

Optimización de las condiciones de cultivo para el desarrollo de una biopelícula bacteriana y su aplicación como biofertilizante en *Solanum lycopersicum* L. var. Río grande



Optimization of the culture conditions for the development of a bacterial biofilm and its application as a biofertilizer in *Solanum lycopersicum* L. var. Río grande

<http://opn.to/a/KEFJA>

Gabriela C. Sarti ¹, Ana E.J. Cristóbal Miguez ^{1*}, Alfredo J. Curá ²

¹Cátedra de Química Inorgánica y Analítica, Departamento de Recursos Naturales y Ambiente, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Av. San Martín 4453, Argentina.

²Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Av. San Martín, Argentina.

RESUMEN: El objetivo del presente trabajo fue optimizar las condiciones de cultivo de *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* para el desarrollo de una biopelícula y su uso como biofertilizante en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. var. Río Grande). Se evaluaron diferentes medios de cultivo para el desarrollo de biopelículas, las cuales se secaron y se les determinó su masa, así como el tiempo de disgregación de las mismas. La siembra de la bacteria se realizó bajo dos tratamientos: suelo fértil y tindalizado. Se midió la masa seca aérea y radicular; las diferencias en la biomasa de parte aérea y radicular del tomate se evaluaron mediante un ANOVA simple. Las medias se compararon utilizando la prueba de Tukey a un nivel de significación de 0,05. El análisis estadístico se realizó con el software Infostat 2016. Las biopelículas obtenidas se evaluaron en términos de porcentajes aritméticos y desviaciones estándares de tres repeticiones. En el medio papa glucosada se obtuvo la mayor cantidad de biopelícula que resultó ser la más resistente a la disgregación. El tratamiento con semillas inoculadas en suelo fértil no demostró mayor desarrollo en las plántulas respecto a los controles sin inocular; sin embargo, cuando se utilizó suelo tindalizado, la biomasa aérea y radicular de las plántulas inoculadas fueron significativamente mayores que los controles sin inocular. La biopelícula desarrollada por *Bacillus* en el medio papa glucosada podría ser utilizada como biofertilizante en tomate.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, biofertilizantes, biopelículas, *Solanum lycopersicum* L., tomate.

ABSTRACT: The aim of this work was to optimize the growth conditions of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* for the development of a biofilm and its use as a biofertilizer in tomato seeds (*Solanum lycopersicum* L. var. Río Grande). Different culture media were tested for the development of biofilms, which were dried and weighed to determine their mass. The time for biofilm disintegration was also determined. The bacteria were introduced under two treatments: fertile or tindalized soil. The aerial and root dry mass was weighed. The differences in the biomass of the aerial part and root of the tomato plants were analyzed by a simple ANOVA. The means were compared by the Tukey test at a significance level of 0.05. The statistical analysis was carried out with the software Infostat 2016. The biofilms obtained were evaluated in terms of arithmetic percentages and standard deviations of three repetitions. The greatest amount of biofilm was obtained in the glucose potato medium, and it was the most resistant to disintegration. No higher seedling growth was shown by the treatment with inoculated seeds in fertile soil compared with the uninoculated controls. However, when the tindalized soil was used, the aerial and root biomass of the inoculated seedlings was significantly higher than in the uninoculated controls. The biofilm developed by *Bacillus* in the potato glucose medium could be used as a biofertilizer in tomato.

Key words: *Bacillus subtilis*, biofertilizers, biofilm, *Solanum lycopersicum* L, tomato.

*Autor para correspondencia: Ana E. J. Cristóbal Miguez. E-mail: karibu@agro.uba.ar; amiguez@agro.uba.ar

Recibido: 07/01/2019

Aceptado: 10/04/2019

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el consumo de hortalizas frescas cobra cada día mayor importancia, debido a su alto valor en vitaminas, sales, minerales y fibras. El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más difundidas a nivel global, posee alto valor económico y su uso está generalizado al ocupar un lugar privilegiado en la contribución de nutrientes por su preferencia y nivel de consumo (1).

El tomate pertenece a la familia *Solanaceae* y es originario de Sudamérica, en especial de la región comprendida por Perú, Bolivia y Ecuador. Se trata de un cultivo perenne de porte arbustivo que se cultiva anualmente, requiere de climas templados a cálidos, con temperaturas óptimas para el crecimiento que oscilan entre los 21 y 24°C. Sin grandes exigencias en cuanto a suelos, se siembra directamente a campo o se hacen almácigos para la producción de plantines, que luego se trasplantan al aire libre o a invernaderos (2).

La creciente demanda de este fruto ha llevado al uso de agroquímicos para incrementar su producción y para el control de plagas, pero el uso indiscriminado de grandes cantidades de fertilizantes de síntesis química da como resultado efectos negativos en la calidad de los frutos, en las características físicas, químicas y biológicas del suelo, en la biodiversidad y en la calidad de vida de los productores, lo que lleva a la pérdida de cultivos y empobrecimiento de los agricultores (3).

Como alternativa a esta problemática se encuentra el uso de ciertas bacterias que colonizan la rizósfera y rizoplano de muchas especies vegetales y que se denominan “rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal” (RPCV) (4). Algunas bacterias con actividad (RPCV) pertenecen a los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, entre otros (5). Su aplicación contribuye a proteger el ambiente para conservar la fertilidad y biodiversidad del ecosistema del suelo (6,7). En este sentido, miembros del género *Bacillus* pueden actuar como biofertilizantes y

biopesticidas o cumplir ambas funciones (8). *Bacillus subtilis* es reconocido por su acción como agente de control biológico, el cual produce más de dos docenas de antibióticos donde la clase predominante es de naturaleza proteica (9,10,11)

Según las condiciones de crecimiento, esta bacteria puede crecer en forma de vida “libre” (células planctónicas) o bien desarrollando biopelículas sobre el sustrato que coloniza.

Las biopelículas bacterianas están constituidas, estructuralmente, por masa microbiana, una matriz mayoritariamente de exopolisacáridos que facilita la construcción de una sofisticada estructura tridimensional (12) y, en menor cuantía, por proteínas, ADN y productos de lisis bacteriana (13). Estas biopelículas intervienen en la inducción y acumulación de lipopéptidos; algunos de estos poseen actividad antibacteriana y antifúngica (14). Estas estructuras representan una antigua estrategia de supervivencia procariótica, debido a que las mismas proporcionan protección a las células frente a fluctuaciones medioambientales de humedad, temperatura y pH, concentrando nutrientes y facilitando la eliminación de desechos. Las células que lo constituyen presentan un amplio rango de estadios fisiológicos, es decir, coexisten células con diversos genotipos y fenotipos que expresan distintas vías metabólicas, respuestas a condiciones hostiles y poseen actividades biológicas específicas.

