento de patógenos a través de la producción de compuestos químicos diversos (Boddey and Dobereiner, 1988; Chabot et al., 1996; Compant et al., 2005; Mendes et al., 2013). Existen diversos reportes donde las respuestas a la inoculación de PGPRs en plantas mono y dicotiledóneas han sido exitosas (Bashan et al., 2010; Dobereiner et al., 1995; Loredó Osti et al., 2004; Perez-Montano et al., 2014; Seldin et al., 1998). Se ha observado un incremento en la biomasa, desarrollo en sistemas radiculares y producción de cultivos de interés comercial como papa, tomate, trigo maíz y soya (Bashan, 1998; Kumar et al., 2011; Martínez et al., 2013; Prashar et al., 2013). Respecto al mecanismo de control biológico existen reportes donde se confirma la capacidad de las PGPRs para reducir el desarrollo de enfermedades causadas por hongos, nematodos y bacterias (Asaka and Shoda, 1996; Hamdan et al., 1991; Kloepper et al., 1981). La mayoría de estos están relacionados con patógenos del suelo, sin embargo, algunas PGPRs tienen la capacidad de inducir resistencia sistémica, reduciendo el impacto de ciertas enfermedades foliares (Bakker et al., 2007).

## 1.5. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las rizobacterias pueden promover el crecimiento de las plantas por medio de diferentes mecanismos directos e indirectos (Kloepper et al., 1981). A continuación se presentan algunos detalles de ambos mecanismos.

### 1.5.1. Mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal

Los mecanismos directos de promoción de crecimiento son aquellos en los que las rizobacterias producen compuestos capaces de estimular el crecimiento vegetal o facilitan la absorción de nutrientes (Prashar et al., 2013; Siddiqui et al., 2006). A continuación se explican algunos de estos mecanismos:

- **Fijación de nitrógeno**

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico es un proceso mediante el cual algunas especies bacterianas, tanto simbióticas como no simbióticas, utilizan la enzima nitrogenasa para convertir el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en amoníaco (Denton et al., 2009). Entre las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno se encuentran, *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, y *Sinorhizobium*, las cuales, se asocian principalmente con leguminosas para formar nódulos, donde cada simbiote obtiene beneficios, la planta asimila el nitrógeno en forma de compuestos orgánicos nitrogenados y la bacteria obtiene refugio y malato para las principales rutas del metabolismo, como el ciclo de Krebs (Bach Álvarez and Díaz, 2008; Calvo García, 2011). Entre las bacterias no simbióticas fijadoras de nitrógeno, se han reportado principalmente, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Hayat et al., 2010; Vessey, 2003). Recientemente se ha planteado el uso de PGPRs como una alternativa viable para reducir el uso de fertilizantes nitrogenados a nivel agrícola, ya que estos microorganismos se encargan de promover el crecimiento de las plantas a través de la fijación biológica del nitrógeno (Pedraza, 2008).

- **Solubilización de fosfatos**

La solubilización del fósforo, se ha relacionado a la transformación de fosfatos orgánicos e inorgánicos a formas solubles por la planta. El fósforo es uno de los elementos químicos esenciales, este compuesto, forma parte de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), del metabolismo energético (ATP) y da flexibilidad a las membranas celulares. Es uno de los

nutrientes más importantes para la planta, Sin embargo, la concentración de fósforo disponible en el suelo es muy baja y sus formas asimilables como aniones  $H_2PO_4^-$  y  $HPO_4^{2-}$  es escasa. Algunos microorganismos del suelo tienen la capacidad producir ácidos orgánicos o enzimas como fosfatasa, fitasa, fosfonatasa y liasa C-P para solubilizar porciones de P insoluble (de Freitas et al., 1997; Jayakumar and Tan, 2005). La producción y liberación a la rizósfera de estos ácidos, provocan la acidificación del suelo e incrementan directamente la solubilidad de los fosfatos. Las enzimas por su parte cumplen diferentes funciones, las fosfatasa participan en la desfosforilación de los grupos fosfoéster unidos a la materia orgánica, las fitasa, catalizan el proceso de hidrólisis del ácido fítico liberando de forma secuencial hasta seis grupos ortofosfatos libres y las fosfonatasa y C-P liasa, participan en la ruptura del enlace carbono- fósforo de los organofosfonatos (Rodríguez et al., 2006). Entre los microorganismos solubilizadores de fosfato se destacan los generos, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azospirillum* (Hayat et al., 2010; Paredes-Mendoza and Espinosa-Victoria, 2010).

- **Producción de reguladores de crecimiento vegetal**

La producción de reguladores de crecimiento vegetal, activan varias respuestas en la célula, entre ellas, el desarrollo y la regulación de muchos parámetros fisiológicos e incrementar la resistencia a diversos factores ambientales. Los reguladores del crecimiento se pueden dividir en cuatro grupos, auxinas, giberelinas, inhibición del etileno y citoquininas.

La auxina más estudiada es el ácido indol acético (AIA) debido a su efecto en la promoción de crecimiento de las plantas mediante el aumento en la capacidad de anclaje a la tierra, la mejora en la captación de nutrientes y por ende en su capacidad de supervivencia (Patten and Glick, 2002). Las giberelinas pueden incrementar el crecimiento de los tallos, interrumpir el periodo de latencia de las semillas para germinar. La inhibición del etileno puede promover el crecimiento vegetativo y de las raíces y puede tener un efecto en la reducción de síntomas por ataque de patógenos. Su inhibición puede ser estimulada por la presencia de altas concentraciones de auxinas, giberelinas o citoquininas.

Por último, las citoquininas regulan la citoquinesis de las células vegetales y son derivadas de las amino purinas (Camelo et al., 2011). Varios géneros bacterianos han sido reportados como productores de reguladores de crecimiento, para la producción de auxina, se destacan *Azotobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. (Ahmad et al., 2008), y para la producción de giberelinas se han estudiado microorganismos como *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* y *Bacillus* sp (Bottini et al., 2004).

### **1.5.2. Métodos indirectos de promoción de crecimiento vegetal**

Los mecanismos indirectos de promoción de crecimiento son aquellos en los que las rizobacterias actúan como agentes de biocontrol para reducir enfermedades o para proteger las plantas de la degradación causada por suelos que han sido contaminados. Estos mecanismos son: la producción de sideróforos, la producción de compuestos antimicrobianos, y la resistencia sistémica inducida (Siddiqui et al., 2006). A continuación se explican algunos de estos mecanismos:

- **Producción de sideróforos**

La producción de sideróforos por rizobacterias puede considerarse un mecanismo de promoción de crecimiento tanto directo como indirecto. El hierro es un nutriente fundamental para el desarrollo y crecimiento de las plantas, pero, este no se encuentra de manera directa en la rizósfera, por lo tanto los microorganismos deben sintetizar o producir los sideróforos para hacer asimilable este micronutriente esencial (Siddiqui et al., 2006). Los sideróforos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular con alta capacidad para capturar el hierro en forma de  $Fe^{3+}$  como parte de sales e hidróxidos de baja solubilidad. Estas pequeñas moléculas, actúan de manera específica como agentes quelantes para secuestrar hierro en presencia de otros metales y reducirlo a  $Fe^{2+}$ , una forma mucho más soluble y aprovechable para las plantas (Aguado-Santacruz et al., 2012). Son diversos los estudios en el tema (Barona-Gomez et al., 2006; Muller and Raymond, 1984).

- **Producción de Antibióticos**

La producción de antibióticos es uno de los mecanismos más efectivos empleados por las PGPR para suprimir las enfermedades asociadas a los cultivos (Glick and Pasternak, 2003; Kinsella et al., 2009). Los antibióticos son compuestos que permiten a la bacteria minimizar la competencia con otros microorganismos, estos, comprenden un grupo de compuestos orgánicos microbianos de bajo peso molecular deletéreos para otros organismos (Raaijmakers et al., 2002). *Pseudomonas fluorescens* y las especies del género *Bacillus* juegan un papel muy importante como agente de biocontrol (Siddiqui, 2006). *B. subtilis* produce varias clases de antibióticos entre ellos: micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, surfactinas, micosubtilinas, fungistatinas, subporinas fenazinas, pioluteorinas, pirrolnitrinas, tropolonas, piocianinas, kanosamina y zwittermina A; los cuales, son eficaces supresores de patógenos en las plantas, como *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*,

*Sclerotinia*, *Laseptoriosis* y *Verticillium* (Kinsella et al., 2009). En el numeral 4.7 se presenta una revisión detallada del tema.

## **1.6. *Bacillus* spp. Promotor del crecimiento vegetal**

Los microorganismos del género *Bacillus* spp. representan una amplia variedad de bacterias del suelo, Gram positivas, aerobias estrictos o anaerobias facultativas y pertenecen al grupo de las bacterias formadoras de endospora (BAFEs). Son un grupo de bacterias que tienen la capacidad de resistir a condiciones climáticas adversas como temperatura extrema, radiación UV, agentes oxidantes y corrosivos, sequías, fuertes lluvias, y procesos de esterilización debido a su potencial de formación de esporas (Bai et al., 2002; Bashan et al., 2010; Schulz et al., 2006; Vessey, 2003). Además, este género es considerado como una fábrica microbiana para la producción de una amplia gama de moléculas biológicamente activas y potencialmente inhibitorias para el crecimiento de fitopatógenos (Ongena and Jacques, 2008).

En el ciclo de vida de estos microorganismos se destacan dos morfologías celulares, las células vegetativas y las esporas. Las células vegetativas colonizan el suelo hasta alcanzar altas densidades poblacionales y las esporas sobreviven a condiciones extremas gracias a sus formas latentes extremadamente resistentes (Errington, 2003). La formación de esporas en *B.subtilis* se da por una serie de mecanismos en los cuales la presencia de nutrientes como el nitrógeno, carbono y fósforo pueden inducir la esporulación, lográndose la producción de esporas en la fase estacionaria de crecimiento cuando los nutrientes se agotan (Sonenshein, 2000). La Figura 1-1 describe el proceso de esporulación de *B. subtilis*. La célula en estado vegetativo deja de crecer y se forman dos tipos de célula la pre-espora y el esporangio, mediante una mitosis asimétrica (Estadio II), posteriormente se forma un septo subpolar en la pre-espora (Estadio III), surge una corteza entre la membrana interna y externa dentro del esporangio (Estadio IV) y se forman las capas de la cubierta de la espora (Estadio V), cuando la espora ha madurado (Estadio VI) se produce la lisis celular del esporangio (Estadio VII) y finalmente la espora es liberada (Errington, 2003).

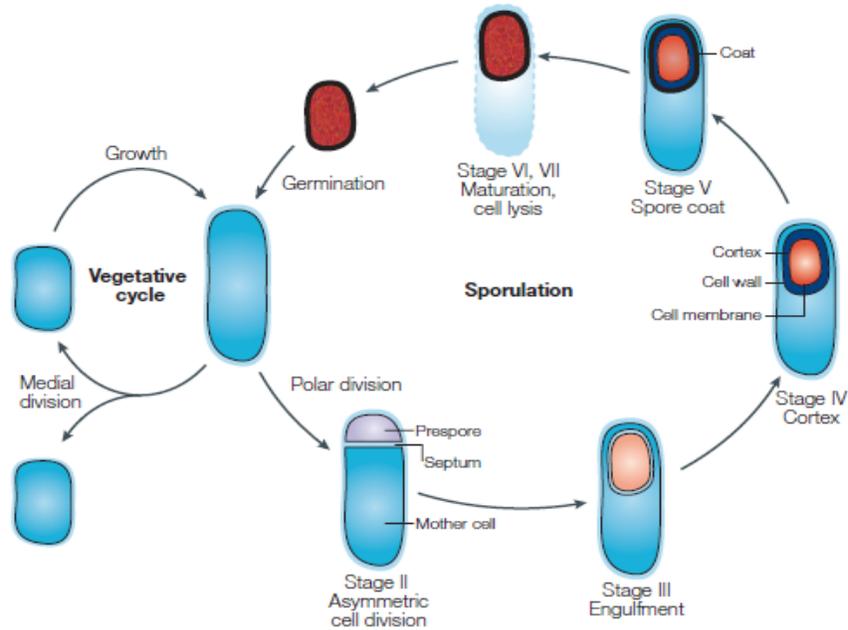


Figura 1-1. Ciclo de esporulación de *B. subtilis* (Errington, 2003).

Los microorganismos de este género, son consideradas algunos de los mejores candidatos para el desarrollo de productos biopesticidas y biofertilizantes eficientes desde un punto de vista tecnológico por su capacidad para producir esporas resistentes lo que hace que los productos tengan larga vida de anaquel y su formulación y producción sea más fácil (Earl et al., 2008; Hamdache et al., 2011). Entre ellos, se destacan las cepas de *B. subtilis* como los más utilizadas para la promoción de crecimiento y para controlar enfermedades cuando se aplica desde semillas hasta a plántulas (Kokalis-Burelle et al., 2005). Actualmente, existen el mercado algunos productos biológicos cuyo componente activo es este microorganismo, entre ellos se encuentran Serenade®, Rhapsody® y Bioraiz® (Serrano et al., 2013).

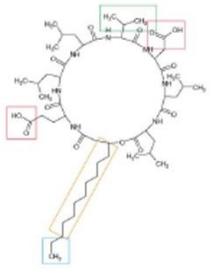
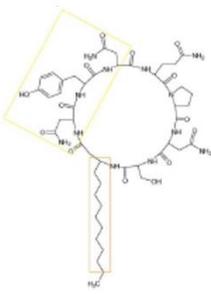
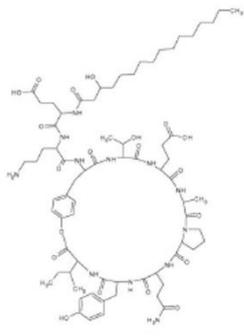
## 1.7. Metabolitos secundarios producidos por *B. subtilis*

*B. subtilis* es una especie bacteriana muy diversa, capaz de crecer dentro de muchos entornos (Earl et al., 2008). Se destaca por su capacidad para producir una amplia gama compuestos estructuralmente diversos con fuertes propiedades antifúngicas, baja toxicidad y alta biodegradabilidad (Chen et al., 2008; Stein, 2005). Entre estos compuestos, se encuentran los lipopéptidos cíclicos (LPs), los cuales han sido ampliamente estudiados por su actividad antagonista contra un gran rango de fitopatógenos bacterianos, fúngicos y

oomicetos como *M. fijiensis*, *R. solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *F. oxysporum* y *Pythium aphanidermatum* (Carrillo et al., 2003; Leclere et al., 2005; Ongena and Jacques, 2008).

Estos LPs son de bajo peso molecular y anfifílicos, se clasifican en tres familias: surfactinas, iturinas y fengicinas. Cada familia, posee un heptapéptido cíclico de siete ácidos grasos en el caso de las iturinas y las surfactinas o 10 ácidos grasos en el caso de las fengicinas (Raaijmakers et al., 2010). En cuanto a sus funciones las iturinas, se destacan por la eficacia contra una amplia variedad de patógenos importantes, como levaduras y algunos son potentes agentes fungicidas, sin embargo su actividad antibacteriana es baja. Las surfactinas por su parte, son conocidas por su gran actividad, antiviral y antibacteriana y su limitada actividad antifúngica esta familia, es un poderoso biosurfactante, y como tal disminuye la tensión superficial, actúa como un excelente detergente, emulsionante y ayuda a la formación de biopelículas. Las fengicinas, poseen una fuerte actividad antifúngica principalmente contra hongos filamentosos (Fahim et al., 2012; Falardeau et al., 2013). Estos compuestos antimicrobianos proveen a la planta protección mediante diferentes mecanismos, directos e indirectos, tales como colonización de las raíces de las plantas, inducción de resistencia sistémica y antagonismo directo contra diversos microorganismos (Ongena and Jacques, 2008). Los mecanismos directos son aquellos en los que los lipopéptidos tienen contacto directo con la membrana celular de los fitopatógenos de la planta, provocando la formación de poros en la misma y como consecuencia un desbalance osmótico y los mecanismo indirectos son aquellos donde al detectar la presencia de un microorganismo patógeno se induce a la resistencia de la planta huésped (Falardeau et al., 2013; Perez-Garcia et al., 2001). En la Tabla1-1 se resumen algunas de sus funciones y evaluaciones en diferentes cultivos agrícolas.

Tabla 1-1. Descripción de los LPs producidos por *B.subtilis*: Surfactinas, Iturinas y Fengicinas

Lipopéptidos	Estructura	Isoformas	Función y Antibiosis	Microorganismo patógeno y cultivo evaluado	Referencia
 <p><b>Surfactinas</b></p>	<p>Heptapéptido cíclico con un ácido graso <math>\beta</math>-hidroxilo y una cadena de átomos de carbono de 13 a 16</p>	<p>surfactina, esperina, lichenisina y pumilacidina</p>	<p>Alta actividad surfactante y hemolítica. Alta actividad antiviral y antibacterial. Limitada actividad antifúngica</p>	<p><i>Fusarium verticillioides</i>, maíz</p>	<p>(Falardeau et al., 2013; Hu et al., 2009; Maget-Dana et al., 1992; Raaijmakers et al., 2010b).</p>
 <p><b>Iturinas</b></p>	<p>Heptapéptido cíclico con un ácido graso <math>\beta</math>-amino de 14 a 17 carbonos de largo.</p>	<p>iturina A, C, D y E; bacilomicina D, F y L y mycosubtilina</p>	<p>Alta actividad hemolítica Alta actividad antifúngica. Limitada actividad antiviral y antifúngica.</p>	<p><i>Podosphaera fusca</i> en manzana</p>	<p>(Falardeau et al., 2013; Raaijmakers et al., 2010b; Romero et al., 2007).</p>
 <p><b>Fengicinas</b></p>	<p>Decapéptido con anillo interno de lactona en la fracción peptídica y un ácido graso <math>\beta</math>-hidroxilo de C14-C18 que puede ser saturado o insaturado.</p>	<p>fengicina A, B y C</p>	<p>Limitada actividad hemolítica Alta actividad antifúngica especialmente contra hongos filamentosos.</p>	<p><i>Fusarium verticillioides</i>, maíz <i>Botrytis cinerea</i>, manzana</p>	<p>(Falardeau et al., 2013; Hu et al., 2009; Ongena et al., 2005; Toure et al., 2004; Villegas-Escobar et al., 2013).</p>

\*La figuras fueron tomadas de (Ongena and Jacques, 2008).

## 1.8. Antecedentes del proyecto de investigación

### 1.8.1. Antecedentes de trabajos en el tema a nivel mundial

A nivel mundial, se han reportado diferentes trabajos relacionados con la evaluación de las PGPR en cultivos de maíz y tomate. En la Tabla 1-2 se presenta un resumen de algunos estudios relacionados.

Tabla 1-2. Publicaciones relacionadas con PGPR en cultivos de Maíz y Tomate.

Año	Descripción de la investigación	Resultado	Autores
2008	Comparación del efecto promotor de crecimiento de <i>B. subtilis</i> y <i>P. aeruginosa</i> en cultivos de tomate, okra y espinaca africana.	El peso seco de los tres cultivos aumentó 31% para tomate, 36 % y 29 % para okra y 83 % y 40 % para la espinaca Africana cuando se inoculo con ambos microorganismos respecto al control. Sin embargo no hubo diferencias significativas entre los microorganismos evaluados.	(Adesemoye et al., 2008)
2011	Evaluación de los efectos de la inoculación de varias cepas de <i>B.subtilis</i> sobre plantas de maíz respecto a la aplicación de nitrógeno y su relación con el rendimiento y el índice de cosecha del cultivo.	Fueron evaluadas 5 cepas de <i>B.subtilis</i> de las cuales una presento diferencias significativas respecto al control (fertilizantes nitrogenado) aumentando en un 32% el rendimiento total.	(Dadnia, 2011)
2013	Evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento bajo diferentes esquemas de fertilización en el cultivo de maíz.	la inoculación individual y en consorcio de la cepa <i>B.subtilis</i> MF5 con una fertilización química de NK, incrementaron el peso seco del grano en 130 y 403%, el contenido de N en 463 y 116%, y el de P en 152 y 376%, respectivamente, logrando un aumento en la producción del grano de maíz y su calidad.	(Valery and Reyes, 2013)
2013	Evaluación del efecto promotor de crecimiento y la de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>B. subtilis</i> en semillas de tomate para combatir el tizón temprano y tardío.	<i>T. harzianum</i> presentó un aumento en longitud radicular 38%, área foliar 32,%y peso fresco radical 58% y <i>Bacillus subtilis</i> tuvo incrementos en estas mismas variables del 28, 47 y 50% respectivamente comparado con control sin inoculación.	(Chowdappa et al., 2013)

### **1.8.2. Trabajos realizados por el grupo de investigación**

El desarrollo actual de los cultivos hace necesario explorar diferentes formas de fertilización y control de enfermedades. Hace algunos años se vienen desarrollando proyectos cuyo fin es emplear biofertilizantes a partir de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, grupo en el cual se encuentran reportadas algunas cepas de *Bacillus spp.* (Bashan, 1998; Errington, 2003; Guo et al., 2004a). De acuerdo a lo anterior, la Universidad EAFIT y la Asociación de bananeros de Colombia (AUGURA), se encuentran trabajando desde hace varios años en productos biológicos que tengan como componente activo a *B. subtilis* EA-CB0575 para complementar, y en un futuro reemplazar en alguna proporción el uso de los productos químicos y fertilizantes utilizados en el cultivo de Banano.

*B. subtilis* EA-CB0575 fue aislado de la rizósfera de una planta de banano *Musa* AAA cv. Valery por Ramírez en 2009. Posteriormente, Posada en 2012, evaluó el efecto de su inoculación en diferentes concentraciones y tiempos de inoculación sobre plantas de *Musa* AAA cv. Williams a nivel de invernadero y Cuellar Gaviria, evaluó en 2014 el efecto de la inoculación del microorganismo sobre la promoción del crecimiento en cultivos de banano, crisantemo y café. En ese mismo año, Ochoa Gómez, evaluó el efecto de la inoculación de *B. subtilis* EA-CB 0575 en la promoción de crecimiento empleando los sobrenadantes libres de células del microorganismos de estudio y estudió el control biológico de Sigatoka negra en *Musa* AAA cv. Variedad Williams.

# **Capítulo 2: Evaluación del efecto de la inoculación de esporas y células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 sobre las variables fisiológicas de *Zea mays* a nivel de invernadero**

## **2.1. Resumen**

El maíz se ha convertido en uno de los cereales más importantes y consumidos en el mundo (FAO, 2011). En su cultivo se utilizan fertilizantes químicos para cumplir con la demanda alimentaria actual ya que en el mundo se consumen cerca de 970 toneladas de este producto (ICG, 2016). Se ha estudiado el papel de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal como una alternativa para contrarrestar los efectos ocasionados por el abuso en el uso de los fertilizantes químicos. Con el fin de determinar las concentraciones y estructuras bacterianas que promuevan el crecimiento de maíz, se evaluó la rizobacteria *B. subtilis* EA-CB0575 en forma de esporas y células vegetativas en  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL a nivel de invernadero. Se evaluaron las variables de respuesta Longitud aérea (LA), peso seco aéreo (PSA), peso seco radical (PSR) y peso seco total (PST). Se encontró que la inoculación del microorganismo, ya sea como esporas ó células vegetativas, y en las dos concentraciones evaluadas, incrementa el crecimiento y desarrollo de las plantas respecto al control absoluto sin inoculación.

## 2.2. Introducción

El maíz es uno de los cereales de más importancia a nivel mundial. Este cultivo ocupa el segundo lugar en el mundo en producción, es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea y es un insumo clave para la industria por ser una materia prima en la alimentación humana, el alimento para el ganado y diversos productos industriales (FAO, 2011). Durante la última década, su consumo se ha incrementado más de un 35% y su cultivo continúa expandiéndose a nuevas áreas y ambientes gracias al crecimiento de la industria del etanol en Estados Unidos, la evolución de los países asiáticos, la recuperación de la industria aviar, los nuevos mercados y el aumento de la población (FENALCE, 2010).

El requerimiento nutricional de esta gramínea es alto, los elementos del suelo que utiliza en mayores cantidades son nitrógeno (N), potasio (K) y fósforo (P), los cuales forman parte de la mayoría de los fertilizantes químicos (Beg, 2000). Según estudios de FENALCE en el 2008, el elemento más importante para la producción de maíz es el nitrógeno, ya que de este depende en gran medida su desarrollo. En Colombia se requieren en promedio de 120 a 180 Kg/ha de este nutriente, incrementando potencialmente los costos de producción y la carga contaminante (FAO, 2011; FENALCE, 2008).

