



**EFFECTO DE LA CO- INOCULACIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE
AHLS Y CEPAS MUTANTES SOBRE FACTORES DE PATOGENICIDAD
DE *Pseudomonas* CON ACTIVIDAD ENTOMOPATÓGENA**

INGRID KATERINE ARIAS LÓPEZ

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

2019



**EFFECTO DE LA CO- INOCULACIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE
AHLS Y CEPAS MUTANTES SOBRE FACTORES DE PATOGENICIDAD
DE *Pseudomonas* CON ACTIVIDAD ENTOMOPATÓGENA**

INGRID KATERINE ARIAS LOPEZ

**INFORME FINAL DE PASANTIA
MODALIDAD GRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE BACTERIÓLOGA
Y LABORATORISTA CLÍNICO**

ASESOR DE PASANTÍA

Ph.D. JAVIER VANEGAS

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

2019

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
2. JUSTIFICACIÓN	6
1. OBJETIVOS	7
1.1. Objetivo General	7
1.2. Objetivos específicos	7
4. PARTICIPANTES	8
5. ENTIDAD EXTERNA DONDE SE REALIZA LA PASANTIA	9
6. PLAN DE TRABAJO	15
METODOLOGÍA	15
7. LOGROS ALCANZADOS:	16
ACADÉMICOS:	16
SOCIALES:	16
PROYECCIÓN:	16
8. DESARROLLO DEL PLAN DE TRABAJO	17
8.1. Detección de producción de AHLs de rizobacterias asociadas a cultivos de papa mediante el uso de biosensores.	17
8.2. Preparación de medios de Cultivo	17
8.3. Co-Inoculación de Rizobacterias productoras de AHLs	18
8.4. Detección de compuestos Volátiles VOCs.	18
8.5. Inoculación de Rizobacterias productoras de AHLs para determinar su acción biocontroladora con <i>Tecia solanivora</i> .	19
8.6. Extracción de ADN Bacteriano	19
8.7. Extracción de AHLs: Sólido-Líquido	19
8.9. Manejo de equipos de laboratorio	19
8.10 Exposición de Artículos	20
8.11 Metodologías empleadas	20
8.12. Experiencias adquiridas	20
9. PRODUCCIÓN	21
9.1 Informe producción de AHLs por biosensor <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	21
9.2 .Informe de Caracterización de microorganismos por producción de proteasas	27

9.3. Informe de caracterización de microorganismos fijadores de nitrógeno.	33
9.4. Informe de caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato.	39
9.5. Informe de detección de sideróforos.	48
9.6. Informe de producción de Ácido Cianhídrico (HCN)	53
9.7. Informe de producción de Ácido Indolacético (AIA)	61
9.8 Resultados de las pruebas realizadas a las 82 cepas bacterianas.	70
9.9. Informe ensayo co-inoculación de bacterias productoras de AHLs y su actividad biocontroladora por producción de compuestos volátiles (VOCs)	74
9.10. Informe inoculación de rizobacterias productoras de AHLs para determinar su acción biocontroladora en <i>Tecia solanivora</i> .	79
9.11. Informe determinación del potencial biocontrolador de bacterias entomopatógenas productoras de AHLs en <i>Rhizotocnia solani</i> .	82
9.12. Informe extracción de ADN.	87
9.13. Informe de extracción de AHLs.	90
10. CERTIFICACIÓN DE PASANTÍA	93
11. NOTA DE PASANTÍA	94

1. INTRODUCCIÓN

Este informe contiene actividades que se realizaron en el primer periodo de 2019, durante 12 semanas de pasantía, en el laboratorio de investigación de la Universidad Antonio Nariño, sede Circunvalar, en la ciudad de Bogotá, tiempo en el cual se realizaron actividades de apoyo al proyecto titulado: Efecto de la co-inoculación de cepas productoras de AHLs y cepas mutantes sobre factores de patogenicidad de *Pseudomonas* con actividad entomopatígena.

Durante el tiempo de pasantía se plantearon actividades relacionadas con el proyecto las cuales se cumplieron de acuerdo al cronograma de actividades que incluían la detección de producción de Acil homoserina Lactonas (AHLs) de rizobacterias asociadas al cultivo de papa y la determinación de su actividad biocontroladora, extracción de las AHLs y la extracción de ADN para la caracterización molecular. La importancia del desarrollo de las actividades es el uso de las rizobacterias en el campo agroambiental, como promotoras de crecimiento, agentes de biocontrol por inhibición de fitopatógenos y su uso en la biofertilización de suelos que según muchas investigaciones llevadas a cabo en rizobacterias aumenta la biodisponibilidad de nutrientes para las plantas mejorando su crecimiento y por ello los productos de los cultivos en el área agrícola.

Todas las actividades se desarrollaron en el laboratorio de investigación de la Universidad Antonio Nariño en la ciudad de Bogotá.

2. JUSTIFICACIÓN

Las actividades realizadas dentro del Proyecto “Efecto de la co-inoculación de cepas productoras de AHLs y cepas mutantes sobre factores de patogenicidad de *Pseudomonas* con actividad entomopatógica” permiten establecer las características de 82 aislamientos de rizobacterias de cultivos de papas mediante detección de enzimas, la determinación de producción de AHLs y la producción de metabolitos secundarios, que facilitan el uso de un microorganismo para ensayos de biocontrol de fitopatógenos como *Tecia solanivora* y aumento de la disponibilidad de nutrientes que mejoren la actividad y crecimiento de las plantas.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo General

Desarrollar actividades asignadas en el proyecto “Efecto de la co-inoculación de cepas productoras de AHLs y cepas mutantes sobre factores de patogenicidad de *Pseudomonas* con actividad entomopatógica”.

1.2. Objetivos específicos

- Detectar la producción de AHLs de rizobacterias asociadas a cultivos de papa mediante el uso del biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026
- Caracterizar los aislamientos de rizobacterias asociadas a cultivo de papa mediante pruebas enzimáticas y producción de metabolitos secundarios.
- Determinar el potencial biocontrolador de rizobacterias productoras de AHLs

4. PARTICIPANTES

ESTUDIANTE:

INGRID KATERINE ARIAS LOPEZ

Código estudiantil: 101749111

Estudiante: Décimo semestre

Programa de Bacteriología y Laboratorio clínico

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

ASESOR ENTIDAD EXTERNA

JAVIER VANEGAS

Docente Investigador

Facultad de ciencias Básicas

Universidad Antonio Nariño

5. ENTIDAD EXTERNA DONDE SE REALIZA LA PASANTIA

La pasantía se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Universidad Antonio Nariño Sede Circunvalar

RESEÑA HISTORICA UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO

NATURALEZA JURÍDICA

La Universidad Antonio Nariño es una entidad privada de educación superior, de utilidad común, sin ánimo de lucro, organizada como Corporación, con personería jurídica reconocida por el Ministerio de Educación Nacional mediante Resolución 4571 del 24 de mayo de 1977, y reconocida como Universidad mediante Resolución 3277 del 25 de junio de 1993, expedida por el mismo Ministerio. A su vez, mediante la Resolución 05846 del 19 de julio de 1994, el Ministerio ratifica la Reforma Estatutaria¹ y la nueva denominación de la entidad como Universidad Antonio Nariño. La Corporación tiene domicilio en la ciudad de Bogotá, y puede, de acuerdo con las normas legales sustantivas y reglamentarias de la educación superior y la reforma estatutaria, establecer dependencias, seccionales y centros regionales en otras ciudades del país.

Origen

La **Universidad Antonio Nariño (UAN)**, nace el 07 de marzo de 1976 en las antiguas instalaciones de la Escuela de Medicina de la Universidad Javeriana, ubicadas en la Calle 20 Sur No. 13 –61 de la ciudad de Bogotá.

La decisión de iniciar actividades en la zona Sur de Bogotá, responde en primer lugar, a la falta de un centro universitario en dicho sector y en segundo término, a que la política de cobertura educativa de entonces, no preveía la ampliación o creación de universidades estatales y programas de pregrado. Por ende, fueron muchos los jóvenes que no podían ser admitidos, y en su mayoría eran habitantes del sur de la capital.

Fue así como la **UAN**, tomó la decisión de liderar el impacto educativo y cultural en dicha área, y estructuró su oferta académica inicialmente con cuatro programas: Administración de Empresas, Contaduría Pública, Licenciaturas en Matemáticas y Física, y Licenciatura en Química y Biología.

Esto significó que para finales de 1977, con la asistencia de representantes del gobierno y el ICFES, la sede Sur de la **Universidad Antonio Nariño**, se inaugurara oficialmente, tras haber sido aprobados los programas con su

correspondiente infraestructura física y académica. De tal modo, las clases iniciaron el 2 de febrero de 1978.

Los años 80: presencia nacional

A lo largo de la década de los años 80, la **UAN** consolida y amplía su portafolio educativo a nivel de pregrado y postgrado.

Creación de programas de pregrado	
Nombre programa	Año
Licenciatura en Ciencias Sociales	1982
Licenciatura en Danzas y Teatro	1983
Ingeniería Industrial	
Ingeniería Mecánica	1984
Ingeniería de Sistemas	1985
Ingeniería Electrónica, programa pionero en proyectos de simulación, arquitectura de micros y tecnología biomédica con amplio reconocimiento nacional e internacional.	
Creación de programas de postgrado	
Nombre programa	Año
Postgrado en Actuaría	1984
Postgrado en Computación para la docencia, ha capacitado a más de 5 mil docentes en todo el país.	
Postgrado en Auditoría de Sistemas	1985
Postgrado en Finanzas	
Postgrados en Administración	
Postgrados en Ciencias Fiscales	
Especialización en Educación Sexual	
Especialización en Educación para la cultura	
Especialización en Educación para la salud	
Especialización en Prevención del alcoholismo y la drogadicción.	
Especialización en Educación para la democracia	
Especialización en Lecto escritura	
Especialización en Educación Bilingüe	
Especialización en Juegos Coreográficos	
Especialización en Teatro	

Además, comienza una nueva fase de su historia, al ofrecer programas a distancia, lo que le permite establecer centros de estudio en cada una de las regiones del país. Lo hace primero en Armenia, luego en Neiva e Ibagué, y

posteriormente en Pereira, Buga, Tunja, Roldanillo, Cartago y Rionegro (Antioquia).

Los años 90: nuevas ofertas de formación

Esta década inicia con los ciclos profesionales de Ingeniería Mecánica (1991) y Tecnología en Sistematización de Datos (1992) bajo la modalidad abierta y a distancia. Para los años siguientes, la **UAN** se concentra en adoptar su desarrollo a las exigencias del país con programas como:

- Ingeniería Biomédica
- Optometría
- Terapias Psicosociales
- Psicología
- Odontología
- Medicina
- Medicina Veterinaria
- Comercio Internacional
- Economía
- Derecho
- Arquitectura
- Hotelería y Turismo Ecológico
- Ingeniería del Desarrollo Ambiental

Así mismo, en 1998 presenta su primer programa de Maestría en Educación Matemática, actualmente en desarrollo.

Siglo XXI: el nuevo reto

El proceso de crecimiento académico de la Universidad Antonio Nariño, no sólo se ha complementado con la construcción de instalaciones propias, diseñadas y proyectadas como campus universitario, y la asignación de recursos físicos y financieros necesarios, como son laboratorios, audiovisuales, biblioteca y centros de cómputo.

También ha contribuido la apreciación constante, constructiva y crítica de los propios procesos desde dentro (autoevaluación, autorregulación), y desde fuera (vigilancia por parte del Estado), en la tarea de mejoramiento continuo tanto en aquellos aspectos que constituyen las mayores fortalezas de la Universidad como en aquellos que requieren redirigirse.

A continuación se presenta el marco estratégico emanado del Proyecto Educativo Institucional (PEI) de la UAN:

Misión

La Universidad Antonio Nariño, como institución de educación superior en claro compromiso con el país, se ha propuesto como misión:

- Formar ciudadanos idóneos y competitivos, éticos y humanistas, con pensamiento autónomo y crítico, personas altamente calificadas y comprometidas con los procesos de transformación positiva del país, fundamentados en la incorporación, difusión, generación e innovación del conocimiento universal.
- Ejercer liderazgo educativo e investigativo, en ciencias, artes y tecnología, acorde con los procesos de globalización y adelantos científicos, que responda a los desafíos provenientes de los cambios locales, regionales, nacionales e internacionales.
- Contribuir a la calidad y excelencia del talento humano mediante la formación académica e investigativa rigurosa que posibilite la creación y consolidación de grupos de investigadores que orienten el desarrollo científico, tecnológico y artístico.
- Contribuir a la democratización del conocimiento y promover la igualdad de oportunidades, no sólo en el acceso sino en la posibilidad de concluir los ciclos de formación mediante la descentralización, la ampliación de la oferta educativa, la diversificación de programas, la generación de mecanismos de financiación y el establecimiento de sistemas de información.
- Establecer los canales de comunicación con las comunidades y con sus líderes y gobernantes para realizar trabajos conjuntos que permitan la resolución de problemas, el mejoramiento de la calidad de vida y la generación de proyectos que procuren la satisfacción de las necesidades y anhelos de cambio.
- Identificar nuevos escenarios, metas y perspectivas que permitan vislumbrar un proyecto futuro de localidad, región y país y trabajar para su realización.

Visión

Posicionarse como una de las mejores universidades del país, con pensamiento crítico, autónomo y global, acreditada nacional e internacionalmente, que al estar a la vanguardia del conocimiento, contribuya a la competitividad nacional en ciencias, artes y tecnología, es el reto de la

Universidad Antonio Nariño. La Universidad ha desarrollado su quehacer institucional con rasgos singulares que deben ser repotenciados de tal manera que se establezca una nueva propuesta caracterizada por:

- El ofrecimiento de programas académicos reconocidos y acreditados nacional y/o internacionalmente, cuya calidad garantice la idoneidad y competitividad de los egresados de todos los programas, así como el aporte de estos en la identificación, análisis, prevención y/o solución de los problemas sociales o técnicos, vigentes o potenciales, programas que propicien además el logro de una formación integral que potencie el pensamiento autónomo y crítico, así como la creatividad en la construcción de la sociedad del futuro.
- Un alto nivel de desarrollo científico, tecnológico y artístico que permita la participación activa en las comunidades académicas nacionales e internacionales.
- Una cultura investigativa consolidada que posibilite la formación de grupos de investigación en diferentes campos del saber con reconocimiento nacional e internacional y que aporten al desarrollo científico del país.
- La contribución a organizaciones, nacionales e internacionales, que agrupan a comunidades y programas académicos, facultades, escuelas e instituciones de educación superior, y la participación activa en proyectos de cooperación interinstitucional.
- El impacto institucional proactivo en todo el país a través de una red robusta de programas académicos en distintas modalidades de formación en pregrado y posgrado, que aprovechen todas las posibilidades tecnológicas, innovadores, diversos y acordes con las demandas y tendencias de desarrollo local, regional, nacional e internacional.
- El fortalecimiento de planes, programas y proyectos de educación continuada y formación permanente que responda a la dinámica de evolución y crecimiento del conocimiento perteneciente a las disciplinas, profesiones, prácticas y oficios.
- El establecimiento de una cultura de colaboración y asesoría a empresas, instituciones gubernamentales, organizaciones no gubernamentales y sociales, junto al desarrollo de convenios y/o la prestación de servicios que contribuyan al bienestar de las comunidades y de los ciudadanos que las componen.
- Ser una institución acreditada nacional e internacionalmente, acorde con las tendencias y estándares de calidad en la educación superior.

- Ser una institución educativa autorregulada gracias al desarrollo de una cultura de auto evaluación y a la autonomía conferida por la ley, que permitan el permanente mejoramiento y consolidación de los procesos.

Objetivos institucionales

En consonancia con el artículo 6 de la Ley 30 de 1992, la Universidad Antonio Nariño establece sus objetivos institucionales, incorporando los propuestos por la ley y adicionando los siguientes:

1. Acreditar los programas de pregrado y postgrado de acuerdo a las disposiciones gubernamentales nacionales e internacionales en un mínimo plazo.
2. En concordancia con el artículo 67 de la Constitución Nacional, ampliar las oportunidades de acceso a quienes en ejercicio de la igualdad de oportunidades, demuestren poseer las capacidades requeridas y cumplan las condiciones académicas exigidas. Igualdad de oportunidades que se vea reflejada no sólo en el acceso sino en la posibilidad de concluir los ciclos de formación en educación superior.
3. Propiciar condiciones, académicas y de bienestar, para que cada miembro de la comunidad educativa complete y cualifique su proyecto de vida de manera que posibilite su plena realización personal.
4. Fomentar medios y procesos de formación integral de ciudadanos con pensamiento autónomo y crítico, que permitan el desarrollo de la creatividad y procuren establecer compromisos al servicio de la construcción de futuro de la sociedad.

6. PLAN DE TRABAJO

Las actividades de pasantía se realizaron desde el día en que fue aceptada la carta de la solicitud de la misma.

FECHA DE INICIO: 26 de Marzo de 2019.

FECHA DE FINALIZACIÓN: 9 de Junio de 2019.