Estas biopelículas presentan una compleja y heterogénea arquitectura que depende del tipo de bacteria y de las condiciones de cultivo (15,16). Las etapas para su construcción estarían conservadas en un amplio número de microorganismos y se las enumeran Etapa 1) Corresponde a procesos de adhesión de células a una superficie biótica o abiótica o bien colonización de interfases aire-líquido; 2) Crecimiento y agregación de células que forman microcolonias, las cuales producen y liberan exopolisacáridos, esto da origen a una matriz extracelular sobre la que se desarrolla la biopelícula; 3) Maduración y mantenimiento de la estructura de la biopelícula; 4) Desprendimiento de células de la estructura para colonizar otros ambientes (17).

En el caso de biopelículas asociadas a especies vegetales, se pueden encontrar aquellas que establecen relaciones de patogénesis, como son *Agrobacterium tumefaciens* (18,19) o *Pseudomonas aeruginosa* (20).

Otras bacterias que producen biopelículas generan beneficios, como las especies *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus licheniformis*, importantes productoras de sideróforos y de ácido indol acético (21,22); mientras que, *Burkholderia tropica* (P4) es activa como solubilizadora de fosfatos (23).

El objetivo del presente trabajo fue optimizar las condiciones de cultivo de *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* para el desarrollo de una biopelícula y su uso como biofertilizante en semillas de tomate (*S. lycopersicum* var. Río Grande).

MATERIALES Y MÉTODOS

Efecto de medios de cultivo complejos sobre la formación de biopelícula en *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*

Se realizaron ensayos tendientes a la búsqueda de un medio de cultivo adecuado para que *B. subtilis* subsp. *spizizenii* desarrolle una biopelícula resistente que pudiera ser utilizada como biofertilizante.

La cepa *B. subtilis* subsp. *spizizenii* provenía de la colección de cultivos de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Preparación del inóculo bacteriano

Activación de la cepa: Se sembró con asa de platino en caja Petri estéril con agar nutritivo (Merck) y se incubó a 30°C durante 24 h.

Condiciones de cultivo en medio mínimo salino

El inóculo de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* se activó y luego se resuspendió en 10 ml de solución salina estéril (0,9 % m/v); se obtuvo 1×10^8 UFC/ml y, posteriormente, se inocularon 1,5 ml de este medio en 150 ml de medio mínimo salino (MMS) en erlenmeyers de 500 ml, con el agregado de fuentes carbonadas y nitrogenadas según los tratamientos. La composición del MMS fue: (g/l): K_2HPO_4 , 1; KH_2PO_4 , 0,30; NH_4Cl , 0,5; NH_4NO_3 , 0,1; Na_2SO_4 , 0,1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01;

$MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $1 \cdot 10^{-3}$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $1 \cdot 10^{-3}$; $CaCl_2$, $5 \cdot 10^{-4}$; EDTA, 0,01; pH 7.

Condiciones de cultivo y extracción de biopelícula

B. subtilis subsp. *spizizenii* se cultivó en condiciones estáticas para permitir la formación de las biopelículas. En todos los casos la incubación fue a 30°C durante 96 h. Las biopelículas formadas se separaron con una varilla de vidrio, cuando la resistencia de la misma lo permitía, o por filtración al vacío en el caso de biopelículas frágiles. En todos los casos, las biopelículas se secaron a 40°C hasta masa constante y luego se pesaron en balanza analítica (OHAUS).

Se ensayaron los siguientes medios de cultivo:

- Medios de cultivo con peptona:** caldo nutritivo (Britania) con 0,5 % peptona, TSC (caldo tripteína soja) (Britania) con 2 % peptona, medio cerebro-corazón (Britania) con 1 % peptona y MMS enriquecido con el agregado de peptona 1 % (Britania).
- Medios de cultivo líquidos con extracto de levadura:** caldo Luria Bertani con 0,5 % extracto de levadura, medio Landy (Britania) con 0,1 % extracto de levadura y MMS enriquecido con extracto de levadura 1 % (Britania). Dado que el extracto de levadura es el resultado de la plasmólisis de las levaduras, esta aporta vitaminas, especialmente del complejo B, así como una mezcla de aminoácidos y péptidos.
- Medios de cultivo con distintas fuentes carbonadas:** MMS enriquecido con 1 % de fuentes carbonadas simples: galactosa, fructosa y biodiesel. Se utilizó el aminoácido ácido L-glutámico 35 mM como fuente nitrogenada.
- Medio de cultivo Papa glucosado :** infusión de papa (50 μ g/ml); esta se filtró y al líquido remanente se le agregó glucosa 10 g/l.

La estabilidad de la biopelícula se evaluó mediante la observación directa, a partir del tiempo que tarda en desprenderse de la interfase aire-líquido y se deposita en el fondo del Erlenmeyer (desagregación de la biopelícula).

Aplicación de biopelícula sobre semillas de tomate

Se trabajó con semillas de tomate, desinfectadas en alcohol 70 % y lavadas 3 veces con agua destilada estéril. Sobre estas semillas se depositó, asépticamente y por medio de una espátula, una fina porción de la biopelícula de 2 mm².

El sustrato utilizado para la siembra fue una mezcla de tierra fértil (relación C/N: 21, pH: 6,8) y compost (relación C/N: 19, pH: 6,4) en proporción 3:1. Se realizaron tratamientos utilizando esta mezcla tinalizada (sustrato empobrecido en microorganismos) y sin tinalizar (sustrato fértil). La tinalización es un método de esterilización en el cual el suelo se somete a calentamiento a 100°C, durante una hora por tres días consecutivos.

El ensayo se realizó en invernáculo en bandejas de germinación (speedling), a una temperatura media de 20°C, durante 30 días. Los tratamientos de inoculación realizados sobre semillas de tomate fueron: a) Semillas inoculadas con la biopelícula sobre sustrato fértil; b) Semillas inoculadas con la biopelícula sobre sustrato tinalizado; c) Semillas sembradas sobre sustrato fértil sin inocular (tratamiento control); d) Semillas sembradas sobre sustrato tinalizado sin inocular (tratamiento control).

Al finalizar el ensayo se evaluó la biomasa aérea y radicular de las plantas de tomate.

Análisis estadístico

La distribución normal de los datos se analizó con la prueba de Levene y la homogeneidad de varianzas mediante prueba de Shapiro-Wilkins. Las diferencias en la biomasa aérea y radicular del tomate se evaluaron mediante un ANOVA simple. Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a un nivel de significación de 0,05. El análisis estadístico se realizó con el software Infostat 2016. Las biopelículas obtenidas se evaluaron en términos de porcentajes aritméticos y desviaciones estándar de tres repeticiones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de medios de cultivo complejos sobre la formación de biopelícula en *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*

Medios complejos con peptona

B. subtilis subsp. *spizizenii* creció y desarrolló una biopelícula en la interfase aire-líquido en medios de cultivos complejos, cuyas composiciones no están completamente

definidas, formulados con extracto de carne y digeridos de proteínas.

