

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Metagenómica fúngica y caracterización de hongos filamentosos
con fenotipos de interés agrícola en suelos utilizados para el
monocultivo de *Saccharum officinarum*

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por Aouda
Nicté Sánchez González para optar al grado académico de
Licenciada en Biotecnología molecular

Guatemala,

enero 2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Metagenómica fúngica y caracterización de hongos filamentosos
con fenotipos de interés agrícola en suelos utilizados para el
monocultivo de *Saccharum officinarum*

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por Aouda
Nicté Sánchez González para optar al grado académico de
Licenciada en Biotecnología molecular

Guatemala,

enero 2023

Vo. Bo.:

(f)

PhD. Dalia Lau

Asesora

Tribunal Examinador:

(f)

PhD. Dalia Lau

(f)

Msc. Isabella García

(f)

PhD. Diego Archila

Fecha de aprobación del examen de graduación:

Guatemala, 12 de enero de 2023

PREFACIO

La elaboración de este trabajo de graduación ha sido posible gracias al financiamiento de Ingenio Magdalena, así como al espacio de investigación del Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) de la Universidad del Valle de Guatemala.

Agradezco a mi asesora, la Dra. Dalia Lau por su orientación a lo largo del desarrollo del presente trabajo de investigación. Así mismo, a Msc. Isabella García por sus observaciones tanto para el desarrollo de este trabajo escrito como para el establecimiento de la metodología a seguir y su presencia durante el trabajo de laboratorio correspondiente a biología molecular. A los investigadores y analistas del Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala por su ayuda para el desarrollo de parte de la experimentación y esclarecimiento sobre las técnicas de micología utilizadas. Además, a la Dra. Pamela Pennington que me introdujo al proyecto y a la Dra. Patrizia Lupo por su ayuda en la resolución de dudas en múltiples instancias. Asimismo, a mis padres y familia por su apoyo a lo largo de mi vida académica y en particular el desarrollo de este proyecto.

ÍNDICE

PREFACIO	ii
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo general	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. JUSTIFICACIÓN	3
4. MARCO TEÓRICO	5
4.1. Suelos en Guatemala	5
4.2. Producción de caña de azúcar en Guatemala y el Mundo	7
4.3. Acerca del Ingenio Magdalena	8
4.4. La planta de caña de azúcar	8
4.5. Impacto del monocultivo en la calidad del suelo	9
4.6. Ecología del suelo	10
4.7. Rol de los hongos en el ecosistema del suelo	11
4.8. Bioproductos: Inoculantes microbianos como biofertilizantes y biocontrolados	12
4.9. Taxones de hongos predominantes en suelos de uso agrícola y aplicados como biofertilizantes o biocontroladores.	13
4.10. Secuenciación de ADN	15
4.11. Metagenómica	17
5. METODOLOGÍA	18
5.1. Materiales y métodos	18
5.1.1. Muestreo	18
5.2. Diagrama de flujo	25
6. RESULTADOS	26
6.1. Análisis metagenómico en base a los amplicones ITS1 e ITS2.	26

6.2.	Caracterización de las cepas aisladas _____	33
7.	DISCUSIÓN _____	36
8.	CONCLUSIONES _____	43
9.	RECOMENDACIONES _____	44
10.	BIBLIOGRAFÍA _____	45
11.	ANEXOS _____	52
11.1.	Microbiología _____	52
11.2.	Datos y gráficos sobre el análisis bioinformático _____	53
11.3.	Enlaces a documentos con información suplementaria _____	60