HORARIO DE TRABAJO: 8:00 AM A 5:00 PM

LUNES A VIERNES.

DURACIÓN: 12 SEMANAS, 58 DIAS, 9 HORAS DIARIAS (522 HORAS)

METODOLOGÍA: PRESENCIAL

El desarrollo de la pasantía se realizó de forma presencial, integrando al pasante con el grupo de trabajo de investigación: estudiantes practicantes de IX Y X semestre de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, profesionales Bacteriólogas, Docentes y todo el personal que está vinculado en el laboratorio, utilizando herramientas y equipos de trabajo disponibles en un ambiente agradable de trabajo con un acompañamiento constante del docente investigador a cargo de la pasantía.

7. LOGROS ALCANZADOS:

ACADÉMICOS:

En la pasantía realizada se colocó en práctica muchos de los conocimientos aprendidos durante los 5 años de la carrera profesional.

- Desarrollo de actividades con responsabilidad.
- Aplicación de normas de bioseguridad.
- Aplicación de conocimientos en el área ambiental y veterinaria
- Desarrollo, descripción y análisis de pruebas de laboratorio.
- Identificación de la importancia de los microorganismos en el área agroambiental.
- Elaboración de protocolos e informes de laboratorio.
- Preparación de medios de cultivo.
- Manipulación de equipos de laboratorio.
- Sentido de pertenencia por la Institución.
- Interés por los Proyectos de investigación.

SOCIALES:

- Capacidad de integración a un equipo de trabajo.
- Colaboración y responsabilidad en las actividades de trabajo.
- Reconocimiento de las diferencias, fomentar la tolerancia y el respeto con los demás.
- Conocimiento de las habilidades y fortalecer las debilidades.
- Establecimiento de un compromiso ético y profesional con la sociedad.
- Sentido de pertenencia por la institución que formó al profesional

PROYECCIÓN:

Esta pasantía permite la adquisición de experiencias que fortalecen la vida laboral a nivel personal y profesional, donde se requiere un compromiso de responsabilidad y respeto con la sociedad. La pasantía amplía la visión del campo de acción de la Bacteriología en el área investigativa incentivando a la adquisición y práctica de nuevos conocimientos no solo relacionados en salud, también en áreas donde se busque solución a problemáticas sociales.

Por medio de esta práctica se logró reconocer la importancia de los énfasis en la carrera, la experiencia personal de adquirir conocimientos en clínica, el énfasis veterinario y la experiencia en el área agroambiental proyectan un futuro promisorio en el ámbito profesional, resaltando la importancia de los énfasis, los semilleros de investigación y la formación de profesionales

integrales dentro de la formación académica de los futuros Bacteriólogos y Laboratoristas clínicos.

8. DESARROLLO DEL PLAN DE TRABAJO

8.1. Detección de producción de AHLs de rizobacterias asociadas a cultivos de papa mediante el uso de biosensores.

Por medio del Biosensor *Chromobacterium violaceum* (CV026) se realizó la detección de AHLs. El biosensor produce un pigmento llamado violaceína para la detección de las moléculas señal AHLs de cadenas cortas de C4 a C8 producidas por las cepas bacterianas asociadas a cultivos de papa como mecanismos de señalización que le otorga a la bacteria la capacidad de colonización e infección. El ensayo se realizó en 82 cepas bacterianas clasificadas en la siguiente tabla:

Muestras de trabajo	Número de aislamientos
Cepas degradadoras más insecticida	26
Cepas entomopatógenas	10
Cepas promotoras	15
Cepas lechuga	16
Cepas degradadoras más insecticida	15
Total muestras	82

La metodología empleada para la detección de la producción de AHLs de rizobacterias, consistió en la activación del biosensor CV026 y la siembra masiva de este, en medio LB. Las rizobacterias se inoculan en sensidiscos: 0.5 ul de cada cepa bacteriana, se dejan incubar a 30°C y se lee a las 24 y 48 horas, el resultado positivo es la producción de pigmento violaceína por parte del CV026 alrededor del crecimiento de las cepas bacterianas y el resultado negativo es la observación de solo el crecimiento sin pigmento.

La metodología de cada una de las pruebas se encuentra detalladamente en los informes anexos.

8.2. Preparación de medios de Cultivo

Se prepararon tanto medios de cultivo sólidos como líquidos, medios de enriquecimiento, selectivos y diferenciales siguiendo los protocolos disponibles en el laboratorio y utilizando las normas de bioseguridad que aseguran la calidad de los medios.

Los medios de cultivo se realizaron para la detección de enzimas y compuestos secundarios producidos por las 82 cepas, para determinar el potencial biocontrolador de Rizobacterias productoras de AHLs utilizadas en los diferentes proyectos del laboratorio de Investigación de la Universidad Antonio Nariño Sede Circunvalar. Los medios utilizados fueron los siguientes :

MEDIOS DE CULTIVO
Medio Luria Bertani
Medio Potato Dextrose Agar PDA
Caldo Nutritivo
Medio Nitrogen free Broth (NFB)
Medio Sundara Rao y Sinha (SRS)
Medio para Sideróforos
Medio Skim Milk (proteasas)
Medio Quitinasas
Medio para ácido indolacético (AIA)
Medio para detección de (HCN)

8.3. Co-Inoculación de Rizobacterias productoras de AHLs

Este ensayo se realizó para determinar el efecto de dos cepas bacterianas C47 Y TN152 con *Rhizoctonia solani* y evaluar su actividad biocontroladora. Se realiza el inóculo de C47 Y TN152 a 0.2 Absorbancia a 500 nm y un co-inóculo de C47 Y TN152 a 0.05 ml a 0.2 Absorbancia cada uno. Después se realiza el enfrentamiento con el Hongo y se observa si los inóculos de las cepas y el co-inóculo de C47 y TN152 inhiben el crecimiento del Hongo. Determinando si las dos cepas productoras de AHLs tienen la capacidad biocontroladora frente al Hongo.

8.4. Detección de compuestos Volátiles VOCs.

En este ensayo se buscaba determinar si las cepas bacterianas C47 y TN152 (cepas entomopatógenas) tienen la capacidad de emitir compuestos volátiles, como mecanismo de protección y su posible uso como agentes de control biológico de plagas (*Tecia solanivora*) para su uso en cultivos de papa, el cual se ve afectado notablemente por pérdidas y daño del producto. Se realizaron tres ensayos de enfrentamiento con *Tecia solanivora* en estado adulto: el primer ensayo con un inóculo de la cepa C47, el segundo ensayo con un inóculo de la cepa TN152 y el tercero con un co- inóculo de las dos cepas C47 Y TN152 con cuatro réplicas cada uno.

8.5. Inoculación de Rizobacterias productoras de AHLs para determinar su acción biocontroladora con *Tecia solanivora*.

Las rizobacterias productoras de AHLs se administraron en larvas de primer estadio de *T. solanivora* a 1×10^{12} UFC/ml, se realizó el ensayo en este estadio porque es el más susceptible a infección, en el que las cepas bacterianas indujeron a un alto porcentaje de muerte. La selección de rizobacterias productoras de AHLs como patógenas de *T. solanivora* fue exitosa ya que todas las cepas mataron la larva del insecto. Las larvas infectadas se caracterizaron por presentar signos de reducción de movilidad, melanización en la región abdominal y finalmente la muerte. La melanización generalmente se presenta por producción de sustancias tóxicas, lo que causa necrosis en el intestino y daño tisular. Las larvas sanas por lo tanto conservan una morfología intacta con el color blanco característico.

8.6. Extracción de ADN Bacteriano

El método de extracción utilizado fue el de extracción orgánica, se utilizaron muestras de cepas promotoras, las cuales fueron lisadas, para luego desnaturalizar las proteínas mediante una enzima y precipitar con fenol cloroformo. El ADN purificado se recupera con etanol e isopropanol precipitando los ácidos nucleico.

8.7. Extracción de AHLs: Sólido-Líquido

El ensayo se realizó con dos cepas positivas para el biosensor *Chromobacterium violaceum*, cepas C47 y TN152 de las cuales se hace un pre inóculo para extracción sólido- líquido en caldo Nutritivo suplementado con glicerol al 0.15% e incubado a 30°C a 130 rpm. Para la extracción de las AHLs se utilizaron cartuchos Bond Elut Plexa, los cuales se preacondicionaron; un cartucho con el compuesto químico acetonitrilo ACN y el otro con isopropanol IPA. Después se procede a hacer 3 lavados de los cartuchos con Agua Milli-Q para eliminar el resto de los compuestos. Posteriormente se agrega la muestra, se baja presión de equipo y se deja secar 10 minutos. Para finalizar se eluyen con tres lavados de 6 ml de ACN e IPA respectivamente. El extracto se guarda en recipientes ámbar y se almacenan a 20°C.

8.9. Manejo de equipos de laboratorio

Para la realización de los diferentes ensayos en el laboratorio se recibió una inducción para el correcto manejo de los siguientes equipos: cabina de extracción, autoclave, balanza analítica, neveras, espectrofotómetro, pH metro.

8.10 Exposición de Artículos

La exposición de artículos se hizo con el fin de conocer los patógenos de los cultivos de papa (*Tecia solanivora*, *Rhizotocnia solani*), la flora bacteriana presente en intestinos de insectos y ampliar los conocimientos sobre la metodología utilizada en los ensayos.

Actividades adicionales

Durante la pasantía se realizó actividades extra en las que se colaboró con otros ensayos realizados por compañeros del laboratorio, preparación de medios de cultivo, actividades en invernadero (desmonte de cultivo de papa, conteo de estolones y brotes).

8.11 Metodologías empleadas

En cuanto a las metodologías de cada una de las actividades realizadas se describe de forma detallada en los informes adjuntos en producción los cuales se elaboraron según los protocolos disponibles en el laboratorio de Investigación de la universidad Antonio Nariño aplicándolos a las muestras obtenidas en el proyecto.

8.12. Experiencias adquiridas

La pasantía realizada en el laboratorio de Investigación de la Universidad Antonio Nariño, promueve la capacidad investigativa de los estudiantes. El desarrollo de esta práctica amplía la visión del campo laboral de la carrera profesional con un enfoque agroambiental de los proyectos desarrollados en este laboratorio, que en un futuro pueden solucionar las problemáticas ambientales presentes en la actualidad. El uso de fertilizantes e insecticidas no solo representa un riesgo para la salud humana al consumir alimentos que han sido tratados con estos químicos, también afecta notablemente la calidad del suelo, por ello cada uno de los ensayos que se realizaron permite usar microorganismos como agentes de biocontrol y como bacterias promotoras de crecimiento vegetal PGRP siendo una opción para implementar prácticas que benefician tanto a las plantas, el suelo y a las personas que trabajan en la agricultura.

En cuanto al área personal esta experiencia brinda la oportunidad de trabajar en equipo y conocer nuevas personas que aportan tanto a nivel profesional como a nivel personal, compartir con compañeros integrales, demuestran la calidad de profesionales que forman los docentes de nuestra institución.

9. PRODUCCIÓN

9.1 Informe producción de AHLs por biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026

UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO

Laboratorio de Investigación

DOCENTE: Javier Vanegas

Pasante: Ingrid Katherine Arias López

Objetivos:

- ✓ Reactivación de *Cv026*.
- ✓ Caracterización de microorganismos que producen AHLs al ser expuestas al Biosensor *CV026*.

Actividades

- Preparación de medio LB (Luria Bertani).
- Reactivación de *CV026* en caldo nutritivo más Kanamicina.
- Realización de enfrentamiento de *CV026* con las 87 cepas (cepas promotoras, cepas degradadoras, cepas degradadoras más insecticida, cepas de lechuga y cepas entomopatógenas).
- Incubación de las bacterias en placas con medio de cultivo a 30°C
- Observación del crecimiento de los microorganismos a las 24 horas, a las 48 horas.

Materiales

- ✓ Asas bacteriológicas.
- ✓ Cajas de Petri.
- ✓ Cepas bacterianas y *CV026*.
- ✓ Tubos Falcon 50.
- ✓ Medio LB.
- ✓ Caldo nutritivo.

Marco Teórico

***Chromobacterium violaceum* CV026**

Es una proteobacteria Gram negativa encontrada en suelo y agua con características macroscópicas en las que se observa colonias lisas de color violeta, color producido por el pigmento bioactivo violaceina codificada por un

vioperon que se expresa cuando las bacterias tienen la capacidad de hacer *Quorum Sensing* (QS) y relacionado con la regulación y producción de triptófano por tal razón CV026 es utilizado en laboratorios de investigación. La temperatura óptima para su crecimiento es de 30°C a 35°C (1).

Caldo nutritivo

Compuesto	g/l	500 ml
Peptona	0.1	6.0
Cloruro de sodio NaCl	0.5	4.8
Extracto de levadura	0.5	0.6
Agar Agar	1.5	

Aislamientos Bacterianos

Se utilizaron 82 cepas bacterianas (cepas degradadoras más insecticida, cepas entomopatógenas, cepas promotoras, cepas de lechuga, cepas degradadoras) aisladas de la rizosfera del cultivo de papa. Cada una de las cepas se describe en las tablas adjuntas:

Cepas degradadoras más insecticida			
Nº	Cepa	Nº	cepa
1.	11 A3	14.	23 A
2.	11 C3	15.	23 B
3.	12 A2	16.	24 A
4.	13C	17.	26 A
5.	21 A2-1	18.	31 C2
6.	21 A2-2	19.	31 C3
7.	21 A3	20.	32 A2
8.	21B2	21.	33 A
9.	21 B3	22.	32 B2
10.	21C2	23.	41 B2
11.	22 A	24.	41 B3
12.	22 B	25.	44 A
13.	22 B2	26.	42B

Cepas entomopatógenas		Cepas promotoras			
Nº	Cepa	Nº	cepa	Nº	Cepa
1.	C31	1.	2	11.	20
2.	C47	2.	03	12.	29
3.	TN33	3.	4	13.	30
4.	TN106	4.	4 A	14.	38
5.	TN107	5.	5	15.	63
6.	TN151	6.	5 A		
7.	TN152	7.	6		
8.	TN503	8.	7		
9.	TN1034	9.	7 A		
10.	TN1035	10.	10		

Cepas Lechuga				Cepas Degradadoras			
Nº	cepa	Nº	Cepa	Nº	Cepa	Nº	Cepa
1.	30	11.	77 A	1.	2 A2	11.	2 B
2.	59 A	12.	77 B	2.	6 A	12.	2 A
3.	59 B	13.	77 C	3.	4 A	13.	3B
4.	59 C	14.	77 D	4.	1 B2	14.	1 B3
5.	59 D	15.	202 A	5.	1 A3	15.	3 A
6.	70	16.	202 B	6.	1 C2		
7.	76 A			7.	2 B2		
8.	76 B			8.	3 C		
9.	76 C			9.	1 A2		
10.	76 D			10.	1 C3		

Metodología

Para la preparación del medio LB se realiza de acuerdo al protocolo.

- ✓ Se prepararon 300 ml de Agar LB para 15 cajas de Petri.

Compuesto	g/L	300 ml
Peptona	0.1	0.03
Cloruro de sodio NaCl	0.5	0.15
Extracto de levadura	0.5	0.15
Agar Agar	1.5	4.5

- ✓ El medio se autoclava durante 20 minutos a 15 lb de presión. Se sirve en placas de Petri.
- ✓ Los aislamientos se colocan cada uno en eppendorf con 100 ml de caldo nutritivo y 50 uL de las muestras respectivas para un total de 82 cepas (cepas promotoras, cepas degradadoras, cepas degradadoras más insecticida, cepas de lechuga y cepas entomopatógenas). Se dejan en shaker a 30 °C durante 24 horas.

Reactivación del CV026:

- ✓ Se toma un tubo Falcon de 15 ml al cual se adiciona 5 ml de caldo nutritivo más 5 ul de Kanamicina para luego adicionar 200 ul de Cv026 (cepa conservada a -70°C) La reactivación no se dio a las 24 horas por lo que se procedió a reactivar dos muestras más de CV026 en menos -70° C obteniendo resultados de crecimiento a las 48 horas a 29°C a 200 rpm.

El stock de antibiótico (Kanamicina) a adicionar se calculó de la siguiente forma:

$$V1.C1=V2. C2 \quad V1. 50 \text{ ug} = (5\text{ml})*(50\text{ug/ml})=0.005 \text{ ml} = 5\text{ul}$$

Después de que el CV026 creció en caldo nutritivo más kanamicina, se realizó el montaje del ensayo:

- ✓ En placas de Petri con caldo LB se siembra masivamente el CV026 con escobillón estéril sobre toda la caja.
- ✓ Se distribuyen 6 sensidiscos a los cuales se les agrega 5 uL de los aislamientos. Como se muestra en la fotografía y se inócula como control positivo PA0 (*Pseudomonas aeruginosa*).
- ✓ Se deja en incubadora a 30°C y se realiza la lectura a las 24 y 48 horas para observar la producción de Violaceina por parte del biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026.