En las últimas décadas, ha sido investigado ampliamente el papel de las rizobacterias promotoras del crecimiento en diversas gramíneas como caña de azúcar (Boddey et al., 1994), cebada, pastos tropicales (Dobereiner et al., 1995) y maíz (Seldin et al., 1998). Estos microorganismos, tienen la capacidad de asociarse con las plantas para aumentar su crecimiento, mejorar su desarrollo y protegerlas contra otros microorganismos del suelo que causan enfermedades (Grobela et al., 2015). Gracias a sus múltiples beneficios, existe una gran posibilidad de ser utilizados a gran escala como biofertilizantes en cualquier sistema de producción agrícola, reduciendo de esta forma los principales impactos negativos asociados al continuo uso de fertilizantes químicos (Hernández Montiel and Escalona Aguilar, 2003). Menhaz en 2010, aisló y caracterizó tres microorganismos promotores de crecimiento de la rizósfera de maíz, *E. cloacae*, *S. maltophilia* y *P. putida*, con los cuales evaluó la promoción de crecimiento en este cultivo y presentando efectos benéficos respecto al aumento del peso seco de las raíces en un 20% respecto al control (Mehnaz et al., 2010). Otros autores reportan la influencia de *P. alcaligenes*, *B. polymyxa* y *Mycobacterium phlei* en el mismo cultivo y en dos tipos de suelo diferentes, concluyendo que estos microorganismos estimulan la absorción del nitrógeno, fósforo y potasio en suelos donde la disponibilidad de nutrientes es deficiente (Egamberdiyeva, 2007).

El presente trabajo se centra en la evaluación de efecto de la inoculación del microorganismo *B.subtilis* EA-CB 0575 en las variables fisiológicas de maíz a nivel de invernadero. Para esto, se realizará la evaluación del cultivo bacteriano en forma de esporas y células vegetativas y además se determinará el efecto de su inoculación en las concentraciones  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL.

## **2.3. Materiales y métodos**

### **2.3.1. Localización del ensayo**

El proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología y en el invernadero de promoción de crecimiento de la Universidad EAFIT, Medellín. Colombia.

### **2.3.2. Microorganismo y proceso de activación**

Se empleó el microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575 aislado en trabajos realizados previamente por la Universidad EAFIT-AUGURA de la rizósfera de una planta de banano, *Musa AAA* cv. Valery, en la finca La Navarra, ubicada en el municipio de Carepa en el Urabá antioqueño, Colombia. El microorganismo fue conservado en TSB (“Tryptic Soy Broth”, Merck) y glicerol (20% v/v) a  $-80^{\circ}\text{C}$  e identificado molecularmente por medio de la secuenciación del gen 16s rDNA (Ramírez, 2011). La cepa bacteriana, fue activada en medio TSA (“Tryptic Soy Agar”, Merck) al 50% a  $30^{\circ}\text{C}$  por 24 horas antes de su uso experimental.

### **2.3.3. Medios de cultivo**

Para el cultivo líquido del microorganismo se prepararon 2 medios de cultivo: medio SBM y medio TSB, cuyos componentes se encuentran en el Anexo 1. El medio de cultivo SBM modificado (Posada, 2012) fue utilizado para la producción de esporas y el medio de cultivo TSB (“Tryptic Soy Broth”, Merck) se empleó para la producción de células vegetativas. Adicionalmente se empleará el medio TSA para activación del microorganismo.

#### **2.3.4. Fermentación del microorganismo a nivel de matraz**

Para el cultivo de las esporas o células vegetativas del microorganismo se prepararon preinóculos de 20 mL en Erlenmeyer de 100 mL y se dejaron en agitación por 12 horas a 30°C y 150 rpm. Estos cultivos se transfirieron a 180 mL de medio de cultivo TSB en Erlenmeyer de 1L, para los tratamientos con células vegetativas, o 180 mL de medio SBM modificado, para los tratamientos con esporas (Posada, 2012). Los cultivos se agitaron a 150 rpm y 30°C por un período de 24 horas para el caso de tratamientos con células vegetativas y 72 horas en el caso de los tratamientos con esporas.

- **Obtención de esporas y células vegetativas en diferentes concentraciones**

Cumplido el tiempo de fermentación se realizó un choque térmico al cultivo sometiéndolo a 80°C durante 20 minutos para asegurar la muerte de las células vegetativas presentes. Posteriormente se procedió a la separación de la biomasa del cultivo por medio de centrifugación a 4500 rpm por 15 minutos. El sobrenadante del cultivo se descartó y el pellet se resuspendió en agua destilada estéril (ADE) hasta concentración de  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL de acuerdo con la curva de calibración absorbancia vs UFC/mL (**Anexo 2**) El mismo procedimiento de ajuste de la concentración empleando la curva de calibración se realizó para las células vegetativas pero en este caso no se realizó choque térmico sino que se procedió directamente al ajuste de la densidad óptica.

#### **2.3.5. Material vegetal**

Se utilizaron semillas de maíz (ICA V-109 amarillo R) de Agrosemillas S.A., estas se trataron con etanol al 70% durante 10 minutos e hipoclorito de sodio al 5% (v/v) por 15 min y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril (ADE) de 5 minutos cada uno, además, se utilizó vacío para facilitar el proceso de desinfección del material. Luego, el material, se dispuso para su pregerminación, por un período tres días en oscuridad en cajas de Petri con papel absorbente previamente esterilizado. Una vez pregerminadas estas semillas fueron empleadas para la evaluación a nivel de invernadero.

### 2.3.6. Inoculación del *B. subtilis* EA-CB0575 en las plantas de *Zea mays* a nivel de invernadero

Las semillas desinfectadas y pregerminadas se inocularon con los tratamientos correspondientes Tabla 2-1. La inoculación se realizó sumergiendo las semillas en las soluciones por un periodo de 1 hora y llevando a un shaker a 150 rpm. Una vez cumplido este tiempo, las semillas se sembraron en macetas con 400 gr de sustrato estéril compuesto por una mezcla de 1:0.5:1:0.5 de arena, orgánicos, tierra y cisco de arroz, las cuales se dispusieron en forma aleatoria en el invernadero y permanecieron allí por 2 meses. Este ensayo se realizó bajo las condiciones medioambientales de la ciudad de Medellín, Temperatura media 24°C, luminosidad 12h/12h y humedad relativa 55%.

Tabla 2-1. Tratamientos para la evaluación de la inoculación de esporas y células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en las variables fisiológicas de *Zea mays* a nivel de invernadero.

Tratamiento	Descripción de los tratamientos
TSB 10 <sup>7</sup>	Células vegetativas de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 en una concentración de 1*10 <sup>7</sup> UFC/ mL
TSB 10 <sup>8</sup>	Células vegetativas de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 en una concentración de 1*10 <sup>8</sup> UFC/ mL
SBM 10 <sup>7</sup>	Esporas de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 en una concentración de 1*10 <sup>7</sup> UFC/ mL
SBM 10 <sup>8</sup>	Esporas de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 en una concentración de 1*10 <sup>8</sup> UFC/ mL
Control Agua	Control absoluto (agua destilada estéril)

Luego de 2 meses de crecimiento en invernadero, las plantas se desprendieron de las macetas y sustrato de cultivo, se lavaron con abundante agua y se dividió la parte aérea (hojas y pseudotallo) y la parte radicular (raíz). Las variables fisiológicas evaluadas se indican en la Tabla 2-2.

Tabla 2-2. Variables de crecimiento en evaluación para determinar el efecto de la inoculación de esporas, células vegetativas y sobrenadante libre de células en los cultivos de *Zea mays* a nivel de invernadero

Variable	Descripción	Unidad
LA	se realizará una medición de la distancia desde el pseudotallo y la hoja de mayor longitud *	cm
PSA	Las muestras serán secadas en un horno a 60°C durante tres días, transcurrido este tiempo se pesará la parte aérea seca de cada planta*	gr
PSR	Las muestras serán secadas en un horno a 60°C durante tres días, transcurrido este tiempo se pesará la parte radicular seca de cada planta*	gr
PST	Sera realizada una sumatoria entre el peso seco aéreo y el peso seco radicular de cada planta	gr

\*Se empleó un flexómetro en la medición de la longitud aérea. \*\*Todos los pesos se determinaron con una balanza electrónica con una resolución de 0.01g.

### 2.3.7. Análisis estadístico de los datos

Para la evaluación de la promoción de crecimiento, la concentración y estructura efectiva de *B. subtilis* EA-CB0575, se realizaron 3 ensayos unifactoriales en tiempos independientes y a nivel de invernadero, los cuales constaron de 3 unidades experimentales por tratamiento, cada una con tres plantas. Los resultados obtenidos de las variables de crecimiento, se analizaron estadísticamente haciendo uso de software Statgraphics Centurion XV. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de 95%. Para evaluar las diferencias significativas entre los tratamientos evaluados y las variables de promoción de crecimiento, se realizó un análisis de rangos múltiples LSD. La verificación de supuestos de normalidad de residuales, igualdad de varianzas e independencia de residuos se realizó por medio de los test de Kolmogorov, Levene y de la gráfica de residuos vs. Orden de corrida. En el caso de los datos que no cumplieron con los supuestos se realizó un análisis no paramétrico por medio del test de Kruskal Wallis con un nivel de confianza del 95%. Con los resultados obtenidos se realizaron tres análisis diferentes, los cuales se presentan a continuación:

**Análisis 1:** Con el fin de evaluar la promoción de crecimiento *B. subtilis* EA-CB0575 en los diferentes tratamientos inoculados se utilizó como factor de estudio el tratamiento inoculado en los niveles: células vegetativas en una concentración de  $10^7$  UFC/mL, células

vegetativas en una concentración de  $10^8$  UFC/m, esporas en una concentración de  $10^7$  UFC/mL, esporas en una concentración de  $10^8$  UFC/mL y el control absoluto compuesto por agua destilada estéril. Se realizaron las comparaciones con el fin de determinar diferencias entre tratamientos. Para este análisis se compararon todos los tratamientos con el fin de conocer los de mayores o menores efectos de promoción respecto al control sin aplicación del microorganismo en sus diferentes formas y concentraciones.

**Análisis 2:** Para determinar la concentración efectiva del microorganismo, se realizó la evaluación de la concentración ( $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL) primero para el microorganismo en forma de esporas y luego para el microorganismo en forma de células vegetativas, por separado. Además se evaluó el control absoluto sin inoculación. Los tratamientos evaluados fueron: el control absoluto, el microorganismo en forma de células vegetativas en una concentración de  $10^7$  UFC/mL y células vegetativas en una concentración de  $10^8$  UFC/mL y separadamente, con esto se hizo la primera parte de este análisis y posteriormente, el control absoluto, esporas en una concentración de  $10^7$  UFC/mL y esporas a  $10^8$  UFC/mL para la segunda parte de este análisis.

**Análisis 3:** En el caso de la evaluación de la estructura efectiva del microorganismo, se evaluaron ambas estructuras en las dos concentraciones,  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL. Para ello, se realizó un análisis de los datos empleando los resultados de las aplicaciones del microorganismo en forma de esporas, o células vegetativas en la concentración de aplicación  $10^7$  UFC/mL el factor de estudio fue el tratamiento inoculado en los niveles: células vegetativas en  $10^7$  UFC/mL, esporas en  $10^7$  UFC/mL y control absoluto. Posteriormente, se evaluaron los datos de la concentración de aplicación  $10^8$  UFC/mL tanto para esporas como células vegetativas, el factor de estudio fue el tratamiento inoculado y los niveles: células vegetativas en  $10^8$  UFC/mL y esporas  $10^8$  UFC/mL y control absoluto.

## 2.4. Resultados y discusión

### 2.4.1. Efecto de la aplicación de esporas y células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en dos concentraciones de aplicación en plantas de maíz.

Con el fin de determinar el efecto en la promoción de crecimiento del *B. subtilis* EA-CB0575 en los tratamientos TSB 10<sup>7</sup>, TSB 10<sup>8</sup>, SBM 10<sup>7</sup>, SBM 10<sup>8</sup> (ver Tabla 2-3) se realizaron tres ensayos experimentales, a continuación se presenta un resumen de los resultados obtenidos en cada ensayo.

Las pruebas realizadas con *B. subtilis* EA-CB0575, demostraron que la inoculación del microorganismo en forma de esporas y células vegetativas en diferentes concentraciones tiene un efecto en el crecimiento y desarrollo de la planta de maíz a nivel de invernadero, las variables PSA, PSR y PST fueron consistentes en mostrar resultados positivos en los diferentes ensayos evaluados, con porcentajes de aumento entre el 19 y el 61%, sin embargo, el ensayo 3 no presentó diferencias significativas con el control encontrándose una reproducibilidad del 67% (ver Tabla 2-3).

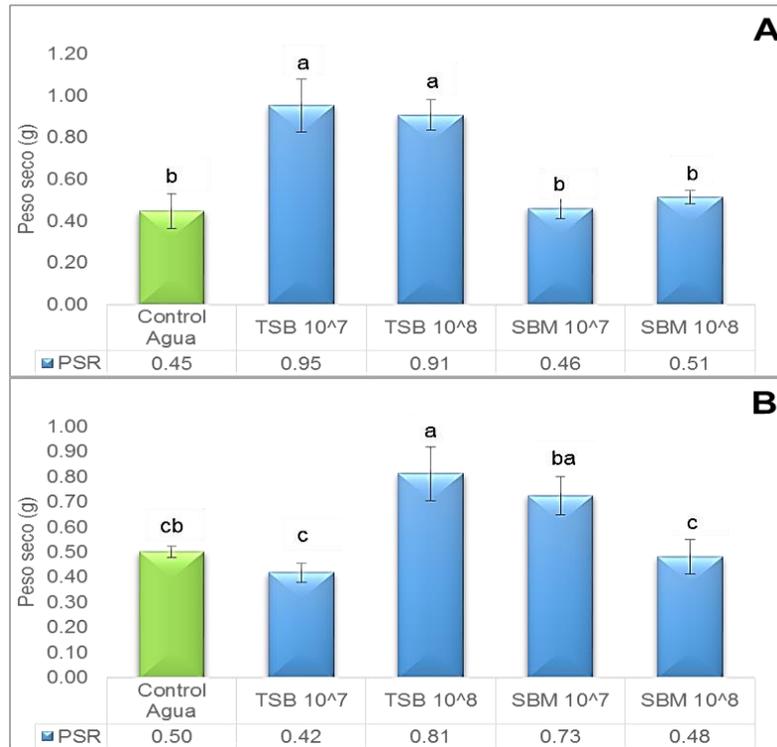
Tabla 2-3. Resumen de los resultados de los tres ensayos realizados para determinar el efecto promotor de crecimiento *B. subtilis* EA-CB0575 sobre las variables fisiológicas de *Zea mays* a nivel de invernadero.

Ensayo	Resultado	Variables	Tratamientos	Aumento (%)	Valor P	Reproducibilidad
1	Hay promoción de crecimiento	LA	TSB 10 <sup>7</sup> , TSB 10 <sup>8</sup> SBM 10 <sup>7</sup> , SBM 10 <sup>8</sup>	23-47	0.0000	67%
		PSA	TSB 10 <sup>7</sup> , SBM 10 <sup>8</sup>	19-21	0.0067	
		PSR	TSB 10 <sup>7</sup> , TSB 10 <sup>8</sup>	51-53	0.0015	
		PST	TSB 10 <sup>7</sup> , TSB 10 <sup>8</sup>	31-40	0.0015	
2	Hay promoción de crecimiento	PSA	TSB 10 <sup>8</sup> , SBM 10 <sup>7</sup>	49-61	0.0361	
		PSR	TSB 10 <sup>8</sup>	38	0.0108	
		PST	TSB 10 <sup>8</sup> , SBM 10 <sup>7</sup>	43-47	0.0046	
3	No hay promoción de crecimiento	No Aplica				

Para el estudio realizado se presentan los resultados de la promoción de crecimiento de la variable PSR (Figura 2-1). En el ensayo 1 los tratamientos con células vegetativas en las concentraciones  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL (TSB  $10^7$ , TSB  $10^8$ ) incrementaron esta variable entre el 51 y 53% respecto al control y los tratamientos con esporas en las diferentes dosis aplicadas al microorganismo (SBM  $10^7$  y SBM  $10^8$ ) no presentaron diferencias significativas. En el ensayo 2, los tratamientos con esporas en las concentraciones  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL y el tratamiento con células vegetativas en  $10^7$  UFC/mL no presentaron diferencias significativas respecto al control, sin embargo el tratamiento con células vegetativas en  $10^8$  UFC/mL presentó un incremento del 38% respecto al control. Los resultados presentados muestran que los tratamientos con células vegetativas fueron consistentes al promover el crecimiento de la planta, sin embargo el incremento en esta variable al inocular las células vegetativas del microorganismo en una concentración de  $10^8$  UFC/mL fue común en ambos ensayos.

Se ha encontrado que las PGPR favorecen el crecimiento de la plantas mediante diversos mecanismos, los cuales, comprenden la solubilización de los nutrientes del suelo, la fijación de iones insolubles y la síntesis de hormonas de crecimiento (Caballero-Mallado, 2006; Compant et al., 2005; Sarabia Ochoa et al., 2010). En estudios realizados, se ha demostrado la capacidad promotora del crecimiento de varias de estas bacterias (Chowdhury et al., 2013; Dey et al., 2004; Lavakush et al., 2014; Mehnaz, 2011; Mia et al., 2010; Vardharajula et al., 2011). Por ejemplo, Dey y colaboradores en 2004, aislaron 9 PGPR del género *Pseudomonas spp.* de la rizósfera de maní y evaluaron el rendimiento del cultivo en campo durante 3 años, finalizado el tiempo, encontraron que tres de los nueve microorganismos incrementaron el rendimiento del cultivo entre un 18 y 28% respecto al control (Dey et al., 2004). En cereales, se ha encontrado beneficiosa la aplicación de estos microorganismos cuando se realiza una adecuada selección de la cepa de estudio (Biswas et al., 2000; Ramirez and Kloepper, 2010; Terouchi and Syono, 1990). Cakmakci y colaboradores en 1999, demostraron que la aplicación de géneros como *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Azospirillum* en sus formas vegetativas incrementan el peso y la absorción de nutrientes de la planta en un cultivo de cebada (Cakmakci et al., 1999), Además, varios estudios relacionados con cereales han puesto de manifiesto que la inoculación de estos microorganismos aumentan los rendimientos de cultivos como arroz, canola, trigo y maíz (de Freitas, 2000; de Freitas et al., 1997; Egamberdiyeva, 2007; Sudha et al., 1999).

Figura 2-1. Peso seco radical de las plantas de maíz inoculadas con células vegetativas y esporas de *B. subtilis* EA-CB0575 en dos concentraciones ( $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL) en los ensayos 1 y 2.



\*Letras diferentes representan diferencias significativas respecto al control según test LSD con  $\alpha=0.05$ . **A.** PSR en el ensayo 1, **B.** PSR en el ensayo 2.

#### 2.4.2. Efecto de la aplicación de dos concentraciones de *B. subtilis* EA-CB0575 en plantas de maíz.

Para determinar el efecto de la concentración efectiva de las células vegetativas y esporas del microorganismo, se evaluaron ambas estructuras en las concentraciones  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL. La Tabla 2-4 presenta un resumen de los resultados obtenidos en los tres ensayos experimentales realizados.

Tabla 2-4. Resumen de los resultados para determinar la concentración de las células vegetativas y esporas de *B. subtilis* EA-CB0575 sobre las variables fisiológicas de *Zea mays* a nivel de invernadero.

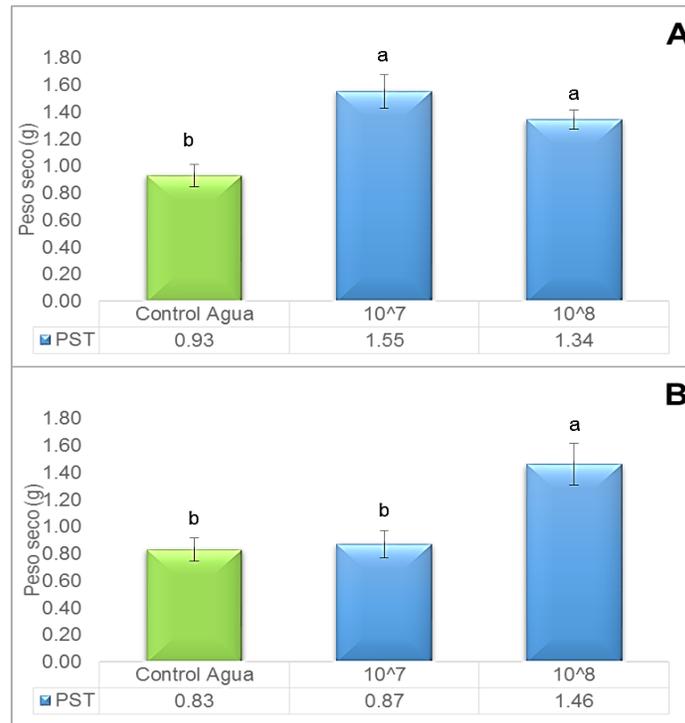
Estructura	Ensayo	Resultado	Variables	Concentración (UFC/mL)	Aumento (%)	Valor P	Reproducibilidad
Células Vegetativas	1	Hay promoción de crecimiento	LA	10 <sup>7</sup> , 10 <sup>8</sup>	35-47	0.0000	67%
			PSR	10 <sup>7</sup> , 10 <sup>8</sup>	51-53	0.0180	
			PST	10 <sup>7</sup> , 10 <sup>8</sup>	31-40	0.0085	
	2	Hay promoción de crecimiento	PSR	10 <sup>8</sup>	38	0.0118	
			PST	10 <sup>8</sup>	43	0.0147	
	3	No hay promoción de crecimiento	No Aplica				
Esporas	1	Hay promoción de crecimiento	LA	10 <sup>7</sup> , 10 <sup>8</sup>	23-35	0.0001	67%
			PSA	10 <sup>7</sup> , 10 <sup>8</sup>	14-19	0.0085	
	2	Hay promoción de crecimiento	LA	10 <sup>7</sup>	30	0.0371	
			PSA	10 <sup>7</sup>	61	0.0349	
			PST	10 <sup>7</sup>	47	0.0133	
	3	Hay promoción de crecimiento	No aplica				

Los resultados indican que ambas concentraciones de aplicación incrementaron el desarrollo de las variables fisiológicas evaluadas en la planta. Los tratamientos con células vegetativas en una concentración de 10<sup>8</sup> UFC/mL presentaron un efecto promotor en las variables de respuesta LA, PSR, PSA y PST con porcentajes de aumento entre el 31 y el 53% en los ensayos 1 y 2, mientras que las células vegetativas en una concentración de 10<sup>7</sup> UFC/mL presentaron un incremento en las mismas variables pero solo en el ensayo 1. En cuanto a los tratamientos en forma de esporas, se obtuvo que inocular una concentración de 10<sup>8</sup> UFC/mL hubo un efecto promotor del 14 al 19% y del 23 al 35% en 40

las variables LA y PSA respectivamente, sin embargo, la concentración  $10^7$  UFC/mL influyó la promoción de crecimiento de las variables LA, PSA y PST en los ensayos experimentales 1 y 2 con un porcentaje de incremento de 14 al 61%. Respecto a la reproducibilidad de las evaluaciones, puede observarse que para ambas estructuras evaluadas, el ensayo 3 no presentó diferencias significativas respecto al control, lo que evidencia una reproducibilidad del 67%. Adicionalmente, los resultados obtenidos muestran que la inoculación de las células vegetativas en una concentración de  $10^8$  UFC/mL y la inoculación de esporas del microorganismo en  $10^7$  UFC/mL favorecen la promoción de crecimiento de la planta.

Se ha encontrado que para el género *Bacillus spp.* las concentraciones por encima de  $10^6$  UFC/mL son efectivas (Bai et al., 2002; Jiang et al., 2014; Liu et al., 2006). En cultivos de maíz, la inoculación de las células vegetativas de *P. alcaligenes* PsA15, *B. polymyxa* BcP26 y *M. phlei* MbP18, en una concentración de  $10^7$  UFC/mL incrementó el peso seco aéreo de la planta entre 17 y el 30% y el peso seco radical entre un 19 y 52% respecto al control (Egamberdiyeva, 2007). Joo y colaboradores aplicaron las células vegetativas de los microorganismos *B. cereus* MJ-1, *B. macroides* CJ-29 y *B. pumilus* CJ-69 en una concentración de  $10^9$  UFC/mL y encontraron *B. pumilus* CJ-69 aumentó la longitud aérea y peso fresco radical del cultivo de pimiento rojo en un 12 y 20% respectivamente (Joo et al., 2004). En la Figura 2-2, se presentan los datos de PST de las células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en ambas concentraciones de aplicación. En los ensayos 1 y 2 con esta variable tuvo un incremento entre el 31 y 40% cuando se inoculó en ambas concentraciones y del 38% cuando se inoculó en una concentración de  $10^8$  UFC/mL.

Figura 2-2. Peso seco total de las plantas de maíz inoculadas con células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en dos concentraciones ( $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL) en los ensayos 1 y 2.



