



Producción de fitohormonas con cultivos de *Bacillus subtilis* y *Bacillus velezensis* para una producción sustentable de alimentos.

Departamento de Procesos y Tecnología (DPT)
División de Ciencias Naturales e Ingeniería
Universidad Autónoma Metropolitana - Cuajimalpa

Acuerdo DCNI-09-202-21

26 de septiembre de 2025

Producción de fitohormonas con cultivos de *Bacillus subtilis* y *Bacillus velezensis* para una producción sustentable de alimentos.

Responsable del proyecto: Dr. Roberto Olivares Hernández (DPT)

Participantes del proyecto:

Dr. Gabriel Viguera Ramírez

Dr. Freddy Castillo Alfonso (externo)

Línea de investigación: Ingeniería Metabólica, biología sintética, modelado y simulación de bioprocesos.

Orientación: Investigación básica e investigación aplicada

Fecha de inicio:

Duración: 4 años.

I. PROPUESTA DEL PROYECTO

A. RESUMEN

El uso de bioestimulantes para el crecimiento de plantas ha ganado relevancia para la práctica de la agricultura ecológica y sustentable. Los microorganismos promotores de crecimiento, como los del género *Bacillus*, son de interés ya que son capaces de producir fitohormonas como bioestimulantes vegetales no tóxicos tanto para el suelo y el medio ambiente. Las fitohormonas más conocidas y que han sido reportadas son las auxinas, giberelinas, citoquininas y el ácido abscísico. Aunque existen reportes de que el género *Bacillus* produce diferentes fitohormonas su capacidad de producción no ha sido determinada.

En los últimos años nuestro grupo de trabajo ha evaluado la producción de la auxina ácido indol-3-acético (AIA) tanto en matraz como en biorreactor usando cepas de *B. subtilis*, como fábricas celulares, utilizando glucosa y/o propionato, además de la adición de triptófano como un inductor. A partir de los cultivos se han obtenido extractos que se han aplicado en charolas para cultivar jitomate y lechuga, obteniendo mejores rendimientos en tamaño de raíces, tallos y follaje de las plántulas. Igualmente, estos extractos se han probado en un huerto escolar a fin de incrementar la productividad de diversas hortalizas con resultados satisfactorios cultivando *Bacillus subtilis* con un diseño de un sistema de cultivo económico y de fácil manejo. Por lo anterior, el objetivo de este proyecto es evaluar la capacidad productora de fitohormonas de *B. subtilis* y *B. velezensis* por medio de la evaluación de medios de cultivos y la cuantificación en los sobrenadantes de las fitohormonas producidas. La generación de datos de transcriptómica, proteómica y genómica aportarán conocimiento de la función de estos sistemas biológicos y a la exploración de las rutas metabólicas para producir fitohormonas. Adicionalmente, se plantea llevar a cabo trabajo de impacto social y difusión de un sistema que desarrollamos para cultivo de *Bacillus* para que pudiera ser aplicado en huertos escolares y urbanos.

B. ANTECEDENTES

Una bioestimulante de plantas ayuda a los procesos moleculares y fisiológicos, mejorando el rendimiento y la calidad de las cosechas de cultivos alimentarios, al tiempo que respalda prácticas agrícolas sustentables. Dentro de este conjunto de moléculas se encuentran las fitohormonas, tales como, las auxinas (ácido indol-3-acético (AIA), ácido indolbutírico (AIB)), Giberelinas (GIB), citoquininas (zeatina (Z)), ácido salicílico, ácido jasmónico, etileno y el ácido abscísico (AA). Actualmente la producción de estos bioestimulantes se basa en métodos de extracción en plantas o síntesis química. En la literatura se reporta la producción de fitohormonas con distintas cepas del género *Bacillus*, entre ellas se reportan las cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus velezensis*. Las concentraciones reportadas están en el orden de magnitud de microgramos por mililitro sin usar triptófano como inductor. Actualmente, la fitohormona de mayor interés es el AIA y se ha reportado su producción en *B. subtilis* y *B. velezensis*. El interés por su producción ha llevado a esfuerzos para producirla en cepas modificadas genéticamente, como lo es en *Escherichia coli*.