Resultados

- ✓ De todos los aislamientos a continuación se muestra una tabla de resultados con las cepas que no presentaron pigmento de Violaceina por parte del CV026 ni a las 24 horas como tampoco a las 48 horas.

Grupos de cepas	Cepas
Cepas degradadoras más insecticida	11C3, 21 A2-2, 21 B2, 23 B
Cepas entomopatógenas	-
Cepas promotoras	2,03,4,5,6,7,7 A,10,20,29,30,38,63
Cepas lechuga	59 B,59 C,77 C
Cepas degradadoras	2 A2, 1 B2, 1 A3, 1 C2, 2 B2, 1 C3, 1 B3

- ✓ Todos los demás aislamientos que no se muestran en la tabla son por lo tanto productores de AHLs debido a que el CV026 presenta pigmento de violaceina al ser expuesto a los aislamientos :
- ✓ 22 aislamientos correspondientes a muestras de cepas degradadoras más insecticidas presentaron respuesta frente a CV026 lo que significa que son cepas productoras de AHLs (n- Acil homoserina Lactonas). Los aislamientos 21 C2, 32 A2, 44 A, 42 B presentaron una baja producción de AHLs al ser enfrentadas con el biosensor CV026 ya que se observa una ligera pigmentación de Violaceina y es importante resaltar que las cepas 31 C2 Y las cepas 32 A2 el resultado positivo fue a las 48 horas después de estar expuestas al biosensor CV026.
- ✓ Todas las cepas entomopatógenas presentaron producción de AHLs solo el aislamiento TN151 tiene una baja producción de AHLs (ligera pigmentación de Violaceina)
- ✓ En las cepas promotoras solo 2 cepas son productoras de AHLs y la cepa 4 tiene una baja producción de AHLs. (Ligera pigmentación de Violaceina)
- ✓ En las cepas de lechuga 13 cepas presentan producción de AHLs y los aislamientos 59A, 77A, 77D una baja producción de ellas. (Ligera pigmentación de Violaceina)
- ✓ Finalmente de las cepas degradadoras 8 cepas: 6A, 4A, 3C, 1A2, 2B, 2A, 3B, 3A, tiene baja producción de AHLs por la ligera pigmentación de Violaceina, sin embargo quienes tienen esta característica más pronunciada son las cepas 3C y 2B, las cuales al estar expuestas 48

horas al Biosensor CV026 no presentaron cambio alguno y continuaron estables con la misma característica que fue observada a las 24 horas.

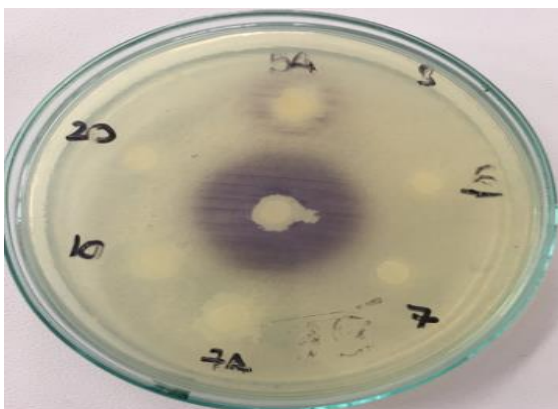


Imagen 1: Control positivo en centro de caja de Petri PAO (*Pseudomonas aeruginosa*). Aislamiento 5 A con ligera pigmentación. Aislamientos 6, 7, 7 A, 10 Y 20 no presentan pigmentación

- ✓ El control positivo PAO (*Pseudomonas aeruginosa*) permite que la prueba sea leída con éxito ya que en el ensayo, su reacción frente al Biosensor CV026 fue altamente eficaz con una producción de violaceína muy marcada.

Conclusiones

- La observación del crecimiento de los microorganismos en el medio LB con el Biosensor CV026 es muy eficaz pero se puede observar que las cepas promotoras son en su mayoría los microorganismos que no producen AHLs (13 aislamientos con resultado negativo) seguidas por las cepas degradadoras (7 aislamientos negativos).
- Las cepas con mayor producción de AHLs son las cepas degradadoras más insecticida, cepas entomopatógenas y las cepas de lechuga presentan una buena producción de AHLs al ser expuestas al biosensor CV026.

Bibliografía

1. Kothari V. et al (2017) Recent research advances on *Chromobacterium violaceum*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine Volume 10, Numero 8, August 2017, Pages 744-752. Disponible en <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1995764517305436?token=2A784C29FE93B45048ABC3AFF669BF07124A378E29700DD2315CEBBDC721A15944D270A4678E90226DC9616F16B3C579>

9.2 .Informe de Caracterización de microorganismos por producción de proteasas

Laboratorio de Investigación

DOCENTE: Javier Vanegas

Pasante: Ingrid Katerine Arias López

Objetivos:

- ✓ Determinar bajo condiciones in vitro la producción de enzimas proteasas por parte de los 82 aislamientos.

Materiales

- ✓ Erlenmeyer
- ✓ Palillos estériles
- ✓ Cajas de Petri
- ✓ Medio Skim Milk

Actividades

- Reactivación de 82 cepas en medio LB (cepas promotoras, cepas degradadoras, cepas degradadoras más insecticida, cepas de lechuga y cepas entomopatógenas)
- Preparación de medio Skim Milk.
- Siembra de cada muestra en el medio Skim Milk.
- Incubación de las bacterias en placas de Petri con medio Skim Milk a 30°C durante 3 días
- Lectura de prueba.

Marco Teórico

Proteasas

Las proteasas son enzimas de origen microbiano con una amplia aplicación industrial y comercial se usan en detergentes, en producción de alimentos, en la industria del cuero, farmacéuticos, lácteos y diagnóstico, por lo que tiene un alto potencial biotecnológico. Estas enzimas están relacionadas con funciones celulares: degradación de sustratos, esporulación, germinación, modificación enzimática entre otras (1) y se clasifican en metaloproteasas, esterasas y serin proteasas (2) Con el hallazgo de enzimas microbianas producidas por bacterias su uso a través de los años ha aumentado por sus propiedades y su estabilidad en temperatura y pH que influyen en la función y han hecho de ellas

las más atractivas en el mercado. (2) Entre las bacterias que presentan producción de proteasas extracelulares se pueden mencionar: *Bacillus subtilis*, *Aeromonas sp.*, *Serratia sp.*, *Enterobacter sp.* y *Pseudomonas sp* (1)

Medio Skim Milk

Es un medio selectivo compuesto por leche que tiene plasmina como principal proteasa formado por el precursor plasminógeno y por la misma plasmina los cuales se unen a la caseína. Este medio determina la actividad enzimática proteolítica de los microorganismos por medio de un halo que indica la hidrólisis de caseína. Útil en la diferenciación de *Clostridium* (2). Las bacterias marinas son productoras de proteasas ejemplo *Pseudomonas* (4)

Preparación Medio Skim Milk

Compuesto	100 ml
Skim Milk	1 gr en 10 ml de H ₂ O destilada Caliente
Agar – agar	1.35 gr en 90 ml de H ₂ O destilada

Cepas bacterianas

Se utilizaron 82 cepas bacterianas relacionadas con el cultivo de papa:

Metodología

1. Se realiza la siembra de reactivación de 82 aislamientos Bacterianos en medio Luria Bertani LB
2. Se prepara el medio Skim Milk según protocolo basado en Suarez y Herrera 2012. Se realiza la conversión de acuerdo a la cantidad a preparar (400 ml)

Composición de medio Skim Milk.

Compuesto	100 ml	400 ml
SKIN MILK	1 gr en 10 ml de H ₂ O destilada Caliente	4 gr en 40 ml de H ₂ O destilada Caliente
Agar – Agar	1.35 gr en 90 ml de H ₂ O destilada	5.4 gr en 360 ml de H ₂ O destilada

Cálculos para 400 ml de Skim Milk

Skim Milk

100 g----- 1000 mL $x = 4$ gr de medio Skin Milk en 40 MI de Agua destilada caliente

X ----- 40 mL

Agar- Agar

15 gr-----1000 mL $x = 5.4$ gr de agar-agar en 360 MI de agua destilada

X ----- 360 mL



Imagen 1: Medio Skim Milk

3. Se disuelven los 4 gr de medio Skim Milk EN 40 MI de Agua destilada caliente en un Erlenmeyer. Se disuelven los 5.4 gr de medio Agar – Agar en 360 ml de Agua destilada en un Erlenmeyer.
4. Se esterilizo cada una de las suspensiones anteriores
5. Se deja enfriar los medios hasta alcanzar una temperatura de 60 ° C Y se mezcla el medio Skim Milk y el Agar- Agar y dejar en agitación hasta observar que la suspensión es homogénea.
6. Se sirve el medio y se siembra con palillo estéril los 82 asilamientos y el control positivo: *Pseudomonas aeruginosa* PA0.
7. Se incuba a 30 ° C durante tres días.

Resultados

Se observa halo transparente producto de la hidrolización de caseína por acción de las proteasas alrededor del crecimiento de las colonias (hidrolisis de caseína) en el medio Skim Milk el cual fue sembrado en placas y evaluado a los tres días obteniendo los siguientes resultados:

A continuación se colocan las cepas que no produjeron proteasas

Grupos de cepas	Numero de cepas
Cepas degradadoras más insecticida	11C3, 21 A2-2, 21 B2, 23 A, 41 B2
Cepas entomopatógenas	C31, TN33, TN151, TN152.
Cepas promotoras	4 A , 5 A.
Cepas lechuga	59C, 76C,76D, 77B,77C,77D, 202A
Cepas degradadoras	1 B2, 1 A3, 1 C2, 1 B3, 1 C3, 1 B3

- ✓ De las cepas degradadoras, 21 cepas producen proteasas y se describen en la tabla .El 80% de las cepas si producen la enzima evidenciándose el halo alrededor de la colonia
- ✓ 6 cepas entomopatógenas, 2 cepas promotoras, 9 cepas de lechuga y 11 cepas degradadoras si producen halo característica de la actividad enzimática

Imágenes de los Resultados.



Imagen 2: Formación de halo hidrolisis de caseína por acción de proteasas cepas 70, 76 A Y 76 B

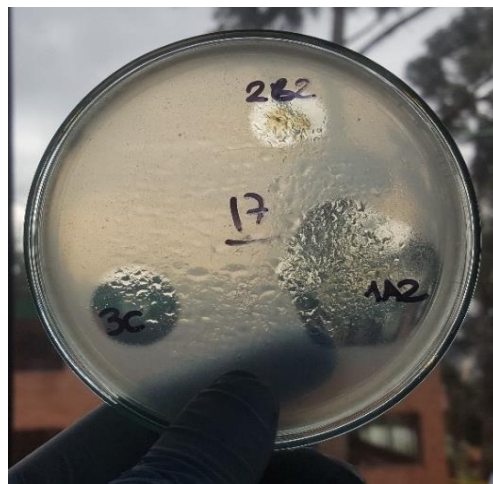


Imagen 3: Formación de halo en tres tamaños Ceba AB2, cepa 3C Y cepa 1 A2

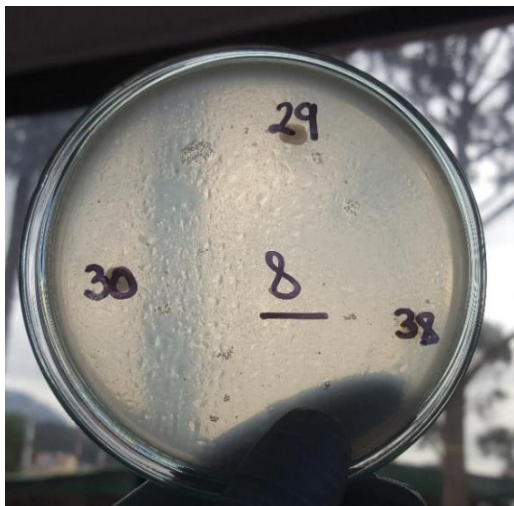


Imagen 4: Aislamientos con resultado negativo no se evidencia producción de halo



Imagen 5: Control positivo: *Pseudomonas aeruginosa* PA0 observación de Halo.

- ✓ El ensayo se realizó dos veces observando los mismos resultados en cada ensayo.
- ✓ El control positivo: *Pseudomonas aeruginosa* PA0 muestra formación de halo por lo que es posible leer la prueba.

Conclusiones

- La actividad proteolítica de las bacterias se determinó por el halo alrededor de las UFC. Las cepas promotoras son las cepas con menor actividad enzimática y las cepas con mayor actividad son las cepas degradadoras más insecticida.

Bibliografía

1. Ferrero MA. Estudios de producción de proteasas en especies del género *Bacillus*. Buenos aires: Biblioteca Digital FCEN-UBA; 1995.
2. Saez Vega AA. Proteasas alcalinas de una cepa nativa de *Bacillus* sp Alcalofílico. Ingeniería y ciencia. 2006 Marzo; 2(3).
3. López Flores A, Luna Urban C, Buenrostro Figueroa J, Hernandez Martinez R, Huerta Ochoa S, Escalona Buendía H, et al. Efecto del pH, temperatura y fuente de proteína y carbohidratos en la producción de proteasas por *Yarrowia lipolytica* en cultivo sólido. Revista mexicana de ingeniería química. 2016 Abril; 15(1).

4. Paredes A, Flores Fernández N, Zavaleta AI. Optimización del medio para la producción de proteasas extracelulares por *Pseudomonas* sp. M211 en fermentación sumergida. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2017 Diciembre ; 83(4): p. 449-462.
5. Liofilchem. Skim Milk. [Online].; 2019 [cited 2019 Mayo 22. Available from: http://www.liofilchem.net/login/pd/ts/610491_TS.pdf.
6. Sánchez , León J, Woolcott , Arauco. Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. *Revista Peruana de Biología*. 2004 Diciembre; 11(2).

9.3. Informe de caracterización de microorganismos fijadores de nitrógeno.

Laboratorio de Investigación

DOCENTE: Javier Vanegas

Pasante: Ingrid Katerine Arias López

Caracterización de Microorganismos fijadores de Nitrógeno

Objetivos:

- ✓ Realización de medio NFB
- ✓ Caracterización de microorganismos con capacidad de fijar nitrógeno

Materiales

- ✓ Cajas de Petri estériles
- ✓ Erlenmeyer
- ✓ Asa curva
- ✓ Agar LB
- ✓ Medio NFB
- ✓ Cepas bacterianas

Actividades

- Reactivación de 82 cepas en medio LB (cepas promotoras, cepas degradadoras, cepas degradadoras más insecticida, cepas de lechuga y cepas entomopatógenas)
- Preparación de medio NFB (Nitrogen free Broth)
- Siembra de cada muestra en el medio NFB.
- Incubación de las bacterias en placas con medio de cultivo NFB a 30°C
- observación del crecimiento de los microorganismos a las 24 horas, a las 48 horas (5 a 7 días).

MARCO TEORICO

Nitrógeno

El nitrógeno es un compuesto que se encuentra en el ambiente en un 70% y hace parte importante de proteínas, aminoácidos, enzimas que participan en muchas rutas metabólicas (1). El nitrógeno en el campo ambiental y agrícola juega un papel importante, al ser un elemento limitante en el crecimiento de la planta debido a que las plantas no tienen facilidad para asimilarlo por si solas

y necesitan la ayuda de bacterias llamadas diazotrofos cuya función es la fijación de nitrógeno realizando a concentraciones bajas del compuesto (amonio, nitrato y nitrógeno orgánico), esta actividad aumenta y mejora la biodisponibilidad de los nutrientes en las plantas y el establecimiento de micorrizas. (2)

Medio Nitrogen Free Broth (NFB)

El medio NFB es un medio selectivo que carece de nitrógeno y permite el crecimiento de microorganismos que toman el nitrógeno atmosférico y por acción de la enzima Nitrogenasa reducen este compuesto y posteriormente lo integran a su metabolismo. La Nitrogenasa es inactivada por el oxígeno por lo que las bacterias para proteger la enzima e impedir la interrupción de su función utilizan mecanismos como la respiración activa, la protección conformacional, los exopolisacáridos, los heterocistos, entre otros. (3)

El medio se caracteriza por su color verde esmeralda y vira a color azul por alcalinización del medio debido a 2 reacciones: la fijación de nitrógeno que genera amoniaco y la conversión de ácido málico a malato (fuente de Carbono) (4) No obstante, el medio también puede cambiar a amarillo por formación de ácidos durante el crecimiento de la bacteria (5)

El pH de este medio generalmente es neutro para que los microorganismos puedan fijar el nitrógeno pero también hay algunos que pueden realizar la fijación a pH ácido (6).

COMPUESTO	g/L
Ácido Málico	5
KOH	4
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.01
CaCl ₂	0.01
NaCl	0.02
Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0.05
NaMoO ₄ . H ₂ O	0.002
MnSO ₄ .7H ₂ O	0.01
Azul de Bromotimol	0.1
Agar	15.0

Se ajusta pH (7.0 y 7.2) con NaOH (1 N) y HCL (1 N) según el caso.