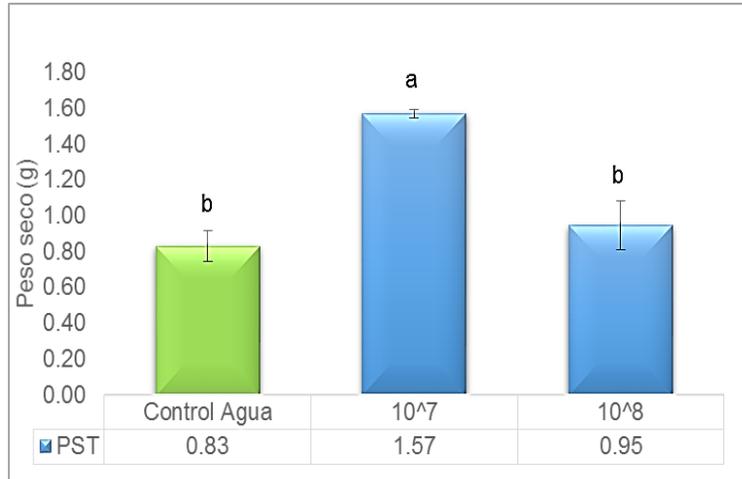
\*Letras diferentes representan diferencias significativas respecto al control según test LSD con  $\alpha=0.05$ . **A.** PST, células vegetativas en el ensayo 1, **B.** PST, células vegetativas en el ensayo 2.

Estudios realizados por Ramirez y Kloepper (2010), demostraron que cuando las esporas de *B. amyloliquefaciens* FZB45 son aplicadas en una concentración de  $10^6$  UFC/mL en cultivos de col china, se obtienen incrementos del 63% en el peso fresco aéreo de la planta. Jetiyanon y Plianbangchang evaluaron en 2010, la eficiencia y concentración óptima de la cepa *B. cereus* RS87 sobre la promoción de crecimiento del cultivo de arroz a nivel de invernadero y campo, encontrando un mayor desarrollo de las raíces respecto al control cuando se inoculó el microorganismo en forma de esporas en una concentración de  $10^8$  UFC/mL (Jetiyanon and Plianbangchang, 2010).

Estos resultados son congruentes con los presentados por Posada en 2012, quien estudió la promoción de crecimiento de *B. subtilis* EA-CB 0575 en cultivos de banano y determinó que las dosis superiores a  $10^6$  UFC/mL promueven el crecimiento de la planta gracias a que la presencia de concentraciones altas del microorganismo favorece la expresión de los mecanismos de acción de las PGPR como la producción de metabolitos secundarios y la competencia por nutrientes o espacio (Posada Uribe, 2012). En la Figura 2-3, se observa

un incremento del 47% respecto al control en la variable de respuesta PST cuando se inoculó una concentración  $10^7$  UFC/mL de esporas del microorganismo.

Figura 2-3. Peso seco total de las plantas de maíz inoculadas con las esporas de *B. subtilis* EA-CB0575 en concentraciones de  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL en el ensayo 2.



\*Letras diferentes representan diferencias significativas respecto al control según test LSD con  $\alpha=0.05$ .

### 2.4.3. Efecto de la aplicación de esporas y células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en plantas de maíz

Con el fin de determinar las estructuras efectivas para la promoción de crecimiento, se evaluaron las esporas y células vegetativas en las concentraciones de aplicación  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL (ver Tabla 2-5). Se encontró que la estructura del *B. subtilis* EA-CB0575, presentó resultados prometedores frente a la promoción de crecimiento de la planta de maíz.

Los resultados presentados muestran que tanto la inoculación de esporas como de células vegetativas promovieron el crecimiento de las variables de respuesta en evaluación respecto al control, con porcentajes de aumento entre el 14 y 61%. Sin embargo, la inoculación de los tratamientos con esporas en la concentración  $10^7$  UFC/mL y los tratamientos con células vegetativas en la concentración  $10^8$  UFC/mL beneficiaron mayormente las variables de respuesta en evaluación. La reproducibilidad para los ensayos realizados en la concentración  $10^7$  UFC/mL fue del 67% y para los ensayos en  $10^8$  UFC/mL fue del 100%, ya que en todos los ensayos experimentales a nivel de invernadero se promovió el crecimiento de las variables en evaluación.

Tabla 2-5. Resumen de los resultados para determinar la estructura de *B. subtilis* EA-CB0575 en una concentración de 10<sup>7</sup> UFC/mL y 10<sup>8</sup> UFC/mL sobre las variables fisiológicas de *Zea mays* a nivel de invernadero.

Concentración (UFC/mL)	Ensayo	Resultado	Variables	Estructura	Aumento (%)	Valor P	Reproducibilidad	
10 <sup>7</sup>	1	Hay promoción de crecimiento	LA	Células Vegetativas Esporas	23-35	0.0000	67%	
			PSA	Células Vegetativas Esporas	14-19	0.0085		
			PSR	Células Vegetativas	53	0.0121		
			PST	Células Vegetativas	40	0.007		
	2	Hay promoción de crecimiento	LA	Esporas	13	0.0103		
			PSA	Esporas	61	0.0186		
			PSR	Esporas	31	0.0107		
			PST	Esporas	47	0.0049		
	3	No hay promoción de crecimiento	No Aplica					
	10 <sup>8</sup>	1	Hay promoción de crecimiento	LA	Células Vegetativas Esporas	35-47		0.0000
PSA				Esporas	21	0.0302		
PSR				Células Vegetativas	51	0.0052		
PST				Células Vegetativas	31	0.0138		
2		Hay promoción de crecimiento	LA	Células Vegetativas Esporas	19-21	0.0000		
			PSR	Células Vegetativas	38	0.0341		
			PST	Células Vegetativas	43	0.0272		
3		Hay promoción de crecimiento	LA	Células Vegetativas Esporas	21-25	0.0316		

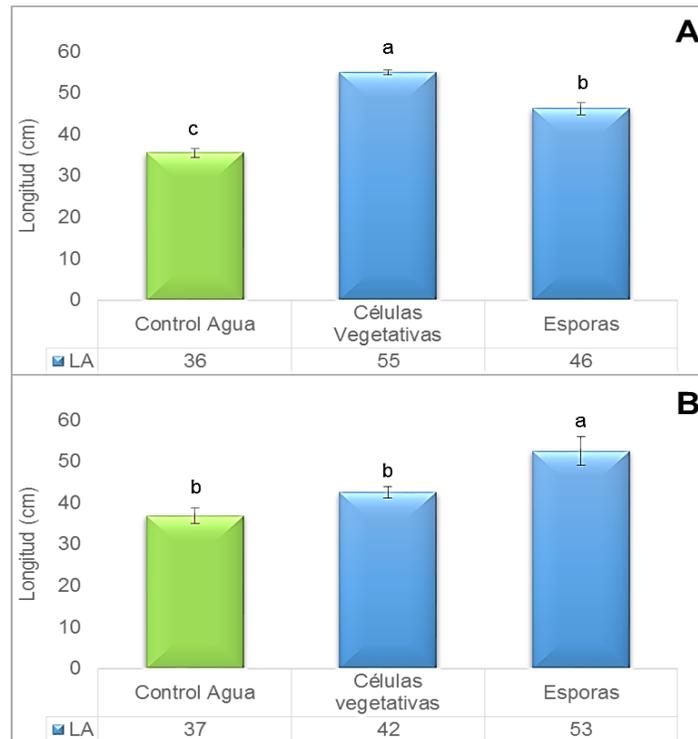
Son pocos los trabajos relacionados con el efecto de la concentración y estructura del microorganismo al ser aplicado al suelo, sin embargo estos parámetros son cruciales para

obtener resultados óptimos y efectivos (Bai et al., 2002; Singh et al., 2013). La estructura a utilizar dependerá del microorganismo en evaluación (Bashan, 1998; Compant et al., 2010). Killian y colaboradores en 1983 estudiaron los mecanismos de acción del *B. subtilis* FZB42® en forma de esporas y encontraron que la inoculación de ambas estructuras mejora la absorción de agua y nutrientes, provoca resistencia sistémica y promueve la promoción del crecimiento de diversos cultivos en su mayoría cereales (Kilian et al., 1983).

Estudios más recientes, realizados con las células vegetativas y esporas de la cepa *B. cereus* RS87 en cultivos de arroz, determinaron que ambas estructuras generan un efecto promotor en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Jetiyanon et al., 2008). Ma et al. (2009) llevaron a cabo experimentos con las células vegetativas de *B. thuringiensis* (Bt) Cry3Bb en plantas de maíz y obtuvieron un aumento en el rendimiento de las semillas y desarrollo de raíces de un 11% a un 66% con respecto al control. La Figura 2-4, muestra los datos correspondientes al análisis para la variable de respuesta LA cuando se inoculó con las esporas y células vegetativas del microorganismo en una concentración de 107UFC/mL, en el ensayo 1, la variable, tuvo incremento del 25 al 35% en las dos estructuras de la bacteria y en el ensayo 2, incrementó en 15.67 cm respecto al control absoluto gracias a la inoculación de las esporas del microorganismo.

Diferentes reportes han establecido las ventajas entre una y otra estructura, se ha estudiado que las células vegetativas colonizan y se multiplican rápidamente en la raíz de las plantas y dependen de la disponibilidad de nutrientes y la facilidad de asimilación de los mismos en el metabolismo celular de la bacteria, las esporas, por su parte, son estructuras sólidas, resistentes a las condiciones adversas del medio y de estrés, lo cual favorece su uso para la formulación de productos biofertilizantes en diferentes cultivos, pero son necesarias condiciones óptimas en el suelo y su proceso de colonización es lento (Berendsen et al., 2015; Bowen et al., 1999; Earl et al., 2008; Errington, 2003; Kozyrovska et al., 1997; Liu et al., 2006; Stephens and Rask, 2000).

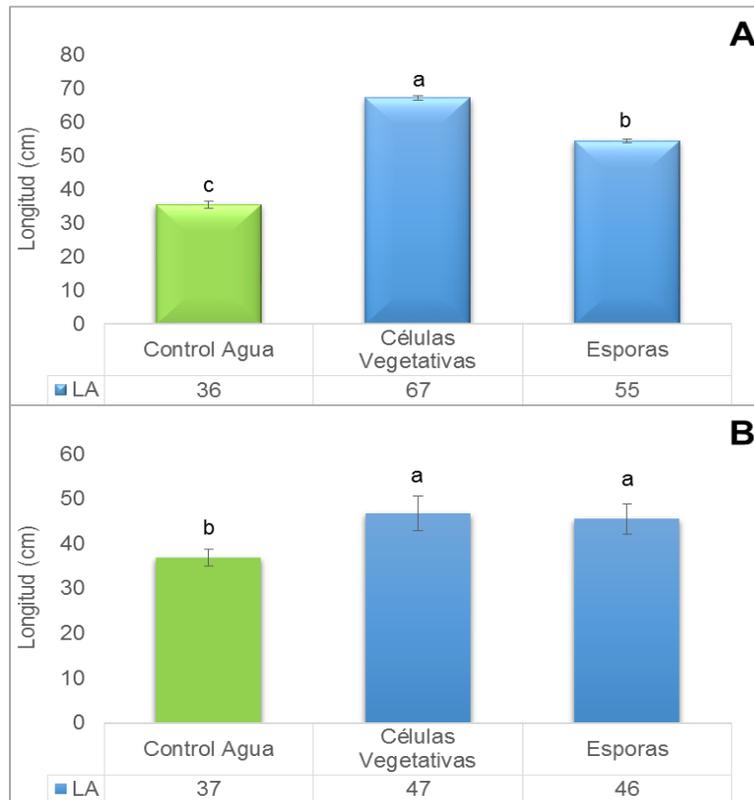
Figura 2-4. Longitud aérea de las plantas de maíz inoculadas con células vegetativas y esporas de *B. subtilis* EA-CB0575 en una concentración  $10^7$  UFC/mL en los ensayos 1 y 2.



\*Letras diferentes representan diferencias significativas respecto al control según test LSD con  $\alpha=0.05$ . **A.** LA en ensayo 1, **B.** LA en ensayo 2.

En la Figura 2-5, se presentan los datos para la variable LA cuando se inoculó con las esporas y células vegetativas del microorganismo en una concentración de  $10^8$ UFC/mL. Esta, se incrementó entre 35 y 47% en el ensayo 1 y entre el 19 y 21% en el ensayo 2 respecto al control absoluto gracias a la inoculación de las esporas y células vegetativas del microorganismo.

Figura 2-5. Longitud aérea de las plantas de maíz inoculadas con células vegetativas y esporas de *B. subtilis* EA-CB0575 en una concentración  $10^8$  UFC/mL en los ensayos 1 y 2.



\*Letras diferentes representan diferencias significativas respecto al control según test LSD con  $\alpha=0.05$ , **A.** PST en el ensayo 1, **B.** PST en el ensayo 2.

## 2.5. Conclusiones

Se realizó la evaluación de la inoculación de las esporas y las células vegetativas del *B. subtilis* EA-CB0575 en las concentraciones de  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL mediante una serie de análisis de evaluaciones unifactoriales en las cuales se evaluaron los tratamientos inoculados, las concentraciones inoculadas o las estructuras del microorganismo aplicadas a las plantas de maíz. Se determinó que el microorganismo en sus diferentes formas estructurales y concentraciones evaluadas presenta un efecto promotor de crecimiento en *Zea mays* por medio del incremento significativo de las variables de respuesta, PSA, LA, PSR y PST. Cuando se trabaja con la estructura vegetativa del microorganismo es más reproducible el resultado positivo de promoción, en una concentración de  $10^8$  UFC/mL y cuando se trabaja con las esporas se recomienda trabajar con una concentración de aplicación de  $10^7$  UFC/mL.

# **3. Evaluación del efecto de la inoculación de esporas y células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 sobre las variables fisiológicas de *Solanum lycopersicum* a nivel de invernadero.**

## **3.1. Resumen**

El tomate es uno de los cultivos hortícolas con mayor demanda en el mundo y representa el 30% de la producción de hortalizas a nivel mundial, su cultivo requiere numerosos nutrientes y es muy delicado a condiciones extremas como temperatura, pH del suelo y condiciones de sequía (Sánchez López et al., 2012). Se han planteado diferentes estrategias con el fin de proteger su calidad y producción a nivel mundial, entre ellas el uso de diferentes PGPRs del género *Bacillus*. En este estudio se evaluó la cepa *B.subtilis* EA-CB0575 en forma de esporas y células vegetativas, en dos concentraciones de aplicación ( $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL) mediante 3 ensayos unifactoriales completamente aleatorios para determinar la promoción de crecimiento, concentración y estructura efectiva del microorganismo en el cultivo de tomate. Se encontró que la inoculación del microorganismo ya sea en células vegetativas o esporas y en ambas concentraciones de aplicación tuvo diferencias significativas respecto al control y aumentó el crecimiento de las variables PSA y PST de la planta a nivel de invernadero.

## **3.2. Introducción**

El tomate es el segundo cultivo hortícola más importante en el mundo. Su producción global es de más de 100 millones de toneladas, su superficie cultivada se ha incrementado cerca del 23% durante los últimos 10 años y sus mayores productores son China, Estados Unidos, India, Turquía y Egipto (FAO, 2013). En Colombia, su producción se concentra principalmente en los departamentos de Cundinamarca, Norte de Santander, Valle del Cauca, Boyacá, Huila, Antioquia, Risaralda y Caldas. En la actualidad el país produce 546

toneladas en aproximadamente 11.304 ha, de las cuales el 30%, se encuentran bajo condiciones de invernadero (FAO, 2013; Gajc-Wolska et al., 2015; Miranda et al., 2009).

Para crecer satisfactoriamente este cultivo necesita nutrientes como nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio (Zaidi et al., 2015). La utilización de fertilizantes, fungicidas y pesticidas químicos se ha considerado como un método fundamental para la mejora y rendimiento de estos cultivos, sin embargo, han conducido a su vez a la contaminación del agua, acidificación de los suelos y al aumento de la frecuencia de aparición de enfermedades en los cultivos (Guo et al., 2010). Se ha estudiado el papel de las PGPR como un potencial biofertilizante y agente biocontrolador para mejorar la disponibilidad y asimilación de los nutrientes del suelo y controlar microorganismos patógenos presentes en el mismo (Bashan et al., 2008; Bernabeu et al., 2015; Sripontan et al., 2014).

Diferentes géneros bacterianos como *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Bacillus* han sido reportados como promotores del crecimiento en diferentes cultivos (Ardebili et al., 2011; Ashwini and Srividya, 2014; Ekin et al., 2009; Fatemeh et al., 2014; Turan et al., 2014). De estos géneros, *Bacillus spp.* ha sido estudiado ampliamente para la promoción de crecimiento y biocontrol de hortalizas como el tomate (Murphy et al., 2003; Serrano et al., 2013; Xiao-ying et al., 2015). Entre las especies que componen este género, *B.subtilis* ha sido de las más estudiadas en el cultivo del tomate, encontrando incrementos en la producción de biomasa, el rendimiento del cultivo y la longitud aérea de la planta (Chowdappa et al. 2013; Adesemoye et al. 2008; Felici et al. 2008).

*B.subtilis* EA-CB 0575, es una rizobacteria promotora de crecimiento de diversos cultivos (Cuéllar Gaviria, 2014; Posada Uribe, 2012). Se presume que su inoculación en diferentes morfologías y concentraciones de aplicación puede generar cambios en las variables fisiológicas de tomate en etapas tempranas del crecimiento a nivel de invernadero. Para esto, se realizará la evaluación del cultivo bacteriano en forma de esporas y células vegetativas y además se determinará el efecto de su inoculación en las concentraciones  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL.

### **3.3. Materiales y métodos**

#### **3.3.1. Localización del ensayo**

El proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología y en el invernadero de promoción de crecimiento de la Universidad EAFIT, Medellín. Los ensayos se realizaron

bajo las condiciones medioambientales de esta ciudad, Temperatura media 24°C, luminosidad 12h/12h y humedad relativa 55%.

### **3.3.2. Microorganismo y proceso de activación**

Fue utilizado el microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575 aislado en trabajos realizados previamente por la Universidad EAFIT-AUGURA de la rizósfera de una planta de banano, *Musa* AAA cv. Valery, su crioconservación, identificación y proceso de activación se explican con detalle en el numeral 2.3.2.

### **3.3.3. Medios de cultivo y fermentación del microorganismo a nivel matraz**

Se emplearon los medios de cultivo SBM modificado para la producción de esporas del microorganismo (Posada, 2012) y el medio TSB (“Tryptic Soy Broth”, Merck) para la producción de las células vegetativas (ver Anexo 1). La fermentación del microorganismo siguió la metodología descrita en el numeral 2.3.4. y se realizó una separación mediante centrifugación a 4500 rpm por 15 minutos, el pellet de estos cultivos fue resuspendido en ADE hasta obtener concentraciones de  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL de acuerdo con la curva de calibración absorbancia vs UFC/mL (Anexo 2). Previo a la separación de biomasa, al cultivo de esporas se le realizó un choque térmico (a 80°C durante 20 minutos) para asegurar la muerte de las células vegetativas presentes.

### **3.3.4. Material vegetal y siembra a nivel de invernadero**

Se utilizaron semillas de tomate variedad Santa Cruz de Agrosemillas S.A., las cuales fueron desinfectadas y pregerminadas mediante el protocolo explicado en el numeral 2.3.5. Posterior a la desinfección, las semillas se sumergieron en los tratamientos correspondientes (ver Tabla 2-1) y se dispusieron en el shaker a 150 rpm por 1 hora. Una vez cumplido este tiempo, las semillas fueron sembradas en macetas con 400 gr de sustrato estéril compuesto por una mezcla de 1:0.5:1:0.5 de arena, orgánicos, tierra y cisco de arroz, las cuales se dispusieron en forma aleatoria en el invernadero y permanecieron allí por 2 meses.

### **3.3.5. Análisis estadístico de los datos**

Luego de 2 meses de crecimiento, las plantas fueron desprendidas del sustrato, se lavaron con abundante agua, se separó la parte aérea de la radicular y se midieron las variables de

respuesta que se presentan en la Tabla 3-1. Se evaluó la promoción de crecimiento, la concentración y la estructura efectiva del microorganismo mediante 3 ensayos unifactoriales realizados en tiempos independientes a nivel de invernadero con 3 unidades experimentales por tratamiento cada uno con tres plantas, los análisis realizados para dicho fin se describen en detalle en el numeral 2.3.7

### 3.4. Resultados y discusión

#### 3.4.1. Efecto de la aplicación de esporas y células vegetativas *B. subtilis* EA-CB0575 en dos concentraciones de aplicación en plantas de tomate.

Para determinar el efecto de la promoción de crecimiento de *B. subtilis* EA-CB0575, se realizaron 3 ensayos experimentales, con el fin de ver su reproducibilidad y cuáles de los tratamientos inoculados (TSB 10<sup>7</sup>, TSB 10<sup>8</sup>, SBM 10<sup>7</sup>, SBM 10<sup>8</sup>) tiene un mayor efecto sobre las variables de respuesta evaluadas. Los resultados de cada ensayo experimental para determinar dicho efecto promotor se presentan a continuación.

Tabla 3-1. Resumen de los resultados de los tres ensayos realizados para determinar el efecto promotor de crecimiento *B. subtilis* EA-CB0575 sobre las variables fisiológicas de *Solanum lycopersicum* a nivel de invernadero.

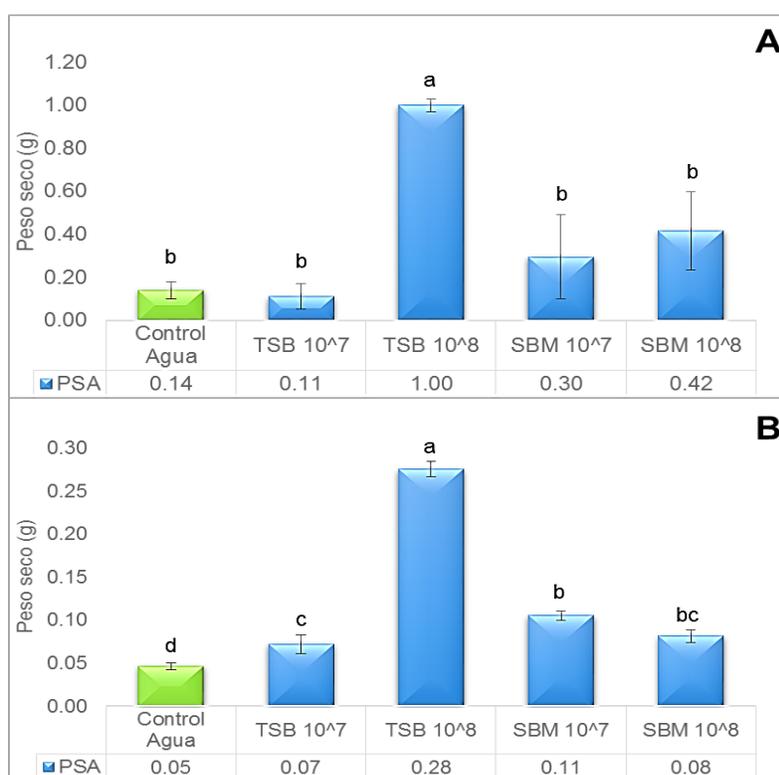
Ensayo	Resultado	Variables	Tratamientos	Porcentaje de aumento (%)	Valor P	Reproducibilidad
1	Hay promoción de crecimiento	PSA	TSB 10 <sup>8</sup>	86	0.0338	67%
2	Hay promoción de crecimiento	PSA	TSB 10 <sup>8</sup> , SBM 10 <sup>7</sup> , SBM 10 <sup>8</sup> , TSB 10 <sup>7</sup>	36-84	0.0000	
		PST	TSB 10 <sup>8</sup> , SBM 10 <sup>7</sup> , SBM 10 <sup>8</sup>	34-76	0.0000	
3	No hay promoción de crecimiento	No Aplica				

Los resultados muestran que la inoculación de las células vegetativas del *B. subtilis* EA-CB0575 en una concentración de 10<sup>8</sup> UFC/mL promueve el crecimiento de las variables PSA y PST de la planta de tomate a nivel de invernadero con un porcentaje de aumento promedio del 82% respecto al control absoluto sin inocular. La variable PSA fue consistente en presentar resultados positivos en los diferentes ensayos evaluados, sin embargo, el

ensayo 3 no presentó diferencias significativas respecto al control encontrándose una reproducibilidad del 67% (ver Tabla 3-1).

Los resultados de la promoción de crecimiento de la variable PSA se presentan en la Figura 3-1, se muestra que para los ensayos 1 y 2 el tratamiento con las células vegetativas del microorganismo en una concentración de  $10^8$  UFC/mL incrementó significativamente esta variable presentando incrementos del 86 y 83% respectivamente. Adicionalmente en el ensayo 2, los tratamientos SBM  $10^7$ , SBM  $10^8$  y TSB  $10^7$  presentaron incrementos respecto al control de 56, 43 y 36% respectivamente. Gracias a estos resultados puede inferirse que la inoculación de las células vegetativas del microorganismo en una concentración de  $10^8$  UFC/mL favorece el aumento de esta variable en el cultivo.

Figura 3-1. Peso seco aéreo de las plantas de tomate inoculadas con células vegetativas y esporas de *B. subtilis* EA-CB0575 en dos concentraciones ( $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL) en los ensayos 1 y 2



Letras diferentes representan diferencias significativas respecto al control según test LSD con  $\alpha=0.0$ . **A.** PSA en el ensayo 1, **B.** PSA en el ensayo 2.