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Géneros de hongos dominantes de acuerdo con las características del ecosistema, en base al cuadro elaborado por Frac y colaboradores (2018). _____	13
Cuadro 2: Secuencias del set de cebadores utilizados. _____	19
Cuadro 3: Pares de cebadores utilizados para las reacciones de PCR. _____	23
Cuadro 4: Concentración y parámetros de pureza del ADN extraído, enviado a Macrogen para secuenciación NGS de las regiones ITS1 e ITS2. _____	26
Cuadro 5: Metadata reportada por Ingenio Magdalena sobre los sitios de muestreo para las muestras de las que se obtuvieron resultados de secuenciación. En la columna área, la B se refiere a un “Área Boscosa” y C a un “Área cultivada”. La columna “Variedad” contiene la variedad de caña de azúcar sembrada en el terreno. _____	27
Cuadro 6: Conteo de lecturas de salida tras cada uno de los pasos del Denoising y clustering de las lecturas obtenidas para la región. Las columnas “Denoised” se refiere al número de secuencias restantes para la muestra tras la eliminación de secuencias redundantes. _____	27
Cuadro 7: Resultados de la siembra en medios diferenciales para la identificación de actividades de interés _____	33
Cuadro 8: Concentración y A260/280 del ADN extraído para el PCR para identificación de <i>F. oxysporum</i> y <i>F.oxysporum</i> raza 4. _____	34
Cuadro 9: Valores de métricas de diversidad alfa para muestras ITS1 e ITS2 _____	57
Cuadro 10: Distancia Bray-Curtis ITS1 _____	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Comparación del mapa de capacidad de uso de la tierra según el INAB y uso de la tierra en 2010.	6
Figura 2: Etapas de desarrollo de la caña de azúcar según Aguilar (2015).	9
Figura 3: Vista rápida a los tipos de comunidades microbianas del suelo y sus interacciones moleculares.	11
Figura 4: Marco para la aplicación exitosa de inoculantes microbianos en la agricultura propuesta por Saad, Eida y Hirt (2020).	13
Figura 5: Representación de la amplificación PCR en puente utilizado para la secuenciación con Illumina.	16
Figura 6: Ubicación de los puntos de muestreo en Guatemala, en base a datos de georreferenciación.	18
Figura 7: Ejemplo de cámara húmeda.	21
Figura 8: Ejemplo de resultados positivos en cada uno de los agares diferenciales utilizados.	22
Figura 9: Abundancia relativa de los 10 filos más comunes por muestra de acuerdo con la secuenciación de ITS2, agrupadas de acuerdo con el tipo de muestra.	28
Figura 10: Abundancia relativa de los 19 géneros más comunes para ambos amplicones por muestra, agrupadas por tipo de muestra.	29
Figura 11: Métricas de diversidad alfa para las muestras evaluadas según el uso del área. Número de ASVs, índice Chao1, índice de Gini-Simpson e índice de Shannon.	31
Figura 12: Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de las distancias de Bray-Curtis entre las muestras analizadas para ITS1 e ITS2.	32
Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de PCR para identificar <i>F. oxysporum</i> y <i>F. oxysporum</i> raza 4.	35
Figura 14: Diluciones seriadas (10^{-2} a 10^{-4}) de las muestras de suelo utilizadas para el aislamiento de las cepas de hongos filamentosos de interés	52
Figura 15: Ejemplo de gráfico de calidad obtenido para cada una de las lecturas forward de la secuenciación de las muestras.	53
Figura 16: Porcentaje de Q20 y Q30 entre las bases de las lecturas de cada muestra proveídas por Macrogen tras la secuenciación en el sistema MiSeq en la plataforma Illumina.	54
Figura 17: Modelos de error.	55
Figura 18: Gráficos de rarefacción	56
Figura 19: PCoA de las distancias de Bray-Curtis obtenidas agrupadas por región de la cual provino la muestra.	59

RESUMEN

La planta de caña es ampliamente producida a nivel mundial y en Guatemala es el tercer producto de exportación más importante. Actualmente, su producción depende grandemente en el monocultivo y aplicación de fertilizantes químicos, prácticas con consecuencias negativas en el medio ambiente y la calidad del suelo. Como contrapropuesta, en la presente investigación se realizó una búsqueda de cepas de hongos nativas del suelo con potencial de biofertilizantes y biocontroladores, así como un análisis metagenómico de las muestras de suelo provenientes de locaciones de alta productividad (AP), baja productividad (BP), áreas boscosas (AB), con alto contenido de materia orgánica (MO) y de caña con áreas anegadas (CA) en fincas del Ingenio Magdalena, con secuenciación de las regiones ITS1 e ITS2. A nivel microbiológico, se realizó aislamiento de cepas de hongos filamentosos a partir de las mismas muestras y se realizaron ensayos en agares diferenciales para identificar los productores de proteasas, gluconansas, lipasas y quitinasas, así como los solubilizadores de fósforo y potasio. Las cepas obtenidas fueron preservadas. Se obtuvo que el filo *Ascomycota* era el dominante entre las muestras, así como que las muestras provenientes de las áreas boscosas evidenciaron una mayor diversidad que aquellas provenientes de las áreas cultivadas. Se aislaron 45 cepas, entre las cuales se considera de especial interés a las cepas: 1AP31, 4AP14, 4MO12, 4MO13, 5MO16, 5MO17, 1AB21 y 1CA10 por la cantidad de actividades presentadas (5 o 6). Para la eventual aplicación de las cepas encontradas como biocontroladores o biofertilizantes, prosigue realizar ensayos cuantitativos e identificación molecular de las cepas.