Metodología

1. Se realizó la siembra de reactivación de 82 aislamientos bacterianos en medio Luria Bertani LB el cual contiene peptona, extracto de levadura y Cloruro de Sodio. La peptona y el extracto de levadura contiene aminoácidos y péptidos y se utiliza como fuente de Nitrógeno, el Cloruro de Sodio mantiene la presión osmótica (7).

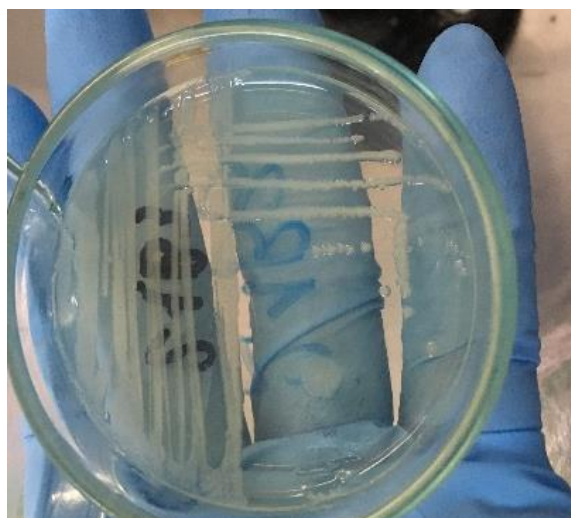


Imagen 1: cepa bacteriana 21B3 en medio LB.

2. Se realiza la preparación del medio NFB según protocolo y se hace la conversión de acuerdo a la cantidad necesaria a preparar (1200 ml).

Composición de medio de cultivo NFB

COMPUESTO	g/L	1200 ml
Acido Málico o Glucosa	5	6
KOH	4	4.8
K ₂ HPO ₄	0.5	0.6
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.01	0.012
CaCl ₂	0.01	0.012
NaCl	0.02	0.024
Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0.05	0.06
NaMoO ₄ . H ₂ O	0.002	0.0024
MnSO ₄ .7H ₂ O	0.01	0.012
Azul de Bromotimol	0.1	0.12
Agar	15.0	18

Se ajusta pH a 7.2 con NaOH a 1 N posteriormente se adiciona los 18 gramos de Agar- Agar y se autoclava durante 20 minutos. Se sirve en placas de Petri.



Imagen 2: medio NFB.

3. Después de 24 horas de incubación a 30°C se toma UFC de cada una de las 82 muestras reactivadas en el medio LB para la siembra por estría

4. se dejó incubar a 30°C y se observó el crecimiento a las 24 horas, 48 horas hasta los 5 días.

RESULTADOS

- ✓ Todos los microorganismos cultivados en el medio NFB presentaron un crecimiento ligeramente homogéneo, con un cambio de color del medio el cual paso de verde esmeralda a azul lo que se podría asimilar como una reacción positiva de las bacterias frente al medio sin embargo ninguna de las muestras presenta las características de gota de rocío.



Imagen 3: Crecimiento de microorganismos en medio NFB al 5 día. Medio viro a color azul indica fijación de N₂ atmosférico

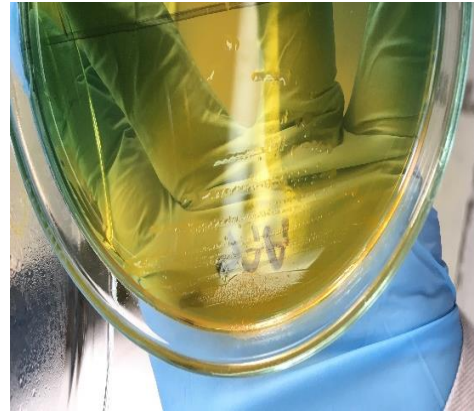


Imagen4: Crecimiento de microorganismos en medio NFB a las 24 horas. Medio viro de color verde a amarillo.



Imagen 5: Crecimiento de microorganismos en medio NFB modificado con glucosa al 5 día. Medio viro a color amarillo indica producción de ácidos durante el crecimiento



Imagen6: Control positivo: *Pseudomonas aeruginosa* PAO
Crecimiento de PAO Y producción de ácidos.

- ✓ El procedimiento se realizó tres veces la primera vez se hizo según indicaciones de protocolo y se repitió con modificación del medio en el cual se sustituyó el ácido málico por glucosa. En este caso el medio presento un mayor crecimiento que en el primer ensayo, pero al término de los 5 días el medio cambio de color verde esmeralda a amarillo lo que indica que los microorganismos producen ácidos durante el crecimiento.

- ✓ El control positivo se realizó con PA0 (*Pseudomonas aeruginosa*) y se evidencio el crecimiento en los ensayos.

CONCLUSIONES

- En el medio NFB se pudo Evidenciar el crecimiento de los microorganismos por lo que todas las cepas bacterianas tienen la capacidad de fijar Nitrógeno atmosférico.
- Se recomienda seguir el orden del protocolo para la adición de los compuestos y dejar disolver muy bien cada uno de ellos.
- Por lo tanto estas bacterias fijadoras de nitrógeno, pueden estimular el crecimiento de las plantas de forma directa, por lo que se podrían utilizar en ensayos de promoción de crecimiento de planta y fertilización de suelos evitando el uso de químicos que degradan la calidad del suelo

Bibliografía.

1. Basurto Cadena , Loa Palacios G, Vázquez Arista M, López Pérez MG. Comunicación química entre comunidades. Acta Universitaria. 2011 Septiembre; 21(4).
2. Moreno Resendez A, Garcia Mendoza , Reyes Carrillo , Vasquez Arroyo J, Cano Rios P. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilizacion para la agricultura sustentable sustentable. Revista Colombiana de Biotecnología. 2018 Junio; XX(1): p. 68-63.
3. Coral F, Bacca T, Díaz L. EFECTO ATRACTIVO DE LOS VOLATILES DE UN TERPENOIDE A INSECTOS ASOCIADOS A COFFEA ARABICA L. (RUBIACEAE). BOLETÍN CIENTÍFICO CENTRO DE MUSEOS MUSEO DE HISTORIA NATURAL. 2012 Septiembre; 16(2).
4. Guillén F, Valero D, Valverde JM, Martinez Es-pla A, Serrano. Interempresas. net POSCOSECHA. [Online].; 2015 [cited 2019 Mayo 20. Available from: HYPERLINK "https://www.interempresas.net/Poscosecha/Articulos/132918-Efecto-aplicacion-salicilato-metilo-poscosecha-calidad-compuestos-bioactivos-cereza.html" .

9.4. Informe de caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato.

Laboratorio de Investigación

DOCENTE: Javier Vanegas

Pasante: Ingrid Katerine Arias López

Objetivos:

- ✓ Realización de medio SRS
- ✓ Caracterización de microorganismos con capacidad de Solubilizar Fosfatos

Actividades:

- Realización de medio SRS
- Reactivación de 82 cepas bacterianas
- Siembra de las cepas bacterianas en medio SRS
- Lectura de resultados

Materiales

- ✓ Cajas de Petri
- ✓ Asas bacteriológicas
- ✓ Medio SRS
- ✓ Cepas bacterianas

Marco Teórico

Medio Sundara Rao y Sinha (SRS)

Es un medio empleado para el crecimiento de microorganismos solubilizadores de fosfato (SRS) (Sundara Rao y Sinha). Este medio se caracteriza por que los microorganismos que crecen en él, poseen una maquinaria enzimática que solubiliza el fosforo presente en el fosfato tricalcico precipitado en el medio, esta reacción se observa por la formación de halos de transparencia o halos de acidificación alrededor de las colonias bacterianas (1) (2) por lo tanto la reacción produce cambios de color en el medio de purpura a amarillo.

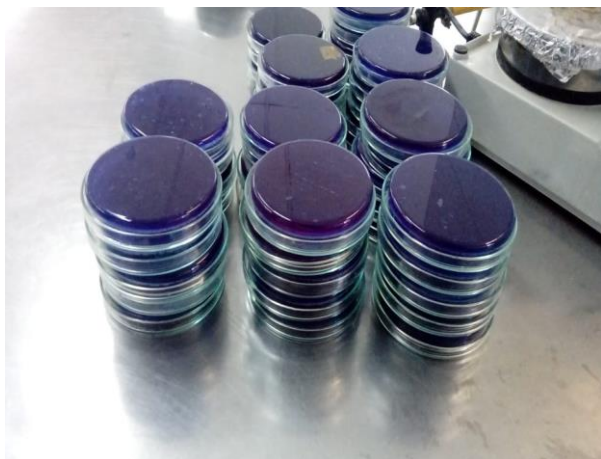


Imagen 1: medio SRS

Composición del medio SRS

Compuesto	g/l	1700 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	0.85
KCl	0.2	0.34
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.3	0.51
MnSO ₄ . H ₂ O	0.004	0.0068
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.002	0.0034
NaCl	0.2	0.34
Extracto de levadura	0.5	0.85
Purpura de Bromocresol	0.1	0.17
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5.0	8.5
Ácido málico	10.0	17
Agar	18.0	30.6

El pH se ajusta si es necesario con una solución de NaOH a 0.1 N o HCl al 0.5 N.

El control positivo: *Pseudomonas aeruginosa* PA0

Metodología

1. Reactivación de 82 cepas en medio LB (cepas promotoras, cepas degradadoras, cepas degradadoras más insecticida, cepas de lechuga y cepas entomopatógenas)
2. Preparación de medio SRS, se realiza los cálculos para preparar 1700 ml y los compuestos se agregan en el orden indicado. El sulfato de Manganeso

monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y el sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) se disuelven en 100 ml de agua destilada y se agregan después del sulfato de Magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) conservado el orden indicado

Compuesto	g/L	1700 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5	0.85
KCl	0.2	0.34
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.3	0.51
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.004	0.0068
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.002	0.0034
NaCl	0.2	0.34
Extracto de levadura	0.5	0.85
Purpura de Bromocresol	0.1	0.17
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5.0	8.5
Glucosa	10.0	17
Agar	18.0	30.6

El medio se ajusta a 7.1 con NaOH 0.5 N

3. Sembrar por estría de agotamiento cada una de las muestras en el medio SRS con punción en el centro de la caja de Petri.
4. Incubar las placas previamente sembradas en medio de cultivo SRS a 30 °C y se dejan entre 3 a 5 días.

Resultados

- ✓ En el medio SRS los microorganismos asimilan tanto el ácido málico como la glucosa como fuente de carbono según la observación en los tres ensayos. El primer ensayo con ácido málico presenta un ligero crecimiento de los microorganismos y en el segundo y tercer ensayo donde se realizó el cambio de ácido málico por glucosa el crecimiento es más homogéneo.
- ✓ La mayoría de las cepas sembradas en el medio producen un cambio de color morado a color amarillo indicando que mientras el microorganismo crece acidifica el medio.
- ✓ El control positivo: *Pseudomonas aeruginosa* PA0 es capaz de solubilizar fosfatos al quinto día de incubación.

- ✓ A continuación se presenta tablas que indican el crecimiento y la producción o no de halo de las cepas expuestas en medio SRS.

De las cepas degradadoras más insecticida 6 cepas presentan halo lo que indica que son cepas con capacidad de solubilizar fosfatos y las cepas bacterianas que crecen en el medio lo acidifican pues el medio se torna de color morado a amarillo.

Nº	Cepas Degradadoras más insecticida	Crecimiento en medio SRS	Producción de ácidos (color amarillo)	Producción de halo
1.	11 A3	SI	SI	NO
2.	11 C3	SI	SI	NO
3.	12 A2	SI	SI	NO
4.	13 C	SI	SI	NO
5.	21 A2-1	SI	SI	NO
6.	21 A2-2	SI	SI	NO
7.	21 A3	SI	SI	SI
8.	21 B2	SI	SI	SI
9.	21 B3	SI	SI	SI
10.	21 C2	SI	SI	NO
11.	22 A	SI	SI	SI
12.	22 B	SI	SI	NO
13.	22 B2	SI	SI	NO
14.	23 A	SI	SI	NO
15.	23 B	SI	SI	NO
16.	24 A	SI	SI	NO
17.	26 A	SI	SI	NO
18.	31 C2	SI	SI	NO
19.	31 C3	SI	SI	NO
20.	32 A2	SI	SI	NO
21.	33 A	SI	SI	SI
22.	32 B2	SI	SI	NO
23.	41 B2	SI	SI	NO
24.	41 B3	SI	SI	SI
25.	44 A	SI	SI	NO
26.	42 B	SI	SI	NO

En las cepas entomopatógenas solo una cepa la TN33 produce un ligero halo indicando solubilización de fosfatos, todas las demás cepas bacterianas crecen y acidifican el medio.

Nº	Cepas Entomopatógenas	Crecimiento en medio SRS	Producción de ácidos (color amarillo)	Producción de halo
1.	C31	SI	SI	NO
2.	C47	SI	SI	NO
3.	TN33	SI	SI	SI (LIGERO)
4.	TN106	SI	SI	NO
5.	TN107	SI	SI	NO
6.	TN151	SI	SI	NO
7.	TN152	SI	SI	NO
8.	TN503	SI	SI	NO
9.	TN1034	SI	SI	NO
10.	TN1035	SI	SI	NO

Ninguna de las cepas promotoras solubilizan fosfatos los microorganismos crecen y acidifican el medio virando el medio a color amarillo.

Nº	Cepas Promotoras	Crecimiento en medio SRS	Producción de ácidos (color amarillo)	Producción de halo
1.	2	SI	SI	NO
2.	03	SI	SI	NO
3.	4	SI	SI	NO
4.	4 A	SI	SI	NO
5.	5	SI	SI	NO
6.	5 A	SI	SI	NO
7.	6	SI	SI	NO
8.	7	SI	SI	NO
9.	7 A	SI	SI	NO
10.	10	SI	SI	NO
11.	20	SI	SI	NO
12.	29	SI	SI	NO
13.	30	SI	SI	NO

14.	38	SI	SI	NO
15.	63	SI	SI	NO

Las cepas de lechuga: cepas 76 A solubiliza fosfatos y las cepas 59B, 59C, 77 D no presentan ninguna reacción por que no crecieron en el medio

Nº	Cepas Lechuga	Crecimiento en medio SRS	Producción de ácidos (color amarillo)	Producción de halo
1.	30	SI	SI	NO
2.	59 A	SI	SI	NO
3.	59 B	NO	NO	NO
4.	59 C	NO	NO	NO
5.	59 D	SI	SI	NO
6.	70	SI	SI	NO
7.	76 A	SI	SI	SI
8.	76 B	SI	SI	NO
9.	76 C	SI	SI	NO
10.	76 D	SI	SI	NO
11.	77 A	SI	SI	NO
12.	77 B	SI	SI	NO
13.	77 C	SI	SI	NO
14.	77 D	NO	NO	NO
15.	202 A	SI	SI	NO
16.	202 B	SI	SI	NO

En cuanto a las cepas degradadoras la cepa 1 A2 presenta un ligero halo y la cepa 1B3 no crece en el medio.

Nº	Cepas Degradadoras	Crecimiento en medio SRS	Producción de ácidos (color amarillo)	Producción de halo
1.	2 A2	SI	SI	NO
2.	6 A	SI	SI	NO
3.	4 A	SI	SI	NO
4.	1 B2	NO	NO	NO
5.	1 A3	SI	SI	NO
6.	1 C2	SI	SI	NO
7.	2 B2	SI	SI	NO
8.	3 C	SI	SI	NO
9.	1 A2	SI	SI	SI (LIGERO)
10.	1 C3	SI	SI	NO
11.	2 B	SI	SI	NO
12.	2 A	SI	SI	NO
13.	3B	SI	SI	NO
14.	1 B3	NO	NO	NO
15.	3 A	SI	SI	NO
16.	2 A2	SI	SI	NO



Imagen2: cepa Bacteriana 1B3 sin crecimiento en agar SRS



Imagen 3: crecimiento de cepa Bacteriana 2 A2 y acidificación en agar SRS



Imagen 4: crecimiento y producción de halo de solubilización de fosfato alrededor de las colonias de la cepa Bacteriana 41B3 y acidificación en agar SRS

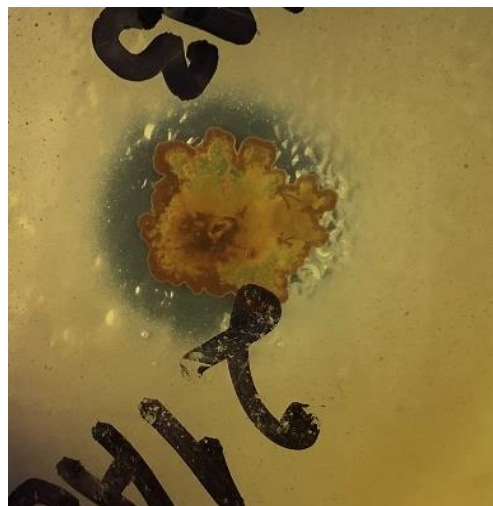


Imagen 5. : crecimiento y halo de solubilización de fosfato de cepa Bacteriana 21 A3

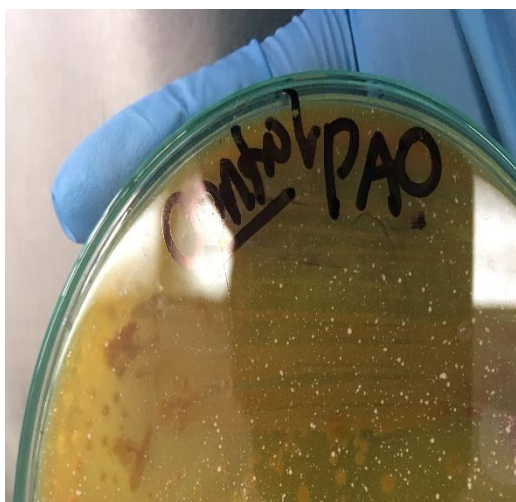


Imagen 6: crecimiento y producción de halo de solubilización de fosfato alrededor de las colonias del control positivo:PA0 en agar SRS



Imagen 7: crecimiento y producción de halo de acidificación alrededor de las colonias de la cepa 1 A2

- Se observa que la mayoría de los microorganismos crecen en este medio, producen ácidos durante su crecimiento virando el medio de color púrpura a amarillo.
- Algunas cepas a los tres días de crecimiento presentan cambios morfológicos originados por una posible producción de metabolitos secundarios.
- De las 82 cepas bacterianas solo 9 cepas solubilizan fosfatos presentando halo alrededor de las colonias y solo 4 cepas no crecieron en medio SRS.
- El ensayo se realizó tres veces en el primer ensayo se realizó la siembra con punciones a lo largo de la estría pero impidió ver la formación de halo por lo tanto el segundo y el tercer ensayo se puncionó en el centro del medio

Bibliografía

1. Bonilla Gomez MA. ESTRATEGIAS ADAPTATIVAS DE PLANTAS DEL PARAMO Y DEL BOSQUE ALTO ANDINO EN LA CORDILLERA ORIENTAL DE COLOMBIA Gomez MAB, editor. Bogota, Colombia: UNIBIBLOS; 2005.