Las PGPRs promueven el crecimiento de los cultivos mediante diferentes mecanismos, directamente a través de la mejora en la toma de nutrientes o la alteración de los niveles de fitohormonas e indirectamente mediante la supresión de los efectos inhibidores de diversos patógenos, estos mecanismos, pueden actuar directa o indirectamente en la planta, lo que implica un crecimiento variable de las plantas regulado por la secreción de compuestos por parte del microorganismo (Glick, 2012; Zaidi et al., 2015). Diferentes estudios han sido realizados en este cultivo con diferentes géneros bacterianos (Gaytan et al., 2012; Gravel et al., 2007; Guel et al., 2008).

Sánchez López y colaboradores en 2012, emplearon las cepas *Enterobacter sp.* TVL-1 y TVL-2, *Pseudomonas sp.* PSO12 y PSO14 y *Bacillus sp.* BEOO2 y BEOO3 en una concentración de  $10^8$  UFC/mL y concluyeron que TVL-1, TVL-2, PSO14, BEOO2 y BEOO3 fueron capaces de producir sideróforos y además que las plantas inoculadas con los tratamientos TVL-2 y BEOO2 duplicaron la longitud aérea la planta transcurridos dos meses del cultivo (Sánchez López et al., 2012). En 2013, Martínez y colaboradores evaluaron el efecto promotor de cuatro rizobacterias del genero *Bacillus* (MA04, MA06, MA12 y MA17) aisladas de plantas de tomate, encontraron que las cepas MA04 y MA17 aumentaron el porcentaje de germinación de las semillas de tomate en un 5 y 6% y las cepas MA06 y MA12 incrementaron el peso seco de las plántulas en un 17 y 20%. Además las cuatros cepas producen ácido indolacético, solubilizan fosfato (Martinez et al., 2013).

### **3.4.2 Efecto de la aplicación de dos concentraciones de *B. subtilis* EA-CB0575 en plantas de tomate.**

Con el fin de determinar la concentración de aplicación del *B. subtilis* EA-CB0575 en forma de esporas y células vegetativas, fueron evaluadas ambas estructuras en las concentraciones  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL. En la Tabla 3-2, se presentan los resultados obtenidos en los tres ensayos realizados. Los resultados muestran que las células vegetativas del microorganismo en una concentración de  $10^8$  UFC/mL favorecen la promoción de crecimiento de las variables PSA y PST en el cultivo de tomate incrementándolas entre un 76 y 86% respecto al control, este análisis tuvo una reproducibilidad del 67% ya que ninguna variable de respuesta del ensayo 3 presentó diferencias significativas respecto al control. La forma de esporas de *B. subtilis* EA-CB0575 incrementó entre el 34 y 56% estas mismas variables cuando se inoculó en las dos concentraciones evaluadas, sin embargo,

únicamente el ensayo 2 presentó diferencias significativas respecto al control obteniendo una reproducibilidad del 33% para esta estructura.

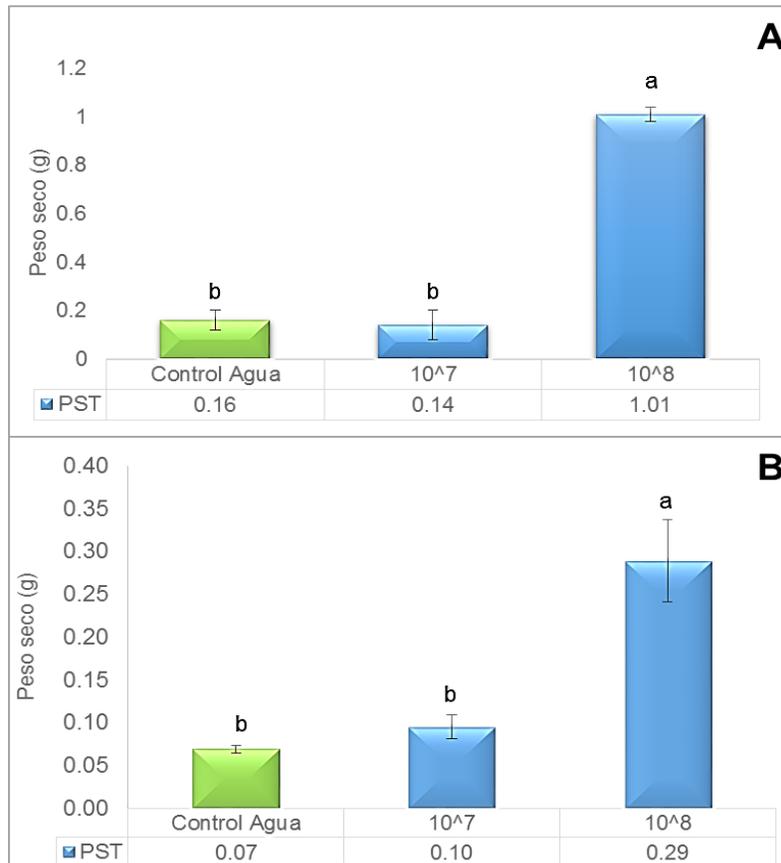
Tabla 3-2. Resumen de los resultados para determinar la concentración de las células vegetativas y esporas de *B. subtilis* EA-CB0575 sobre las variables fisiológicas de *Solanum lycopersicum* a nivel de invernadero

Estructura	Ensayo	Resultado	Variables	Concentración (UFC/mL)	Porcentaje de aumento (%)	Valor P	Reproducibilidad
Células vegetativas	1	Hay promoción de crecimiento	PSA	10 <sup>8</sup>	86	0.0013	67%
			PST	10 <sup>8</sup>	84	0.0017	
	2	Hay promoción de crecimiento	PSA	10 <sup>8</sup>	83	0.0000	
			PST	10 <sup>8</sup>	76	0.0000	
	3	No hay promoción de crecimiento	No Aplica				
	Esporas	1	No hay promoción de crecimiento	No aplica			
2		Hay promoción de crecimiento	PSA	10 <sup>8</sup> ,10 <sup>7</sup>	43-56	0.001	
			PST	10 <sup>8</sup> ,10 <sup>7</sup>	34-48	0.0017	
3		No hay promoción de crecimiento	No aplica				

Esto se ha reportado previamente por otros autores, como Yan y colaboradores en 2002, quienes evaluaron el control biológico de la forma vegetativa de la cepa *B.pumilus* SE34 en una concentración de 10<sup>8</sup> UFC/mL contra el tizón tardío del tomate a nivel de invernadero y encontraron que la inoculación de la cepa en las condiciones anteriormente mencionadas reduce significativamente la enfermedad (42%) respecto al control (Yan et al., 2002). Chowdappa en 2013, encontró que la inocular las células vegetativas de la cepa *B.subtilis* OTPB1 en una concentración 10<sup>8</sup> UFC/mL las variables longitud radicular, longitud aérea, peso seco aéreo y peso seco radicular incrementaron en un 28, 17, 16 y 29% respectivamente (Chowdappa et al., 2013). La Figura 3-2 muestra los datos de la inoculación de las células vegetativas en las concentraciones 10<sup>7</sup> y 10<sup>8</sup> UFC/mL para la

variable PST. En los ensayos 1 y 2 el tratamiento con la concentración  $10^8$  UFC/mL presento incrementos del 86 y 76% respectivamente respecto al control.

Figura 3-2. Peso seco total de las plantas de tomate inoculadas con células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en dos concentraciones ( $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL) en los ensayos 1 y 2.



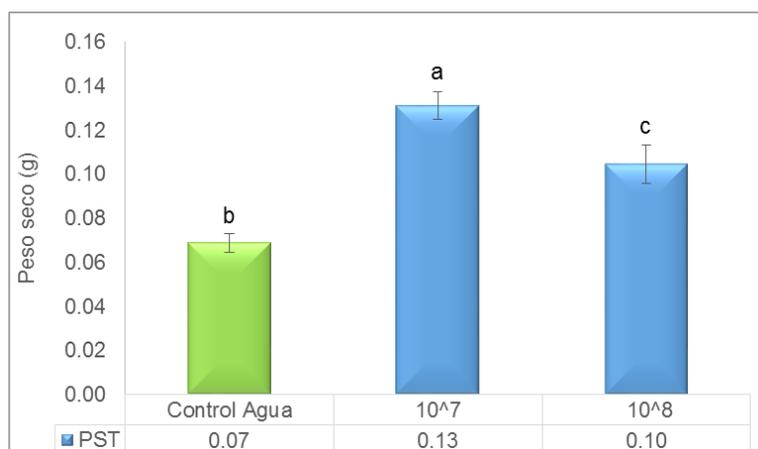
\*Letras diferentes representan diferencias significativas respecto al control según test LSD con  $\alpha=0.0$ . **A.** PST en el ensayo 1, **B.** PST en el ensayo 2.

La definición de una concentración de aplicación al cultivo es necesaria para garantizar la coherencia de la promoción de crecimiento y la protección de patógenos en los diferentes ensayos experimentales realizados, sin embargo esta puede depender del microorganismo en evaluación (Bais et al., 2004; Singh et al., 2011; Yan et al., 2000). En otros cultivos de interés hortícola se ha reportado que las células vegetativas del genero *Bacillus* en concentraciones de aplicación altas (alrededor de  $10^8$  -  $10^{11}$  UFC/mL) son beneficiosas para la promoción del crecimiento (Domenech et al., 2006; Orhan et al., 2006; Turan et al., 2014). Turan y colaboradores reportaron en 2014 los experimentos realizados en cultivos de

repollo a nivel de invernadero con microorganismo *B. megaterium* TV-91C y *B.subtilis* TV-17°C, estos resultados concluyeron que al inocular ambos cultivos en la estructura vegetativa y una concentración de  $10^8$  UFC/mL se incrementaron los pesos secos y frescos tanto aéreos como radicales del cultivo, sin embargo la cepa TV-91C arrojó mejores resultados con incrementos del 32.9%, 22.6%, 16.0%, y 35.69%, respectivamente (Turan et al., 2014).

En el cultivo de tomate, Murphy y colaboradores evaluaron en 2003, combinaciones en forma de esporas y en concentraciones de  $10^7$  UFC/mL de la PGPR del *B.subtilis* GB03 con diferentes microorganismos del género *Bacillus* (*B.pumilus* SE34, *B.amyloliquefaciens* IN937a, *B. subtilis* IN937b, *B.pumilus* INR7 y *B.pumilus* T4) en el cultivo de tomate y encontraron que la coinoculación de las cepas GB03/ SE34 , GB03/ INR7 y GB03/ T4 aumentaron la longitud aérea y el peso fresco de la planta en un promedio del 8 y 57% respectivamente (Murphy et al., 2003). En la Figura 3-3, se observa que la inoculación del *B.subtilis* EA-CB0575 en forma de esporas y en las concentraciones de aplicación  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL incrementó en un 48 y 34% respectivamente la variable de respuesta PST respecto al control absoluto sin inocular.

Figura 3-3. Peso seco total de las plantas de tomate inoculadas con las esporas de *B. subtilis* EA-CB0575 en concentraciones de  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL en el ensayo 2.



\*Letras diferentes representan diferencias significativas respecto al control según test LSD con  $\alpha=0.05$

### 3.4.3 Efecto de la aplicación de esporas y células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en plantas de tomate

Para determinar la estructura del *B. subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento del cultivo de tomate se realizó la evaluación de las células vegetativas y las esporas del microorganismo en las concentraciones  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL. Se encontró que la aplicación de ambas estructuras incrementa el PSA y PST de la planta. En la Tabla 3-3, se presenta un resumen de los resultados en cada ensayo experimental.

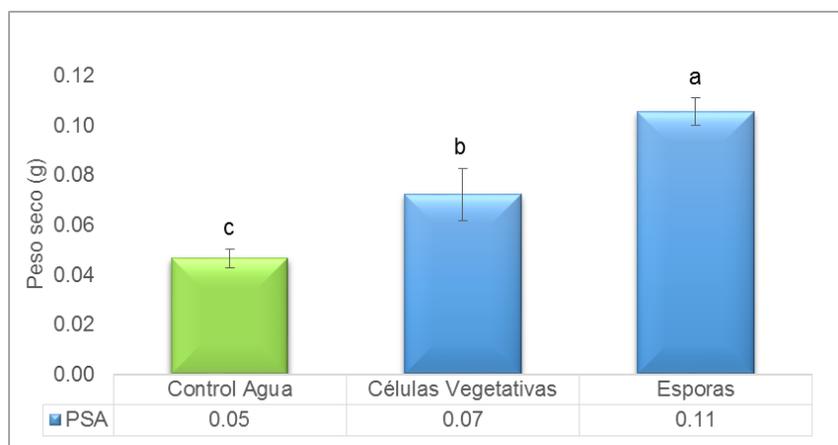
Tabla 3-3. Resumen de los resultados para determinar la estructura de *B. subtilis* EA-CB0575 en una concentración de  $10^7$  UFC/mL y  $10^8$  UFC/mL sobre las variables fisiológicas de *Solanum lycopersicum* a nivel de invernadero.

Concentración (UFC/mL)	Ensayo	Resultado	Variables	Estructura	Porcentaje de aumento (%)	Valor P	Reproducibilidad	
$10^7$	1	No hay promoción de crecimiento	No aplica				0.003	33%
	2	Hay promoción de crecimiento	PSA	Esporas Células vegetativas	36 56			
			PST	Esporas	48			
	3	No hay promoción de crecimiento	No aplica					
$10^8$	1	hay promoción de crecimiento	PSA	Células vegetativas	86	0.0433	67%	
	2	Hay promoción de crecimiento	PSA	Esporas Células vegetativas	43 83	0.0000		
			PST	Células vegetativas	76	0.0000		
	3	No hay promoción de crecimiento	No aplica					

Los resultados indican que ambas estructuras incrementaron el desarrollo de las variables PSA y PST, Las células vegetativas en una concentración de  $10^8$  UFC/mL fue consistente en mostrar resultados favorables en los ensayos 1 y 2 con un incremento promedio del

82%, en el caso de las esporas la concentración de aplicación  $10^7$  UFC/mL influyó significativamente el desarrollo de las variables PST y PSA incrementando estas variables en un 60% respecto al control. La reproducibilidad para los ensayos realizados en la concentración  $10^7$  UFC/mL fue del 33% ya que únicamente las variables en el ensayo 2 presentaron diferencias significativas respecto al control, para los ensayos en  $10^8$  UFC/mL la reproducibilidad fue del 67%, ya que en los ensayos experimentales 1 y 2 a nivel de invernadero se presentaron diferencias respecto al control. En la Figura 3-4, se observa que la inoculación de esporas y células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en la concentración  $10^7$  UFC/mL incremento el desarrollo de la variable PSA a nivel de invernadero, sin embargo la inoculación con las esporas tuvo un efecto mayor respecto al control con un porcentaje de aumento del 56%.

Figura 3-4. Peso seco aéreo de las plantas de tomate inoculadas con células vegetativas y esporas de *B. subtilis* EA-CB0575 en una concentración  $10^7$  UFC/mL en el ensayo



\*Letras diferentes representan diferencias significativas respecto al control según test LSD con  $\alpha=0.05$ .

En la literatura existen diferentes relacionados con la aplicación de las células vegetativas o esporas del género *Bacillus*, las diferencias entre una estructura u otra se basan en la capacidad de soportar condiciones de estrés, su proceso de colonización y su tiempo de duplicación. Jetiyanon y colaboradores en 2008, determinaron que tanto la aplicación de esporas como las células vegetativas de *B. cereus* SO87 tuvieron un efecto promotor en cultivos de pepino y pimentón, sin embargo, los bioinsumos promotores de crecimiento usan esporas de los microorganismos y no las células vegetativas ya que estas estructuras

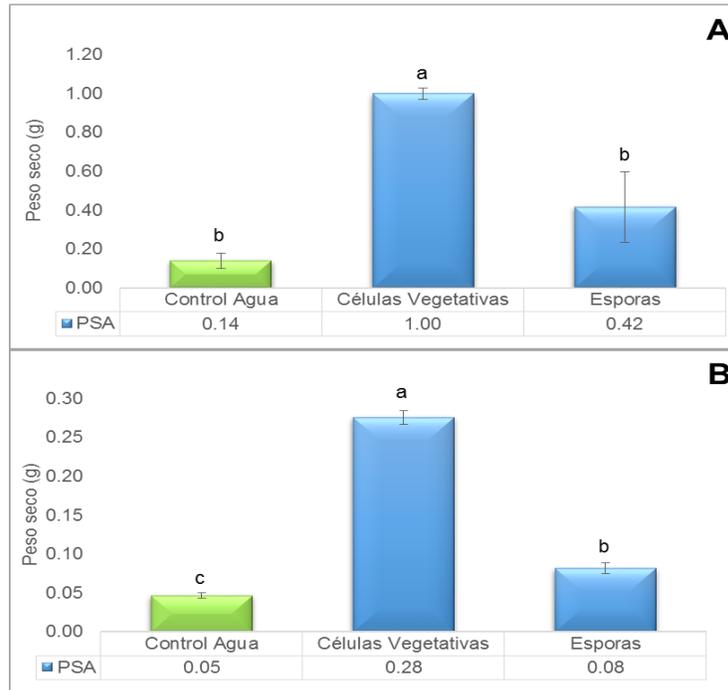
favorecen la supervivencia del microorganismo durante condiciones de estrés (Errington, 2003; Kilian et al., 1983; Posada-Uribe et al., 2015; Ramirez and Kloepper, 2010).

Felici y colaboradores en 2008, evaluaron la coinoculación e inoculación por separado de la estructura vegetativa de las cepas *B.subtilis* 101 y *Azospirillum brasilense* SP245 en una concentración de  $10^7$  UFC/mL, la coinoculación de estos microorganismo no mostro diferencias significativas respecto a la inoculación por separado de los microorganismos encontrando que la inoculación de *A. brasilense* SP245 aumentó en un 66, 23, 42% el peso seco radical, longitud aérea y peso seco aéreo de las plantas y la inoculación de *B.subtilis* 101 aumentó en un 50, 21, y 36% estas variables (Felici et al., 2008).

En un estudio realizado en 2015, por Xiao- ying y colaboradores, se evaluó la forma vegetativa la cepa *B.subtilis* CGMCC 1.3343 en una concentración de  $10^8$  UFC/mL y se obtuvo que la inoculación de este microorganismo disminuyó significativamente la severidad del hongo patógeno *Botrytis cinerea* e incrementó el peso fresco radical en 12.6 g y el peso seco aérea en 106.6 g respecto al control (Xiao-ying et al., 2015). Adesemoye y colaboradores estudiaron en 2008 el efecto promotor de *B.subtilis* y lo compararon con el efecto promotor de *P.aeruginosa* en cultivos de tomate bajo condiciones de invernadero, ambos microorganismos aumentaron la Longitud aérea de la planta, sin embargo la capacidad de formar esporas resistentes hace a *B. subtilis* un microorganismo más versátil cuando se aplica a los cultivos (Adesemoye et al., 2008).

La Figura 3-5, muestra los datos correspondientes al análisis para la variable PSA cuando se inoculó con las células vegetativas y esporas del microorganismo en una concentración de  $10^8$  UFC/mL, en el ensayo 1 la variable tuvo un incremento del 86% respecto al control cuando se inoculo con las células vegetativas y en el ensayo 2 ambas estructuras (células vegetativas y esporas) incrementaron esta variable respecto al control, sin embargo las células vegetativas registraron un aumento (83%) mucho mayor respecto a la inoculación con las esporas (43%) cuando se inocularon a la planta.

Figura 3-5. Peso seco aéreo de las plantas de tomate inoculadas con células vegetativas y esporas de *B. subtilis* EA-CB0575 en una concentración  $10^8$  UFC/mL en los ensayos 1 y 2.



\*Letras diferentes representan diferencias significativas respecto al control según test LSD con  $\alpha=0.05$ . **A.** PSA en ensayo 1, **B.** PSA en ensayo 2.

### 3.5. Conclusiones

Se realizó la evaluación de la inoculación de las esporas y las células vegetativas del *B. subtilis* EA-CB0575 en las concentraciones de aplicación  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL sobre las variables LA, PSR, PSA y PST, de estas variables sólo dos (PSA y PST) mostraron diferencias significativas con el control sin inoculación en los tres análisis realizados, sin embargo gracias al aumento considerable de las mismas (entre el 34 y 86%) se puede inferir que el microorganismo en las formas y concentraciones enunciadas anteriormente promueve el crecimiento de la planta de tomate a nivel de invernadero. No obstante las formas vegetativas del mismo tuvieron incrementos mayores cuando se inocularon en una concentración de  $10^8$  UFC/mL.

## **4. Determinación del efecto de la aplicación del sobrenadante del cultivo del *B. subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento de *Zea mays* y *Solanum lycopersicum* a nivel de invernadero.**

### **4.1. Resumen**

La cepa de estudio, *B. subtilis* EA-CB0575 ha sido evaluada en la promoción de crecimiento de diversos cultivos. En el proceso de producción de bioinsumos donde el microorganismo es el principio activo, se utiliza su biomasa, pero se desecha el sobrenadante del cultivo, siendo un subproducto potencialmente aprovechable, gracias a los nutrientes remanentes y los metabolitos presentes en él. En este trabajo se evaluó el efecto de los sobrenadantes libres de células (SLC) de los medios de cultivo para la producción de células vegetativas y esporas y de los medios frescos y estériles, sobre las variables fisiológicas de las plantas de maíz y tomate. Se encontró que para el cultivo de maíz, el SLC de los cultivos, tanto para la producción de esporas como de células vegetativas, promovió el crecimiento de las variables LA, PSA, PSR y PST con un porcentaje de aumento promedio de 50% respecto al tratamiento control. En el caso del cultivo de tomate, los pesos secos aumentaron cerca del 70%. La inoculación del medio fresco para la producción de células vegetativas (TSB) aumentó en un 43% el PSA y PST en maíz y el medio fresco para la producción de esporas (SBM) incrementó en un 69% los pesos secos del cultivo de tomate, lo que indica que el SLC del cultivo y los medios frescos para el cultivo bacteriano contienen elementos favorables para la promoción de crecimiento de ambos cultivos tales como compuestos biológicamente activos secretados por el microorganismo o nutrientes que favorecen el desarrollo de las plantas.

## 4.2. Introducción

Las plantas necesitan nutrientes para crecer, producir biomasa y ser alimento para microorganismos y animales (Margulis and Sagan, 1996). Estos, se componen de 16 elementos químicos considerados esenciales: C, H, O, N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, B, Mo, Cu, Zn y Cl de los cuales, el C, H y el O son obtenidos directamente del aire y del agua y los demás son aportados por el suelo y absorbidos mediante el sistema radicular (Navarro García and Navarro Blaya, 2003). Actualmente la mayoría de los agricultores dependen de fertilizantes inorgánicos comerciales que contienen entre otros nitrógeno (en forma de nitrato), fósforo (en forma de iones fosfato) y potasio (en forma de iones potasio), los cuales aumentan el rendimiento de los cultivos (FAO, 2002). Sin embargo, el uso extensivo de estos productos contamina las aguas superficiales y subterráneas, provoca la eutrofización de ríos, lagos y mares, desequilibra el ciclo global del nitrógeno y del fósforo y origina la lluvia ácida (Martín and Carrasco, 2003; Sarandón, 2002).

Las PGPR han sido estudiadas para contrarrestar los impactos asociados al uso de estos productos (Berg, 2009; Glick, 1995; Prashar et al., 2013). Entre los géneros más estudiados se encuentran *Pseudomonas* y *Bacillus*, este último tiene la capacidad de formar esporas resistentes a condiciones de estrés, secretar lipopéptidos antibióticos y contribuir a la supervivencia de la planta en condiciones ambientales adversas (Figueiredo et al., 2010; Kumar et al., 2011; Leclere et al., 2005; Ongena et al., 2005). Ha sido reportado como efectivo para el control de fitopatógenos y para la promoción de crecimiento de cultivos como trigo, maíz, soya, papa y tomate (Lavakush et al., 2014; Swain and Ray, 2009; Zaidi et al., 2015). Además, se encuentran en el mercado varios productos biológicos basados en microorganismos de este género, por ejemplo el producto Rhapsody® tiene como componente activo la cepa *B.subtilis* QST173 y el producto Kodiak® es elaborado a partir de la cepa *B.subtilis* GB03 (Lanna Filho et al., 2010).

La cepa de estudio, *B. subtilis* EA-CB0575 ha sido evaluada en la promoción de crecimiento en plantas de banano, maíz, tomate, crisantemo, cilantro y pimentón (Cuéllar Gaviria, 2014; Posada Uribe, 2012). Para su fermentación líquida se utilizaron dos medios de cultivo, el medio TSB, para la producción de células vegetativas y el medio SBM, para la producción de esporas, los cuales, están compuestos por nutrientes y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo del microorganismo. En el proceso de producción de bioinsumos donde el microorganismo es el principio activo, se utiliza su

biomasa, pero se desecha el sobrenadante del cultivo, siendo un subproducto potencialmente aprovechable, gracias a los nutrientes remanentes y compuestos secretados por el microorganismos que podrían influenciar directa o indirectamente el crecimiento de la planta (Ochoa Gómez, 2014).

El presente estudio busca determinar el efecto de la aplicación del Sobrenadante libre de células (SLC) proveniente de los cultivos de células vegetativas y esporas del microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575 en dos especies vegetales de interés económico, con el fin de determinar si esta inoculación ayuda a mejorar el crecimiento de las plantas en estudio a nivel de invernadero.