Para que la biopelícula pueda desarrollarse se necesitaron 96 horas de cultivo. De acuerdo con esto, Holscher *et al.* (24) sugirieron que las bacterias requieren de un tiempo de incubación previo a la formación de biopelícula, donde se produce un gradiente de oxígeno que se genera cuando la bacteria alcanza una alta densidad de crecimiento en el cultivo líquido y en condiciones estáticas. Cuando *Bacillus* alcanza la interfase aire-líquido sufre un cambio desde su estilo de vida libre como bacteria móvil a un nuevo estadio, en el cual libera exopolisacáridos que constituyen la base de la matriz que posteriormente dará origen a la biopelícula (25).

La cantidad de biopelícula formada, utilizando caldo nutritivo, no mostró diferencia respecto de la obtenida utilizando un medio de cultivo de sales minerales con el agregado de peptona 1 %. Cuando se usó caldo Cerebro-Corazón, el incremento en la formación de la biopelícula fue más del triple (Fig.1). Este medio de cultivo, además del hidrolizado proteico de peptona, contiene otros nutrientes como fosfatos, glucosa y la presencia de otros componentes químicamente no definidos que actuarían sobre *Bacillus* como factores de crecimiento, para favorecer la formación de la biopelícula.

B. subtilis subsp. *spizizenii* utilizando peptona, como única fuente de carbono y nitrógeno, creció y formó biopelícula; sin embargo, otras bacterias, bajo estas condiciones, solo fueron capaces de crecer y desarrollar el primer estadio de la formación de la biopelícula, que corresponde a una adhesión reversible con la interfase, tal es el caso de *Pseudomonas spongiae* (26).

Medios de cultivos complejos con extracto de levadura

El medio de cultivo mínimo salino, con el agregado de extracto de levadura 1 %, produjo 0,8 mg biopelícula/ml de cultivo; en el medio de cultivo Landy el desarrollo de la biopelícula se incrementó más de un 80 % y en medio de cultivo Luria Bertani el incremento fue mayor al 100 %. (Fig.2)

El medio de cultivo Landy, además del extracto de levadura, contiene otros nutrientes como son fosfatos, glucosa, glutamato, sales de

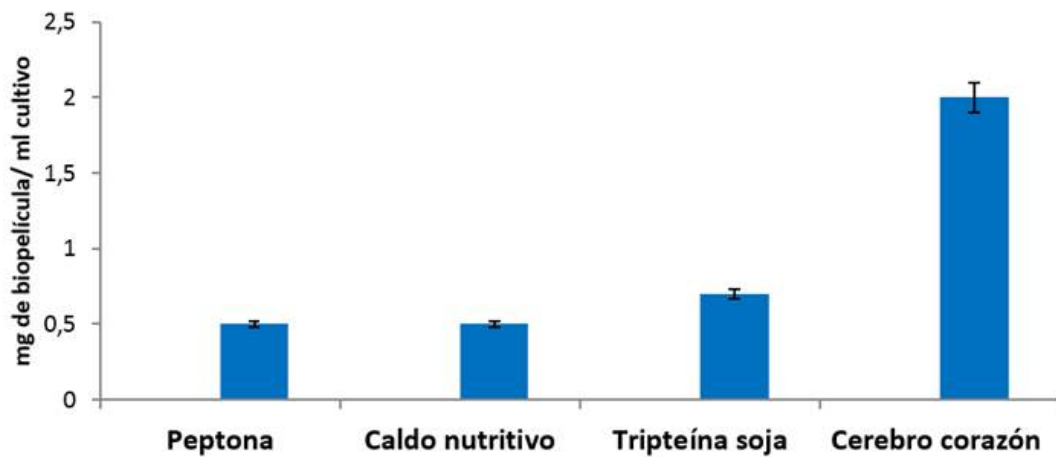


Figura 1. Formación de biopelículas por *B. subtilis* subsp. *spizizenii* en medios de cultivo complejos con peptona a 30°C en condiciones estáticas. / Biofilm formation by *B. subtilis* subsp. *spizizenii* in complex culture media with peptone at 30°C in static conditions.

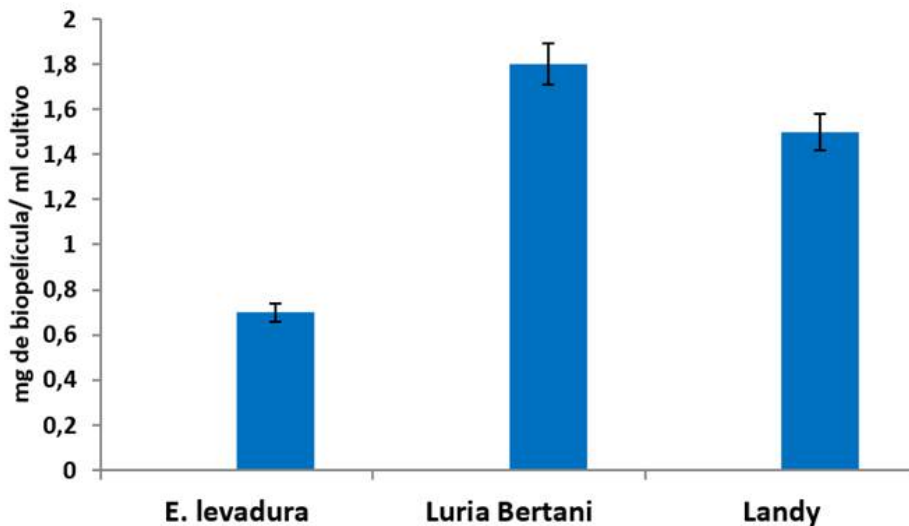


Figura 2. Formación de biopelículas por *B. subtilis* subsp. *spizizenii* en medios de cultivo complejos con extracto de levadura a 30°C en condiciones estáticas/ Biofilm formation by *B. subtilis* subsp. *spizizenii* in complex culture media with yeast extract at 30°C in static conditions

hierro y magnesio, que actuarían sobre la bacteria para favorecer su actividad metabólica y sintetizando productos que formarían parte de la matriz. Según Morikawa y Banin *et al.* (27,28) en *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente, el glutamato y las sales de hierro favorecieron la formación de las biopelículas. En el presente ensayo, la mayor cantidad de biopelícula se registró en medio de cultivo Luria Bertani, que posee una combinación de extracto de levadura y peptona en relación 1:2.