2. Moratto , Martínez J, Valencia , Sánchez. Efecto del uso del suelo sobre hongos solubilizadores de fosfato y bacterias diazotróficas en el páramo de Guerrero (Cundinamarca). Agronomía colombiana. 2005 Noviembre; 23(2).

9.5. Informe de detección de sideróforos

Laboratorio de Investigación

DOCENTE: Javier Vanegas

Pasante: Ingrid Katherine Arias López

Objetivos:

- Determinar la detección de sideróforos en 82 cepas bacterianas

Materiales:

- ✓ Cajas de Petri estériles
- ✓ Asa curva
- ✓ Tubos eppendorf estériles
- ✓ Agar LB
- ✓ Reactivo de CAS
- ✓ Agar – Agar
- ✓ Erlenmeyer

MARCO TEÓRICO

Sideróforos

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular, solubles en soluciones acuosas a pH neutro y su función es quelar el hierro. Son sintetizados por bacterias principalmente bacterias Gram negativas, hongos, levaduras y plantas (1) se clasifican en tres tipos de sideróforos: Catecoles, Hidroxamatos (2) e hidrocarboximatos. El hierro es vital para el crecimiento de las bacterias, cuando ellas necesitan hierro liberan sideróforos al medio, que se unen al hierro de las proteínas transportadoras y forman el complejo (Fe^{3+} -sideróforos), las bacterias internalizan el hierro por los receptores de sideróforos que tienen en su superficie pero además de este mecanismo las bacterias se unen al hierro por otras dos formas: la forma directa, por medio de receptores de unión a proteínas transportadores de hierro y a la hemoglobina y la otra forma es por la liberación de toxinas en concentraciones bajas de hierro que causan la muerte celular liberando el metal que luego es tomado por las bacterias (2)

Metodología

- ✓ Se realiza la Reactivación de las 82 cepas en agar LB se dejan incubar a 30°C durante 24 horas

- ✓ Se prepara Agar LB y se sirve una capa delgada en cada caja de Petri estéril, para luego inocular cada uno de los cepas realizando la siembra en la mitad de la caja (solo se toca el medio y no se hace estría) y se deja incubar durante 48 horas a 30° C.
Se deben también sembrar los controles

Controles

- Control negativo : caja de Petri con solución cas sola
 - Control positivo: *Pseudomonas aeruginosa* PA01
- ✓ Después de las 48 horas de incubación, se procede a realizar la solución CAS suplementada con Agar- Agar al 0.9%. Esta solución se debe preparar el mismo día que se revela la prueba.
 - ✓ Se toma 10 mL de la solución CAS y se adiciona suavemente sobre la colonia que ha crecido en el agar LB, Se deja solidificar y se incuba durante 3 horas a 30°C

Preparación de la solución CAS (1L de agar + CAS)

1. Pesar 0.065 g de Cromo Azul-S (CAS) y disolver en 50 ml de agua Milli-Q
2. Pesar 0.0027 g de cloruro de Hierro FeCl₃ y disolver en 10 ml de ácido Clorhídrico HCl al 37% disuelto en Agua destilada.
3. Pesar 0.073 g de Hexadecyltrimethylammonium Chloride HDTMA y disolver en 40 ml de Agua Milli-Q
4. Mezclar las tres soluciones para obtener 100 ml de Solución CAS (Color purpura).
5. Autoclavar la solución CAS (color azul oscuro).
6. Preparar agar – agar a una concentración de 0.9% y autoclavar.
7. Mezclar la solución CAS con el agar –agar y adicionar la solución CAS al agar- agar evitando la formación de espuma.

Preparación de ácido Clorhídrico (HCL)

8.3 ul de HCl al 37 % y aforar a 10 ml con H₂O destilada.

Preparación de agar – agar

15 de Agar – Agar ----- 1.5% concentración

X -----0.9% concentración

X= 9 g de Agar-Agar para un litro de agua destilada para una concentración de 0.9% de agar – agar

Para la realización de la lectura se toman las cepas que presentan viraje del medio alrededor de la colonia bacteriana

Lectura de prueba

Para la realización de la lectura de la prueba, el resultado positivo será las cepas que presentan viraje del medio alrededor de la colonia bacteriana y será un resultado negativo cuando solo se presente crecimiento de la cepa sin cambio de color

- Catecoles: rosado
- Hidroxamatos: amarillo
- Hidrocarboximatos: naranja

Resultados

Cepas degradadoras más insecticida

De las 26 cepas degradadoras más insecticida 4 cepas presentan crecimiento sobre agar LB pero no presentan cambio de color en el medio alrededor de la colonia después de agregar la reacción de CAS, las 22 cepas restantes si presentan reacción positiva con producción de Hidroxamatos (color amarillo alrededor de la colonia)

Grupos de cepas			Numero de cepas
Cepas degradadoras más insecticida			11C3, 21 B3, 24 A, 32 A2
Cepas entomopatógenas			C47,TN151
Cepas promotoras			2, 5 , 5 A.
Cepas lechuga			30,77C, 202A
Cepas degradadoras			2 A2, 6A



Imagen 1: Resultado negativo: Ceba 77C
crecimiento de la bacteria sobre el agar pero
sin reacción con el reactivo de CAS

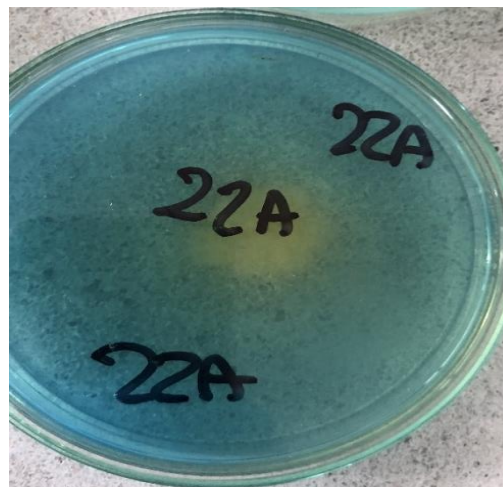


Imagen 2: Resultado positivo: Ceba 22 A
crecimiento de la bacteria sobre el agar con
producción de Hidroxamatos (color
amarillo

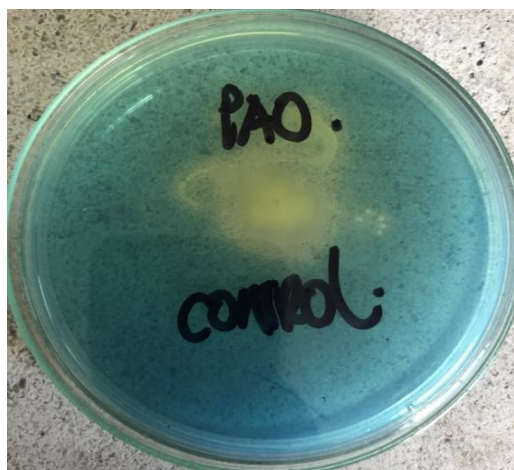


Imagen 3: Control positivo: *Pseudomonas
aeruginosa* PAO
Producción de Hidroxamatos

Conclusiones

La mayoría de cepas en el ensayo presentaron crecimiento y producción de sideróforos clasificados como Hidroxamatos debido a que medio vira a color amarillo alrededor de la colonia.

Las cepas utilizadas en el ensayo producen sideróforos que pueden ser utilizadas en los patógenos de las plantas y en control de hongos, además de promover el crecimiento de las plantas en suelos con menor disponibilidad de hierro lo que mejoraría la calidad del suelo

Bibliografía

1. Aguado Santacruz GA, Moreno Gómez B, Jiménez Francisco B, García Moya E, Preciado Ortiz RE. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. Revista fitotecnica mexicana. 2012 Marzo; 35(1).
2. Cárdenas Perea ME, Cruz y Lopez OR, Gándara Ramírez JL, Pérez Hernández MA. Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. Elementos 94. 2014;; p. 35-43.
3. K. pneumoniae: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. IATREIA. 2010 Junio; 23(2).

Perez- Miranda s: Cabirol nM; Tellez George ; Zamudio – Rivera L.S; fernandez F.J O-CAS a fastand universal method for siderophore detection. Department of Biotechnonology. Universidad Autonoma metropoliotana Iztapalapa. A.P.55-535, Mexico 2007

9.6. Informe de producción de Ácido Cianhídrico (HCN)

Laboratorio de Investigación

DOCENTE: Javier Vanegas

Pasante: Ingrid Katerine Arias López

Objetivo:

Determinar la producción de ácido cianhídrico en 82 cepas bacterias aisladas de cultivo de papa.

Materiales

- ✓ 2 g de Carbonato de sodio (CO_3Na_2)
- ✓ 0,5 g de ácido pícrico ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$)
- ✓ Agua destilada
- ✓ Papel filtro u otro papel absorbente blanco Whatman N°1
- ✓ Frasco de vidrio de boca angosta con tapón preferentemente de goma
- ✓ Agar King B
- ✓ Asas estériles
- ✓ Gradilla
- ✓ Cepas bacterianas
- ✓ Escala Mc Farland 0,5
- ✓ Filtrador
- ✓ Bomba de vacío
- ✓ Incubadora

Actividades

- Reactivación de 66 cepas bacterianas (cepas degradadoras más insecticida, cepas degradadoras, cepas entomopatógenas, cepas degradadoras) en medio LB
- Ajuste de inóculo de las cepas bacterianas
- Elaboración de caldo LB enriquecido con glicina
- preparación de carbonato de sodio (Co_3Na_2) al 2%
- Preparación de la solución pícrica al 0,5%
- Preparación de papel picrosódico
- Montaje del ensayo y lectura de prueba

Marco Teórico

El ácido cianhídrico (HCN) es un compuesto volátil, producido por algunas bacterias, hongos y algas (1). El HCN es un metabolito secundario y su producción está relacionado con precursores de la vía: aminoácidos, glicinas (en exudados de raíz) (2) y metionina, y glucosidos cianógenicos. Las rizobacterias producen HCN el cual beneficia el crecimiento de la planta solo si se encuentra en pequeñas cantidad (3) debido a que también el mecanismo de acción de HCN es la alteración de la respiración radical en plantas (4) y la hipoxia celular o anoxia citotóxica, lleva a la muerte celular. En estudios *in vitro* se ha demostrado su utilidad en la inhibición de fitopatógenos por toxicidad tal es el caso de *Pseudomonas fluorescens* con el hongo *Rhizotocnia solani* el cual está relacionado con la pudrición de la raíz de las plantas. (5) Los sideróforos también está relacionado con el secuestro de metales, la interacción con el hierro, el secuestro de fósforo, actividades que aumenta la disponibilidad de fósforo y hierro y por lo tanto nutrientes tanto para las mismas rizobacterias como para la planta (2)

Metodología

1. Reactivación de las 66 cepas de interés (cepas degradadoras más insecticida, cepas entomopatógenas, cepas promotoras y cepas degradadoras) en medio LB, se incuban a 30° durante 24 horas
2. Se realiza la suspensión bacteriana de cada una de las cepas en agua destilada estéril (5 ml de agua destilada y biomasa)
3. Se ajusta inóculo a 0.02 de absorbancia a 500 nm
4. En un tubo de vidrio se coloca 800 µl de caldo LB enriquecido con glicina y 200 µl de suspensión bacteriana.
5. se utiliza un tapón para cerrar el tubo, en el tapón se sujeta las tiras de papel picosódico de tal manera que el papel no toque las paredes del tubo ni la suspensión se incuban a 30° C por 96 horas (4 días)

Preparación de carbonato de sodio (CO₃Na₂) al 2%

- ✓ Pesar 2g de Carbonato de sodio
- ✓ Diluir los 2g de Carbonato de sodio en 100ml de agua destilada

Carbonato de sodio al 2% = 0,2g de CO₃Na₂ en 100ml de agua destilada

Preparación de la solución pícrica al 0,5%

- ✓ Filtrar el ácido pícrico usando la bomba de vacío

- ✓ Pesar 0,5g de ácido pícrico
- ✓ Diluir 0,5g de ácido pícrico en 100ml de Carbonato de sodio al 2%
- ✓ Depositar en frasco ámbar y almacenar bajo oscuridad

Solución pícrica al 0,5%= 0,5g de ácido en 100 ml de agua destilada

Preparación del papel picrosódico

- ✓ Recortar tiras de papel filtro absorbente blanco Whatman N° de 1 cm de ancho y el largo depende de la altura del frasco a emplear, impregnar las tiras en la solución de ácido pícrico al 0,5 %.
- ✓ Dejar secar en la oscuridad.
- ✓ Guardar en caja de cartón en lugar seco.

Preparación de caldo nutritivo enriquecido con glicina

- ✓ Pesar 0,44g de glicina
- ✓ Diluir los 0,44 g de glicina en 100ml de Caldo nutritivo

6. Se realiza la observación del ensayo cada 24 horas y se procede a realizar la lectura a los 4 días.

Lectura de prueba: Comparar las tiras con la escala colorimétrica de Guignard después del tiempo de incubación. Un color rojo- marrón se considera positivo

Escala colorimétrica de Guignard

Carta de colores para determinación cualitativa de HCN



Contenido aproximado de HCN según la escala de colores

Escala de color	Contenido de HCN (ppm) base húmeda
1	< 10
2	10-15
3	15-25
4	25-40
5	40-60
6	60-85
7	85-115
8	115-150
9	> 150

Imagen tomada de: manual de Procedimientos del laboratorio UAN

Controles de la prueba

Control positivo: CHA0 *Pseudomonas fluorescens*

Control negativo: tubo sin inóculo.

Resultados

De las cepas bacterianas degradadoras más insecticida 4 cepas 11 A3, 11C3, 22 A, 22 B son cepas no productoras de HCN y dos cepas: la 12A2 y la cepa 22B2 producen menos de 10 (ppm) de HCN.