ABSTRACT

Sugarcane plant is widely produced worldwide. It is the third most exported product in Guatemala. Currently, its production depends largely on monocropping and the use of chemical fertilizers, both of which have negative consequences for the environment and soil quality. The aim of this investigation was to find native soil fungal strains with biofertilizer and biocontrol potential. A metagenomic analysis of soil samples from locations of high productivity (AP), low productivity (BP), forest areas (AB), with high organic matter content (MO) and sugar cane with flooded areas (CA) was performed with soil samples of farms of the Magdalena Sugar Mill, using the ITS1 and ITS2 regions as barcodes. Strains of filamentous fungi were isolated from the same samples and tests were carried out in differential agars to identify the producers of proteases, gluconases, lipases and chitinases, as well as phosphorus and potassium solubilizers. The strains obtained were preserved. It was found that the *Ascomycota* phylum was the dominant among all the samples. The samples from forest areas showed a greater diversity than those from cultivated areas. During the investigation 45 strains were isolated, among which the strains 1AP31, 4AP14, 4MO12, 4MO13, 5MO16, 5MO17, 1AB21 and 1CA10 are considered of special interest due to the number of enzyme and solubilization activities presented (5 or 6). For the eventual application of the strains found as biocontrollers or biofertilizers, quantitative tests and molecular identification of the strains are the next steps.

1. INTRODUCCIÓN

En Guatemala, la caña de azúcar ha sido cultivada de manera exhaustiva desde el siglo XVI (Aguilar, 2015). La producción a gran escala de este cultivo en el país ha sido posible, en parte, gracias a la práctica del monocultivo y el uso de fertilizantes químicos y plaguicidas. Sin embargo, esta no es una práctica sostenible a largo plazo, debido a su impacto en la diversidad de los ecosistemas, estado de los cuerpos de agua circundantes y la calidad del suelo, resultando en la reducción de la productividad de la tierra (Killebrew & Wolff, 2010). Por esta razón, a lo largo de este siglo ha surgido interés en el uso de biofertilizantes y biocontroladores como alternativa. El presente estudio es de carácter exploratorio y tiene como finalidad determinar la diversidad fúngica de los suelos utilizados para el monocultivo de caña de azúcar, *Saccharum officinarum*, y de uso agrícola mediante un análisis de microbioma por barcoding ITS1 e ITS2, así como crear un cepario con los hongos filamentosos aislables provenientes de las mismas muestras que presenten actividades de interés agrícola para el futuro desarrollo de biofertilizantes.

Para el análisis de microbioma se utilizaron datos provenientes de secuenciación de siguiente generación en la plataforma *Illumina* de las regiones ITS1 e ITS2. El análisis se realizó en el software R con el paquete *dada2*. El aislamiento de las cepas se realizó a partir de la siembra de diluciones seriadas de suelo, seguido por su purificación, caracterización macroscópica y microscópica y la elaboración de soluciones de esporas. La solución de esporas fue utilizada para la inoculación de los agares diferenciales y en el sistema de preservación. Las actividades de interés evaluadas fueron: solubilización de fósforo y potasio, así como la producción de proteasas, gluconasas, lipasas, proteasas y quitinasas.

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo general*

Determinar la diversidad fúngica de suelos utilizados para el monocultivo de caña de azúcar, *Saccharum officinarum*, y de uso no agrícola mediante un análisis metagenómico y conservar los hongos filamentosos nativos con propiedades fenotípicas de interés para el futuro desarrollo de biofertilizantes o biocontroladores.

2.2. *Objetivos específicos*

- Analizar a nivel metagenómico la composición poblacional y la diversidad de hongos en muestras de suelo utilizado para el monocultivo de *S. officinarum* y suelo no agrícola, utilizando datos obtenidos mediante secuenciación de siguiente generación (NGS) para la región preservada ITS.
- Cultivar y aislar hongos filamentosos presentes en las muestras de suelo analizadas y caracterizar potenciales actividades de interés agrícola, mediante siembra en medios de cultivo diferenciales.
- Conservar las cepas con fenotipos de interés obteniendo un cepario.

3. JUSTIFICACIÓN

La metagenómica fúngica y caracterización de hongos filamentosos con fenotipos de interés agrícola en suelos utilizados para el monocultivo de *S. officinarum*, caña de azúcar, es de interés científico pues el 86% del azúcar a nivel mundial proviene de la caña (FAO, 2019). Este producto es de gran importancia para la economía guatemalteca, ya que representa el 6.5% de las exportaciones del país, colocando a Guatemala como el tercer mayor exportador de América Latina, empleando a aproximadamente 54,000 personas (ASAZGUA, 2020).