### **4.3. Materiales y métodos**

#### **4.3.1. Localización**

Este proyecto se realizó en el laboratorio de biotecnología y en el invernadero de rizobacterias de la Universidad EAFIT, Medellín. Bajo las condiciones ambientales de este lugar (Temperatura media 24°C, luminosidad 12h/12h y humedad relativa 55%).

#### **4.3.2. Microorganismo y proceso de activación**

Se empleó el microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575 aislado de la rizósfera de una planta de banano *Musa* AAA cv. Valery, en la finca La Navarra, ubicada en el municipio de Carepa en el Urabá antioqueño, Colombia en trabajos realizados previamente por la Universidad EAFIT-AUGURA. La conservación y el proceso de activación del microorganismo para su uso experimental se describen detalladamente en el numeral 2.3.2 del presente trabajo.

#### **4.3.3. Preparación de los medios de cultivo**

Se prepararon dos medios de cultivo para la fermentación líquida del microorganismo: TSB (“Tryptic Soy Broth”, Merck) y SBM modificado (Posada-Urbe et al., 2015) ver Anexo 1. El medio TSB fue utilizado para el crecimiento del microorganismo en forma de células vegetativas y el medio SBM para la esporulación del microorganismo.

#### **4.3.4. Determinación del efecto de la aplicación del sobrenadante del cultivo del *B. subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento en *Zea mays* y *Solanum lycopersicum***

- **Fermentación de microorganismo**

Para el cultivo del microorganismo se prepararon 2 preinóculos de 20 mL en erlenmeyers de 100 mL y se agitaron durante 12 horas a 30°C y 150 rpm. Estos cultivos se transfirieron a 180 mL de medio de cultivo TSB, para la producción de células vegetativas o de medio SBM modificado, para la producción de esporas. Los cultivos se prepararon en erlenmeyers de 1 L (Posada, 2012). Los cultivos se incubaron a 150 rpm y 30°C por un período de 24 horas, para el caso de tratamientos con células vegetativas y 72 horas en el caso de los tratamientos con esporas.

- **Obtención del sobrenadante libre de células**

Los cultivos bacterianos obtenidos en los medios TSB y SBM se centrifugaron durante 15 min a 4500 rpm para separar la biomasa del sobrenadante. La biomasa resultante de la centrifugación fue descartada y el sobrenadante se filtró con filtros de membrana de acetato de celulosa de 0.45 µm Sartorius® para obtener el SLC. Para determinar la filtración total de microorganismos se realizaron cultivos por superficie de los sobrenadantes en medio TSA 50% y se comprobó que no hubo crecimiento microbiano en el agar. Los sobrenadantes se almacenaron a 4°C hasta su uso.

- **Material vegetal**

Para las diferentes evaluaciones se emplearon semillas de tomate variedad Santa Cruz y semillas de maíz (ICA V-109 amarillo R) de Agrosemillas S.A., estas fueron desinfectadas con etanol al 70% por 15 minutos e hipoclorito de sodio al 5% (v/v) por 10 minutos, se realizaron dos lavados con agua destilada estéril (ADE) y se empleó vacío en el proceso de desinfección. Posteriormente el material se dispuso para germinación en cajas de Petri con papel absorbente previamente esterilizado, por un período tres días y en oscuridad.

- **Evaluación de la promoción de crecimiento del SLC de los medios de cultivo para la producción de esporas y células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en cultivos en evaluación**

Una vez pregerminadas las semillas, se sumergieron los SLC de cada cultivo y se agitaron por 1 hora, a 30°C y 150 rpm en un shaker (New Brunswick®, C1 Classic). Luego las semillas se sembraron en recipientes con 300 gr de sustrato Tierra Negra®, compuesto por una mezcla de 1:0.5:1:0.5 de arena, orgánicos, tierra y cisco de arroz y se dispusieron en el invernadero de forma aleatoria. Se emplearon tres unidades experimentales con tres plantas por unidad experimental. Se realizaron 3 ensayos unifactoriales cada uno en tiempos independientes, cuyo factor de estudio fue el tratamiento en los niveles que se muestran en la Tabla 4-1. Luego de dos meses de crecimiento de las plantas a nivel de invernadero, se desprendieron de las macetas y del sustrato de cultivo, se lavaron con abundante agua, se dividió la parte aérea (hojas y pseudotallo) y la parte radicular (raíz) y se evaluaron las variables fisiológicas indicadas en la Tabla 2-2.

Tabla 4-1. Tratamientos para la determinación del efecto de la aplicación del sobrenadante del cultivo del *B. subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento en *Zea Mays* y *Solanum lycopersicum*.

Tratamiento	Descripción del tratamiento
SLC-V	SLC del cultivo de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 en medio TSB
SLC-E	SLC del cultivo de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 en medio SBM
MF-V	Medio de cultivo TSB fresco sin inoculación bacteriana
MF-E	Medio de cultivo SBM fresco sin inoculación bacteriana

- **Análisis estadístico de los datos**

Para la evaluación de la promoción de crecimiento del SLC del *B. subtilis* EA-CB0575, fueron realizados 3 ensayos unifactoriales a nivel de invernadero en tiempos independientes. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de 95% y un análisis de rangos múltiples LSD haciendo uso del software Statgraphics Centurion XV. La verificación de los supuestos de normalidad de residuales, igualdad de varianzas e independencia de residuos se explica con detalle en el numeral 2.3.7

#### **4.3.5. Evaluación de la cinética de crecimiento y consumo de sustrato del *B. subtilis* EA-CB0575 de los medios de cultivo TSB y SBM a nivel de matraz**

- **Cinética de crecimiento del microorganismo**

Con el fin de evaluar los parámetros cinéticos y de consumo de sustrato de microorganismo se realizó un preinóculo de 12h, sembrando una colonia de la cepa proveniente de un cultivo en medio sólido incubado durante 24 horas a 30°C en 50 mL de los medios de cultivo en evaluación. 10 mL del cultivo anterior se adicionaron a 90 mL de medio fresco, y se dejó en incubación a 30°C, 150 rpm durante 50 horas. Se tomaron dos muestras de 1 mL cada dos horas durante las primeras 12 horas de los medios TSB y SBM y cada 12 horas durante el tiempo siguiente, las cuales se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos. El pellet fue resuspendido en 1 mL de agua destilada estéril para determinar la absorbancia ( $DO_{600}$ ).

- **Consumo de sustrato en los medios de estudio**

Se evaluó la presencia de azúcares reductores para los sobrenadantes del cultivo de esporas empleando el método de DNS (ácido-dinitrosalicílico) (Miller, 1959). Para esto se preparó una solución estándar de glucosa con 0.40 gr de glucosa anhidra grado reactivo en 100 mL de agua desionizada y se construyó una curva de calibración realizando diluciones del estándar para obtener 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 y 1.2 g/L de glucosa ver curva y mediciones en el

Anexo . Posteriormente, se tomaron 2 muestras de 1 mL del sobrenadante del cultivo y se les adicionó a cada uno 1 mL de solución DNS, se agitó, se llevó a ebullición por 10 minutos, se enfrió rápidamente, se dejó reposar por 15 minutos y se midió la densidad óptica a 540 nm ( $DO_{540}$ ). La concentración de glucosa experimental en cada punto se obtuvo a partir de la ecuación de la recta dada por la curva de calibración.

- **Modelación del crecimiento bacteriano**

Con los datos recolectados de concentración biomasa ( $DO_{600}$ ) y concentración de azúcares se calculó la velocidad específica de crecimiento microbiano ( $\mu_x$ ), el rendimiento de sustrato en biomasa ( $Y_x/s$ ) y el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) para cada tratamiento por el modelo exponencial.

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu_X \times t \text{ Ecuación 4-1}$$

Donde, X es la concentración de biomasa (g/L), t es el tiempo (s), X es la máxima concentración de biomasa (g/L), X<sub>0</sub> concentración de biomasa inicial (g/L).

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_X} \text{ Ecuación 4-2}$$

$$Y_{X/s} = \frac{dx}{ds} \text{ Ecuación 4-3}$$

Donde, Y<sub>X/s</sub> corresponde al rendimiento teórico de sustrato en biomasa (g/g) y fue determinado a partir de la pendiente de la figura X vs S (g/L) para los datos en la fase exponencial de crecimiento. Además, se modeló el crecimiento por medio del modelo logístico (Speers et al., 2003) y la cinética de consumo de sustrato mediante el modelo Luedeking Piret modificado (Gu et al., 2006) evaluando las desviaciones de los valores reales respecto al modelo en ambos casos.

$$\ln\left(\frac{X_{max}}{X} - 1\right) = \mu_{max} \times t + \left(\frac{X_{max}}{X_0} - 1\right) \text{ Ecuación 4-4.}$$

$$S(t) = -\left(\frac{1}{Y_{X/s}}\right) \times (X - X_0) + S_0 \text{ Ecuación 4-5.}$$

Donde, S es la concentración de sustrato (g/L), S<sub>0</sub> es la concentración de sustrato inicial (g/L).

## 4.4. Resultados y discusión

### 4.4.1. Determinación del efecto de la aplicación del sobrenadante del cultivo del *B.subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento en *Zea mays* y *Solanum lycopersicum*

Para determinar los efectos de la aplicación de los SLC obtenidos del cultivo de *B. subtilis* EA-CB0575 en medio TSB y SBM, y de los medios de cultivo frescos respecto al control absoluto sin inocular sobre los cultivos en evaluación se realizaron 3 ensayos experimentales en el cultivo de maíz y 3 en el cultivo de tomate. Los resultados se muestran en la Tabla 4-2.

Tabla 4-2. Resumen de los resultados de los ensayos realizados para determinar el efecto promotor de crecimiento del sobrenadante libre de células de *B. subtilis* EA-CB0575 sobre las variables fisiológicas de *Zea mays* y *Solanum lycopersicum* a nivel de invernadero.

Material Vegetal	Ensayo	Resultado	Variables	Tratamientos	Porcentaje de aumento (%)	Valor P	Reproducibilidad
Maíz	1	Hay promoción de crecimiento	LA	SLC Esporas SLC Vegetativas	54 58	0.001	67 %
			PSA	SLC Esporas SLC Vegetativas	51	0.0000	
			PSR	SLC Esporas SLC Vegetativas	10 34	0.0022	
			PST	SLC Esporas SLC Vegetativas	61 78	0.0000	
	2	No hay Promoción de crecimiento	No aplica				
	3	Hay promoción de crecimiento	LA	Medio TSB	29	0.0206	
			PSA	Medio TSB	45	0.0029	
PST			Medio TSB	40	0.0037		
Tomate	1	Hay promoción de crecimiento	PSR	SLC Esporas	85	0.0022	100%
	2	Hay promoción de crecimiento	PSA	SLC Vegetativas, Medio SBM, SLC Esporas	76 77 80	0.0000	
			PSR	SLC Vegetativas SLC Esporas	49 62	0.0004	
			PST	Medio SBM SLC Esporas, SLC Vegetativas	70 73 75	0.0000	
	3	Hay promoción de crecimiento	PSA	SLC Vegetativas Medio SBM	52 58	0.0101	
			PST	SLC Vegetativas, Medio SBM	52 61	0.0169	

Se encontró que la inoculación del SLC en el cultivo para la producción de *B.subtilis* EA-CB0575 en forma de esporas y células vegetativas tiene una influencia positiva en las variables fisiológicas evaluadas en ambos cultivos, con porcentajes de aumento promedio del 50% en la planta de maíz y 70% en la planta de tomate. El medio de cultivo fresco para

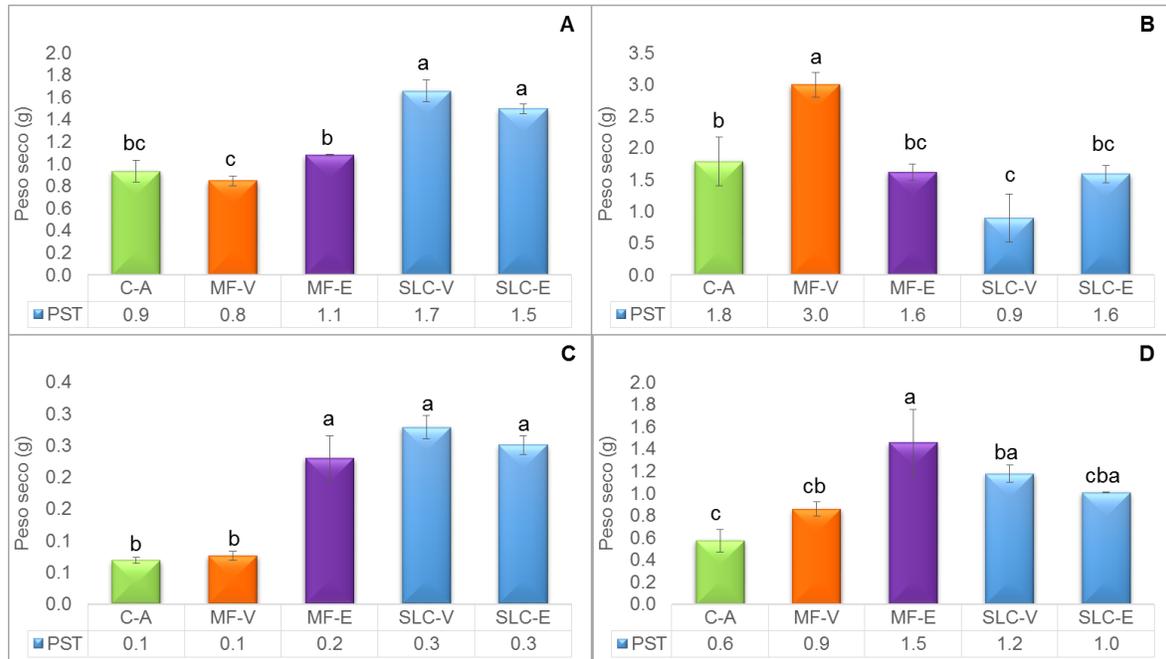
la producción de células vegetativas favoreció el crecimiento en un 29, 45 y 40% de las variables LA, PSA y PST respectivamente del cultivo de maíz y el medio fresco estéril para la producción de esporas incrementó las variables PSA y PST del cultivo de tomate con porcentajes de aumento del 58 y 61% respectivamente respecto al control. Adicionalmente, el ensayo 2 en el cultivo de maíz no tuvo diferencias significativas en ninguna variable de respuesta respecto al control, lo que indica una reproducibilidad del 67%, en el ensayo de tomate todos los tratamientos presentaron un efecto promotor sobre las variables evaluadas por lo tanto su reproducibilidad fue del 100%.

Con el fin de estudiar el efecto promotor de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos, Buensanteai y colaboradores en 2008 y 2013, evaluaron el efecto promotor del SLC de *B. amyloliquefaciens* KPS46 y *B. subtilis* CaSUT007 en cultivos de soya y yuca respectivamente, en ambos casos se encontró que el ácido indolacético y algunos metabolitos secundarios como las surfactinas, están presentes en el sobrenadante del cultivo y juegan un papel importante, en el incremento (25 - 30%) del peso seco total del material vegetal de estudio (Buensanteai et al., 2013; Buensanteai et al., 2008). Ochoa en 2014, evaluó a nivel de invernadero la inoculación del SLC del cultivo de *B. subtilis* EACB-0575 en forma de esporas y células vegetativas y los medios de cultivo TSB y SBM puros en plantas de banano variedad Williams a nivel de invernadero y obtuvo que los SLC provenientes de los cultivos de esporas y células vegetativas promovieron el desarrollo de las variables LA, PSA y PST del cultivo en 13-20%, 17-19% y 13-15% respectivamente, además el medio fresco SBM mostró diferencias significativas respecto al control negativo en las variables LA, PSA y PSR evidenciando incrementos del 19, 28 y 24% respectivamente (Ochoa Gómez, 2014) .

La Figura 4-1, muestra los datos de la variable peso seco total (PST) en ambos cultivos en evaluación, puede observarse que en la planta de maíz se vio influenciada en el ensayo 1 (Figura 4-1A), por la inoculación del SLC de células vegetativas y esporas aumentando en entre un 61 y 78% esta variable y en el ensayo 3 por el tratamiento que contenía el medio fresco estéril para la producción de células vegetativas, incrementando en un 40% esta variable de respuesta respecto al control absoluto, por otra parte la inoculación con el SLC de las células vegetativas redujo en un 50% esta variable (Figura 4-1B). En el cultivo de tomate, los tratamientos SLC de esporas y células vegetativas y el medio fresco para la producción de esporas aumentaron entre un 70 y 75% la variable peso seco total con diferencias significativas respecto al control absoluto en el ensayo 2 (Figura 4-1C). En el

ensayo 3, la variable, aumentó entre un 52 y 61% cuando se inoculó con el SLC de células vegetativas y el medio fresco estéril para la producción de esporas, mostrando diferencias significativas respecto al control sin inocular (Figura 4-1D).

Figura 4-1. Peso Seco Total de las plantas inoculadas con el medio TSB y SBM fresco y el SLC del cultivo de *B. subtilis* EA-CB0575 en medios específicos para la producción de células vegetativa y esporas (TSB y SBM) en los cultivos en evaluación.



\*Letras diferentes representan diferencias significativas respecto al control según test LSD con  $\alpha=0.05$ . Los tratamientos están dados: SLC obtenido a partir del medio SBM modificado específico para la producción de esporas (SLC-E), SLC obtenido a partir del medio TSB específico para la producción de células vegetativas (SLC-V), Medio fresco estéril SBM para la esporulación de *Bacillus* sin inocular (MF-E), Medio fresco estéril TSB para la producción de células vegetativas sin inocular (MF-V), Control absoluto (C-A), **A.** PST en el ensayo 1 del cultivo de Maíz. **B.** PST en el ensayo 3 del cultivo de Maíz. **C.** PST en el ensayo 2 del cultivo de Tomate. **D.** PST en el ensayo 3 del cultivo de Tomate.

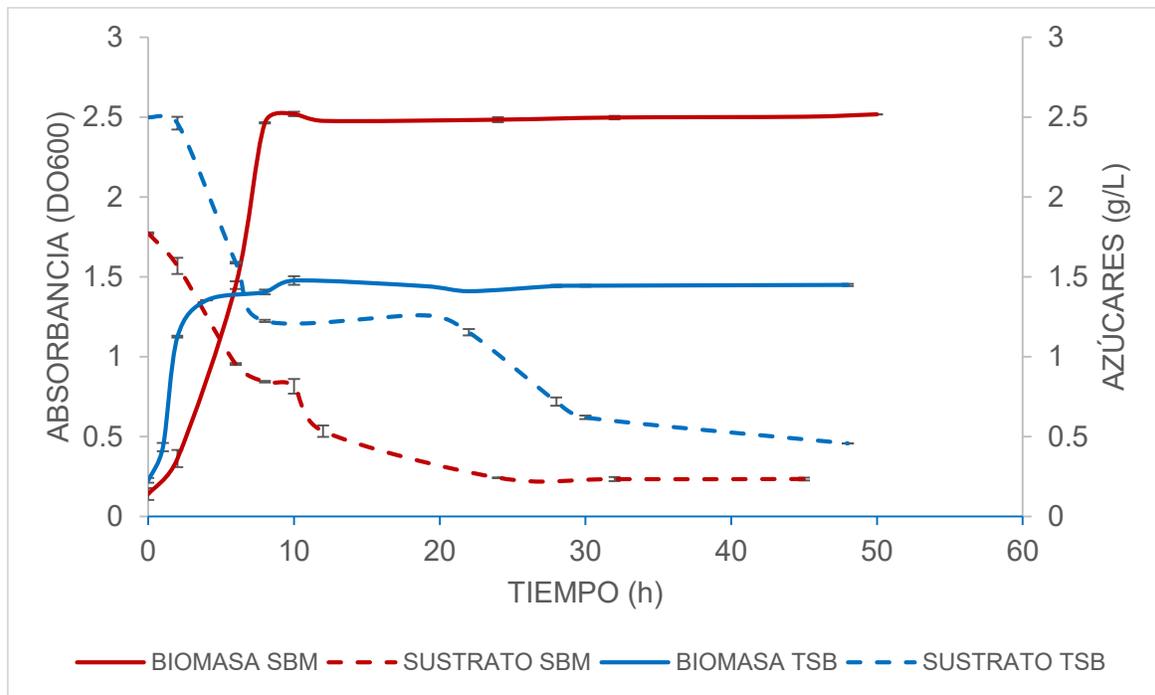
Finalmente, los incrementos en las variables evaluadas gracias a la inoculación de los SLC del microorganismo para la producción de esporas y células vegetativas, sugieren que el microorganismo de estudio produce metabolitos secundarios y compuestos biológicamente activos con gran actividad antibiótica, posiblemente iturinas, fengicinas y surfactinas (Idris et al., 2007; Ongena and Jacques, 2008; Romero et al., 2007). Por otra parte los incrementos asociados a los medios frescos del cultivo pueden asociarse a la composición del mismo, ya que algunos nutrientes comunes para el crecimiento de microorganismos son

utilizados para la fabricación de fertilizantes químicos o medios nutritivos para el cultivo hidropónico de las plantas (Shen et al., 2011; Valenzuela López et al., 2014).

#### 4.4.2. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato del *B.subtilis* EA-CB0575 en los medios de cultivo para la producción de esporas y células vegetativas.

El microorganismo *B.subtilis* se cultivó en los medios SBM y TSB durante 50 horas, con el fin de determinar la cinética de crecimiento y consumo de azúcares reductores e identificar la presencia de trazas residuales de nutrientes que pueden aportar al desarrollo de la planta. La Figura 4-2 muestra la cinética de crecimiento ( $DO_{600}$ ) y consumo de sustrato (g/L) del *B.subtilis* EACB-0575 en los medios TSB y SBM.

Figura 4-2. Cinética de crecimiento ( $DO_{600}$ ) y consumo de sustrato de *B.subtilis* EACB-0575 en los medios TSB y SBM



\*Barras verticales corresponden a los errores estándar n=2

Puede observarse en el crecimiento de biomasa de ambos medios que no se presenta fase de latencia en el cultivo y que la fase exponencial de crecimiento inicia en la hora 0 y se extiende hasta la hora 10 para el medio SBM y hasta la hora 8 para el medio TSB, en ambos se presenta una fase estacionaria de 40 horas aproximadamente. En el consumo de sustrato la concentración de azúcares reductores en el medio SBM es mucho mayor a la

concentración de glucosa adicionada en lo que indica la presencia de otras fuentes de azúcares reductores diferentes a la glucosa probablemente aportados por algunos componentes complejos del medio, por otro lado, *B. subtilis* EA-CB0575 en el medio para la producción de esporas tuvo un consumo del 90% de los azúcares reductores presentes en el medio, encontrándose 0.17g/L de azúcares reductores residuales y en el medio TSB consumió el 83% de los azúcares reductores presentes en el medio (0.43 g/L). En estudios realizados por Zhong y colaboradores en 2014 se encontró que el *B. subtilis* ZK8 cultivado en un medio para la producción de células vegetativas presenta una fase de latencia en las 5 primeras horas del cultivo, una fase exponencial de aproximadamente 15 horas y una fase estacionaria a partir de la hora 20 donde la glucosa ha sido consumida en un 87% (Zhong et al., 2014). La Tabla 4-3 muestra los parámetros cinéticos del microorganismo mediante el modelo exponencial. Se halló la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_x$ ), el tiempo de duplicación del microorganismo ( $t_d$ ) y rendimiento observado de biomasa en sustrato  $Y'_{x/s}$ .