Nº	Cepas degradadoras más insecticida	Escala de color	Contenido de HCN (ppm) base húmeda
1.	11 A3	Negativo	Negativo
2.	11 C3	Negativo	Negativo
3.	12 A2	1	<10
4.	13 C	4	25-40
5.	21 A2-1	4	25-40
6.	21 A2-2	4	25-40
7.	21 A3	5	40-60
8.	21 B2	5	40-60
9.	21 B3	4	25-40
10.	21 C2	3	15-25
11.	22 A	Negativo	Negativo
12.	22 B	Negativo	Negativo
13.	22 B2	1	<10
14.	23 A	2	10-15
15.	23 B	4	25-40
16.	24 A	4	25-40
17.	26 A	5	40-60
18.	31 C2	5	40-60
19.	31 C3	4	25-40
20.	32 A2	5	40-60
21.	33 A	5	40-60
22.	32 B2	4	25-40
23.	41 B2	4	25-40
24.	41 B3	5	40-60
25.	44 A	4	25-40
26.	42 B	2	10-15

Las cepas entomopatógenas son cepas productoras de HCN EL 70 % producen entre el 25-40 (ppm) de HCN Y el 30% producen de 40-60 40 (ppm) de HCN

Nº	Cepas Entomopatógenas	Escala de color	Contenido de HCN (ppm) base húmeda
1.	C31	4	25-40
2.	C47	4	25-40
3.	TN33	4	25-40
4.	TN106	5	40-60
5.	TN107	4	25-40
6.	TN151	5	40-60
7.	TN152	5	40-60
8.	TN503	4	25-40
9.	TN1034	4	25-40
10.	TN1035	4	25-40

En las cepas promotoras el 33% producen HCN de 20-60 ppm y el 66% de las cepas producen entre 25-40 ppm de HCN

Nº	Cepas Promotoras	Escala de color	Contenido de HCN (ppm) base húmeda
1.	2	4	25-40
2.	03	5	40-60
3.	4	4	25-40
4.	4 A	5	40-60
5.	5	4	25-40
6.	5 A	4	25-40
7.	6	4	25-40
8.	7	5	40-60
9.	7 A	5	40-60
10.	10	4	25-40
11.	20	4	25-40
12.	29	4	25-40
13.	30	4	25-40
14.	38	5	40-60
15.	63	4	25-40

El 66% de las cepas degradadoras producen de 25-40 (ppm) de HCN Y el 26% producen de 40-60 (ppm) de HCN

Nº	Cepas degradadoras	Escala de color	Contenido de HCN (ppm) base húmeda
1.	2 A2	5	40-60
2.	6 A	4	25-40
3.	4 A	4	25-40
4.	1 B2	4	25-40
5.	1 A3	4	25-40
6.	1 C2	4	25-40
7.	2 B2	5	40-60
8.	3 C	4	25-40
9.	1 A2	5	40-60
10.	1 C3	5	40-60
11.	2 B	4	25-40
12.	2 A	5	40-60
13.	3B	4	25-40
14.	1 B3	4	25-40
15.	3 A	4	25-40
16.	2 A2	5	40-60



Imagen1: Control negativo: tubo sin inóculo
Papel picrosódico color verde.

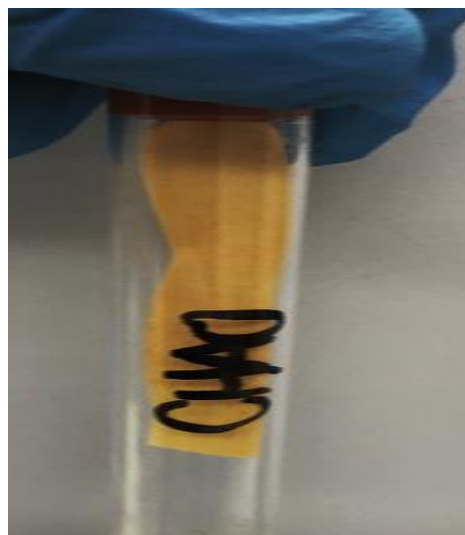


Imagen 2: Control positivo: tubo con inóculo de *Pseudomonas fluorescens* CHAO
Papel picrosódico color naranja.

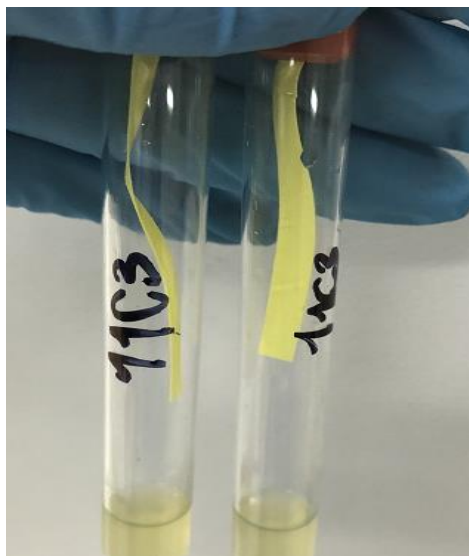


Imagen1: Resultado negativo: tubo inóculo 11C3
Papel picrosódico color verde.

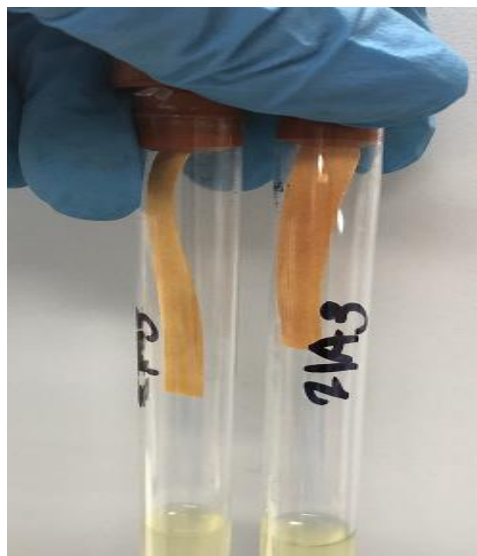


Imagen 4: Resultado positivo: tubo con inóculo de cepa 21 A3
Papel picrosódico color naranja.

Conclusiones

La mayoría de las cepas bacterianas son productoras de HCN solo 4 cepas bacterianas correspondientes a las cepas degradadoras más insecticida son no productoras de HCN. Estos resultados indicarían que las rizobacterias pueden ser útiles para contrarrestar enfermedades en plantas y atacar insectos.

Como las cepas que producen HCN son capaces de producir sideróforos (6) se correlacionaría con el ensayo de detección de sideróforos, por lo que al ser usadas en ensayos ambientales de crecimiento de plantas aumentarían la biodisponibilidad de nutrientes.

Bibliografía

1. Resúmenes de Salud Pública - Cianuro (Cyanide) agencia para sustancias toxicas y Registro de enfermedades. [Online]. [cited 2019 05 30. Available from: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs8.html.
2. Rijavec , Lapanje A. Hydrogen Cyanide in the Rhizosphere: Not Suppressing Plant Pathogens, but Rather Regulating Availability of Phosphate. *Frontiers in Microbiology*. 2016 noviembre; 7.
3. Hernández Montiel LG, Escalona Aguilar MA. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. *REVISTA DE DIVULGACION CIENTIFICA Y TECNOLOGICA DE LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA*. 2003 Enero- abril; 16(1).

4. Pacheco Hernández XJ, Rodríguez Dorantes A, GonzálezRivera , Amora Lazcano E, Guerrero-Zúñiga , Rodríguez Tovar AV. Evaluación del efecto fitotóxico de rizobacterias deletéreas sobre el crecimiento radical de *Axonopus affinis* (Chase) y *Lens esculenta* (Moench). *Polibotánica*. 2015 Agosto;(40): p. 137-152.
5. Laverde Robayo PL. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE *Pseudomonas* spp. CON POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE AGENTES FITOPATÓGENOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE PAPA Bogota; 2016.
6. Conrado Moreno. Asimilación de cianuro por bacterias. "Lo que no mata, engorda". SEBBM. 2014 Julio.

9.7. Informe de producción de Ácido Indolacético (AIA)

Laboratorio de Investigación

DOCENTE: Javier Vanegas

Pasante: Ingrid Katherine Arias López

Objetivo:

Determinar la producción de ácido Indolacético de las 82 cepas bacterianas utilizadas en el proyecto de Papa

Materiales

- Erlenmeyer
- Cajas de Petri
- Medio LB
- Triptófano
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4)
- Cloruro de Hierro ($FeCl_3$)
- Agua destilada estéril
- Balón aforado de 100 ml
- Frasco ámbar 100 ml
- Pipeta de vidrio de 10 ml
- Membrana de nitrocelulosa
- Falcón 50 ml estéril
- Jeringa de 10 ml
- Mezclador de vidrio
- Recipiente de vidrio (100 ml,200ml 500 ml)
- Cepas bacterianas
- Magneto
- Papel filtro estéril
- Pinzas estériles

Actividades

- ✓ Reactivar las 82 cepas bacterianas en medio LB
- ✓ Preparar la solución stock de Triptófano
- ✓ Preparar la solución de Salkowsky
- ✓ Preparar el medio LB enriquecido con triptófano
- ✓ Lectura de la prueba

Marco teórico

Ácido indolacético (AIA)

Es una hormona vegetal conocida como auxina de plantas y es considerada una de las hormonas más importantes por su acción en el control de procesos fisiológicos como la elongación y división celular, diferenciación de tejidos, desarrollo de raíz lateral y dominancia apical, respondiendo a la luz y la gravedad(1). El ácido indolacético no solo es producido por las plantas también por hongos, bacterias y algas. Aproximadamente el 80% de las bacterias producen AIA, por dos vías anabólicas cuyo precursor es el triptófano que se encuentra en el exudado de la raíz de la planta: la vía de Indol-3 piruvato IPA utilizada por bacterias precursoras de crecimiento PGPB que como su nombre lo indica promueven el crecimiento de la planta por producción de fitohormona. La segunda vía es la de Indol- 3 acetamida IAM, utilizada por bacterias Fitopatógenas que causan daños en la planta como tumores vegetales, corona de agallas y causar la muerte de la planta. (1)

Metodología

1. Reactivación de las 82 cepas bacterianas (Cepas degradadoras más insecticida, cepas entomopatógenas, cepas promotoras, cepas lechuga, cepas degradadoras) en medio LB.



Imagen 1: cepa TN106 reactivada en medio LB

2. se prepara 450 ml de LB para posteriormente enriquecerlos con la solución de triptófano (Se adiciona por cada 90 ml de medio LB 10 ml de triptófano)

Preparación de solución stock de triptófano:

0.612 gr de triptófano -----1000 ml de agua destilada estéril

X -----200 ml de agua destilada estéril

$X = 0.612 \text{ g de triptófano} \times 200 \text{ ml de agua destilada estéril} / 100 \text{ ml de agua destilada estéril}$.

$X = 0.1224$ de triptófano en 200 ml de agua estéril.

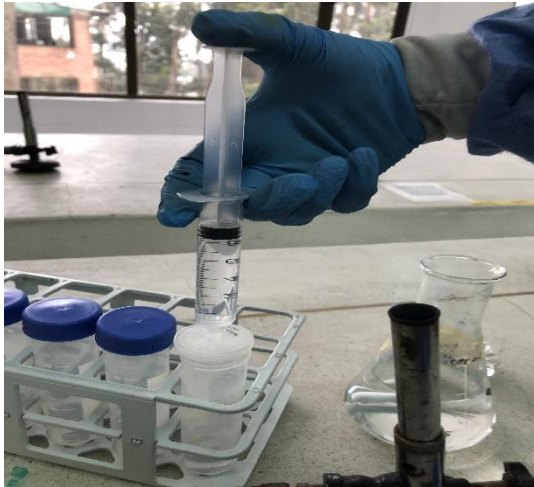


Imagen 2: Preparación de triptófano (membrana de nitrocelulosa)

3. Se realiza la siembra de las 82 cepas bacterianas en medio LB enriquecido con triptófano y se incuba a 30°C durante 48 horas.

4. A las 48 horas de incubación se coloca sobre las colonias papel filtro estéril y se lleva a incubar durante 24 horas

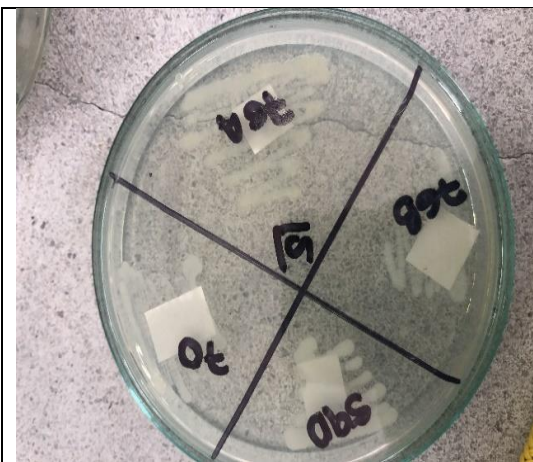


Imagen 3 : caja de Petri con siembra de Cepas de lechuga con papel filtro estéril sobre las colonias



Imagen 4: caja de Petri con si siembra de *Azospirillum sp* con papel filtro estéril.

5. se retira el papel filtro de cada una de las cepas y se agrega 1 gota de reactivo de Salkowsky, se incuba a 30° C durante 24 horas.

Preparación de solución de Salkowsky

12 gr de FeCl₃-----1000ml agua estéril destilada

X-----50 ml de agua estéril destilada

$X = 12 \text{ gr de FeCl}_3 * 50 \text{ ml de agua destilada estéril} / 100 \text{ ml de agua destilada estéril}$

X= 0.6 gr de FeCl₃

Se toma 0.6 gr de FeCl₃ y se adiciono 50 ml de agua destilada estéril. A esta solución se agrega 43 ml de H₂SO₄

6. Después de 24 horas se agrega una gota de solución de Salkowsky y se deja incubar durante tres horas para luego realizar la lectura de la prueba

Lectura de la prueba

Es un método colorimétrico que detecta la presencia de grupos Indol que va desde rosado a fucsia

Color	Característica
Fucsia	++++
Rosado oscuro	+++
Rosado pálido	+++
Rosado	+
Negativo	-

El color expuesto en las tiras representa la cantidad de ácido indolacético producido por las cepas bacterianas: el color fucsia es indicativo de una alta producción de AIA e indica una reacción oxidativa causada por el ácido sulfúrico y una transaminación que lleva a la sustitución del grupo amino por el Cloro de FeCl₃ y el tono rosado es la baja presencia del compuesto en el reactivo de salkowsky entre más poder oxidativo del ácido mayor intensidad de color. (2)

Resultados

En las cepas degradadoras más insecticida solo 6 cepas son productoras de ácido indol acético el resto son cepas no productoras del compuesto.

Nº	Cepas degradadoras más insecticida	Producción de AIA
1.	11 A3	+
2.	11 C3	+
3.	12 A2	-
4.	13 C	-
5.	21 A2-1	+++
6.	21 A2-2	++
7.	21 A3	++
8.	21 B2	-
9.	21 B3	-
10.	21 C2	-
11.	22 A	-
12.	22 B	+
13.	22 B2	-
14.	23 A	-
15.	23 B	-
16.	24 A	-
17.	26 A	-
18.	31 C2	-
19.	31 C3	-
20.	32 A2	-
21.	33 A	-
22.	32 B2	-
23.	41 B2	-
24.	41 B3	-
25.	44 A	-
26.	42 B	-

En las cepas entomopatógenas 4 cepas son productoras de ácido indol acético 6 cepas no producen el compuesto

Nº	Cepas Entomopatógenas	Producción de AIA
1.	C31	++++
2.	C47	++
3.	TN33	-
4.	TN106	-
5.	TN107	-
6.	TN151	+++
7.	TN152	+++
8.	TN503	-
9.	TN1034	-
10.	TN1035	-

Todas las cepas promotoras son productoras de ácido indol acético

Nº	Cepas Promotoras	Producción de AIA
1.	2	++
2.	03	++++
3.	4	++
4.	4 A	+
5.	5	+++
6.	5 A	+++
7.	6	+++
8.	7	+++
9.	7 A	+
10.	10	++
11.	20	++
12.	29	+++
13.	30	+++
14.	38	+++
15.	63	+++

Las cepas de lechuga son en su mayoría productoras de Ácido indol acético 14 cepas de las 16 cepas y 2 cepas que no lo producen.

Nº	Cepas Lechuga	Producción de AIA
1.	30	+
2.	59 A	+++
3.	59 B	++
4.	59 C	++
5.	59 D	+
6.	70	-
7.	76 A	+
8.	76 B	+
9.	76 C	+
10.	76 D	+++
11.	77 A	-
12.	77 B	+++
13.	77 C	++
14.	77 D	+++
15.	202 A	+
16.	202 B	+

Las cepas degradadoras son cepas no productoras de AIA solo la cepa 1C3 es productora de AIA

Nº	Cepas degradadoras	Producción de AIA
1.	2 A2	-
2.	6 A	-
3.	4 A	-
4.	1 B2	-
5.	1 A3	-
6.	1 C2	-
7.	2 B2	-
8.	3 C	-
9.	1 A2	-
10.	1 C3	+
11.	2 B	-
12.	2 A	-
13.	3B	-
14.	1 B3	-
15.	3 A	-

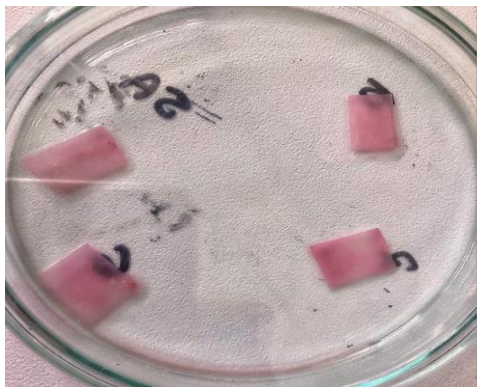


Imagen 1: Cepas 5A, 5, 3, 6 productoras de ácido indol acético (color rosado a fucsia)

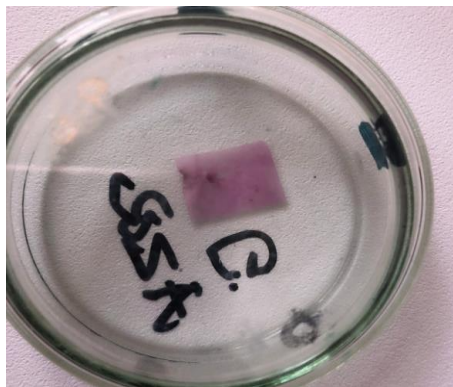


Imagen 2: Control positivo: *Azospirillum* (color rosado a fucsia)

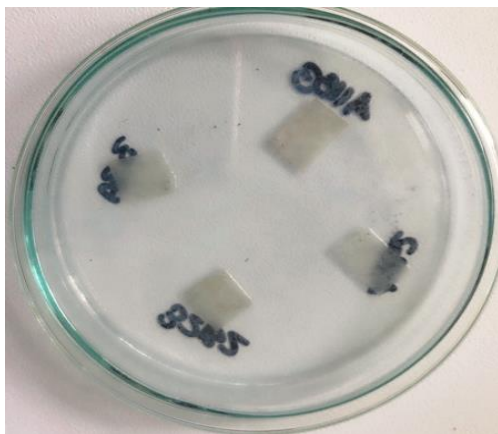


Imagen 3: Resultado negativo: Cepas 41B3, 41B2, 32B2 T 33A no productoras de ácido indol acético (color del papel filtro)

Conclusiones

- En el ensayo se puede observar que todas las cepas promotoras son productoras de ácido indol acético seguidas de las cepas de lechuga que con excepción de una cepa, la cepa 70 no produce el compuesto.
- Las cepas degradadoras y las cepas degradadoras más insecticida son cepas bacterianas que en su mayoría no producen AIA.