Medios de cultivo con distintas fuentes carbonadas

La mayor cantidad de biopelícula se obtuvo con el medio de cultivo papa glucosada (PG). En

este sentido Kovacs *et al.* (29) observaron que la principal bacteria aislada de productos alimenticios, como sopas a base de papas, corresponde a *Bacillus subtilis*. Esta bacteria puede sobrevivir a procesos de cocción y desarrollar grandes poblaciones que colonizan las interfaces aire-líquido. En estos mismos alimentos, *Bacillus thuringiensis* fue incapaz, por sí misma, de producir una biopelícula: sin embargo, esta especie se desarrolló si en el mismo producto coexistía con *Bacillus subtilis*.

Cuando se utilizó como fuentes carbonadas galactosa y fructosa se obtuvieron cantidades similares (Fig. 3). Cuando se agregó biodiesel al medio de cultivo la bacteria fue capaz de crecer,

pero no desarrolló biopelícula. Kankeu *et al.* (30), en su trabajo con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 y *Bacillus subtilis* sp., expusieron estas bacterias a distintas concentraciones de biodiesel, desde 1 % hasta 70 %, y en todos los casos las bacterias crecieron (a través de la liberación de surfactinas), utilizando biodiesel como fuente carbonada; sin embargo, bajo esas condiciones no desarrollaron biopelícula. Vazquez *et al.* (31) postularon un mecanismo por el cual los sustratos hidrofóbicos producirían modificaciones directas en la membrana bacteriana favoreciendo el contacto con el sustrato y, de esta forma, poder ser utilizados por la bacteria; sin embargo, este trabajo se realizó con la bacteria crecida en medio de cultivo líquido.

B. subtilis subsp. *spizizenii* fue capaz de sintetizar biopelícula en medios de cultivo complejos y simples. (Fig. 1, 2, 3, 4)

En estudios con *Rhizobium leguminosarum* (32) se demostró que los medios de cultivo mínimos, que poseían como única fuente carbonada manitol o succinato, favorecían la formación de biopelícula. Yang *et al.* y Reisner *et al.* (33,34) demostraron que en los casos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, la adherencia bacteriana y la formación de la biopelícula eran estimuladas en condiciones de escasez de nutrientes y, por el contrario, los medios de cultivo ricos resultaron desfavorables. Para el caso de *Citrobacter* sp. y *Staphylococcus aureus*, el fosfato y la glucosa fueron elementos que aumentaron el desarrollo de sus biopelículas (35,36).

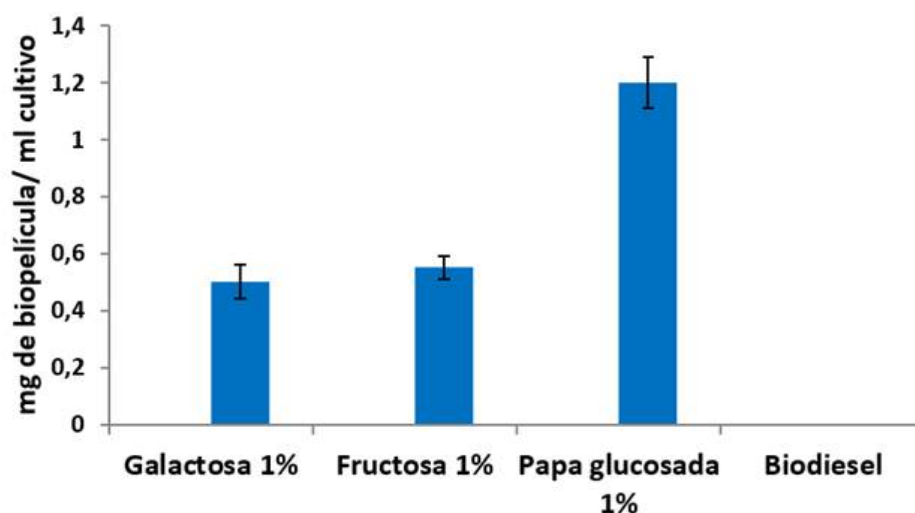


Figura 3. Biopelículas formadas por *B. subtilis* subsp. *spizizenii* en medio mínimo salino, ácido L-glutámico y diferentes fuentes carbonadas en concentración 1 % a 30°C en condiciones estáticas./ Biofilms formed by *B. subtilis* subsp. *spizizenii* in minimal saline medium, L-glutamic acid and different carbon sources at 1 % concentration at 30°C in static conditions



Figura 4. Biopelícula formada por *B. subtilis* subsp. *spizizenii* (vista superficial) en **a)** medio Cerebro corazón, **b)** en medio Landy, **c)** en medio Papa glucosada / Biofilm formed by *B. subtilis* subsp. *Spizizenii* (superficial view) in **a)** brain heart medium. **b)** Landy medium, **c)** potato and glucose medium

Tiempo de desagregación de las biopelículas

Se evaluó la durabilidad de la biopelícula en el tiempo, utilizando los medios de cultivo en los cuales se obtuvo la mayor cantidad de biopelícula.

La biopelícula obtenida utilizando el medio de cultivo Papa glucosada fue la más resistente a los procesos degradativos, debido a que a temperatura ambiente (25°C) no mostró ningún signo de degradación hasta luego de siete días. (Fig. 5).

Las biopelículas desarrolladas a partir de Luria Bertani y Landy, al cuarto día evidenciaron signos de disgregación y la biopelícula se desprendió de la interface aire-líquido, depositándose en el fondo del erlenmeyer. A los seis días se había desintegrado el 40 % de la biopelícula desarrollada en medio de cultivo Luria Bertani y 46 % de la misma desarrollada en medio de cultivo Landy. La biopelícula menos resistente a la degradación fue la que se desarrolló en medio de cultivo Cerebro corazón. En varios trabajos realizados por Branda *et al.* (37,38,39) se sugiere que las biopelículas desarrolladas por *Bacillus subtilis* son muy robustas y contienen agregados celulares que no pueden ser disgregados por procedimientos sencillos de laboratorio, con lo cual se requiere varios ciclos de sonicación para lograr su

desintegración. Las superficies de estas biopelículas se comparan con los cuerpos de fructificación de ciertas estructuras fúngicas.

En otros trabajos, donde se compara la utilización de medios de cultivo industrializados con subproductos de la industria alimentaria, se encontró que estos últimos pueden servir como sustratos más económicos para la producción a gran escala de las biopelículas bacterianas (40). Tomando esto como referencia y los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo, para los ensayos posteriores sobre inoculación de semillas de tomate y para el crecimiento de la bacteria y desarrollo de la biopelícula, se utilizó el medio de cultivo Papa glucosada por ser, dentro de los medios de cultivo evaluados, el de menor costo y porque su biopelícula fue la más estable a los procesos degradativos.