Tabla 4-3. Parámetros cinéticos modelados mediante el modelo exponencial, para la cinética de crecimiento y consumo de sustrato de *B.subtilis* EA-CB 0575 en el medio SBM

Parámetros cinéticos							
Medio de Cultivo	$\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )	td (h)	R <sup>2</sup>	$Y'_{x/s}$ (DO <sub>600</sub> /g)	R <sup>2</sup>	DO <sub>600max</sub>	% Esporulación (50 h)
SBM	0.16	4.33	0.99	2.24	0.91	2.52	98
TSB	0.27	2.60	0.7	0.84	0.97	1.45	3.31

Los resultados obtenidos anteriormente muestran que el cultivo para la producción esporas alcanzó una densidad óptica máxima de 2.52 y el medio TSB de 1.45, adicionalmente el rendimiento observado fue mayor en el medio SBM que en el TSB, lo que indica que hubo un mayor asimilación de los nutrientes en el medio SBM. Adicionalmente la velocidad específica de crecimiento fue mayor en el medio para la producción de células vegetativas que en el medio para la producción de esporas, por lo cual el tiempo de duplicación del microorganismo es menor cuando se trabaja con el medio TSB, sin embargo el modelo de Monod no se ajustó adecuadamente en el caso del medio TSB por lo que se recomienda modelar el crecimiento con modelos como Tessier o Mosser (Liu, 2013). Al finalizar la cinética de crecimiento se realizó una siembra por superficie para conocer el porcentaje de esporulación de ambos cultivos y se determinó que el medio SBM tuvo un porcentaje de esporulación del 98% y el del medio TSB fue del 3.31% lo que indica que los nutrientes y

las condiciones del cultivo facilitan la producción de esporas del microorganismo. La literatura cita que la falencia de nutrientes como el nitrógeno, carbono y fósforo pueden inducir la esporulación, lográndose la producción de esporas en la fase estacionaria de crecimiento cuando los nutrientes se agotan (Sonenshein, 2000). En diversas especies del género *Bacillus* se encontró que la esporulación puede tardar entre 30 horas y 14 días, producirse en medios de diferentes composiciones, temperaturas entre 25 y 37°C y pH entre 5 y 7.5 (Monteiro et al., 2005). Posada Uribe realizó previamente un estudio con la cepa *B.subtilis* EA-CB0575, comparando el crecimiento de la cepa en ambos medios y encontró que la fase exponencial en el medio de cultivo TSB tuvo una duración aproximada de 10 horas y el medio de cultivo SBM tiene una duración de 12 horas, adicionalmente obtuvo porcentajes de esporulación del 5% para el medio TSB y del 94% para el medio SBM, además el rendimiento observado fue mayor en el medio para la producción de esporas. De acuerdo a los resultados puede inferirse que los medios de cultivo son determinantes en la producción de biomasa o esporas microbianas, ya que estos componen los nutrientes requeridos para el crecimiento y desarrollo celular y la presencia de diferentes compuestos, macro y micronutrientes, en diferentes concentraciones pueden generar cambios en el crecimiento y esporulación de los microorganismos, debido a variaciones en el metabolismo y en el intercambio de aire dentro del sistema (Monteiro et al., 2005; Schaeffer et al., 1965; Shafikhani et al., 2003). Además, se realizó el ajuste de los datos de crecimiento y consumo de sustrato respecto al modelo logístico y Luedeking Piret modificado, con los que se determinaron los datos teóricos  $\mu_{max}$ ,  $X_0$ ,  $Y_{x/s}$  y  $S_0$  que se presentan en la Tabla 4-4

Tabla 4-4. Parámetros cinéticos de *B.subtilis* EA-CB0575 obtenidos por el modelo Logístico, Luedeking Piret y experimentalmente

Medio de cultivo	Biomasa	Parámetros Cinéticos		
		$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	X <sub>0</sub> (DO <sub>600</sub> )	R <sup>2</sup>
SBM	Modelo Logístico	0.52	0.11	0.99
	Datos Experimentales	0.25	0.14	0.95
TSB	Modelo Logístico	0.73	0.36	0.89
	Datos Experimentales	0.29	0.23	0.5
Medio de Cultivo	Sustrato	Parámetros Cinéticos		
		Y <sub>x/s</sub> (DO <sub>600</sub> /g)	S <sub>0</sub> (g/L)	R <sup>2</sup>
SBM	Modelo Luedeking Piret	2.47	1.68	0.9
	Datos Experimentales	1.04	1.8	0.73
TSB	Modelo Luedeking Piret	2.52	1.15	0.55
	Datos Experimentales	0.03	2.5	0.54

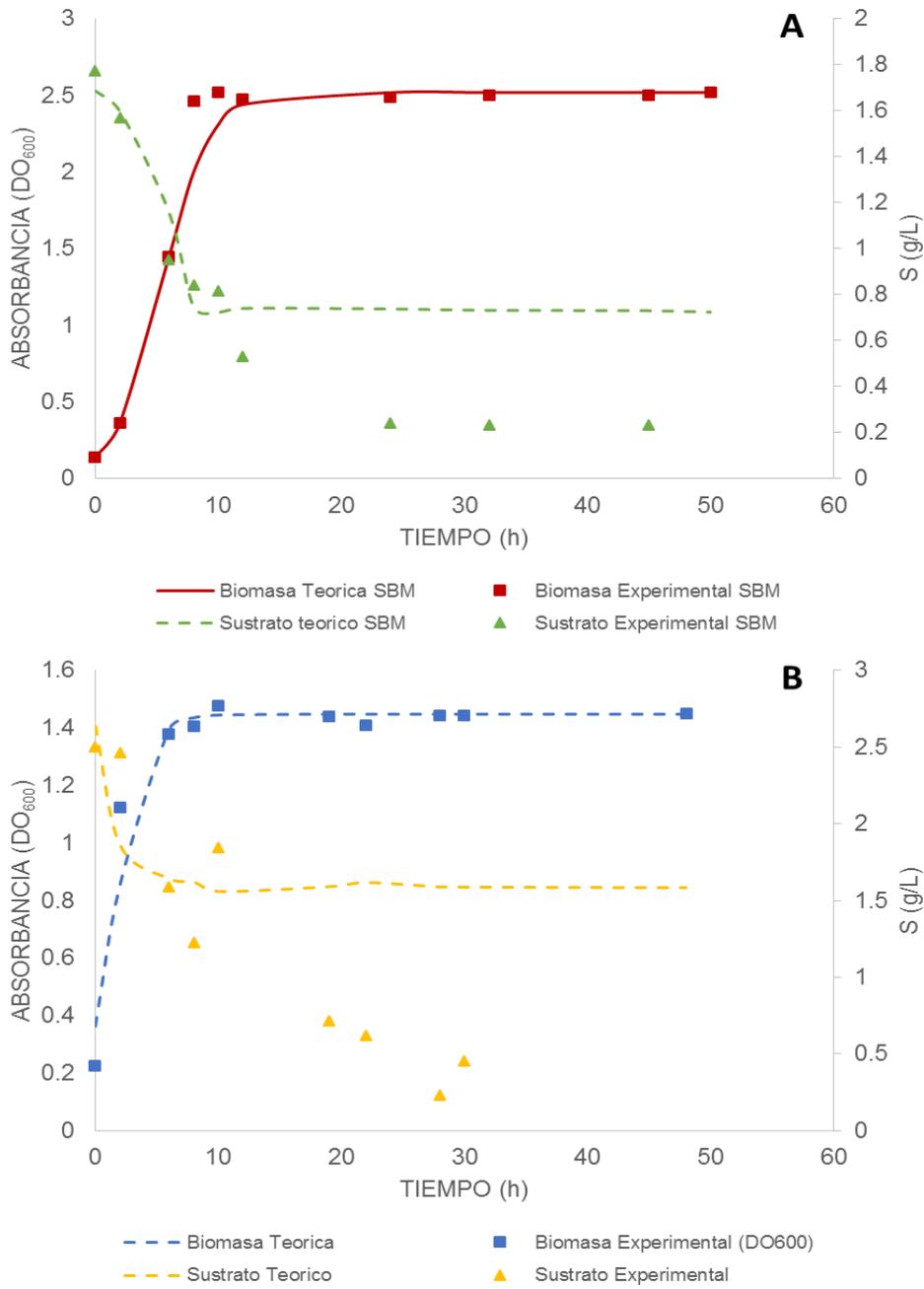
La tabla anterior muestra que en el caso de la biomasa, teóricamente el modelo podría llegar a una velocidad específica de crecimiento máxima de  $0.52 \text{ h}^{-1}$  en el medio de cultivo SBM y de  $0.73 \text{ h}^{-1}$  en el medio de cultivo TSB, pero debido a las condiciones del cultivo solo llegan a las velocidades específicas reportadas. En el caso de los azúcares reductores presentes, se encontraron rendimientos estequiométricos para cada medio, en el medio SBM se encontró un valor de 2.47 ( $\text{DO}_{600}/\text{g}$ ) para una concentración de sustrato inicial de 1.8 (g/L) y en el medio TSB el rendimiento estequiométrico fue de 2.52 ( $\text{DO}_{600}/\text{g}$ ) para una concentración de sustrato inicial de 1.68 (g/L). Sin embargo en el medio TSB no se presentó un buen ajuste a los modelos evaluados, para lo cual sería adecuado evaluar otros reportados en la literatura (Liu, 2013). Posada en 2012, reportó los valores correspondientes a  $\mu_{max}$ ,  $X_0$ ,  $Y_{x/s}$  y  $S_0$  para el medio SBM a nivel de biorreactor donde, para la biomasa los valores experimentales de  $\mu_{max}$  y  $X_0$  fueron respectivamente  $0.29 \text{ (h}^{-1}\text{)}$  y  $0.13 \text{ (g/L)}$  y los valores teóricos mediante el modelo logístico fueron  $0.52 \text{ (h}^{-1}\text{)}$  y  $0.11 \text{ (g/L)}$  con un ajuste de los datos entre el 99 y 97% respectivamente y para el sustrato los valores experimentales de  $Y_{x/s}$  y  $S_0$  fueron  $1.85 \text{ (g/g)}$  y  $2.32 \text{ (g/L)}$  y los valores teóricos modelados mediante el modelo Ludecking Piret fueron  $1.85 \text{ (g/g)}$  y  $2.02 \text{ (g/L)}$  con un ajuste de los datos entre el 93 y 95%.

En otro reporte, Subhasish y colaboradores estudiaron en 2011 los modelos logístico y ludecking Piret para describir el comportamiento de la producción de esporas de *B. coagulans* RK-02, encontrando que la producción de biomasa se ve influenciada por la presencia de azúcares reductores en concentraciones inferiores a 20 (g/L) y superiores a 4(g/L). Cuando la concentración inicial de sustrato ( $S_0$ ) fue de 4 g/L, la biomasa aumentó exponencialmente hasta que la glucosa llegó a concentraciones del alrededor 0,4 g/L y comenzó la esporulación del microorganismo en la fase estacionaria (aproximadamente a las 8 horas del cultivo). Adicionalmente, encontraron que el rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) promedio del crecimiento fue de 0.116 g/g, y la  $\mu_{max}$  experimental fue de  $0.52 \text{ (h}^{-1}\text{)}$  y la arrojada por el modelo de  $0.93 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ , la diferencia entre ambas podría reducirse mediante la optimización de parámetros como el pH y la concentración de sales en el medio (Das and Sen, 2011).

En la Figura 4-3 se muestran las curvas de crecimiento en el tiempo, biomasa ( $\text{DO}_{600}$ ) y consumo de sustrato, g/L de azúcares reductores para los medios TSB y SBM. Se observa una similitud entre los datos del modelo logístico y los datos experimentales en ambos medios, respecto al modelo Ludeking piret, se muestra que experimentalmente el

microorganismo continua consumiendo azúcares hasta las 45 horas del cultivo, lo que indica que el modelo no describe adecuadamente los datos experimentales.

Figura 4-3. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato y modelos ajustados para *B. subtilis* EA-CB0575 en los medios de cultivo.



A. Medio SBM, B. Medio TSB.

## 4.5. Conclusiones

Los resultados obtenidos mediante las pruebas realizadas a nivel de invernadero en ambos cultivos muestran que la inoculación del SLC de los cultivos para la producción de *B.subtilis* EA-CB0575 en forma de esporas y células vegetativas y los medios de cultivo frescos TSB y SBM, tienen una influencia positiva en el desarrollo de los cultivos de maíz y tomate. En el caso de SLC se obtuvieron aumentos promedio del 50% en maíz y del 70% en el cultivo de tomate y en el caso de los medios frescos, el medio para producción de células vegetativas promovió el crecimiento de las plantas de maíz en un 42% y el medio para la producción de esporas aumentó el crecimiento de la planta de tomate en un promedio del 69%. Son pocos los reportes relacionados con el efecto de la inoculación del género *Bacillus spp.*, ya sea en su estructura vegetativa, esporas o en el sobrenadante libre de células proveniente de su fermentación y este hecho junto con los resultados previos reportados por Ochoa en 2014, podrían ser un aliciente para continuar investigando sobre los mecanismos utilizados por esta PGPR para promover el crecimiento vegetal y contribuir al aprovechamiento de uno de sus subproductos más grandes.

## **5. Identificación de los lipopéptidos reportados para la promoción de crecimiento presentes en el sobrenadante del cultivo del *B. subtilis* EA-CB0575 en medios de cultivo para producción de esporas y células vegetativas.**

### **5.1. Resumen**

Las cepas del género *Bacillus* producen una variedad compuestos con propiedades antibacterianas y antifúngicas, entre los que se encuentran los lipopéptidos cíclicos pertenecientes a las familias de las surfactinas, iturinas y fengicinas. Estos lipopéptidos, están comúnmente asociados a la promoción de crecimiento de la planta mediante el biocontrol de fitopatógenos. En el presente trabajo se identificaron los metabolitos presentes en el sobrenadante del cultivo de la PGPR *B.subtilis* EA-CB0575 y se cuantificó su producción cuando el microorganismo fue cultivado en los medios para la producción de esporas y células vegetativas del microorganismo. Se encontró que según los picos obtenidos en los cromatogramas realizados para la visualización preliminar de los metabolitos las fengicinas podrían estar presentes entre los tiempos de retención 10 y 20 minutos y las surfactinas entre los 25 y 30 minutos, adicionalmente y mediante la cuantificación de las áreas de los picos en los cromatogramas realizados para los medios TSB y SBM, se observó que el rendimiento y la producción de metabolitos es mayor cuando el microorganismo está en estado vegetativo.

## 5.2. Introducción

Cerca del 10% de la producción mundial de alimentos se pierde gracias a la incidencia de enfermedades y plagas que atacan a los cultivos de interés agrícola, estas enfermedades, incrementan los costos de producción, gracias a la necesidad de implementar estrategias adicionales para el control del microorganismo patógeno o la disminución de sus efectos sobre los cultivos (Strange and Scott, 2005). Actualmente, se ha investigado acerca del desarrollo de bioproductos a partir de PGPR para el control de fitopatógenos, en aras de generar cultivos amigables con el medio ambiente y al mismo tiempo contribuir con la crisis alimentaria actual (Bloemberg and Lugtenberg, 2001; Regazzo-Sanchez et al., 2011).

Estos microorganismos tienen efectos benéficos en el desarrollo de los cultivos, pueden promover el crecimiento de las plantas y adicionalmente evitar la infección del tejido vegetal por patógenos (Raaijmakers et al., 2002). Gracias a su aplicación es posible aumentar el rendimiento de los cultivos y mejorar las capacidades de la planta para resistir periodos más largos de sequía (Compant et al., 2005; Jetiyanon and Kloepper, 2002; Raaijmakers et al., 2002). Gou y colaboradores evaluaron en 2004 el control biológico de tres PGPR a nivel de invernadero: *Serratia* sp. J2, J3 *P. fluorescens* y *Bacillus* sp. BB11, y encontraron que las tres controlaban la marchitez del tomate causada por *Ralstonia solanacearum* y además promovían el crecimiento y desarrollo de la planta aumentando su productividad (Guo et al., 2004).

Se conoce que el género *Bacillus* produce un amplio espectro de metabolitos secundarios en forma de lipopéptidos con un gran potencial para la biotecnología, los cuales, son efectivos para inhibir el desarrollo de hongos y bacterias patógenas entre los que se destacan, *Podosphaera fusca*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *P. syringae* (Cao et al., 2012; Ongena and Jacques, 2008; Romero et al., 2007; Yu et al., 2002). Adicionalmente, Ongena y Jacques en 2008, reportaron que los lipopéptidos producidos por *B.subtilis* pueden influir en la colonización de las raíces y por tanto en la duración de la bacteria en la rizósfera de la planta, además estudios realizados por Buensanteai y colaboradores en 2013 determinaron que el sobrenadante del cultivo de esta especie, tiene un efecto promotor sobre los cultivos, gracias a la producción de estos metabolitos durante el desarrollo del microorganismo (Buensanteai et al., 2013; Buensanteai et al., 2008; Ongena and Jacques, 2008). Dentro de los metabolitos secundarios producidos por *B.subtilis*, se destacan las familias Iturinas, fengicinas y surfactinas, los cuales son

compuestos anfifílicos estructuralmente diversos Las Iturinas y fengicinas son potentes agentes antifúngicos y las surfactinas son un poderoso biosurfactante que tiene gran actividad antibacterina y antiviral (Ongena and Jacques, 2008; Raaijmakers et al., 2002).

Trabajos previos del grupo de investigación han determinado que la rizobacteria *B. subtilis* EA-CB0575 es antagonista a nivel *in vitro* de *Fusarium* sp., *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* y *Mycosphaerella fijiensis*, además es promotora del crecimiento de diferentes cultivos y cuando es cultivada en el medio de cultivo MOLP (Jacques et al. ,1999) produce los lipopéptidos pertenecientes a las familias de las fengicinas y las surfactinas (resultados no publicados) (Ceballos et al., 2012; Cuéllar Gaviria, 2014; Posada Uribe, 2012; Villegas Escobar, 2012). De acuerdo a lo anterior, el propósito de este estudio, fue identificar los lipopéptidos presentes en el sobrenadante libre de células de los cultivos del microorganismo para la producción de esporas y células vegetativas.

## **5.3. Materiales y Métodos**

### **5.3.1. Localización**

El experimento se realizó en el laboratorio de biotecnología y en el laboratorio de química instrumental de la Universidad EAFIT, Medellín.

### **5.3.2. Microorganismo y proceso fermentativo**

Se empleó el microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575 aislado en trabajos realizados previamente por la Universidad EAFIT-AUGURA de la rizósfera de una planta de banano, *Musa* AAA cv. Valery. El microorganismo fue conservado y activado como se describe en el numeral 2.3.2. Se prepararon 3 preinóculos de 12 h (30°C, 140 rpm) en Erlenmeyers de 100 mL con 20 mL de medio de cultivo MOLP, TSB y SBM (Anexo 1) los cuales fueron posteriormente inoculados en Erlenmeyers de 1L con 180 mL de medio MOLP, TSB y SBM y crecidos por 5 días para el medio de cultivo MOLP y 3 días para los medios de cultivo TSB y SBM a 30°C, 140 rpm.

### **5.3.3. Extracción de los compuestos presentes en el sobrenadante de los cultivo de *B.subtilis* EA-CB0575**

La preparación y extracción de los metabolitos secundarios producidos por *B.subtilis* EA-CB0575 se realizó según la metodología propuesta por Villegas, en 2012. Pasadas 12 h de incubación se adicionó a cada Erlenmeyer 4% de resina amberlita XAD-16 (Alfa Aesar®) previamente esterilizada y al finalizar el tiempo de incubación se retiró el sobrenadante y se lavó la resina con 500 mL de agua destilada estéril. Los metabolitos absorbidos en la resina se eluyeron con 200 mL de MeOH y la fracción metanólica se evaporó a presión reducida en un rotoevaporador (50°C, -50 psig) hasta obtener un residuo sólido que fue resuspendido en agua destilada (11 mL). Posteriormente se realizó la etapa de extracción en columna SPE (Solid Phase Extraction) C18 (Baker®, 500 mg), empleando un flujo menor a 3 mL/min con bomba de vacío. Para esta etapa se realizaron los fraccionamientos de la siguiente manera:

- **Proceso de extracción para observación preliminar de los extractos (Fraccionamiento 1):**

Con el fin de realizar una observación rápida de los picos, presentes en los extractos obtenidos de los medios TSB, SBM y MOLP, se procedió al acondicionamiento de la columna SPE C18 de la siguiente manera: primero se pasaron 80 mL de acetonitrilo por la columna, posteriormente se pasaron 80 mL de MeOH y 80 mL de agua destilada. Luego se aplicó la muestra (10 mL) a la columna y se eluyeron los compuestos con diferentes relaciones de MeOH – H<sub>2</sub>O (80 mL) en gradiente por etapas. Primero se pasó metanol al 50% y luego metanol al 100% dos veces. La fracción de 100% se colectó y se evaporó con nitrógeno líquido para posteriormente almacenarse hasta la cuantificación a 4°C.

- **Proceso de extracción para observación preliminar de los extractos (Fraccionamiento 2):**

Para cuantificar los metabolitos presentes en los extractos obtenidos de los medios TSB y SBM se acondicionó la columna SPE C18 de menor tamaño cartridge (Agilent®, 10g) empenado primero 4 mL de acetonitrilo, luego 4 mL de MeOH y 4 mL de agua destilada. Posteriormente se aplicó la muestra (2 mL) y se procedió a la elución de los compuestos con diferentes relaciones de MeOH – H<sub>2</sub>O (4 mL) en gradiente por etapas. Se utilizó el gradiente por etapas 20%, 40%, 70% y 100% MeOH, seguida de un lavado adicional con

etanol 100%. Las fracciones 70% y 100% más metanol de lavado al 100% se procedieron a evaporar con nitrógeno líquido y almacenado a 4 ° C hasta su cuantificación.

### 5.3.4. Purificación e identificación de los compuestos presentes en el sobrenadante de los cultivos de *B.subtilis* EA-CB0575

Los extractos crudos obtenidos en cada caso, se resuspendieron en 2 mL de MeOH al 100% y se purificaron por medio de cromatografía líquida (HPLC Agilent 1200) en fase reversa. Se utilizó una columna Eclipse XDB C18 (250 x 4.6 mm, y tamaño de poro 5 µm) y una fase móvil A (agua + 0.1%TFA) y C (acetonitrilo + 0.1%TFA). La Tabla 5-1 muestra las especificaciones del gradiente de acetonitrilo para la observación preliminar de los picos y la cuantificación de los metabolitos presentes. Ambas evaluaciones se realizaron con un flujo de 1 mL/min, una detección UV a 214 nm y una inyección de 40 µL de muestra a una concentración de 50 mg/mL. Las evaluaciones se realizaron por duplicado y en dos tiempos diferentes.

Tabla 5-1. Modo de operación en gradiente de HPLC en fase reversa para la observación preliminar de los extractos obtenidos de los medios TSB, SBM y MOLP y la cuantificación de los extractos obtenidos del medio TSB y SBM.

Medios de Cultivo	Identificación Preliminar	
MOLP TSB SBM	Tiempo	%C (acetonitrilo + 0.1%TFA)
	0 minutos	30
	25 minutos	100
	35 minutos	100
<b>Cuantificación de los extractos obtenidos</b>		
TSB SBM	Tiempo	%C (acetonitrilo + 0.1%TFA)
	0 minutos	30
	60 minutos	70
	75 minutos	100
	85 minutos	100

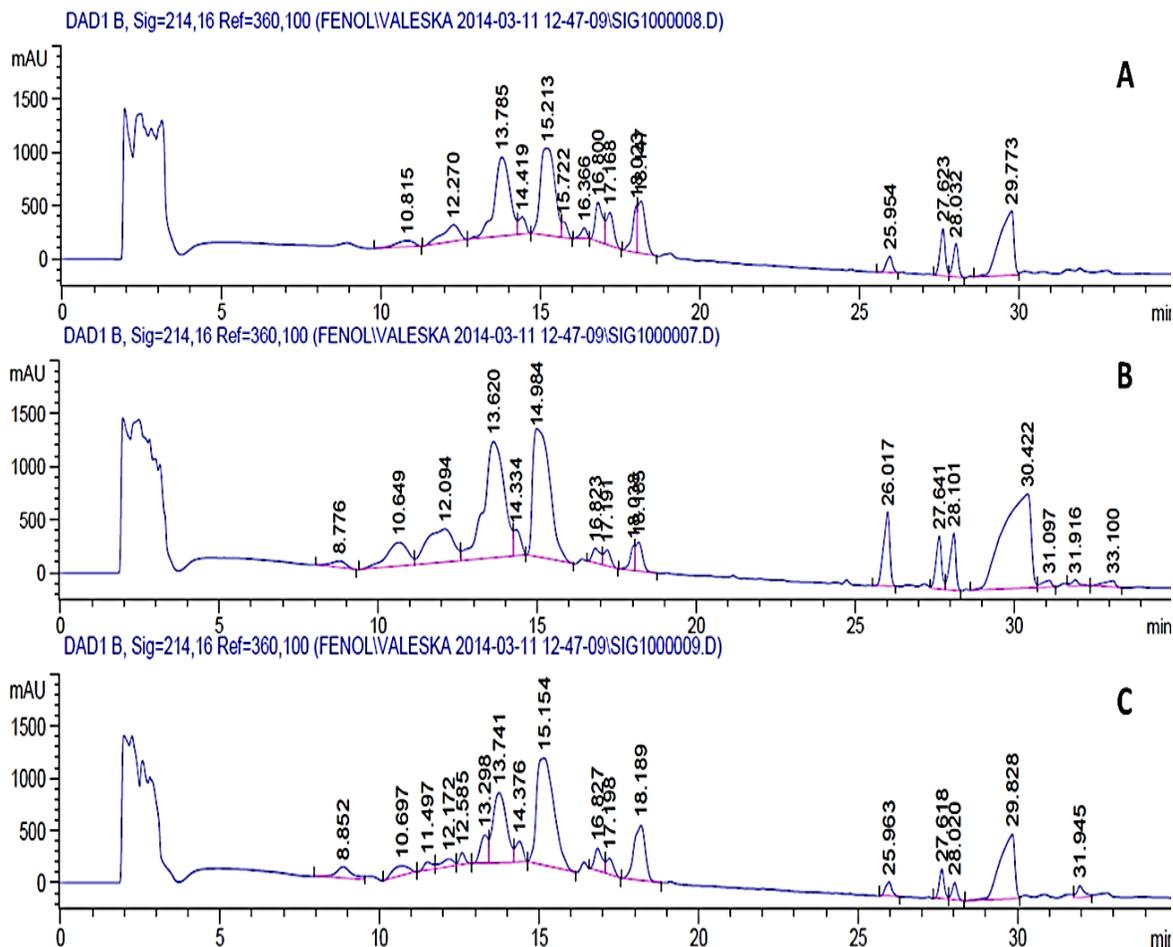
## 5.4. Resultados y discusión

### 5.4.1. Análisis preliminar de los extractos crudos obtenidos del sobrenadante del cultivo de *B.subtilis* EA-CB0575.

Con el fin de visualizar los metabolitos del tipo lipopéptidos presentes en las fracciones provenientes de los sobrenadantes del cultivo del *B.subtilis* EA-CB0575 en el medio MOLP, TSB y SBM, se realizó la purificación de los extractos crudos obtenidos en cada medio mediante cromatografía líquida (HPLC) en fase reversa inyectando 40 µL de cada extracto metanólico a una concentración de 50 mg/mL.