Debido a la escala de la producción, las prácticas utilizadas en el cultivo de la caña tienen impacto en el suelo y cuerpos de agua guatemaltecos. Gran parte del azúcar del país es producida en monocultivos. El monocultivo es una práctica de agricultura industrial intensiva en la que la misma variedad de un cultivo es cosechada en una porción de tierra todos los años, usualmente en grandes extensiones. Como consecuencia, se agotan los nutrientes, hay una pérdida significativa de materia orgánica y se erosiona el terreno (GRACE Communications Foundation, 2021). Adicionalmente, esta práctica tiene un impacto negativo en la diversidad de la microbiota del suelo, haciendo a los cultivos más propensos a las plagas (Wetzel y colaboradores, 2016).

Para mitigar los efectos mencionados, los agricultores optan por intensificar el uso de agroquímicos, ya sea fertilizantes o bien pesticidas. Esta estrategia afecta negativamente el medio ambiente y no logra prevenir la pérdida en productividad del suelo a largo plazo (Killebrew & Wolff, 2010). A esto se suma, que el costo de los productos químicos agrícolas ha sufrido un alza constante desde inicios de siglo, agravándose tras la pandemia de COVID-19, de manera que el índice de precios del productor (PPI) para esta industria alcanzó el 196.653 en noviembre de 2022, mientras que en febrero de 2020 tenía un valor de 126.800 respecto a junio de 2003 en los Estados Unidos (U.S Bureau of Labor Statistics, 2022), lo cual impacta los costos de producción agrícola.

Los organismos del reino fungi que habitan en el suelo cumplen un rol crucial en el desarrollo de los ciclos biogeoquímicos gracias a la diversidad de enzimas presentes en sus rutas metabólicas (Gadd, 2018). Pueden ejercer funciones como reguladores del ecosistema, controles biológicos y descomponedores (Frac y colaboradores, 2018). Es importante destacar su capacidad de secuestrar nutrientes para provecho de los organismos vegetales, formando incluso relaciones mutualistas mediante micorrizas (Ritz, 2005). Debido a estas relaciones benéficas, se han formulado numerosos productos con inóculos de taxones fúngicos que son utilizados como biofertilizantes o biocontroladores, para potenciar la disponibilidad de nutrientes y reducir el uso de agroquímicos (Mendes dos Santos, Escobar, Bentes, & Cid, 2020).

El uso exitoso de inóculos microbianos, sean fúngicos o bacterianos, está ligado a la comprensión fisicoquímica y biológica de las características del campo. Entre ellas, se encuentra la diversidad de los microorganismos presentes y la estructura de las comunidades microbianas presentes (Figuereido & Lopes, 2021). Si bien, en el pasado se utilizaba la microbiología clásica para obtener una idea del perfil de microorganismos presentes en una muestra ambiental, en la actualidad se cuenta con la tecnología de secuenciación necesaria para obtener este perfil con una estrategia “metagenómica”, que integra técnicas de biología molecular y bioinformática. Lo anterior, permite un análisis más eficiente en términos de tiempo y más completo, ya que una fracción importante de los microorganismos en muestras ambientales no son aislables en el laboratorio (Suman, y otros, 2022).

En Guatemala actualmente ya se aplican algunos hongos como biocontroladores, específicamente *Metarhizium anisopliae*, *Cotesia flavipes* y *Bauveria bassina* (ASAZGUA, 2020), además existen empresas que ofrecen productos formulados que contienen microorganismos, tales como Successo (Agroindustrias Successo, 2021) EMAGRO (EMAGROGT, 2022) y Semiagro que importa productos de la línea *Lallemand Plant Care* (SEMIAGRO, 2018). Estos microorganismos pueden ser aislados a partir del suelo ya utilizado para el cultivo, a manera de obtener cepas adaptadas a las condiciones particulares del sitio.

Para realizar un acercamiento a la diversidad de hongos presentes en dicho suelo, se realizará un análisis metagenómico de las muestras de suelo utilizando la región ITS, la cual es altamente conservada en los organismos fúngicos. Hasta la fecha, los análisis metagenómicos de organismos fúngicos son relativamente escasos cuando se compara a los realizados para bacterias (Segre, 2020). Adicionalmente, se espera que las cepas obtenidas a través del aislamiento y diferenciación con medios de cultivo puedan contribuir a reducir la erosión suelos y contaminación con agroquímicos de dicha industria. Esto, obteniendo un conjunto de organismos candidatos a ser utilizados como biofertilizantes o biocontroladores en las fincas del Ingenio Magdalena en Guatemala especialmente adaptados a las condiciones del sitio.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Suelos en Guatemala