Bibliografía

1. Vega Celedón , Canchignia Martínez , González , Seeger. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. Cultivos Tropicales. 2016; 37.
2. Celis Bautista LX, Gallardo IR. ESTNADARIZACIÓN DE METODOS DE DETECCIÓN PARA PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL (ACIDO INDOL ACETICO Y GIBERELINAS) EN CULTIVOS MICROBIANOS Bogota; 2008.

9.8 Resultados de las pruebas realizadas a las 82 cepas bacterianas

RESULTADOS ENSAYOS DE CEPAS DEGRADAORAS MAS INSECTICIDA											
NÚMERO	DEGRAD + INSECTIDA	SRS			NFB		PROTEASAS	SIDERÓFOROS	AHLs	AIA	HCN
		CRECIMIENTO	HALO ÁCIDOS	HALO SOLUBILIZACIÓN	CRECIMIENTO	ÁCIDOS	HALO	HIDROXAMATOS	VIOLACEINA		
1	11A3	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
2	11C3	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
3	12A2	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
4	13C	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
5	21A2-1	+	+	-	+	+	+	+	+	+++	+
6	21A2-2	+	+	-	+	+	-	+	-	++	+
7	21A3	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+
8	21B2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
9	21 B3	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
10	21C2	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
11	22A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
12	22B	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
13	22B2	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
14	23A	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
15	23B	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
16	24A	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
17	26A	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
18	31C2	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
19	31C3	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
20	32A2	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
21	33A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
22	32B2	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
23	41B2	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
24	41B3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
25	44A	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
26	42B	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
PRUEBA QUITINASAS: PENDIENTE LECTURA EN 10 DIAS											

RESULTADOS ENSAYOS CEPAS ENTOMOPATOGENAS											
NÚMERO	CEPAS ENTOMOPATÓGENAS	SRS			NFB		PROTEASAS	SIDERÓFOROS	AHLs	AIA	HCN
		CRECIMIENTO	HALO ÁCIDOS	HALO SOLUBILIZACIÓN	CRECIMIENTO	ÁCIDOS	HALO	HIDROXAMATOS	VIOLACEINA		
1	C31	+	+	-	+	+	-	+	+	++++	+
2	C47	+	+	-	+	+	+	-	+	++	+
3	TN33	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
4	TN106	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
5	TN107	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
6	TN151	+	+	-	+	+	-	-	+	+++	+
7	TN152	+	+	-	+	+	-	+	+	+++	+
8	TN503	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
9	TN1034	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
10	TN1035	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
PRUEBA QUITINASAS: PENDIENTE LECTURA EN 10 DIAS											

RESULTADOS ENSAYOS CEPAS PROMOTORAS											
NÚMERO	CEPAS PROMOTORAS	SRS			NFB		PROTEASAS	SIDERÓFOROS	AHLs	AIA	HCN
		CRECIMIENTO	HALO ÁCIDOS	HALO SOLUBILIZACIÓN	CRECIMIENTO	ÁCIDOS	HALO	HIDROXAMATOS	VIOLACEINA		
1	2	+	+	-	+	+	-	-	-	++	+
2	3	+	+	-	+	+	-	+	-	++++	+
3	4	+	+	-	+	+	-	+	-	++	+
4	4A	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
5	5	+	+	-	+	+	-	-	-	+++	+
6	5A	+	+	-	+	+	+	-	+	+++	+
7	6	+	+	-	+	+	-	+	-	+++	+
8	7	+	+	-	+	+	-	+	-	+++	+
9	7A	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
10	10	+	+	-	+	+	-	+	-	++	+
11	20	+	+	-	+	+	-	+	-	++	+
12	29	+	+	-	+	+	-	+	-	+++	+
13	30	+	+	-	+	+	-	+	-	+++	+
14	38	+	+	-	+	+	-	+	-	+++	+
15	63	+	+	-	+	+	-	+	-	+++	+
PRUEBA QUITINASAS: PENDIENTE LECTURA EN 10 DIAS											

RESULTADOS ENSAYOS CEPAS DE LECHUGA											
NÚMERO	CEPAS LECHUGA	SRS			NFB		PROTEASAS	SIDERÓFOROS	AHLs	AIA	HCN
		CRECIMIENTO	HALO ÁCIDOS	HALO SOLUBILIZACIÓN	CRECIMIENTO	ÁCIDOS	HALO	HIDROXAMATOS	VIOLACEINA		
1	30	+	+	-	+	+	+	-	+	+	
2	59A	+	+	-	+	+	+	+	+	+++	
3	59B	+	+	-	+	+	+	+	-	++	
4	59C	-	-	-	+	+	-	+	-	++	
5	59D	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
6	70	+	+	-	+	+	+	+	+	-	
7	76A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
8	76B	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
9	76C	+	+	-	+	+	-	+	+	+	
10	76D	+	+	-	+	+	-	+	+	+++	
11	77A	+	+	-	+	+	+	+	+	-	
12	77B	+	+	-	+	+	-	+	+	+++	
13	77C	+	+	-	+	+	-	-	-	++	
14	77D	-	-	-	+	+	-	+	+	+++	
15	202A	+	+	-	+	+	-	-	+	+	
16	202B	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
PRUEBA QUITINASAS: PENDIENTE LECTURA EN 10 DIAS											

RESULTADOS ENSAYOS CEPAS DEGRADADORAS											
NÚMERO	CEPAS DEGRADADORAS	SRS			NFB		PROTEASAS	SIDEROFOROS	AHLs	AIA	HCN
		CRECIMIENTO	HALO ÁCIDOS	HALO SOLUBILIZACIÓN	CRECIMIENTO	ACIDOS	HALO	HIDROXAMATOS	VIOLACEINA		
1	2A2	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
2	6A	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
3	4A	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
4	1B2	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
5	1A3	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
6	1C2	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
7	2B2	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
8	3C	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
9	1A2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
10	1C3	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
11	2B2	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
12	2A2	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
13	3B	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
14	1B3	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
15	3A	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
PRUEBA QUITINASAS: PENDIENTE LECTURA EN 10 DIAS											

9.9. Informe ensayo co-inoculación de bacterias productoras de AHLs y su actividad biocontroladora por producción de compuestos volátiles (VOCs)

Laboratorio de Investigación

DOCENTE: Javier Vanegas

Pasante: Ingrid Katherine Arias López

Objetivos:

- Determinar la producción de compuestos volátiles de las cepas C47 y TN152 y el co-inoculo de las dos cepas bacterianas como mecanismo de biocontrol de *Tecia Solanivora*.

Materiales:

- Tubos falcón de 15 ml
- Frascos ámbar
- Erlenmeyer
- Gasa
- Algodón
- Alambre
- Materiales (miel, agua estéril)
- Caldo nutritivo
- Glicerol

Compuestos volátiles VOCs

Los compuestos químicos volátiles orgánicos son producidos por microorganismos y plantas durante el metabolismo, funcionan como mecanismo de protección y comunicación, tienen características de bajo peso molecular, alta presión de vapor y baja solubilidad en agua. Entre los compuestos volátiles se encuentran alcoholes, aldehídos, cetonas, aminas, terpenos, hidrocarburos aromáticos y clorados y compuestos azufrados de bajo peso molecular (1) las cuales actúan como sustancias de señalización entre las bacterias ampliando su actividad a grandes distancias algunos compuestos volátiles actúan contra hongos y otros fitopatógenos por ejemplo el Cianuro de Hidrogeno producido por *Pseudomonas* inhibe la actividad del Hongo oomiceto *Pythium ultimum*. (2)

Las plantas también producen VOCs; el salicilato de metilo que se sintetiza a partir del ácido salicílico es uno de ellos y forma parte del tejido vascular de la planta actúa contra hongos e insectos y se libera en respuesta al estrés. (3) (4)

Procedimiento

1. Se realiza la preparación de 100 ml caldo nutritivo y se esteriliza el medio

$$8.0 \text{ gr} \text{ ----- } 1000 \text{ m L } \mathbf{X} = 8.0 \text{ gr} * 100 \text{ ml} / 1000 \text{ ml} = 0.8 \text{ gr}$$

$$\mathbf{X} \text{ ----- } 100 \text{ m L}$$

2. Se prepara glicerol (50%) a partir de glicerol al 99.5% se ajusta al 50% (100 ml)

$$\mathbf{V1 * C1 = V2 * C2 = X * 99.5\% = 100 \text{ m L} * 50\% \mathbf{X} = 100 \text{ m L} * 50 / 99.5\%}$$

$\mathbf{X} = 50.2 \text{ m L}$ de glicerol y completar 100 m L de agua destilada

Esterilizar y llevar a refrigeración a 4 °C

3. Se esteriliza igualmente los materiales (algodón, frascos ámbar, gasa, tubos de 15 ml).

4. Se coloca los tubos Falcon de 15 ml 6 ml de caldo nutritivo más glicerol y se deja en shaker durante 24 horas a 30°C.

5. Para la realización del ensayo se toman 15 frascos ámbar en los cuales se colocan 3 insectos adultos de Tecia Solanivora y los otros 15 frascos ámbar los cuales se mencionan a continuación en la siguiente tabla:

Ensayos	Muestra
3 frascos control	6000 ul de caldo nutritivo más glicerol al 50%
4 frascos ámbar	Inoculo C47 en caldo nutritivo más glicerol al 50%
4 frascos ámbar	Inoculo TN152 en caldo nutritivo más glicerol al 50%
4 frascos ámbar	Con el co-inoculo C47 y TN152 en caldo nutritivo más glicerol al 50%

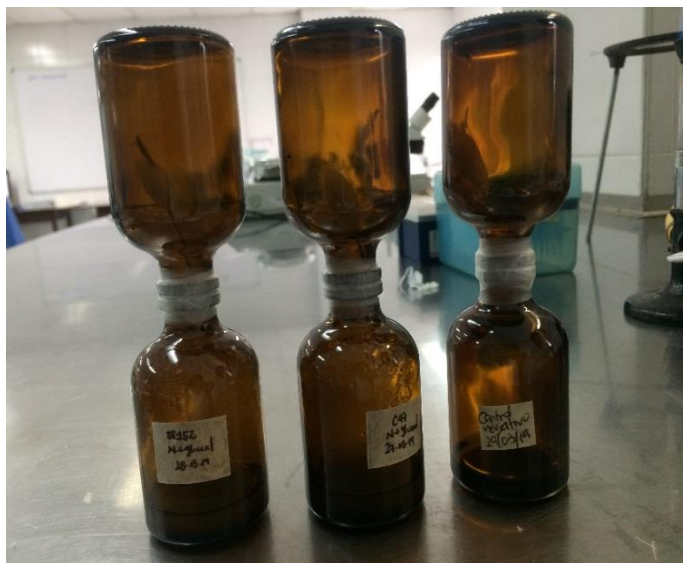


Figura 1. Ensayos con inóculo de C47 Y TN152

6. Los 15 frascos se taparon con una fina capa de gasa y sobre esta gasa se sostuvo un alambre con algodón impregnado con 45 ul de agua destilada y 5 ul de miel como fuente de alimento del insecto. Los dos frascos se unen con papel para film tanto el frasco que contiene los tres adultos de *Tecia solanivora* y el frasco con el inóculo bacteriano y se incuban a 30 °C durante una semana.

Resultados

Durante los tres primeros días del ensayo no se observa mortalidad del insecto, pero después de los 5 días, los insectos presentaron mortalidad observándose solo 1 de cada tres insectos expuestos en los ensayos.

Los controles se encontraban intactos, ningún insecto estaba muerto.

Ensayo inóculo C47	Mortalidad (N° de insectos)					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Total
Frasco 1	0	0	1	0	1	2
Frasco 2	0	0	0	0	1	1
Frasco 3	0	0	1	0	1	2
Frasco 4	0	0	0	0	1	1

En el día 1 y el día 2 no se observa mortalidad. Los frascos 2 y 4 no presentaron mortalidad en el día 3 pero los frascos 1 y 3 si presentan cada

uno un insecto muerto de los tres expuestos. Y el día 5 los frascos 1 y 2 presentaban un insecto muerto cada uno mientras que en el frasco 4 solo tenía un insecto muerto.

Ensayo inoculo TN152	Mortalidad (N° de insectos)					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Total
Frasco 1	0	0	1	0	1	2
Frasco 2	0	0	1	0	1	2
Frasco 3	0	0	1	1	1	3
Frasco 4	0	0	1	0	1	2

Con el siguiente ensayo inoculado con TN 152 durante los dos primeros días, en ningún frasco se observa la mortalidad de insectos, en el día 3 todos los frascos tenían un insecto muerto, en el día 4 solo el frasco 3 tenían un insecto muerto y en el día 5 todos los frascos tenían un insecto muerto en cada uno de ellos.

Ensayo inoculo TN152	Mortalidad (N° de insectos)					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Total
Frasco 1	0	0	1	1	0	2
Frasco 2	0	0	1	1	0	2
Frasco 3	0	0	1	1	0	2
Frasco 4	0	0	1	1	1	3

Durante los dos primeros días se observó igual que en los anteriores ensayos con TN152 Y C47 ninguna muerte de insectos, el día 3 cada uno de los frascos tenía un insecto muerto, el día 4 se observa la muerte de otro insecto en cada frasco y el día 5 en los tres frascos no se observó mortalidad pero el frasco 4 si tenía un insecto muerto.

Conclusiones

En el día 1 y el día 2 no se evidencio mortalidad en ninguno de los ensayos (inoculación con C47, Inoculación con 152, co-inoculación C47 Y 152). La mortalidad se observó al tercer día en cada uno de los ensayos sin embargo la mortalidad de los tres insectos solo se presentó al 5 día con el ensayo del inoculo TN152 en un solo frasco y la co- inoculación con C47 Y TN 152 en un solo frasco.

Se podría concluir de acuerdo a los ensayos realizados que tanto el inóculo de C47, TN152 y el co-inóculo de las dos cepas bacterianas puede inducir a muerte de insectos por VOCs, se sugiere tener en cuenta la variabilidad en la tasa de mortalidad del ensayo e incluir ajustes de los ensayos y realizar nuevamente el montaje del ensayo con adultos que hayan eclosionado el mismo día y tengan los mismos días de vida debido a que su ciclo de vida refiere la muerte a las 2 semanas.

Bibliografía

Basurto Cadena , Loa Palacios G, Vázquez Arista M, López Pérez MG. Comunicación química entre comunidades. Acta Universitaria. 2011 Septiembre; 21(4).

Moreno Resendez A, Garcia Mendoza , Reyes Carrillo , Vasquez Arroyo J, Cano Rios P. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable sustentable. Revista Colombiana de Biotecnología. 2018 Junio; XX(1): p. 68-63.

Coral F, Bacca T, Diaz L. EFECTO ATRACTIVO DE LOS VOLATILES DE UN TERPENOIDA A INSECTOS ASOCIADOS A COFFEA ARABICA L. (RUBIACEAE). BOLETÍN CIENTÍFICO CENTRO DE MUSEOS MUSEO DE HISTORIA NATURAL. 2012 Septiembre; 16(2).