Fueron calculados los rendimientos para cada medio de cultivo, el medio MOLP obtuvo un rendimiento de 99 mg, el medio TSB 35 mg y el medio SBM obtuvo 3 mg del extracto crudo, el cual, podría estar compuesto por los metabolitos de interés. El medio MOLP es un medio optimizado para la producción de lipopéptidos del microorganismo *B.subtilis* S499 y por tanto fue considerado un medio control para la visualización de los metabolitos presentes en el microorganismo de estudio (Jacques et al., 1999). Ya previamente Villegas-Escobar en 2013, estudió la producción de compuestos antimicrobianos tipo lipopéptidos por parte de la cepa *B. subtilis* EA-CB0015, una cepa también aislada de banano y encontró que cuando esta es cultivada en medio MOLP produce surfactinas, Iturinas y fengicinas, los cuales fueron purificados e identificados por espectrometría de masa (MS) (Villegas-Escobar et al., 2013). Este mismo autor logró determinar también que en medio MOLP la cepa de estudio de este proyecto, *B. subtilis* EA-CB0575, puede producir lipopéptidos del tipo surfactinas y fengicinas, pero la producción de iturinas no fue detectada (datos no mostrados). En este caso, se realizó la evaluación al medio MOLP en el cual se cultivó el microorganismo de interés y además se evaluaron los medios SBM y TSB. Los cromatogramas de las extracciones en fase solida a una concentración 50 mg/mL de 100% MeOH para cada medio de cultivo evaluado se muestran en la Figura 5-1.

Figura 5-1. Perfil cromatográfico del extracto SPE 100% de *B. subtilis* EA-CB0575 en el gradiente por etapas 50%, 100% en los medios MOLP, TSB y SBM.



A. Cromatograma medio MOLP B. Cromatograma medio TSB C. Cromatograma medio SBM.

Los cromatogramas mostrados anteriormente, evidencian grupos de picos en tiempos de retención muy similares (Figura 5-1 A, B y C). Un primer grupo eluye en los tiempos entre los 10 y 20 minutos y un segundo grupo entre los 25 y 30 minutos. Esto ha sido encontrado en el grupo de investigación por Villegas-Escobar quien sugiere que los grupos de picos similares pertenecen a las fengicinas y surfactinas producidas por *B. subtilis* EA-CB0575 y que además, este microorganismo no produce iturinas (datos no publicados). Adicionalmente, Posada-Urbe en su tesis doctoral (2015) identificó por espectrometría de

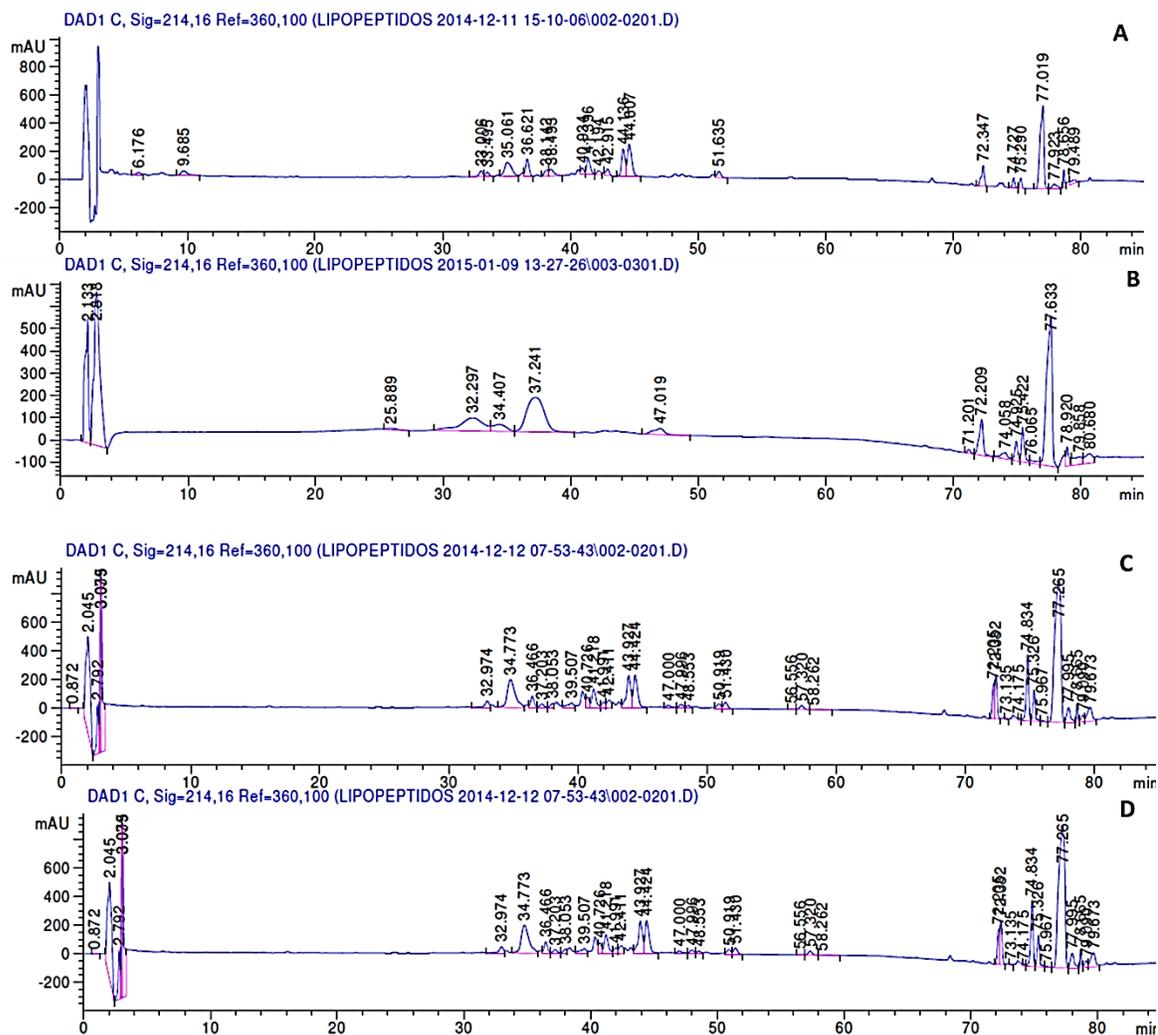
masas (MS) los extractos purificados del sobrenadante del cultivo del *B.subtilis* EA-CB0 575 y encontró que el grupo de picos en los primeros tiempos de retención correspondían a las fengicinas y los grupos de picos siguientes pertenecían a las surfactinas (datos no publicados). Según lo encontrado y presentado en la figura anterior, es posible determinar que los grupos de compuestos producidos en los tres medios son similares, sin embargo y debido a los rendimientos obtenidos y ya enunciados, el medio en el que más cantidad de los compuestos es producido es el medio MOLP, posteriormente el medio TSB y finalmente el medio SBM.

En cuanto a la producción de estos lipopéptidos con la promoción del crecimiento de los cultivos, diferentes estudios han descrito su potencial para el biocontrol sobre diferentes patógenos como *Ralstonia solanacearum*, *Rhizoctonia solani*, *Mycosphaerella fijiensis* y *Botrytis cinerea* en cultivos de banano, tomate, papa, entre otras (Ceballos et al., 2012; Clark and Page, 1968; Guo et al., 2004b; Mosquera et al., 2014; Yu et al., 2002). Sin embargo, aún se conoce poco acerca de cómo cada uno de los lipopéptidos contribuyen de forma global a la eficacia del microorganismo cuando es aplicado a suelo (Ongena and Jacques, 2008; Toure et al., 2004). Según Pryor y colaboradores, las surfactinas y fengicinas podrían tener una acción inmediata sobre los patógenos de los cultivos cuando son aplicados en la planta y de igual forma, el biocontrol se incrementa gracias a la secreción de estos compuestos por el establecimiento de las células vegetativas y las endoesporas en el suelo (Pryor et al., 2007).

#### **5.4.2. Cuantificación de los metabolitos presentes en el sobrenadante del cultivo de *B.subtilis* EA-CB0575 para la producción de esporas y células vegetativas**

Con el fin de cuantificar la cantidad de compuestos del tipo lipopéptidos presentes en los sobrenadantes de los cultivos para producción de esporas y células vegetativas del *B. subtilis* EA-CB0575 se realizó una extracción de dichos cultivos y se procedió a la purificación SPE en columnas C-18 colectando las fracciones 70% y 100% MeOH. En este caso, los tiempos de elución en el HPLC fueron mayores con el fin de mejorar la separación entre los picos (se trabajó con un gradiente hasta los 85 minutos de elución). La Figura 5-2 presenta las extracciones en fase solida a una concentración de 5 mg/mL en 100% MeOH para cada medio de cultivo evaluado.

Figura 5-2. Análisis por HPLC del sobrenadante libre de células separados por extracción en fase sólida a 100% MeOH en el gradiente por etapas 70%, 100% del sobrenadante del cultivo de *B.subtilis* EA-CB0575 en los medios TSB y SBM.



**A.** Cromatograma medio TSB-1 **B.** Cromatograma medio TSB-2

**C.** Cromatograma medio SBM-1. Cromatograma medio SBM-2

En la figura anterior se observa que se encontraron grupos de picos similares entre los tiempos desde el minuto 33 hasta el minuto 44, y desde el minuto 72 hasta el minuto 80, en los cuatro cromatogramas presentados. Esto es consistente con los resultados obtenidos por Posada-Urbe en 2015 empleando espectrometría de masas (no publicados). Al hacer el análisis de estos datos se determinó la presencia de surfactinas y fengicinas, por lo cual

se presupone que estos grupos son estos compuestos. Los rendimientos y áreas promedio calculadas para cada medio se presentan en la Tabla 5-2

Tabla 5-2. Rendimientos y áreas promedio obtenidas en SPE 100% de los extractos obtenidos a partir de los medios TSB y SBM.

Medio de Cultivo	Rendimiento SPE 100% (mg)	Área promedio Fengicina (mAU*s)	Área promedio Surfactinas (mAU*s)
TSB	2.35	24234.07	24861.91
SBM	1.4	22480.21	20462.10

Como puede observarse en la tabla anterior el rendimiento para el medio TSB es 0.95 veces mayor que el medio SBM. Adicionalmente, el área o la altura de pico es proporcional a la concentración que hay en la muestra, en el medio TSB las fengicinas y surfactinas presentaron áreas promedio muy similares, por otra parte, en el medio SBM el área de los picos que componen las surfactinas fue un 18% mayor al área de los picos correspondientes a las fengicinas. Respecto a las diferencias entre los medios puede observarse que el área de los picos que componen las fenginas y surfactinas es mayor para el medio de cultivo para la producción de células vegetativas, lo que quiere decir que se produce una cantidad mayor de estos metabolitos en este medio.

El medio SBM fue diseñado y optimizado por Posada en 2015 para la producción de esporas del *B.subtilis* EA-CB0575, en este caso la fase exponencial es muy corta y la estacionaria se da con rapidez en el cultivo. Diferentes autores han reportado que en el cultivo líquido del microorganismo, los mayores niveles de producción de surfactinas se dan en la fase exponencial de crecimiento (entre las 0 y las 10 h para los medios evaluados), donde la concentración de nutrientes es mayor, en el caso de las fenginas, su producción está condicionada por la fase estacionaria del cultivo, cuando el microorganismo el microorganismo se encuentra produciendo altas cantidades de esporas y los nutrientes son escasos (Jacques et al., 1999; Rahman et al., 2006). Gracias a lo anterior cabe anotar que la producción de los metabolitos en grandes cantidades está influenciada directamente por las condiciones de crecimiento y la optimización del medio de cultivo (Akpa et al., 2001; Mosquera et al., 2014).

## 5.5. Conclusión

Fueron identificados los lipopéptidos reportados para la promoción de crecimiento de las cepa *B.subtilis* EA-CB0575, en el sobrenadante de los medios de cultivo para la producción de lipopéptidos, células vegetativas y esporas, en este caso se obtuvieron rendimientos de 99 mg, 35 mg y 3 mg respectivamente evidenciando una mayor cantidad de los compuestos en el extracto crudo del medio MOLP, en estos medios se evidenciaron grupos de picos en los tiempos de retención entre 10 y 20 minutos y 25 y 30 minutos, lo cual sugiere que los picos en el primer grupo pertenecen a las fengicinas y los picos en el segundo grupo pertenecen a las surfactinas. Adicionalmente se cuantificó la cantidad de lipopéptidos producidos por el microorganismo en el sobrenadante del cultivo de *B.subtilis* EA-CB0575 para la producción de esporas y células vegetativas, encontrándose que cuando el microorganismo se encuentra en estado vegetativo la producción de fengicinas y surfactinas aumenta en un 7 y 18% respectivamente, presentando rendimientos 0.98 veces mayores a los cuantificados en el sobrenadante del medio para la producción de esporas.

## 6. Bibliografía

- Adesemoye, A.O., Obini, M., Ugoji, E.O., 2008. Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology* 39, 423-426.
- Aguado-Santacruz, G.A., Moreno-Gomez, B., Jimenez-Francisco, B., Garcia-Moya, E., Preciado-Ortiz, R.E., 2012. Impact of the microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: a synthesis. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35, 9-21.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S., 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163, 173-181.
- Akpa, E., Jacques, P., Wathelet, B., Paquot, M., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., Thonart, P., 2001. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91-3, 551-561.
- Aldrich, S.R., Leng, E.R., 1965. Modern corn production. Modern corn production, Illus.
- Altieri, M., Nicholls, C.I., 2000. AGROECOLOGIA: Teoría y práctica para una agricultura sustentable.
- Ardebili, Z.O., Ardebili, N.O., Hamdi, S.M.M., 2011. Physiological effects of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants and its possible impact on *Fusarium oxysporum* f. sp *Lycopersici*. *Australian Journal of Crop Science* 5, 1631-1638.
- Armenta Bojórquez, A.D., Garcia Gutiérrez, C., Camacho Báez, J.R., Apodaca Sánchez, M.Á., Gerardo Montoya, L., Nava Pérez, E., 2010. Role of Biofertilizers in the agricultural development in Mexico, pp. 51-56.
- Asaka, O., Shoda, M., 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4081-4085.
- Ashwini, N., Srividya, S., 2014. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech* 4, 127-136.
- Bach Álvarez, T., Díaz, M., 2008. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en la agricultura. *Agricultura Orgánica* 3, 3.

- Bai, Y.M., Pan, B., Charles, T.C., Smith, D.L., 2002. Co-inoculation dose and root zone temperature for plant growth promoting rhizobacteria on soybean *Glycine max* (L.) Merr grown in soil-less media. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 1953-1957.
- Bais, H.P., Fall, R., Vivanco, J.M., 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology* 134, 307-319.
- Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., van Loon, L.C., 2007. Induced systemic resistance by *fluorescent Pseudomonas spp.* *Phytopathology* 97, 239-243.
- Banco Mundial, 2008. Informe sobre el desarrollo mundial 2008. Agricultura para el desarrollo.
- Barona-Gomez, F., Lautru, S., Francou, F.X., Leblond, P., Pernodet, J.L., Challis, G.L., 2006. Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependent iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. *Microbiology-Sgm* 152, 3355-3366.
- Bashan, Y., 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances* 16, 729-770.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Donald, L.S., 2010. Chapter Two - How the Plant Growth-Promoting *Bacterium Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment, *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 77-136.
- Bashan, Y., Puente, M.E., de-Bashan, L.E., Hernandez, J.-P., 2008. Environmental uses of Plant Growth-Promoting bacteria.
- Beg, D.M., 2000. Fertilización del cultivo de maíz, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias
- Berendsen, E.M., Zwietering, M.H., Kuipers, O.P., Wells-Bennik, M.H.J., 2015. Two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties. *Food Microbiology* 45, 18-25.
- Berg, G., 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84, 11-18.
- Bernabeu, P.R., Pistorio, M., Torres-Tejerizo, G., Estrada-De los Santos, P., Galar, M.L., Boiardi, J.L., Luna, M.F., 2015. Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*. *Scientia Horticulturae* 191, 113-120.

- Biswas, J.C., Ladha, J.K., Dazzo, F.B., 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Science Society of America Journal* 64, 1644-1650.
- Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J., 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 343-350.
- Boddey, R.M., Deoliveira, O.C., Urquiaga, S., Reis, V.M., Deolivares, F.L., Baldani, V.L.D., Dobereiner, J., 1994. Biological Nitrogen Fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. 15th World Congress of Soil Science, Vol 4a, Transactions: Commission Iii: Symposia, 273-292.
- Boddey, R.M., Dobereiner, J., 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals recent results and perspectives for future research. *Plant and Soil* 108, 53-66.
- Bottini, R., Cassan, F., Piccoli, P., 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 497-503.
- Bowen, G.D., Rovira, A.D., Donald, L.S., 1999. The Rhizosphere and Its Management To Improve Plant Growth, *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 1-102.
- Buensanteai, N., Sompong, M., Kanjana, T., Athinuwat, D., Bruman, A., Plassard, C., 2013. The plant growth promoting bacterium *Bacillus* sp. CaSUT007 produces phytohormone and extracellular proteins for enhanced growth of cassava. *African Journal of Microbiology Research* 7, 6.
- Buensanteai, N., Yuen, G.Y., Prathuangwong, S., 2008. The Biocontrol Bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 Produces auxin, surfactin and extracellular proteins for enhanced growth of soybean plant. *Thai Journal of Agricultural Science* 41, 16.
- Caballero-Mallado, J., 2006. Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Rev. Latinoamericana de Microbiología* 48, 154-161.
- Cakmakci, R., Kantar, F., Algur, O.F., 1999. Sugar beet and barley yields in relation to *Bacillus polymyxa* and *Bacillus megaterium* var. phosphaticum inoculation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 162, 437-442.
- Calvo García, S., 2011. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Biología Ambiental* 3, 87.
- Camelo, M., Vera, S.P., Bonilla, R.R., 2011. Mechanisms of action of plant growth promoting rhizobacteria. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 12, 8.

- Cao, Y., Xu, Z., Ling, N., Yuan, Y., Yang, X., Chen, L., Shen, B., Shen, Q., 2012. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing Fusarium wilt of cucumber. *Scientia Horticulturae* 135, 32-39.
- Carrillo, C., Teruel, J.A., Aranda, F.J., Ortiz, A., 2003. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1611, 91-97.
- CCI, C.C.I., 2009. Agricultura controlada, producción asegurada, Colombia.
- Ceballos, I., Mosquera, S., Angulo, M., Mira, J.J., Argel, L.E., Uribe-Velez, D., Romero-Tabarez, M., Orduz-Peralta, S., Villegas, V., 2012. Cultivable Bacteria Populations Associated with Leaves of Banana and Plantain Plants and Their Antagonistic Activity Against *Mycosphaerella fijiensis*. *Microbial Ecology* 64, 641-653.
- Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M.P., 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Plant and Soil* 184, 311-321.
- Chen, H., Wang, L., Su, C.X., Gong, G.H., Wang, P., Yu, Z.L., 2008. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology* 47, 180-186.
- Chowdappa, P., Kumar, S.P.M., Lakshmi, M.J., Upreti, K.K., 2013. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological Control* 65, 109-117.
- Chowdhury, S.P., Dietel, K., Raendler, M., Schmid, M., Junge, H., Borriss, R., Hartmann, A., Grosch, R., 2013. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on Lettuce Growth and Health under Pathogen Pressure and Its Impact on the Rhizosphere Bacterial Community. *Plos One* 8.
- Clark, M.C., Page, O.T., 1968. Accumulation of hypoxanthine in potato *Solanum tuberosum* leaves and its effect on spore germination in *Phytophthora infestans*. *Can J Bot* 46, 267-270.
- Compant, S., Clement, C., Sessitsch, A., 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology & Biochemistry* 42, 669-678.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., Barka, E.A., 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4951-4959.
- Corfo, S., 1986. Monografías hortícolas: tomate, arveja, brocoli, zanahoria.

- Cuéllar Gaviria, T.Z., 2014. Evaluación de la promoción de crecimiento de *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en cultivos de banano, crisantemo y Café, Departamento de Ingeniería de Procesos. Universidad EAFIT, Colombia, p. 153.
- Dadnia, M.R., 2011. Effect of different strains of *Bacillus subtilis* on growth and grain yield of corn (*Zea mays* L.). *Research on Crops* 12, 360-363.
- DANE, 2004. Maíz Tecnificado en Colombia.
- DANE, 2009. La Canasta Familiar a su alcance.
- DANE, 2011a. Encuesta Nacional Agropecuaria.
- DANE, D.A.N.d.E., 2011b. Resultados Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA).
- Das, S., Sen, R., 2011. Kinetic modeling of sporulation and product formation in stationary phase by *Bacillus coagulans* RK-02 vis-a-vis other Bacilli. *Bioresource Technology* 102, 9659-9667.
- de Freitas, J.R., 2000. Yield and N assimilation of winter wheat (*Triticum aestivum* L., var. Norstar) inoculated with rhizobacteria. *Pedobiologia* 44, 97-104.
- de Freitas, J.R., Banerjee, M.R., Germida, J.J., 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils* 24, 358-364.
- Denef, K., Roobroeck, D., Wadu, M., Lootens, P., Boeckx, P., 2009. Microbial community composition and rhizodeposit-carbon assimilation in differently managed temperate grassland soils. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 144-153.
- Denton, M.D., Pearce, D.J., Ballard, R.A., Hannah, M.C., Mutch, L.A., Norng, S., Slattery, J.F., 2009. A multi-site field evaluation of granular inoculants for legume nodulation. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 2508-2516.
- Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M., Chauhan, S.M., 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research* 159, 371-394.
- Dobereiner, J., Urquiaga, S., Boddey, R.M., 1995. Alternatives for nitrogen nutrition of crops in tropical agriculture. *Fertilizer Research* 42, 339-346.
- Domenech, J., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Ramos, B., Gutierrez-Manero, J., 2006. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or

- Chryseobacterium for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *Biocontrol* 51, 245-258.
- Earl, A.M., Losick, R., Kolter, R., 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* 16, 269-275.
- Egamberdiyeva, D., 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology* 36, 184-189.
- Ekin, Z., Oguz, F., Erman, M., Oeguen, E., 2009. The effect of *Bacillus* sp OSU-142 inoculation at various levels of nitrogen fertilization on growth, tuber distribution and yield of potato (*Solanum tuberosum* L.). *African Journal of Biotechnology* 8, 4418-4424.
- Errington, J., 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology* 1, 117-126.
- Escalona, V., Alvarado, P., Monardes, H., Urbina, C., Martin, A., 2009. Manual de cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).
- Esquinas-Acazar, J., Nuez Viñals, F., 1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate, in: Corpoica (Ed.).
- Fahim, S., Dimitrov, K., Gancel, F., Vauchel, P., Jacques, P., Nikov, I., 2012. Impact of energy supply and oxygen transfer on selective lipopeptide production by *Bacillus subtilis* BBG21. *Bioresource Technology* 126, 1-6.
- Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., Avis, T.J., 2013. Ecological and Mechanistic Insights Into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens. *Journal of Chemical Ecology* 39, 869-878.
- FAO, 2002. Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030.
- FAO, 2009a. Como alimentar al mundo 2050: Foro de expertos de alto nivel.
- FAO, 2009b. La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050.
- FAO, 2013. Statistical database of food and agricultura organization of the United Nations.
- FAO, F.a.A.O.o.t.U.N., 2011. El Maíz en Los Trópicos: Mejoramiento y Producción (Colección FAO: Producción y Protección Vegetal).
- Fatemeh, A., Masoud, T., Pejman, A., Aidin, H., 2014. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) and stratification on germination traits of *Crataegus pseudoheterophylla* Pojark seeds. *Scientia Horticulturae* 172, 61-67.

- Felici, C., Vettori, L., Giraldi, E., Forino, L.M.C., Toffanin, A., Tagliasacchi, A.M., Nuti, M., 2008. Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Applied Soil Ecology* 40, 260-270.
- FENALCE, 2008. Programa de producción de maíz en zona cafetera.
- FENALCE, 2012. Expectativas de siembre para maíz y soya en 2022, p. 103.
- FENALCE, F.N.d.C.y.L., 2010. El cultivo del maíz, historia e importancia.
- Figueiredo, M.D.B., Seldin, L., de Araujo, F.F., Mariano, R.D.R., 2010. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications, in: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Springer, New York, pp. 19-43.
- Freeling, M., Walbot, V., Lane, B., 1994. The Maize Leaf, *The Maize Handbook*. Springer New York, pp. 17-28.
- Gajc-Wolska, J., Kowalczyk, K., Marcinkowska, M., Radzanowska, J., Bujalski, D., 2015. Influence of growth conditions and grafting on the yield, chemical composition and sensory quality of tomato fruit in greenhouse cultivation. *Journal of Elementology* 20, 73-81.
- Gaytan, I., Pena, C., Nunez, C., Cordova, M.S., Espin, G., Galindo, E., 2012. *Azotobacter vinelandii* lacking the Na<sup>+</sup>-NQR activity: a potential source for producing alginates with improved properties and at high yield. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 28, 2731-2740.
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41, 109-117.
- Glick, B.R., 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012, 963401.
- Glick, B.R., Pasternak, J.J., 2003. *Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*. Third edition. *Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA*. Third edition, i.
- Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R.J., 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology & Biochemistry* 39, 1968-1977.
- Grobelak, A., Napora, A., Kacprzak, M., 2015. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering* 84, 22-28.