El suelo es el medio natural para el crecimiento de los organismos vegetales, es un cuerpo que consiste en capas denominadas horizontes, que se componen de minerales meteorizados, materia orgánica, aire y agua (FAO, 2021). Algunos elementos que se encuentran en el suelo son hidrógeno, carbono, oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, aluminio, sílice y metales alcalinos y alcalinotérreos. Asimismo, están presentes elementos traza con relevancia biológica por participar en el metabolismo de algunos organismos como cofactores enzimáticos. Entre ellos se encuentran el hierro, cobalto, níquel, cobre magnesio, molibdeno y zinc. Una parte fundamental del suelo es la materia orgánica, presente ya sea en forma de biomasa, es decir organismos vivos, o como necromasa (organismos muertos) . Cabe destacar que sus componentes no se encuentran exclusivamente en estado sólido, ya que también están presentes cantidades variables de gases, como el dióxido de carbono, y líquidos, como el agua (Coleman, Callahan, & Crossley, 2018).

El buen manejo del suelo asegura que sus minerales no se tornen deficientes o haya presencia de compuestos tóxicos ya sea para las plantas o para los seres humanos, a quienes los compuestos pueden llegar a través de la cadena trófica. En contraposición, el mal manejo del suelo resulta en su degradación, es decir, ocurre cambio del estado de salud del suelo que lleva a una disminución de su capacidad para proporcionar bienes y servicios a sus beneficiarios (FAO, 2021).

De acuerdo con el sistema de clasificación del Instituto Nacional de Bosques (INAB), aproximadamente el 33% del territorio nacional tiene la capacidad de producir cultivos agrícolas sin limitaciones o con alguna práctica de conservación de suelos. Además, para evitar la degradación del suelo, el 34% del territorio nacional necesita mantener la cobertura forestal, ya sea en agroforestería o sistemas silvopastoriles, además de mantener un 32.75% de áreas de producción forestal o sistemas de protección forestal. Estas cifras contrastan con los reportes de uso de la tierra en el país, como se observa en la Figura 1, según los cuales el 42.77% del territorio nacional es utilizado para actividades agrícolas y el 35.96% del territorio es bosque u otras tierras forestales. Cabe destacar que existen diferentes fuentes de información sobre el uso de tierras en el país que no concuerdan entre sí y que las más recientes datan del año 2010, por lo que es difícil saber qué tan cercanas se encuentran las cifras reportadas a las reales (MARN, 2017).

En los suelos de uso agrícola ocurre la mayor parte de la erosión en los suelos guatemaltecos, entre los cuales se estima que anualmente se erosionan 11.44 millones de toneladas por año. También se erosionan cantidades considerables de suelos cubiertos por arbustos y matorrales, en donde se erosionan 2.77 millones de toneladas por año y las áreas con pastos, entre los cuales se erosionan 1.37 millones de toneladas al año. Adicionalmente, se erosionan 844.12 toneladas al año en suelos usados para infraestructura y otros (MARN, 2017). De acuerdo con datos del año 2003 presentados en el Informe Ambiental del Estado de Guatemala 2016, las ecorregiones con mayor erosión son los bosques húmedos de Petén-Veracruz y los Bosques de pino-encino de Centroamérica.

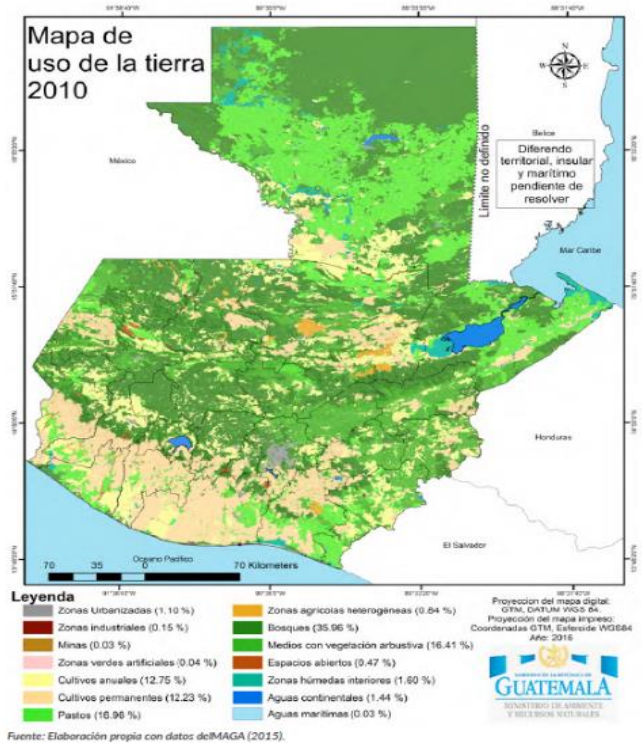
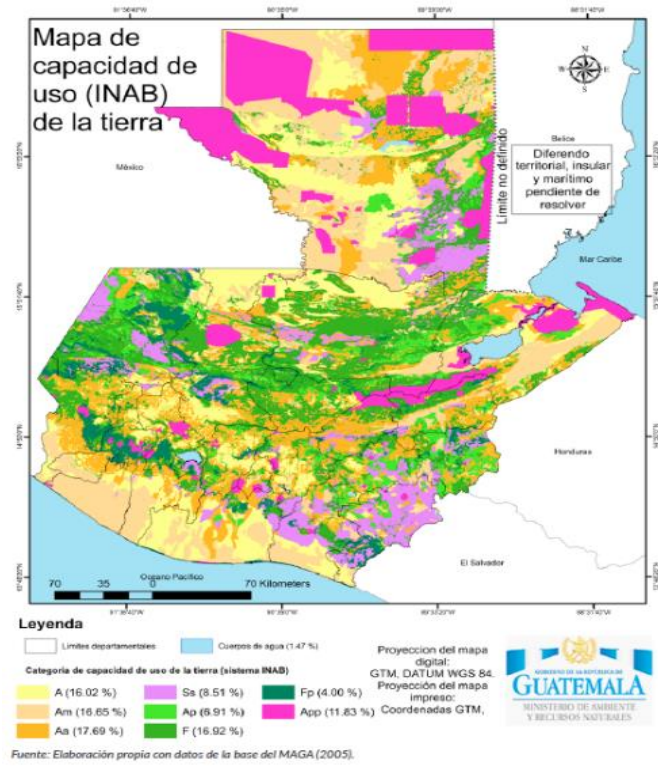