Efecto de tindalización del sustrato en el desarrollo de las plántulas de tomate

El sustrato que recibió el tratamiento de tindalización quedó empobrecido en su flora microbiana, a su vez que disminuyó su granulometría y formó un suelo con mayor compactación. Bajo esta condición, el desarrollo de la biomasa aérea disminuyó más de 70 % y el desarrollo de las raíces 38 %, con respecto a las plántulas sembradas sobre sustrato fértil. (Fig. 6, 7)

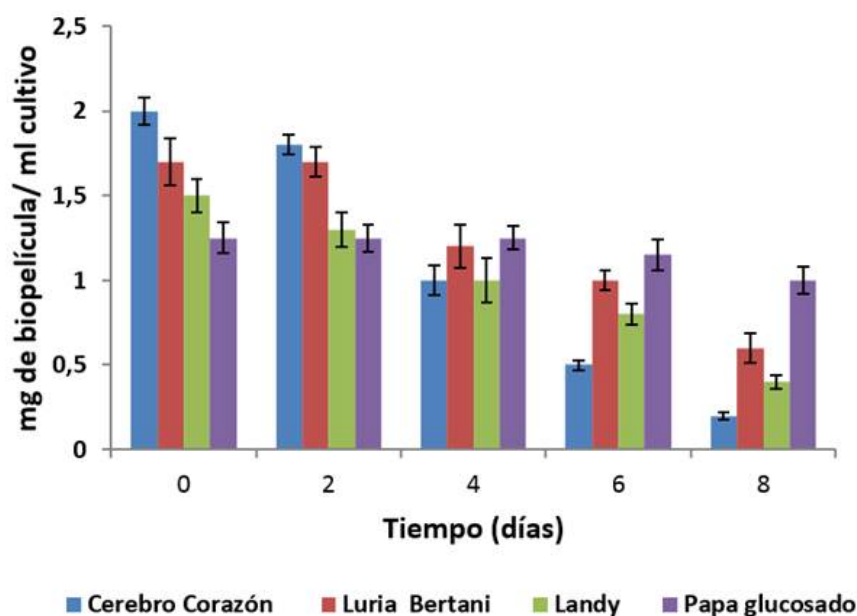


Figura 5. Tiempo de disgregación de las biopelículas desarrolladas en medios de cultivo complejos a 25°C en condiciones estáticas. / Time of disintegration of the biofilm developed in complex culture media at 25°C in static conditions

Inoculación de semillas de tomate con *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii*

Cuando se utilizó el sustrato fértil no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de la biomasa aérea ni de las raíces de las plántulas de tomate que fueron inoculadas con la biopelícula de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* respecto del control (Fig. 8 y 9).

Se observó que en los tratamientos donde se aplicó la biopelícula el tiempo de germinación se retrasó dos días respecto a las semillas sin

biopelícula, sin modificar el poder germinativo (dato no mostrado). En un trabajo en el cual se estudió la colonización de la raíz de cebada por *Pseudomonas* sp. DMSZ 13134 (agente fitosanitario PRORADIX), sugieren que el efecto de las RPCV puede variar de acuerdo a la microbiota presente en los sustratos, debido a las interacciones que pueden presentarse entre las cepas aplicadas con los microorganismos nativos y/o con condiciones abióticas (41). En otro trabajo donde se inocularon plantas de Banano

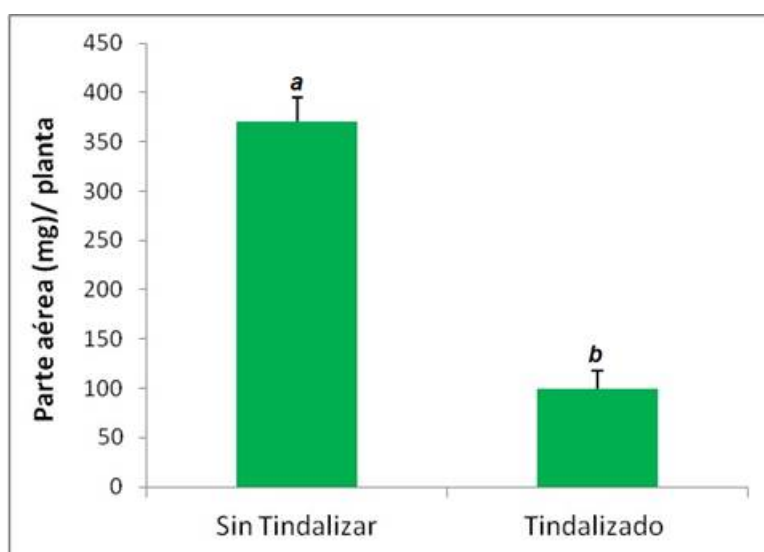


Figura 6. Crecimiento de parte aérea de plántulas de tomate crecidas sobre sustrato sin tindalizar y tindalizado. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) / Growth of the aerial part of tomato seedlings grown on non-tindalized or tindalized substratum. Different letters between treatments indicate significant differences ($p < 0.05$)

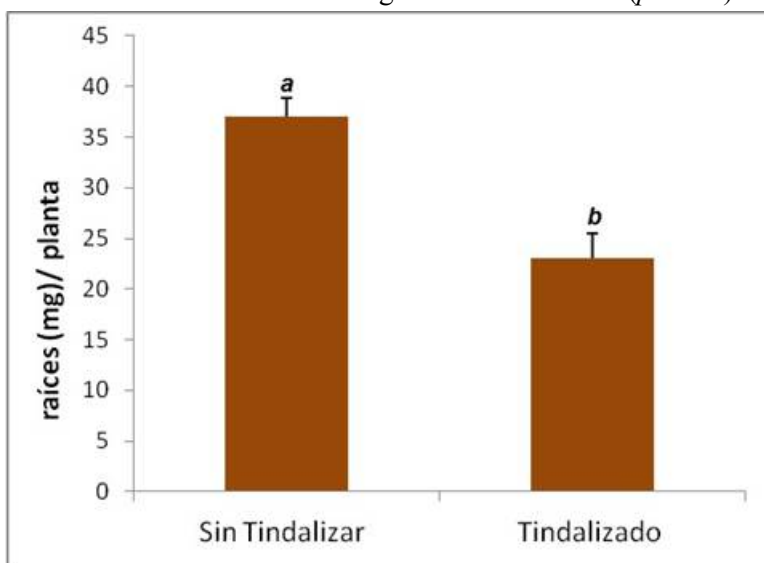


Figura 7. Crecimiento de raíces de plántulas de tomate crecidas sobre sustrato sin tindalizar y tindalizado. Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) / Root growth of tomato seedlings grown on non-tindalized or tindalized substratum. Different letters between treatments indicate significant differences ($p < 0.05$)