Actualmente no se tiene bien caracterizadas la capacidad máxima de producción ni la actividad de las vías metabólicas responsables. Por medio del trabajo de transcriptómica, proteómica y modelado de rutas metabólicas se puede caracterizar la actividad a nivel biología de sistemas y de esta manera comprender las regulaciones que impiden la sobreproducción de productos de interés por medio de sistemas biológicos. En los últimos años hemos evaluado la producción de AIA tanto en matraz como en biorreactor usando cepas de *B. subtilis* como fábricas celulares, utilizando como fuente de carbono glucosa y/o propionato, además de la adición de triptófano para inducir la producción de AIA. A partir de los cultivos se han obtenido extractos que se han aplicado en charolas para cultivar jitomate y lechuga, obteniendo mejores rendimientos en tamaño de raíces, tallos y follaje de las plántulas. Como parte de la evaluación de producción de AIA, se han probado los extractos del cultivo de *B. subtilis* en un huerto escolar a fin de incrementar la productividad de diversas hortalizas con resultados satisfactorios. Estos primeros resultados dan pauta para plantearnos los objetivos de este proyecto. El sistema desarrollado para aplicar en el huerto escolar fue construido con materiales accesibles con sistemas de control de código abierto y de bajo costo. Ya que el objetivo final es poder transferir a pequeños agricultores, a través de asesorías y capacitaciones, permitiéndoles tener acceso a bioestimulantes para una producción agroecológica de cultivos alimentarios.

C. OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES

Evaluar y caracterizar la capacidad de producción de fitohormonas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus velezensis*.

Los objetivos particulares son:

1. Realizar cultivos en matraz de *Bacillus subtilis* y de *Bacillus velezensis* para evaluar la producción de fitohormonas utilizando glucosa y propionato como fuentes de carbono y distintas concentraciones de inductores los cuales son triptófano y peptona.
2. Cuantificar por HPLC la producción de fitohormonas (AIA, AAB ácido abscísico, giberelinas) en los sobrenadantes de los cultivos de *Bacillus subtilis* y de *Bacillus velezensis*.
3. Modelado de rutas metabólicas utilizando los modelos metabólicos a escala genómica para encontrar las mejores estrategias de ingeniería metabólica para sobre producir fitohormonas.
4. Escalar las mejores condiciones de cultivo para obtener el bioestimulante bajo condiciones controladas en un biorreactor utilizando las cepas de *B. subtilis* como para *B. velezensis* como biofábricas de fitohormonas.

D. DESCRIPCIÓN

Hipótesis

Es posible determinar las condiciones óptimas de crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Bacillus velezensis* para maximizar su eficiencia como sistemas biológicos en la síntesis de fitohormonas. La aplicación de estas fitohormonas en cultivos alimentarios mejorará significativamente el crecimiento vegetal, la tolerancia al estrés y el rendimiento agrícola, y el conocimiento generado permitirá diseñar un sistema de cultivo económicamente viable y con alto impacto social

Metodología

Experimentos en matraz para evaluar condiciones de cultivo

Se utilizarán las cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus velezensis* proporcionada por el IBT-UNAM, mantenidas en glicerol al 30% v/v y conservadas en ultracongelación a -80°C por el laboratorio de Biotecnología de la UAM-Cuajimalpa. Se realizarán cultivos en matraz bafleado y agitado para determinar los parámetros cinéticos variando las fuentes de carbono (glucosa, propionato) y el tipo de inductor (triptófano, peptonas) usando tres niveles de concentración. Los experimentos se llevarán a cabo en incubadora orbital I26/26R (New Brunswick Scientific) a 37°C y 200 rpm, determinando la cantidad de biomasa por peso seco, el consumo de sustrato y producción de AIA por HPLC. Los experimentos y análisis se realizará por triplicado para aplicar ANOVA simple, los parámetros cinéticos serán determinados por ajuste de Gompertz (Castillo-Alfonso et al., 2022)

Cultivos en biorreactor escala laboratorio

Se realizarán cultivos en biorreactor de tanque agitado escala laboratorio de 3L BioFlo III New Brunswick, equipado con sensores de pH, oxígeno disuelto, CO₂/O₂ Off-gas y sistema de adquisición de datos a través del software Biorec 1.3.0.0/Bioreactor Controller-2016, que permite el control del proceso y el análisis dinámico de las variables. Se determinarán parámetros abióticos de escalamiento, coeficiente de transferencia de oxígeno (KLa), la tasa de transferencia de oxígeno (OTR), número de potencia (NP) y velocidad en la punta del impulsor (N_{Da}). En condiciones bióticas se determinará la tasa de transferencia de oxígeno (OUR) y el coeficiente respiratorio (RQ), para caracterizar el sistema. El volumen de trabajo será de 2 L, temperatura controlada a 30°C, agitación a 500 rpm con impelentes tipo Rushton, aireación estéril a 1VVM. El muestreo será de 2

mL cada hora para determinar biomasa por DO a 600nm, consumo de sustrato y producción del AIA por HPLC. Se determinarán parámetros cinéticos de producción de biomasa, consumo de oxígeno, consumo de sustrato y producción de AIA (Quintana-Menendez et al. 2024).