Figura 1: Comparación del mapa de capacidad de uso de la tierra según el INAB y uso de la tierra en 2010.

(MARN, 2010)

4.2. Producción de caña de azúcar en Guatemala y el Mundo

La caña de azúcar ha sido cultivada en los países productores de manera exhaustiva desde el siglo XVI. Esta actividad ha estado históricamente ligada a los procesos de colonización y desarrollo de los países productores (Aguilar, 2015). Actualmente, el 86% de los cultivos dedicados a la producción de azúcar alrededor del mundo son de caña de azúcar, seguidos por otras fuentes como la remolacha (FAO, 2019)

Los principales productores de caña de azúcar a nivel mundial son Brasil, India, la Unión Europea y Tailandia (OCDE-FAO, 2021). Se ha proyectado que la producción de la caña de azúcar aumentará en el mundo en los próximos años, dado que se puede utilizar tanto para la producción de azúcar como de etanol fácilmente, de manera que los productores pueden adaptar las proporciones de producción según los precios del mercado. Se estima que este incremento será del 1.3% p.a., y se anticipa que Brasil contribuirán en un 44% al aumento. Además, se espera que la mayoría de este aumento ocurra en países en vías de desarrollo, que producirán el 77% del azúcar para 2028, comparado con el 75% previo al 2019. Las proyecciones indican que el papel de Latinoamérica en la producción mundial de azúcar disminuirá del 31% al 29%. Adicionalmente, se espera que el consumo de azúcar global aumente un 1.6% p.a. (FAO, 2019).

Cada región cañera posee características y condiciones productivas particulares que producen variaciones en el rendimiento esperado y el costo de producción. En el caso de Guatemala, la expectativa de rendimiento es de 65-88t/ha, una expectativa favorable ya que se encuentra en el estrato con la segunda mayor producción esperada (Aguilar, 2015). Guatemala es el 6º mayor exportador de azúcar en el mundo y el 3er mayor exportador de América Latina (ASAZGUA, 2020). La caña de azúcar se cultiva principalmente en el sur del país y ocupa un 2.97% del territorio nacional (FUNDAZÚCAR, 2019). Este producto y sus derivados fueron el 4º producto más exportado por el país en 2020, representando el 6.5% de las exportaciones totales del país. Esta actividad genera más de 54,000 empleos directos que contribuyen al desarrollo del país (ASAZGUA, 2020). El 88% de la caña molida en el país Guatemala se produce en 11 ingenios que se encuentran agrupados en la Asociación de Azucareros de Guatemala (ASAZGUA): Pantaleón, Concepción, San Diego (Trinidad), Palo Gordo, Santa Ana, Magdalena, Santa Teresa, La Unión, Madre Tierra, La Sonrisa y El Pilar (ASAZGUA, 2020; Labrador & Villagrán, 2017).