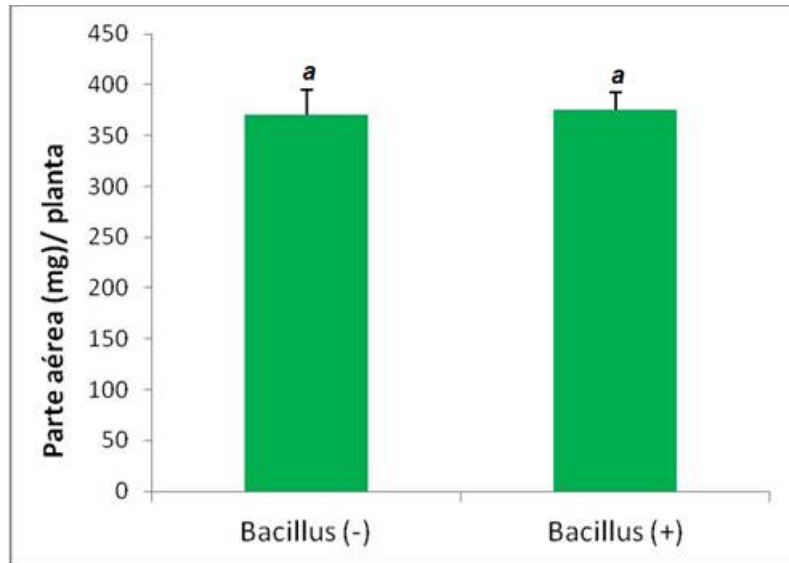


Figura 8. Crecimiento de parte aérea de plántulas de tomate crecidas sobre sustrato sin tindalizar y sin inocular (*Bacillus* -) e inoculadas con *B. subtilis* (*Bacillus* +). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) / Growth of the aerial part of tomato seedlings grown on non-tindalized substratum without inoculation (*Bacillus* -) or inoculated with *B. subtilis* (*Bacillus* +). Different letters between treatments indicate significant differences ($p < 0.05$)

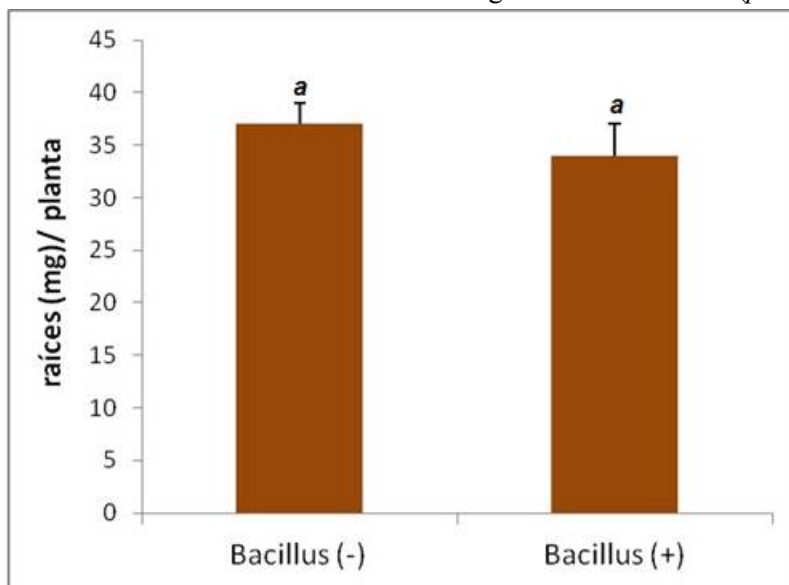


Figura 9. Crecimiento de raíces de plántulas de tomate crecidas sobre sustrato sin tindalizar y sin inocular (*Bacillus* -) e inoculadas con *B. subtilis* (*Bacillus* +). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) / Root growth of tomato seedlings grown on non-tindalized substratum without inoculation (*Bacillus* -) or inoculated with *B. subtilis* (*Bacillus* +). Different letters between treatments indicate significant differences ($p < 0.05$)

con *Bacillus subtilis* EA-CB0575, encontraron en el suelo un efecto de enmascaramiento o antagonismo de las poblaciones nativas de Banano, posiblemente debido a la dominancia de la bacteria promotora del crecimiento *Bacillus* sobre las raíces de la planta (42).

Cuando el sustrato fue tindalizado se encontraron diferencias significativas entre las semillas inoculadas con la biopelícula y los

controles (semillas sin inocular). Con respecto a los valores de biomasa aérea, las semillas inoculadas con la bacteria mostraron un aumento de 50 % con relación a los controles sin inocular y en el desarrollo radicular se observó un aumento de 40 % con respecto a los controles sin inocular. (Fig. 10, 11)

La mayor biomasa podría deberse a la producción de fitohormonas liberadas como

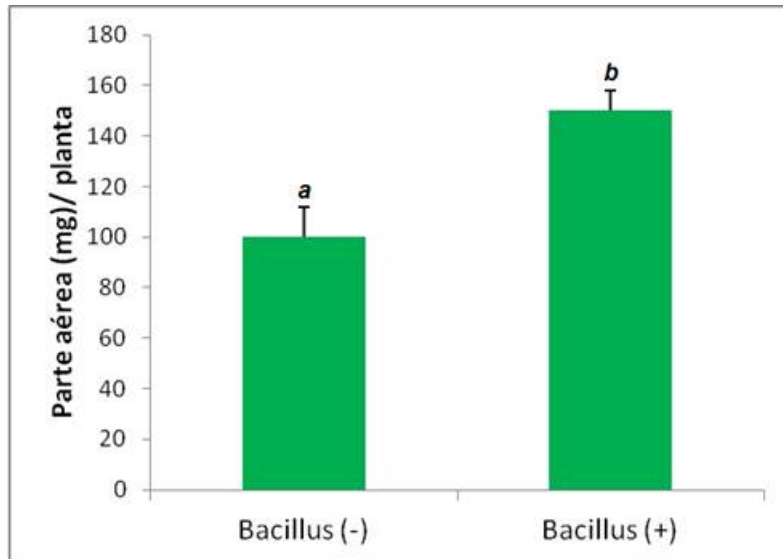


Figura 10. Crecimiento de parte aérea de plántulas de tomate crecidas sobre sustrato tindalizado y sin inocular (*Bacillus* -) e inoculadas con *B. subtilis* (*Bacillus* +). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) / Growth of the aerial part of tomato seedlings grown on tindalized substratum without inoculation (*Bacillus* -) or inoculated with *B. subtilis* (*Bacillus* +). Different letters between treatments indicate significant differences ($p < 0.05$)