Análisis para cuantificar el consumo de sustrato por HPLC

El consumo de la fuente de carbono se determina a partir de los sobrenadantes de las muestras obtenidas de los cultivos. La cuantificación se realizará por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) usando columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad), se tienen ajustados los parámetros para detectar el consumo de ambos sustratos glucosa y propionato. Los estándares y muestras son filtrados con membrana de Nylon de 0.2 μm . Se usará un HPLC ProStar (Varian) equipado con detector de Índice de refracción SmarLine (Knauer). La fase móvil es ácido sulfúrico 5mM, ajustada a un flujo de 0.6 mL/min, temperatura de 50°C en el horno. Se utiliza el software ClarityChrom para la adquisición y procesamiento de los cromatogramas (Alfonso-Castillo et al. 2021)

Determinación de AIA y otras fitohormonas

La producción de AIA y otras fitohormonas (ácido abscísico y giberelinas) se determina a partir de los sobrenadantes de las muestras obtenidas de los cultivos. La cuantificación se realizará en HPLC ProStar (Varian) usando columna InertSustain Cyano (Inertsil). Los estándares y muestras son filtrados con membrana de Nylon de 0.2 μm . La fase móvil es 10:90 de metanol y ácido fosfórico al 0.1% (v/v), ajustada a un flujo de 1 mL/min, temperatura de 40°C en el horno, y detección en UV a 210 nm. Se utiliza el software ClarityChrom para la adquisición y procesamiento de los cromatogramas (Kaeothip et al. 2013)

E. FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

Se espera dirigir proyectos de tesis a nivel licenciatura y posgrado, en las áreas de modelado, simulación del metabolismo celular, análisis de datos omicos y cultivos en fermentadores. Los alumnos podrán proceder de la UAM o de otras instituciones de educación superior.

F. IMPACTO ESPERADO DEL PROYECTO

Esta propuesta tiene el objetivo de generar conocimiento básico al evaluar la capacidad a de *Bacillus subtilis* y *Bacillus velezensis* para producir fitohormonas bajo condiciones de cultivo controladas y poder llegar a los rendimientos adecuados para su producción industrial y aplicación en el cultivo alimentario. Adicional a esto, se desea que la generación de este conocimiento impacte en el diseño un nuevo sistema de cultivo de *Bacillus* que sea económico y de fácil manejo para ser utilizado en pequeños productores, huertos urbanos y huertos escolares.

II. RECURSOS NECESARIOS PARA EL PROYECTO

A. FINANCIAMIENTO E INFRAESTRUCTURA FÍSICA Y HUMANA ACTUAL

Financiamiento

Por el momento solo se tiene financiamiento por parte del Departamento de Procesos y Tecnologías.

Infraestructura física actual

Equipo de cómputo:

- Workstation Dell Precisión Tower 7910 CTO (32 GB de memoria RAM, disco duro 2TB, 2 procesadores Intel Xeon con 12 núcleos c/u)
- 10 computadores personales
- Servidor virtual UAM-C

Programas computacionales especializados:

- MATLAB con toolboxes (R2020a)

Equipo experimental

- Biorreactor de tanque agitado escala laboratorio de 3L BioFlo III New Brunswick
- Sensores de pH, oxígeno disuelto, CO₂/O₂ Off-gas y sistema de adquisición de datos a través del software Biorec 1.3.0.0/Bioreactor Controller-2016
- HPLC ProStar (Varian) usando columna InertSustain Cyano (Inertsil)

Infraestructura humana actual

Los dos profesores actualmente cuentan con 2 alumnos de doctorado y dos de licenciatura. Sin embargo, con este proyecto se busca captar más alumnado de Maestría y licenciatura.

B. PRESUPUESTO CALENDARIZADO

Presupuesto	21I	21P	21O	22I	22P	22O	23I	23P	23O	24I	24P	24O
Interno UAM*	\$32,000			\$32,000			\$32,000			\$32,000		

* De los presupuestos individuales asignados a los profesores participantes del DPT, con base en el histórico.

C. FUENTE DE FINANCIAMIENTO EXTERNAS

No se cuenta por el momento con financiamiento externo.