En el país se ha invertido en el desarrollo biotecnológico aplicado al cultivo de caña. Desde hace más de dos décadas se estableció el Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación en Caña de Azúcar (CENGICANÑA). En este centro, entre otras actividades, se desarrollan proyectos de biotecnología aplicada al cultivo de caña. Por ejemplo, en el Programa de Variedades, se realiza mejoramiento genético de la caña de azúcar enfocado a contribuir al incremento de la productividad de la caña de azúcar cultivada, a través del diseño de variedades de alto, adaptables, resistentes a enfermedades y plagas y otras características de interés agronómico. Con ingeniería genética se ha explorado tanto en Guatemala como el resto del mundo la introducción de ciertas características a la caña, tales como la resistencia a glufosinato, glifosato e imadazolina, la resistencia a salinidad y la introducción de inhibidores de proteinasas. Además, se ha implementado el uso de

microorganismos como controles biológicos de plagas, específicamente *Metarhizium anisopliae*, *Cotesia flavipes* y *Bauveria bassina*, así como nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis*. Así mismo, se ha apuntado como área de interés el desarrollo de biofertilizantes, que puedan ser producidos dentro de los ingenios azucareros (CENGICAÑA, 2019).

4.3. Acerca del Ingenio Magdalena

El Ingenio Magdalena es una empresa que tuvo sus inicios en 1983 y forma parte de ASAZGUA. Está orientada a implementar una cultura de mejora continua, y se enfocada en procesos tecnológicos que faciliten la toma de decisiones y con un sentido de responsabilidad hacia sus grupos de interés. Es un ingenio productor de azúcar, energía y alcohol (Grupo Magdalena , 2017).

Su visión es llegar a 2026 como una empresa líder en costos y productividad, diversificando sus productos, mientras que su misión es desarrollar y comercializar de forma sostenible productos agrícolas alimenticios, energéticos y de valor agregado, mejorando la calidad de vida de las personas. Además, es una empresa comprometida con el desarrollo sostenible, balanceando tres ejes: social-laboral, medioambiental y económico, por lo que cuenta con un plan de gestión ambiental. Sus medidas de reducción de impacto ambiental les valieron en 2018 el galardón Sustainability of the Year en los premios Mastercana Award (Grupo Magdalena , 2017).

Posee programas de desarrollo del entorno, relación con comunidades vecinas, educación, desarrollo económico, salud, infraestructura vial, gestión ambiental y un centro de investigación. Este último se realizan investigaciones con hongos entomopatógenos, desarrollo de estrategias para el control de enfermedades y el establecimiento de una biofábrica en la que se realiza micropropagación de múltiples especies de planta, incluyendo orquídeas y otras plantas ornamentales (Grupo Magdalena , 2017).

4.4. La planta de caña de azúcar

La planta de la caña de azúcar pertenece a la familia de las gramíneas o poáceas y al género *Saccharum*. Se caracteriza por no almacenar sus azúcares en semillas, sino que en su tallo en forma de sacarosa. Las cañas de azúcar nobles, especies que se distinguen por ser suaves y dulces al masticarlas, y pertenecen principalmente a la especie *S. officinarum*, la cual es originaria de Papúa Nueva Guinea (Bull, 2000). Esta planta es un cultivo perenne que crece principalmente en regiones tropicales y subtropicales y requiere un alto consumo de agua (FAO, 2019). Se le considera una de las especies de plantas más eficientes, ya que en estado de madurez tiene la mitad de su biomasa en forma de fibra y azúcares (Aguilar, 2015).

En la actualidad las variedades comerciales de caña utilizadas para la producción de caña son híbridos interespecíficos, especialmente entre *S. officinarum* L., *S. spontaneum* L., y *S. roboratum* (Aguilar, 2015). Estos híbridos tienen un contenido de fibra más alto y un contenido de azúcares menor que las cañas nobles (Bull, 2000), sin embargo, tienen un mayor tamaño que permiten incrementar la producción final de azúcar (Aguilar, 2015). En Guatemala, la variedad de caña de azúcar más utilizada es la *S. officinarum* L. CG02-163, desarrollada por CENGICAÑA (ASAZGUA, 2021). Además de por composición genética de la planta, el contenido de azúcares en el cultivo es determinado por la disponibilidad de

nutrientes, disponibilidad de agua, la incidencia de enfermedades, el clima y otros factores (Aguilar, 2015). Independientemente de la variedad de caña utilizada, de acuerdo con Bull (2000), el desarrollo de la planta de caña puede ser dividida en 5 etapas, ilustradas en la Figura 2:

- 1) Germinación: La planta se establece y el vástago aparece.
- 2) Crecimiento inicial: Aparece el dosel de hojas y ocurre el máximo crecimiento del tallo (órgano almacenador de sacarosa).
- 3) Maduración: Se ralentiza el crecimiento del tallo y la planta empieza a madurar.
- 4) Afloramiento: Se detiene el crecimiento de la planta y se produce la flor con forma de flecha.
- 5) Cosecha: Se cortan los tallos y puede reiniciar de nuevo el ciclo si se conservan las mismas plantas en el terreno.