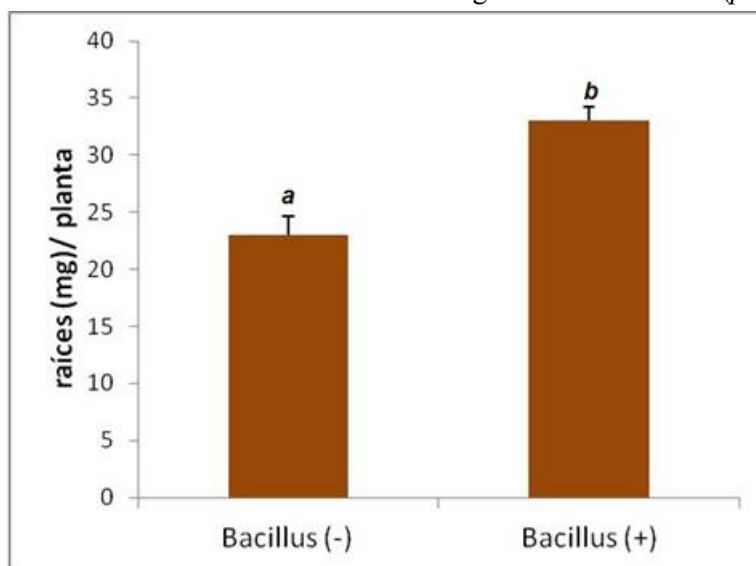


Figura 11. Crecimiento de raíces de plántulas de tomate crecidas sobre sustrato tindalizado y sin inocular (*Bacillus* -) e inoculadas con *B. subtilis* (*Bacillus* +). Letras distintas entre tratamientos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) / Root growth of tomato seedlings grown on tindalized substratum without inoculation (*Bacillus* -) or inoculated with *B. subtilis* (*Bacillus* +). Different letters between treatments indicate significant differences ($p < 0.05$)

producto del metabolismo bacteriano de *Bacillus*, las cuales regulan parámetros como el crecimiento, la división celular o extensión de la raíz. Entre ellas se encuentran las citoquininas, auxinas y giberilinas; estas últimas reportadas en algunas especies del género *Bacillus* (42). Además, Dweipayan *et al.* (43) y Sanchez López (44) señalaron la capacidad nitrogenasa y de solubilización de fósforo, por parte de bacterias

del género *Bacillus*, ambos nutrientes esenciales para el desarrollo vegetal.

Niñirola *et al.* (45), en un estudio con plantas de berro a nivel de invernadero crecidas en sustrato estéril y tratadas con inóculo líquido de *B. subtilis*, encontraron mayores resultados sobre el sustrato tindalizado.

Estas observaciones sobre el efecto de *Bacillus* como RPCV de manera acentuada en el

tratamiento con sustrato empobrecido, podría deberse a la ausencia de una microbiota que disminuya el desarrollo de *Bacillus* en el suelo, al adquirir esta bacteria dominancia como promotor del crecimiento.

La aplicación de biopelículas de origen microbiano, como inoculante de semillas, sería una herramienta tecnológica efectiva y novedosa a los inoculantes líquidos convencionales, debido a que la matriz que forma la misma le permitiría a la bacteria adaptarse a las nuevas condiciones ambientales y favorecer, de este modo, la supervivencia de la bacteria. Esta innovación en los métodos de inoculación de RPCV se alinea con el desarrollo de una agricultura sustentable, que aumente los rendimientos de los cultivos, sin provocar los problemas ambientales vinculados con los fertilizantes químicos.

CONCLUSIONES

En este trabajo se propone utilizar como biofertilizante la biopelícula desarrollada por *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*. Las condiciones nutricionales óptimas para su desarrollo fue el medio de cultivo líquido papa glucosado debido a que en este medio se obtuvo una cantidad adecuada de biopelícula y a su vez la misma mostró ser resistente a la degradación a través del tiempo.

En el estadio de plantín del tomate, la aplicación de *Bacillus* como RPCV fue exitoso cuando se utilizó un sustrato tinalizado; sin embargo, el hecho de no encontrar el mismo efecto cuando se utilizó un sustrato fértil podría explicarse teniendo en cuenta que en el sustrato fértil los procesos de competencia entre la propia microbiota y los microorganismos que constituyen la biopelícula requieren de mayores tiempos adaptativos para que *Bacillus* desarrolle su acción como promotora del crecimiento vegetal. La microbiota presente en un suelo fértil podría, en un principio, generar relaciones de competencia con las bacterias RPCV, en este caso *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, por lo que sería adecuado, en estudios futuros, evaluar los parámetros de biomasa aérea y radicular luego de un periodo más prolongado del ciclo de vida del vegetal.

REFERENCIAS

1. Murillo RAL, Reyes Pérez JJ, López Bustamante RJ, Reyes Bermeo M, Murillo Campuzano G, Sarmaniego Armijos C. Abonos orgánicos y su efecto en el crecimiento y desarrollo del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Centro Agrícola. 2015; 42(4):67-74.
2. Wakil W, Brustand G, Pening T. Sustainable management of arthropod pest of tomato. 2017. 1er Edition. 372 p.ebook ISBN 9780128135082
3. Cruz Koizumi YP, Alayón Gamboa JA, Morón Ríos A. Efecto de la fertilización orgánica y de la síntesis química en tomate verde *Physalis ixocarpa* Brot. (Ex Horn) en Calakmul, Campeche (México). Avances en investigación agropecuaria. 2017; 21(2): 41-53.
4. Kloepper J, Rodriguez-Ubana R, Zehnder G, Murphy J, Sikora E, Fernandez C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potencial extension to systemic and foliar diseases. Australasian Plant Pathology. 1999; (28):21-26.
5. Espinosa Palomeque B, Moreno Reséndez A, Cano Ríos P, De Paul Álvarez Reyna V, Sáenz Mata J Sánchez Galván H et al. Inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Afrodita en invernadero. Terra Latinoamérica. 2017, 35:169-178.
6. Hernández Montiel LG, Chiquito Contreras RG, Castillo Rocha DG, Contreras CJ, Vidal Hernández L, Beltrán Morales FA. Efecto de microcápsulas de *Pseudomonas putida* sobre crecimiento y rendimiento de pimiento marrón. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2018; 20:325-334.
7. Prashar P, Kapoor N, Sachdeva S. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. Reviews in Environmental Science and Biotechnology. 2014; 22:1-15.
8. Borriss R. "Bacillus, a plant beneficial bacterium" in Principles of Plant Microbe Interactions. Microbes for Sustainable Agriculture, ed. B. Lugtenberg (Berlin: Springer). 2015; 379- 391.
9. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology. 2005; 56 (4):845-857.
10. Zhiqiong T, Baoying L, Rongyi Z. A novel antifungal protein of *Bacillus subtilis* B25. SpringerPlus. 2013; 2 (543):2-6.
11. Baindara P, Mandal SM, Chawla N, Kumar Singh P, Kumar Pinnaka A, Korpole S. Characterization of two antimicrobial peptides

- produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample. *AMB Express*. 2013; 30 (2):465-478.
12. Trejo M, Douarchea C, Bailleuxa V, Poularda C, Mariota S, Regeardb C, Raspauda E. Elasticity and wrinkled morphology of *Bacillus subtilis pellicles*. *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*. 2013; 110 (6):2011-2016.
 13. Stanley N, Lazazzera B. Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly DL glutamic acid production and biofilm formation. *Molecular Microbiology*. 2005; 57(4):1143-1158.
 14. Billings N, Ramirez Millan M, Caldara M, Rusconi R, Tarasoval Y, Stocker R, Ribbeck K. The Extracellular Matrix Component Psl Provides FastActing Antibiotic Defense in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLOS Pathogens*. 2013; 9(8). <http://www.plospathogens.org>
 15. Branda SS, Friedman V, Kolter K. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*. 2005; (13):20-26.
 16. Sinha SD, Chatterjee S, Maiti PK, Tarafdar S, Moulik SP. Evaluation of the role of substrate and albumin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm morphology through FESEM and FTIR studies on polymeric biomaterials. *Programation Biomaterials*. 2017; 6:27-38.
 17. Berhe N, Tefera Y, Tintagu T. Review on biofilm formation and its control options. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 2017; 8 (4):122-133.
 18. Tomlinson AD, Fuqua C. Mechanisms and regulation of polar surface attachment in *Agrobacterium tumefaciens*. *Current opinion in microbiology*. 2009; (12):708-714.
 19. Strauss SL, Stover JK, Kluepfel DA. Impact of biological amendments on *Agrobacterium tumefaciens* survival in soil. *Applied Soil Ecology*. 2015; (87):39-48.
 20. Walker TS, Bais HP, Deziel E, Schweizer HP, Rahme LG, Fall R, Vivanco JM. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiology*. 2004; (134):320-331.
 21. Ansari FA, Ahmad I. Fluorescent *Pseudomonas* FAP2 and *Bacillus licheniformis* interact positively in biofilm mode enhancing plant growth and photosynthetic attributes. *Scientific reports*. 2019; 9:45-47.
 22. Godino A, Príncipe A, Fischer S. A pts P deficiency in PGPR *Pseudomonas fluorescens* SF39a affects bacteriocin production and bacterial fitness in the wheat rhizosphere. *Research in Microbiology*. 2016; (167) I:3 p178-189.
 23. Ghosh R, Barman S, Mandal NCh. Phosphate deficiency induced biofilm formation of *Burkholderia* on insoluble phosphate granules plays a pivotal role for maximum release of soluble phosphate. *Scientific Reports*. 2019; 9:5477.
 24. Hölscher T, Bartels B, Cheng Lin Y, Monterrosa R, Whelan A, Kolter R, et al. Motility, chemotaxis and aerotaxis contribute to competitiveness during bacterial pellicle biofilm development. *Journal Molecular Biology*. 2015; (427):3695-3708.
 25. Kobayashi K. *Bacillus subtilis pellicle* formation proceeds through genetically defined morphological changes. *Journal of Bacteriology*. 2007; (56):4920-4931.
 26. Lim Y, Jana M, Luong TT, Lee CY. Control of glucose -and NaCl- induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 2004; (186):722-729.
 27. Morikawa M. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006;1 (101):1-8.
 28. Banin E, Vasil M, Greenberg E. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proceeding. Academic Science. USA*. 2005; (102):11076-11081.
 29. Kovács A, Dragoš A. Evolved biofilm: Review on the experimental evolution Studies of *Bacillus subtilis Pellicles*. *Journal of Molecular Biology Article in press*. 2019. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.02.005.
 30. Kankeu E, Max S, Brink A. Adaptation behaviour of bacterial species and impact on the biodegradation of biodiesel. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2017; (34):469-480.
 31. Vazquez Vazquez JL. Producción, caracterización parcial y evaluación de la capacidad emulsificante de hidrocarburos del bioemulsificante de *Actinobacter bouvetii* UAM25. (Tesis de posgrado: aspirante a doctorado en biotecnología(. 105 p. Universidad autónoma Metropolitana, México. 2018. <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI22467.pdf>
 32. Voza N. Factores de adhesión de *Rhizobium leguminosarum* y su rol en la formación de biofilms. (Tesis doctoral(. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires 2012. <https://>

- digital.bl.fcen.uba.ar/collection/tesis/document/tesis_n5057_Vozza
33. Yang L, Hiu Y, Liu Y, Molin S. Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environmental Microbiology*. 2012; (13):1705-1711.
 34. Reisner A, Krogfelt K, Klein B, Zechner E, Molin S. *In vivo* biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: Impact of environmental and genetic factors. *Journal Bacteriology*. 2006; (188):3572-3581.
 35. Allan V, Callow M, Macaskie L, Paterson-Beedle M. Effect of nutrient limitation on biofilm formation and phosphatase activity of a *Citrobacter* sp. *Microbiology*. 2002; 148:277-288.
 36. Huang Y, Dobretsov S, Xiong H, Pei-Yuan Q. Effect of Biofilm Formation by *Pseudoalteromonas spongiae* on Induction of Larval Settlement of the Polychaete *Hydroides elegans*. *Applied Environmental Microbiology*. 2007; 73 (19):228-236.
 37. Branda SS, Gonzalez-Pastor JE, Ben-Yehuda S, Losick R, Kolter R. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci*. 2001; 98:11621-11626.
 38. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. Biofilms: The matrix revisited. *Trends Microbiology*. 2005; 13:20-26.
 39. Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*. 2006; 59:1229-1238.
 40. Reisner A, Krogfelt K, Klein B, Zechner E, Molin S. *In vivo* biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: Impact of environmental and genetic factors. *Journal Bacteriology*. 2006; (188):3572-3581.
 41. Buddrus-Schiemann K, Schmid M, Schreiner K, Welzl G, Hartmann A. Root Colonization by *Pseudomonas* sp DSMZ 13134 and Impact on the Indigenous Rhizosphere Bacterial Community of Barley. *Microbial Ecology*. 2010; 60(2):381-393.
 42. Posadas Uribe LF. Promoción del crecimiento vegetal de *Bacillus subtilis* EA-CB0575, colonización rizosférica y potencial genómico y bioquímico. (Tesis de doctorado en bioquímica). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Medellín, Colombia. 2017. <http://bdigital.unal.edu.co/57419/1/43979285.2017.pdf>
 43. Goswami D, Thakker JN, Dhandhukia PC. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (RPCV): A review. *Cogent Food & Agriculture*. 2016; 2:1127500.
 44. Sanchez López DB. Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fósforo en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2014; (16):122-128.
 45. Niñirola D, Pignata SN, Egea-Gilabert C, Fernández JA. Efecto de las RPCV en la producción y vida útil del berro (*Nasturtium officinale*) cultivado en bandejas flotantes. III Workshop en Investigación Agroalimentaria, Cartagena, Colombia. 2014. <https://iris.unito.it/handle/2318/1520962#.XQuyfbZKjIU>

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)