- Gu, S.B., Yao, J.M., Yuan, Q.P., Xue, P.J., Zheng, Z.M., Yu, Z.L., 2006. Kinetics of *Agrobacterium tumefaciens* ubiquinone-10 batch production. *Process Biochemistry* 41, 1908-1912.
- Guel, A., Kidoglu, F., Tuezal, Y., Tuezal, I.H., 2008. Effects of nutrition and *Bacillus amyloliquefaciens* on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) growing in perlite. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6, 422-429.
- Guo, J.-H., Qi, H.-Y., Guo, Y.-H., Ge, H.-L., Gong, L.-Y., Zhang, L.-X., Sun, P.-H., 2004a. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control* 29, 66-72.
- Guo, J.H., Liu, X.J., Zhang, Y., Shen, J.L., Han, W.X., Zhang, W.F., Christie, P., Goulding, K.W.T., Vitousek, P.M., Zhang, F.S., 2010. Significant Acidification in Major Chinese Croplands. *Science* 327, 1008-1010.
- Guo, J.H., Qi, H.Y., Guo, Y.H., Ge, H.L., Gong, L.Y., Zhang, L.X., Sun, P.H., 2004b. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control* 29, 66-72.
- Habibi, S., Djedidi, S., Prongjunthuek, K., Mortuza, M.F., Ohkama-Ohtsu, N., Sekimoto, H., Yokoyama, T., 2014. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. *Plant and Soil* 379, 51-66.
- Hamdache, A., Lamarti, A., Aleu, J., Collado, I., 2011. Non-peptide Metabolites from the genus *Bacillus*. *Journal of natural products* 74, 893-899.
- Hamdan, H., Weller, D.M., Thomashow, L.S., 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of gaeumannomyces-graminis-var-tritici by *Pseudomonas-fluorescens* 2-79 and m4-80r. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3270-3277.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I., 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* 60, 579-598.
- Hernández Montiel, L.G., Escalona Aguilar, M.A., 2003. Microorganismos que benefician a las plantas: Las bacterias PGPR.
- Hu, L.B., Zhang, T., Yang, Z.M., Zhou, W., Shi, Z.Q., 2009. Inhibition of fengycins on the production of fumonisin B-1 from *Fusarium verticillioides*. *Letters in Applied Microbiology* 48, 84-89.
- ICG, 2016. Grain Market Report, International grains conference 2016. <http://www.igc.int/>, London.
- Idris, E.E., Iglesias, D.J., Talon, M., Borriss, R., 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 619-626.

- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., Pauw, E., Thonart, P., 1999. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 77, 223-233.
- Jaramillo, J., Rodriguez, V.P., Zapata, M., 2006. Manual técnico buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de tomate bajo condiciones protegidas., in: Corpoica (Ed.), Colombia, p. 314.
- Jayakumar, P., Tan, T., 2005. Phosphorus solubilization by ectomycorrhizal *Pisolithus tinctorius* in pure culture and in association with *Acacia mangium*. 39, 125-130.
- Jetiyanon, K., Kloepper, J.W., 2002. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological Control* 24, 285-291.
- Jetiyanon, K., Plianbangchang, P., 2010. Dose-responses of *Bacillus cereus* RS87 for growth enhancement in various Thai rice cultivars. *Canadian Journal of Microbiology* 56, 1011-1019.
- Jetiyanon, K., Wittaya-Areekul, S., Plianbangchang, P., 2008. Film coating of seeds with *Bacillus cereus* RS87 spores for early plant growth enhancement. *Canadian Journal of Microbiology* 54, 861-867.
- Jiang, C.M., Shi, J.L., Liu, Y.L., Zhu, C.Y., 2014. Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis*. *Food Control* 35, 41-48.
- Jiménez, A., 2012. Beneficios del maíz en la salud: la vitamina B7 o biotina le aporta beneficios nutricionales al maíz, in: FENALCE (Ed.).
- Joo, G.J., Kim, Y.M., Lee, I.J., Song, K.S., Rhee, I.K., 2004. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. *Biotechnology Letters* 26, 487-491.
- Kilian, M., Steiner, U., KRebs, B., Junge, H., Schmiedeknecht, G., Hain, R., 1983. FZB24® *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. 21.
- Kinsella, K., Schulthess, C.P., Morris, T.F., Stuart, J.D., 2009. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 374-379.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N., 1981. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 71, 231.

- Kloepper, J.W., Rodríguez-Kábana, R., Zehnder, A.W., Murphy, J.F., Sikora, E., Fernández, C., 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology* 28, 21-26.
- Kloepper, J.W., Schroth, M.N., 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. . *Proceedings of the fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria* 2, pp. 879-892.
- Kokalis-Burelle, N., Kloepper, J., Reddy, M., 2005. Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology* 31, 91-100.
- Kozyrovska, N., Kovtunovych, G., Gromosova, E., Kuharchuk, P., Kordyum, V., Wise, D.L., 1997. Novel inoculants for an environmentally-friendly crop production, *Studies in Environmental Science*. Elsevier, pp. 729-735.
- Kumar, A., Prakash, A., Johri, B.N., 2011. *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem, in: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Springer, New York, pp. 37-59.
- Lanna Filho, R., Monteiro Ferro, E., Canuto de Pinho, R., 2010. Controle biológico mediado por *Bacillus sibtillis*. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas* 4, 9.
- Lavakush, Yadav, J., Verma, J.P., Jaiswal, D.K., Kumar, A., 2014. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). *Ecological Engineering* 62, 123-128.
- Leclere, V., Bechet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., Jacques, P., 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4577-4584.
- Liu, S., 2013. *Bioprocess Engineering: Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design*. Bioprocess Engineering: Kinetics, Biosystems, Sustainability, and Reactor Design
- Liu, X.M., Zhao, H.X., Chen, S.F., 2006. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. *Current Microbiology* 52, 186-190.
- Loredo Osti, C., Lopez Reyes, L., Espinosa Victoria, D., 2004. Plant Growth-Promoting Bacteria in Association with Graminaceous Species: A Review. *Terra Latinoamerica* 22, 14.
- Lucy, M., Reed, E., Glick, B.R., 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 86, 1-25.

- Lugtenberg, B.J.J., Kravchenko, L.V., Simons, M., 1999. Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environmental Microbiology* 1, 439-446.
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., Ptak, M., 1992. Surfactin-iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie (Paris)* 74, 1047-1051.
- Margulis, L., Sagan, D., 1996. ¿Qué es la vida? Tusquets Editores.
- Martinez, L.L., Peniche, R.A.M., Iturriaga, M.H., Medrano, S.M.A., Aguilar, J.R.P., 2013. Characterization of rhizobacteria isolated from tomato and their effect on tomato and bell pepper growth. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36, 63-69.
- Martín, F., Carrasco, I., 2003. La fertilización mineral en agricultura ecológica.
- Martínez, V.R., 2002. Biofertilización y producción agrícola sostenible. Retos y perspectivas, La Habana.
- Mehnaz, S., 2011. Plant Growth-Promoting Bacteria Associated with Sugarcane, in: Maheshwari, D.K. (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Springer, New York, pp. 165-187.
- Mehnaz, S., Kowalik, T., Reynolds, B., Lazarovits, G., 2010. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 42, 1848-1856.
- Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J.M., 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *Fems Microbiology Reviews* 37, 634-663.
- Mia, M.A.B., Shamsuddin, Z.H., Mahmood, M., 2010. Use of Plant Growth Promoting Bacteria in Banana: A New Insight for Sustainable Banana Production. *International Journal of Agriculture and Biology* 12, 459-467.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, pp. 426-428.
- Miranda, D., Fischer, G., Barrientos, J.C., Carranza, C., Rodriguez, M., Lancho, O., 2009. Characterization of Productive Systems of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in Producing Zones of Colombia, Colombia, pp. 35-45.

- Monteiro, S.M., Clemente, J.J., Henriques, A.O., Gomes, R.J., Carrondo, M.J., Cunha, A.E., 2005. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress* 21, 1026-1031.
- Mosquera, S., González-Jaramillo, L.M., Orduz, S., Villegas-Escobar, V., 2014. Multiple response optimization of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 culture and identification of antifungal metabolites. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3, 378-385.
- Muller, G., Raymond, K.N., 1984. Specificity And Mechanism Of Ferrioxamine-Mediated Iron Transport In *Streptomyces-Pilosus*. *Journal of Bacteriology* 160, 304-312.
- Murphy, J.F., Reddy, M.S., Ryu, C.M., Kloepper, J.W., Li, R.H., 2003. Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against Cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 93, 1301-1307.
- Navarro García, G., Navarro Blaya, S., 2003. Los elementos químicos y la vida vegetal, in: Mundi-Prensa (Ed.), *Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida*, 2 ed, Madrid, p. 443.
- Ochoa Gómez, N., 2014. Efecto del *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento y control de Sigatoka negra en *Mussa AAA cv. Williams*, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, p. 128.
- Ongena, M., Duby, F., Jourdan, E., Beaudry, T., Jadin, V., Dommès, J., Thonart, P., 2005. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 692-698.
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* 16, 115-125.
- Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M., Sahin, F., 2006. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae* 111, 38-43.
- Paredes-Mendoza, M., Espinosa-Victoria, D., 2010. Organic Acids Produced by Phosphate Solubilizing Rhizobacteria: A Critical Review. *Terra Latinoamerica* 28, 9.
- Patten, C.L., Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System, *Applied and environment microbiology*, pp. 3795-3801.
- Pedraza, R.O., 2008. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 125, 25-35.

- Perez-Garcia, A., Olalla, L., Rivera, E., Del Pino, D., Canovas, I., De Vicente, A., Tores, J.A., 2001. Development of *Sphaerotheca fusca* on susceptible, resistant, and temperature-sensitive resistant melon cultivars. *Mycological Research* 105, 1216-1222.
- Perez-Montano, F., Alias-Villegas, C., Bellogin, R.A., del Cerro, P., Espuny, M.R., Jimenez-Guerrero, I., Lopez-Baena, F.J., Ollero, F.J., Cubo, T., 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research* 169, 325-336.
- Pingali, P., 2007. Agricultural growth and economic development: a view through the globalization lens. *Agricultural Economics* 37, 1-12.
- Polania Fierro, M.G., 2014. Aspectos técnicos de la producción de maíz en Colombia: Importancia del cultivo de maíz, in: FENALCE (Ed.).
- Posada, L., 2012. Diseño conceptual del proceso productivos de cepa *Bacillus subtilis* EA-CB0575 para la promoción de crecimiento de Musa AAA., Universidad Nacional de Colombia.
- Posada Londoño, L.G., Pimineto Vargas, E., 1997. Desarrollo Económico Sostenible, Relaciones Económicas Internacionales y Recursos Minero-Energéticos en Colombia.
- Posada Uribe, L.F., 2012. Diseño conceptual del proceso productivos de cepa *Bacillus subtilis* EA-CB0575 para la promoción de crecimiento de Musa AAA., Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Colombia, p. 151.
- Posada-Uribe, L.F., Romero-Tabarez, M., Villegas-Escobar, V., 2015. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 38, 1879-1888.
- Prashar, P., Kapoor, N., Sachdeva, S., 2013. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 1-15.
- Pryor, S.W., Gibson, D.M., Hay, A.G., Gossett, J.M., Walker, L.P., 2007. Optimization of Spore and Antifungal Lipopeptide Production During the Solid-state Fermentation of *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 143, 63-79.
- Raaijmakers, J., Bruijn, D., Nybroe, O., Ongena, M., 2010a. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS, Microbiology Reviews* 34, 1037-1062.

- Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M., 2010b. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *Fems Microbiology Reviews* 34, 1037-1062.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M., de Souza, J.T., 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81, 537-547.
- Rahman, M.S., Ano, T., Shoda, M., 2006. Second stage production of iturin A by induced germination of *Bacillus subtilis* RB14. *Journal of Biotechnology* 125, 513-515.
- Ramirez, C.A., Kloepper, J.W., 2010. Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. *Biology and Fertility of Soils* 46, 835-844.
- Regazzo-Sanchez, J.A., Robles-Cabrera, A., Lomelí-González, L., Luna-Solano, G., Corderón-Santoyo, M., 2011. Selección de cepas de *Bacillus spp.* productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17, 7.
- Richardson, A., Barea, J.-M., McNeill, A., Prigent-Combaret, C., 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321, 305-339.
- Rodriguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., Bashan, Y., 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil* 287, 15-21.
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.-W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., Perez-Garcia, A., 2007. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 430-440.
- Sarabia Ochoa, M., Madrigal Pedraza, R., Martínez Trujillo, M., Carreón Abud, Y., 2010. Plantas, Hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas* 12, 65-71.
- Sarandón, S.J., 2002. Agroecología: El camino hacia una agricultura sustentable. Ediciones Científicas Americanas (E.C.A) Buenos Aires.
- Schaeffer, P., Millet, J., Aubert, J.-P., 1965. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc Nat Acad Sci USA* 54, 704-711.

- Schulz, B.E., Boyle, C.C., Sieber, T., Kloepper, J., Ryu, C.-M., 2006. Bacterial Endophytes as Elicitors of Induced Systemic Resistance, *Microbial Root Endophytes*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 33-52.
- Seldin, L., Rosado, A.S., da Cruz, D.W., Nobrega, A., van Elsas, J.D., Paiva, E., 1998. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere, and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3860-3868.
- Serrano, L., Manker, D., Brandi, F., Cali, T., 2013. The Use of *Bacillus subtilis* QST 713 and *Bacillus pumilus* QST 2808 as Protectant Fungicides in Conventional Application Programs for Black Leaf Streak Control. *International IShs-Promusa Symposium on Bananas and Plantains: Towards Sustainable Global Production and Improved Use* 986, 149-155.
- Shafikhani, S.H., Partovi, A.A., Leighton, T., 2003. Catabolite-induced repression of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Current Microbiology* 47, 300-308.
- Shen, P., Li, D.-c., Gao, J.-s., Xu, M.-g., Wang, B.-r., Hou, X.-j., 2011. Effects of Long-Term Application of Sulfur-Containing and Chloride-Containing Chemical Fertilizers on Rice Yield and Its Components. *Agricultural Sciences in China* 10, 747-753.
- Siddiqui, Z., Antoun, H., Prévost, D., 2006. Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer Netherlands, pp. 1-38.
- Siddiqui, Z.A., 2006. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. *Pgpr: Biocontrol and Biofertilization*, 111-142.
- Singh, J.S., Pandey, V.C., Singh, D.P., 2011. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 140, 339-353.
- Singh, N.K., Chaudhary, F.K., Patel, D.B., 2013. Effectiveness of Azotobacter bio-inoculant for wheat grown under dryland condition. *Journal of Environmental Biology* 34, 927-932.
- Sonenshein, A.L., 2000. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* 3, 561-566.
- Speers, R.A., Rogers, P., Smith, B., 2003. Non-linear modelling of industrial brewing fermentations. *Journal of the Institute of Brewing* 109, 229-235.
- Sripontan, Y., Tan, C.-W., Hung, M.-H., Young, C.-C., Hwang, S.-Y., 2014. Effects of plant-growth-promoting microorganisms and fertilizers on growth of cabbage and tomato and *Spodoptera litura* performance. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17, 587-593.

- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. . Molecular Microbiology 56, 845-857.
- Stephens, J.H.G., Rask, H.M., 2000. Inoculant production and formulation. Field Crops Research 65, 249-258.
- Strange, R.N., Scott, P.R., 2005. Plant disease: A threat to global food security, Annual Review of Phytopathology. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 83-116.
- Sudha, S.N., Jayakumar, R., Sekar, V., 1999. Introduction and expression of the cry1Ac gene of *Bacillus thuringiensis* in a cereal-associated bacterium, *Bacillus polymyxa*. Current Microbiology 38, 163-167.
- Swain, M.R., Ray, R.C., 2009. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. Microbiological Research 164, 121-130.
- Sánchez López, D.B., Gómez-Vargas, R.M., Garrido Rubiano, M.F., Bonilla Buitrago, R.R., 2012. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. Revista mexicana de ciencias agrícolas 3, 1401-1415.
- Terouchi, N., Syono, K., 1990. Rhizobium attachment and curling in asparagus rice and oat plants. Plant and Cell Physiology 31, 119-128.
- Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P., 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. Journal of Applied Microbiology 96, 1151-1160.
- Turan, M., Ekinçi, M., Yildirim, E., Gunes, A., Karagoz, K., Kotan, R., Dursun, A., 2014. Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 38, 327-333.
- Valenzuela López, M., Partida Ruvalcaba, L., Díaz Valdés, T., Velázquez Alcaraz, T.d.J., Bojórquez Bojórquez, G., Enciso Osuna, T., 2014. Response of tomato grown in hydroponics with nutrient solutions in substrate-coir vermicompost. Revista mexicana de ciencias agrícolas 5, 807-818.
- Valery, A., Reyes, I., 2013. Evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento bajo diferentes esquemas de fertilización en el cultivo de maíz variedad HIMECA-95. Revista Colombiana de Biotecnología 15, 81-88.
- Vardharajula, S., Ali, S.Z., Grover, M., Reddy, G., Bandi, V., 2011. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus spp.*: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. Journal of Plant Interactions 6, 1-14.

- Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255, 571-586.
- Villegas Escobar, V., 2012. Identificación y caracterización de extractos bacterianos biológicamente activos contra patógenos de *Musa sp.* Universidad Nacional de Colombia, Colombia, p. 181.
- Villegas-Escobar, V., Ceballos, I., Mira, J.J., Edith Argel, L., Orduz Peralta, S., Romero-Tabarez, M., 2013. Fengycin C Produced by *Bacillus subtilis* EA-CB0015. *Journal of Natural Products* 76, 503-509.
- Xiao-ying, G., Chun-e, H., Tao, L., Zhu, O., 2015. Effect of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on Growth of Greenhouse Tomato and Rhizosphere Microbial Community. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)* 22, 32-42.
- Yan, Z., Ryu, C.M., McInroy, J., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., 2000. Effect of PGPR dosage on plant growth promotion and induced systemic resistance.
- Yan, Z.N., Reddy, M.S., Ryu, C.M., McInroy, J.A., Wilson, M., Kloepper, J.W., 2002. Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 92, 1329-1333.
- Yu, G.Y., Sinclair, J.B., Hartman, G.L., Bertagnolli, B.L., 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 955-963.
- Zaidi, A., Ahmad, E., Khan, M.S., Saif, S., Rizvi, A., 2015. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: Current perspective. *Scientia Horticulturae* 193, 231-239.
- Zhong, J., Zhang, X., Ren, Y., Yang, J., Tan, H., Zhou, J., 2014. Optimization of *Bacillus subtilis* cell growth effecting jjean-peptide production in fed batch fermentation using central composite design. *Electronic Journal of Biotechnology* 17, 132-136.

# Anexos

## Anexo 1. Composición de los Medios de cultivo

### Medio de cultivo TSA (“Tryptic Soy Agar”, Merck)

Reactivo	Cantidad (g/L)
Caseína pancreática digestiva	15
Enzima digestiva de soya	5
NaCl	2.5
Agar	15
Bactoagar (Oxoid)	9

### Medio de cultivo TSB (“Tryptic Soy Broth”, Merck)

Reactivo	Cantidad (g/L)
Glucosa	2.5
Caseína pancreática digestiva	17
Enzima digestiva de soya	3
NaCl	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5

### Medio de cultivo SBM modificado “Sporulation *Bacillus* Medium” (Posada, 2012)

Reactivo	Cantidad (g/L)
Glucosa	1.04
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.59
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6
Extracto de levadura	5
Peplona Especial	3
NaCl	0.01

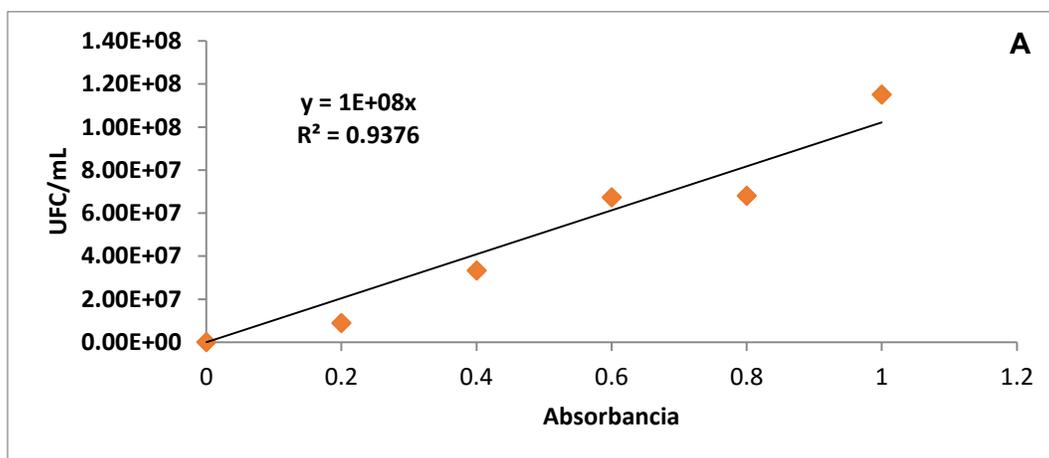
**Medio de cultivo MOLP “Medium Optimal for Lipopéptide Production” (Ongena & Jacques, 2008)**

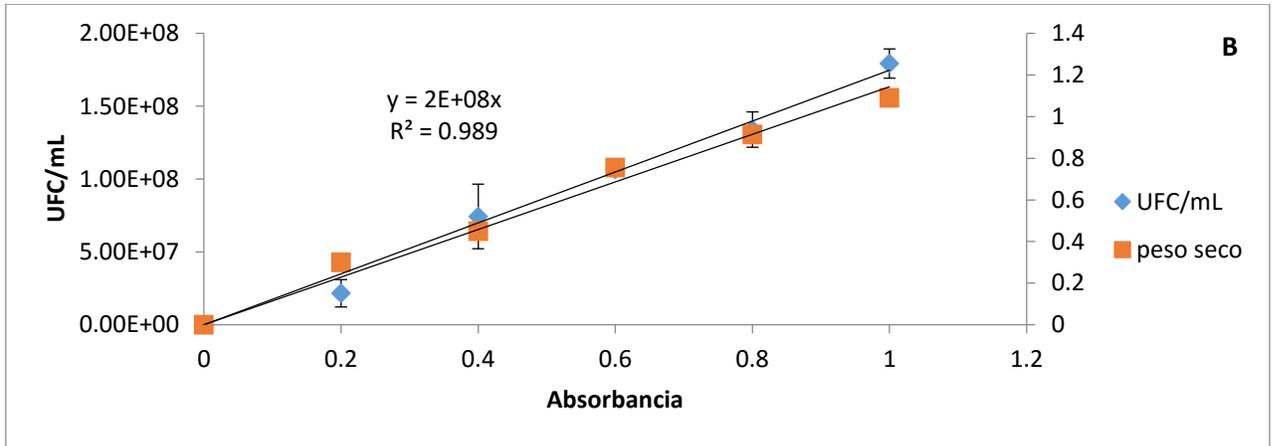
Reactivo	Cantidad (g/L)
Peptona especial (Oxoid)	30
Sacarosa comercial	20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Carlo Erba)	1.9
Extracto de levadura (Oxoid)	7
Solución de elementos traza*	1 mL/L
Solución de Mn-Mg**	9 mL/L

\*La solución de elementos traza estaba compuesta por: CuSO<sub>4</sub>, 1 mg/L; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5 mg/L; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 4 mg/L; KI, 2 mg/L; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.14 mg/L; H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 10 mg/L, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>7</sub>, 10 g/L.

\*\* La solución de Mn-Mg por: MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.4 g/L, MgSO<sub>4</sub>, 50 g/L. El pH será ajustado a 7 con una solución de NaOH 1 M (Jacques et al., 1999).

**Anexo 2.** Curva de calibración Absorbancia vs UFC/mL del microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575. **A.** Células Vegetativas, **B.** Esporas





**Anexo 3.** Curva de calibración y mediciones para el Consumo de Azúcares

Muestras	Agua (μL)	Glucosa (4g/L) μL	Solución final (concentración final de glucosa) (g/L)	DNS (μL)	Densidad óptica (540nm)
Blanco	500	0	0	500	0
1	475	25	0.2	500	0.09
2	450	50	0.4	500	0.16
3	425	75	0.6	500	0.24
4	400	100	0.8	500	0.32
5	355	125	1	500	0.407
6	350	150	1.2	5	0.509