III. CALENDARIO DE ACTIVIDADES EN PERIODOS TRIMESTRALES

Actividades	26I	26P	26O	27I	27P	27O	28I	28P	28O	29I	29P	29O
Realizar cultivos en matraz de <i>Bacillus subtilis</i> utilizando glucosa como fuentes de carbono y distintas concentraciones de triptófano como inductor.	X	X										
Realizar cultivos en matraz de <i>Bacillus velezensis</i> utilizando glucosa como fuentes de carbono y distintas concentraciones de triptófano como inductor.			X	X								
Realizar cultivos en matraz de <i>Bacillus subtilis</i> utilizando propionato como fuentes de carbono y distintas concentraciones de triptófano como inductor.	X	X										
Realizar cultivos en matraz de <i>Bacillus velezensis</i> utilizando propionato como fuentes de carbono y distintas concentraciones de triptófano como inductor.			X	X								
Búsqueda de las rutas metabólicas productoras de fitohormonas en <i>Bacillus subtilis</i> .	X	X										
Cuantificar por HPLC la producción de fitohormonas (AIA, AAB ácido abscísico, giberelinas) en los sobrenadantes de los cultivos de <i>Bacillus subtilis</i> y de <i>Bacillus velezensis</i> .		X		X								
Construcción de modelo metabólico de <i>Bacillus velezensis</i>				X	X	X						
Simulación de escenarios de producción de fitohormonas en <i>Bacillus</i> .							X	X				
Escalar las mejores condiciones de cultivo para obtener el bioestimulante bajo condiciones controladas en un biorreactor utilizando las cepas de <i>B. subtilis</i> como para <i>B. velezensis</i>									X	X	X	
Evaluar los datos cinéticos con los modelos metabólicos										X	X	X

IV. INFORMACIÓN PARA EL SEGUIMIENTO DEL PROYECTO

a. *Calendarización de productos esperados a lo largo del proyecto*

Producto	2026	2027	2028	2029
Publicación de artículos en revistas indizadas internacionales			1	1
Presentación de publicaciones en congresos nacionales	1	2	2	2
Presentación de publicaciones en congresos internacionales			1	1
Dirección de tesis o proyectos terminales de licenciatura	1	1	1	1
Dirección de tesis de maestría		1	1	
Dirección de tesis de doctorado				1

b. *Resultados esperados*

Metas científicas (entregables)

- Publicación artículos en revistas internacionales indexadas.
- Presentación de resultados en congresos nacionales e internacionales.

Metas académicas

- Fortalecimiento de la docencia a nivel licenciatura y posgrado mediante el desarrollo de proyectos aplicados a la práctica sustentable de producción de alimentos.
- Formación de alumnos de licenciatura y posgrado en el área de bioprocesos e Ingeniería metabólica y modelado

Bibliografía

1. Poveda, J., & González-Andrés, F. (2021). Bacillus as a source of phytohormones for use in agriculture. Applied Microbiology and Biotechnology, 1-17.
2. Hamid, B., Zaman, M., Farooq, S., Fatima, S., Sayyed, R. Z., Baba, Z. A., ... & Suriani, N. L. (2021). Bacterial plant biostimulants: a sustainable way towards improving growth, productivity, and health of crops. Sustainability, 13(5), 2856.
3. de Andrade, L. A., Santos, C. H. B., Frezarin, E. T., Sales, L. R., & Rigobelo, E. C. (2023). Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. Microorganisms, 11(4), 1088.
4. Menéndez, A. Q., De la cruz García, D., López, H. V., & Vigueras, J. G. Evaluación de un bioproceso para la producción de ácido indol acético en Bacillus subtilis. Ciencia y Sociedad, 2, 2.
5. Castillo-Alfonso, F., Quintana-Menéndez, A., Vigueras-Ramírez, G., Sales-Cruz, A. M., Rosales-Colunga, L. M., & Olivares-Hernández, R. (2022). Analysis of the propionate metabolism in Bacillus subtilis during 3-indolacetic production. Microorganisms, 10(12), 2352.
6. Alfonso, F. C., Vigueras-Ramírez, G., Rosales-Colunga, L. M., del Monte-Martínez, A., & Hernández, R. O. (2021). Propionate as the preferred carbon source to produce 3-indoleacetic acid in B. subtilis: comparative flux analysis using five carbon sources. Molecular Omics, 17(4), 554-564.

7. Elsoud, M. M. A., Hasan, S. F., & Elhateir, M. M. (2023). Optimization of Indole-3-acetic acid production by *Bacillus velezensis* isolated from *Pyrus* rhizosphere and its effect on plant growth. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 50, 102714.
8. Wu, H., Yang, J., Shen, P., Li, Q., Wu, W., Jiang, X., ... & Qi, F. (2021). High-level production of indole-3-acetic acid in the metabolically engineered *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(6), 1916-1924.2.
9. Balderas-Ruiz, K. A., Bustos, P., Santamaria, R. I., González, V., Cristiano-Fajardo, S. A., Barrera-Ortíz, S., ... & Serrano-Carreón, L. (2020). *Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion. *Ambio Express*, 10, 1-19.
10. Barrera-Ortiz, S., Balderas-Ruiz, K. A., López-Bucio, J. S., López-Bucio, J., Flores, C., Galindo, E., ... & Guevara-García, Á. A. (2023). A *Bacillus velezensis* strain improves growth and root system development in *Arabidopsis thaliana* through cytokinin signaling. *Rhizosphere*, 28, 100815.