Guillén F, Valero D, Valverde JM, Martínez Es-pla A, Serrano. Interempresas. net POSCOSECHA. [Online].; 2015 [cited 2019 Mayo 20. Available from: HYPERLINK "<https://www.interempresas.net/Poscosecha/Articulos/132918-Efecto-aplicacion-salicilato-metilo-poscosecha-calidad-compuestos-bioactivos-cereza.html>"]

9.10. Informe inoculación de rizobacterias productoras de AHLs para determinar su acción biocontroladora en *Tecia solanivora*

Laboratorio de Investigación

DOCENTE: Javier Vanegas

Pasante: Ingrid Katherine Arias López

Objetivos:

- Determinar la acción biocontroladora de rizobacterias TN 152 y C47 cepas productoras de AHLs en *Tecia solanivora*

Marco teórico

Tecia Solanivora

Tecia solanivora conocida también como gusano guatemalteco pertenece al orden lepidóptera y a la familia *Gelechiidae*. Tiene 4 estadios: huevo, larva, pupa y adulto y afecta cultivos de papa *Solanum tuberosum* atacando ya sea tubérculos cosechados en campo o en almacenamiento. Su ciclo se ve afectado por la temperatura y la humedad y su tiempo de desarrollo de huevo a adulto puede variar de 42 días y de 95 días dependiendo de las condiciones ambientales (1) En ensayos experimentales se han realizado investigaciones sobre esta polilla y se ha infectado con suspensiones a altas concentraciones de patógenos para aumentar la probabilidad de infección, y se ha utilizado el estadio larvario como el estadio más vulnerable para causar infecciones (2)

Metodología

- ✓ Tomar las rizobacterias TN152 Y C47 cepas productoras de AHLs y se prepara un inóculo a una concentración de 1×10^{12} UFC/ml de agua destilada estéril (0.500 Absorbancia a 600 nm)
- ✓ Se tomó 50 µl de cada suspensión para colocarlos sobre las rodajas de papa pastusa (dieta natural contaminada) y se colocaron en cajas de 60X15 mm, las cajas se esterilizaron durante 20 min a 15 lb y se secan en horno a 40°C durante 12 horas.
- ✓ Para este ensayo se colocaron 20 larvas de primer estadio de *Tecia solanivora* recién eclosionadas del huevo, 10 larvas con inóculo de C47 y 10 larvas con inóculo de TN52 en la dieta. las cajas se sellaron para evitar la salida de las larvas.
- ✓ El estadio utilizado es el más susceptible a infección
- ✓ Se observó las larvas a las 24 horas, a las 48 horas y a las 72 horas.

- ✓ A los tres días después de ser infectada la comida de la larva se observó características en la morfología de la larvas, melanización en la región abdominal y parálisis móvil y finalmente la muerte

Resultados

- Las características de infección por parte de las cepas bacterianas TN152 Y C47 por medio de la melanización en la región abdominal y la parálisis son la evidencia que las cepas productoras de AHLs y VOCs pueden producir alteraciones en tejidos e inducir a muerte de la larva de *Tecia Solanivora*.



Imagen 1: Larva de Tecia solanivora



Imagen 2: Larva de Tecia solanivora sana primer día después de eclosionar del huevo en estereoscopio



Imagen 3: Larva de Tecia solanivora después de tres días de realizado el ensayo con dieta contaminada (melanización en región abdominal)

Conclusiones

Se sugieren ensayos futuros para evaluar nuevamente mortalidad en vista de que para este ensayo solo se tomó una pequeña cantidad de larvas debido a que no había suficientes huevos para la realización del ensayo y se debía conservar la cría para futuros ensayos.

Bibliografía

1. Villanueva D, Saldamando CI. *Tecia solanivora*, Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae): una revisión sobre su origen, dispersión y estrategias de control biológico. *Ingeniería y Ciencia*. 2013 July/Dec; 9(18).
2. PROSPECCIÓN DE PATÓGENOS CON POTENCIAL PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA POLILLA GUATEMALTECA DE LA PAPA (*Tecia solanivora*, FAM Gelechiidae) Bogota; 2019.

9.11. Informe determinación del potencial biocontrolador de bacterias entomopatógenas productoras de AHLs en *Rhizotocnia solani*.

Laboratorio de Investigación

DOCENTE: Javier Vanegas

Pasante: Ingrid Katerine Arias López

Objetivo: Determinar la actividad biocontroladora de las cepas bacterianas entomopatógenas C47 Y TN152 en *Rhizotocnia solani*

Materiales:

- ✓ Pinzas estériles
- ✓ Papel filtro estéril
- ✓ Pipetas
- ✓ Erlenmeyer
- ✓ Medio PDA
- ✓ Medio LB
- ✓ Cepas bacterianas

Actividades a realizar

- Preparar agar LB para reactivación de cepas bacterianas y elaborar PDA para reactivación del hongo *Rhizotocnia solani*.
- Autoclavar medios y sembrar las cepas y el hongo.
- Preparar inóculo de las cepas bacterianas para realización de ensayos

Marco Teórico

Rhizotocnia solani

Es un hongo patógeno que afecta las plantas cuya enfermedad recibe el nombre de Rhizotocniasis y costa negra en tubérculos de papa. Afecta el crecimiento de la planta de dos formas la primera ocurre en la estación de crecimiento en la que infecta heridas a tallos, brotes y estolones produciendo canchales y estrangulamientos (1). (2) La segunda fase forma esclerocios en tubérculos, encontrándose también en el resto de materia en descomposición (1). Cuando la planta está colonizada por el hongo se observa necrosis cortical del tejido leñoso, pigmentación púrpura de hojas y formación de tubérculos aéreos entre otras características que cambian la morfología de las plantas, reduce el vigor de las plantas y afecta la calidad de sus frutos. El uso de bacterias como agentes de biocontrol del hongo se ha investigado en el campo agrícola con el fin de evitar pérdidas económicas y de productos como lo es el de la papa por ejemplo el uso de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa* como agente de

control de *Rhizotocnia solani* en ensayos in vitro (3) y el uso de *Pseudomonas fluorescens* para reducir los síntomas de la enfermedad producidos por el hongo en papa (*S. phureja*). (4)

Metodología

1. Realizar la siembra del hongo *Rhizotocnia solani* en agar PDA e incubar a 26°C Durante 72 horas.
2. Reactivar las cepas bacterianas C47 y TN152 en medio LB, incubar a 30°C durante 24 horas.

Para realizar los dos ensayos:

- **Ensayo 1.** Inoculación de las cepas C47 y TN152 y co-inoculación de las mismas después de tres días de crecimiento del Hongo *Rhizotocnia solani*.
- **Ensayo 2.** Inoculación de las cepas C47 y TN152 y co-inoculación de las cepas al mismo tiempo se realiza la siembra del hongo *Rhizotocnia solani*.



Imagen 1: Inoculación de las cepas C47 y TN152 y co-inoculación de las dos cepas a los tres días de crecimiento del hongo *Rhizotocnia solani*.

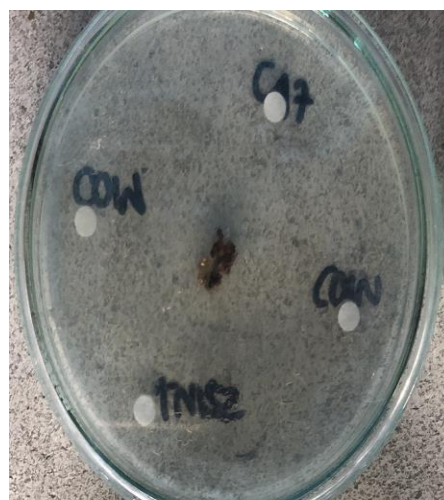


Imagen 2: Inoculación de las cepas C47 y TN152 y co-inoculación de las dos cepas al mismo tiempo con la siembra del hongo *Rhizotocnia solani*.

3. Se realiza dos réplicas de cada uno de los ensayos ajustando inóculo de las cepas bacterianas a 0,5 ul y 0.2 de absorbancia cada cepa y el co-inóculo se ajusta a 0.25 ul de cada cepa a la misma absorbancia 0.02., se incuban a 26°C y se realiza su observación a las 24 horas y durante 72 horas.



Imagen 3: Hongo *Rhizotocnia solani* en Potato Dextrose agar (PDA) después de 14 días de crecimiento.



Imagen 4: Hongo *Rhizotocnia solani* en Potato Dextrose agar (PDA) 1 días de crecimiento.



Imagen 5 :Hongo *Rhizotocnia solani* en Potato Dextrose agar (PDA) después de 3 días de crecimiento

Resultados

A las 24 horas después de la siembra en el primer ensayo se observa el crecimiento de las cepas bacterianas en los sensidiscos donde fueron inoculadas. El crecimiento del hongo es de forma homogénea y no hay inhibición por parte de las cepas bacterianas.



Imagen 6: inóculos bacterianos y el hongo a las 72 horas

En el segundo ensayo se observa crecimiento bacteriano pero el crecimiento del hongo a un no se ha establecido.

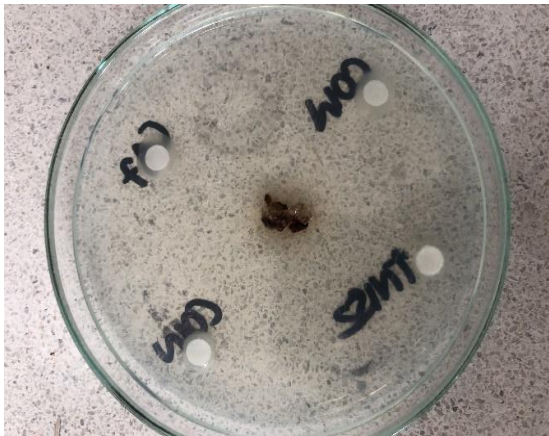


Imagen 7: inóculos bacterianos y el hongo a las 24 horas

A las 72 horas el ensayo 1 se puede observar que las cepas bacterianas no producen inhibición en el crecimiento del Hongo

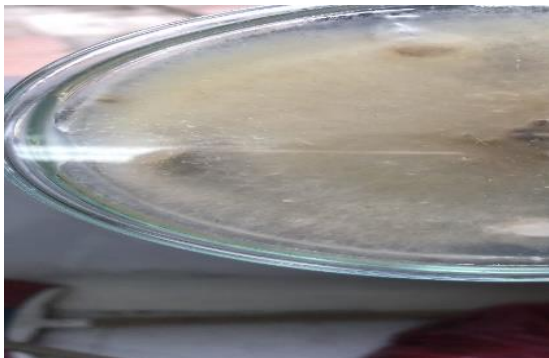


Imagen 7: inóculos bacterianos y el hongo a las 72 horas (Ensayo 1)

EL Ensayo 2 a las 72 horas aún no ha alcanzado el crecimiento suficiente para ver los resultados. A los 7 días el hongo alcanza crecimiento y se observa que no hay inhibición por parte de las cepas C47 Y TN152 sobre *Rhizoctonia solani*.

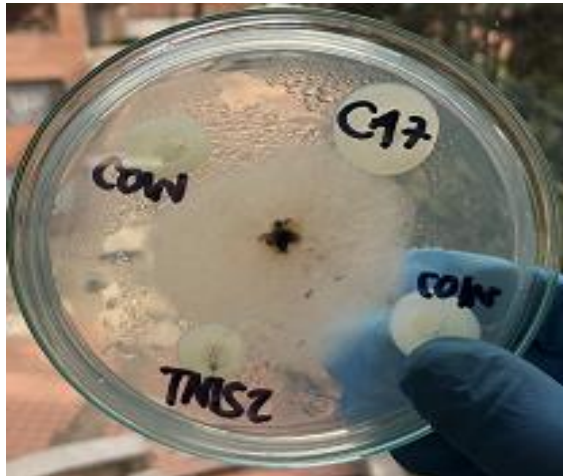


Imagen 8: inóculos bacterianos y el hongo a las 72 horas (Ensayo 2)

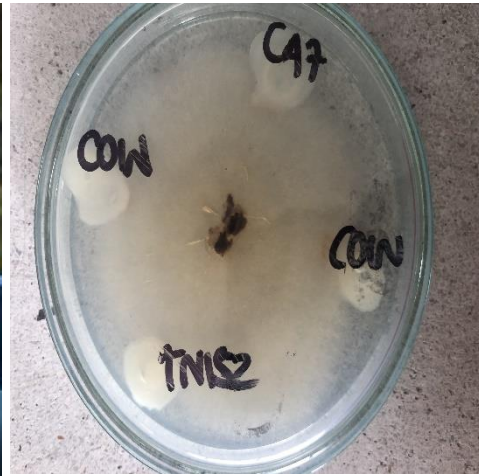


Imagen 8: inóculos bacterianos y el hongo a los 7 días (Ensayo 2)

Conclusiones

- Con respecto a este ensayo se podría decir que la metodología en el ensayo 2 no es la más adecuado ya que si observamos el crecimiento de los co-inóculo de las bacterias crecen lo suficiente y en una hipótesis cuando el hongo crezca las bacterias ya no están en fase exponencial por lo que la actividad puede ser negativa frente al hongo
- Se sugiere sembrar el hongo a los lados de la caja y en el centro sembrar la bacteria de forma vertical para obtener resultados diferentes.

Bibliografía

1. Acuña B. , Araya. Rizoctoniasis de la papa. 20017..
2. Instituto Colombiano Agropecuario ica. linea agricola. [Online].; 2011 [cited 2019 Junio 09. Available from: <https://www.ica.gov.co/getattachment/b2645c33-d4b4-4d9d-84ac-197c55e7d3d0/Manejo-fitosanitario-del-cultiva-de-la-papa-nbsp;--.aspx>.
3. Control de *Rhizoctonia solani* en frijol común con rizobacterias y productos naturales. Revista Centro Agrícola. 2018 Abril- Junio; 45(2): p. 55-60.
4. Bautista G, Mendoza H, Uribe D. BIOCONTROL OF *Rhizoctonia solani* IN NATIVE POTATO (*Solanum phureja*) PLANTS USING NATIVE *Pseudomonas fluorescens*. Acta Biológica Colombiana. 2007 Enero; 12(1): p. 19-32.

9.12. Informe extracción de ADN

Laboratorio de Investigación

DOCENTE: Javier Vanegas

Pasante: Ingrid Katerine Arias López

Objetivos:

- Realizar la extracción de ADN de las 15 cepas promotoras de cultivos de papa.

Marco teórico

La extracción de ADN es una técnica muy importante para la aplicación de pruebas de biología molecular consiste en aislar y purificar moléculas de ADN. Este procedimiento consta de tres etapas: la lisis celular, inactivación de nucleasas celulares y la separación de los ácidos (1)se mezcla con isopropanol o etanol, fenol cloroformo y alcohol isoamilico. El ADN está formado por dos cadenas de nucleótidos que se unen para formar una doble hélice, los nucleótidos están constituidos por un azúcar desoxirribosa, un grupo fosfato y una base nitrogenada y se unen por el grupo fosfato y el azúcar por enlace fosfodiester y las bases se unen por puentes de hidrógeno lo que hace que se mantenga la forma helicoidal (1).

Metodología

Se utilizó el protocolo de extracción de ADN genómico MINIPREP OF BACTERIAL GENOMIC DN (Current protocols in Molecular Biology) disponible en el laboratorio.

- ✓ Se reactivan las 15 cepas promotoras en medio LB durante 24 horas a 30°C.
- ✓ se toma la biomasa suficiente y se coloca a crecer en medio liquido LB durante 24 horas
- ✓ Centrifugar por 5 minutos. Descartar el sobrenadante.
- ✓ Resuspender, para obtener un volumen aproximado de 500ul de pellet, en una solución stock de 567ul de Buffer TE, 3ul de SDS 10% y 3ul de proteinasa K 20mg/ml. Mezclar hasta obtener una solución homogénea, liquida e incubar 1:30 a 37°C.
- ✓ Adicionar 200ul de NaCl 5M. Mezclar muy bien.
- ✓ Adicionar 250ul de solución de Bromuro de cetiltrimetilamonio CTAB/NaCl, (previamente calentar a 65°C aproximadamente). Mezclar de forma constante hasta obtener una solución liquida, incubar 15 minutos a 65°C.

- ✓ Transferir la fase acuosa (arriba) en un tubo estéril, adicionar 0,5 volúmenes de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Mezclar muy bien y centrifugar hasta la separación total de fases.



Imagen: las tres fases despues de centrifugar. La fase acuosa es la capa ubicada en la parte inferior

- ✓ Transferir la fase acuosa (inferior) a un tubo estéril, adicionar 0,6 volúmenes de isopropanol frio (200ul aprox), precipitar con etanol 100%, 0,3 volúmenes del volumen (200ul aprox). Centrifugar por 15 minutos y descartar el sobrenadante y dejar secar el tubo completamente.
- ✓ Resuspender el pellet en 50ul de agua destilada estéril

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

1. TE Buffer: 100ml

10mM Tris HCL pH 8.0 $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$

$$V_1 (1M) = (100ml) (0,01M)$$

$$V_1 = 1ml \text{ Tris } 1M.$$

1mM EDTA pH 8.0 $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$

$$V_1 (0,5M) = (100ml) (0,001M)$$

$$V_1 = 0,2 \text{ ml EDTA pH } 8 \text{ } 0,5M$$

En aproximadamente 50ml de H₂O + 1ml Tris 1M + 0,2 ml EDTA pH 8 0,5M y aforar a 100ml.

2. SDS 10% Solución

SDS 100g → 100 ml H₂O destilada.

Ajustar pH 7,2 con HCl concentrado. Calentar para disolver.