Figura 2: Etapas de desarrollo de la caña de azúcar según Aguilar (2015).

Si bien las mismas plantas pueden ser cosechadas en múltiples ocasiones, su producción es decreciente conforme pasa el tiempo, por lo que con frecuencia se opta por una nueva siembra anual. Cabe destacar que esta planta puede ser utilizada no solo para la producción de azúcar, sino que también de etanol, electricidad y bioplásticos (FAO, 2019).

4.5. Impacto del monocultivo en la calidad del suelo

El monocultivo es una práctica utilizada para la agricultura industrial intensiva. En ella, el mismo cultivo es sembrado y cosechado en la misma porción de suelo todos los años, frecuentemente en grandes extensiones. Esta práctica provoca la pérdida de materia orgánica en el suelo y puede provocar una erosión significativa (GRACE Communications Foundation, 2021). Como consecuencia, se hace necesaria la utilización de agroquímicos que impactan la calidad del agua de las áreas circundantes, pues inducen la eutrofización de cuerpos de agua (Killebrew & Wolff, 2010). A largo plazo, la aplicación de agroquímicos reduce la productividad del suelo, siendo esta un 10% más baja para los cultivos de estaciones regulares y un 25% más baja en los cultivos de estación seca al compararlos con cultivos en rotación (Magdoff & Van Es, 2019).

La práctica del monocultivo no solo impacta el suelo a nivel fisicoquímico, sino que también a nivel ecológico. En primer lugar, las plantaciones de monocultivos se encuentran en mayor riesgo de ser afectados por plagas de insectos. Un estudio de Wetzel y

colaboradores (2016) sugiere que esto se debe a que, si las plantas cultivadas tienen el mismo valor nutricional para los insectos en largas extensiones de tierra, la homogeneidad de las plantas presentes en el área propicia la propagación de los insectos. En sistemas naturales donde hay más diversidad se observa el comportamiento opuesto. Por lo tanto, se hace necesario un incremento en el uso de pesticidas para mantener el cultivo viable, llevando a la bioacumulación de los compuestos (Killebrew & Wolff, 2010). En segundo lugar, esta práctica impacta la diversidad microbiana en el suelo en el que se lleva a cabo. Por ejemplo, un estudio realizado por Jatoi y colaboradores (2019), mostró que la diversidad de hongos es significativamente menor en los suelos con monocultivos al compararlos con los suelos de cultivo mixto. Además, el estudio apunta a que un factor determinante para la estructura bacteriana y fúngica del suelo es el pH. Se ha demostrado que la aplicación de agroquímicos, derivada de la degradación de los suelos con monocultivos, impacta negativamente la diversidad de las comunidades fúngicas y microbianas, ejemplificado por los resultados de los estudios realizados por Zhou y colaboradores (2017) y Paungfoo-Lonhienne y colaboradores (2015).

Asimismo, es importante mencionar que hay múltiples impactos socioeconómicos asociados con la agricultura industrial y los monocultivos, entre los que se pueden mencionar los conflictos con el derecho a la tierra de las poblaciones indígenas, el acceso a agua, la pérdida de autonomía y soberanía sobre el acceso a la comida, la discriminación contra las familias del área rural, las condiciones de trabajo inhumanas o peligrosas, entre otros (Monsalve & Emanuelli, 2009).

4.6. Ecología del suelo

La ecología del suelo es una disciplina que estudia cómo los organismos del suelo, tanto microbios como fauna, interactúan entre ellos y con su ambiente, así como su influencia y respuesta a variaciones en los procesos y propiedades del suelo, observando los cambios en su capacidad para proveer servicios ecosistémicos esenciales. Algunos procesos claves que se estudian desde ella son los ciclos biogeoquímicos, la formación de agregados del suelo y las interacciones de su biodiversidad (NC State University, 2021). Esta disciplina requiere de la integración de conocimientos en análisis químico, microbiología, fisiología, biología molecular y bioinformática (Staak, 2017).

La biodiversidad del suelo se define como la variación de la vida en el suelo, a nivel de genes presentes en las comunidades, variación de hábitats, cantidad y distribución de los organismos a diferentes escalas (FAO, 2021). La heterogeneidad de este medio como hábitat permite el desarrollo de una alta diversidad de bacterias, hongos y animales tanto microscópicos como macroscópicos. Todos estos organismos son los conductores principales de la descomposición de materia orgánica, el flujo de dióxido de carbono en los suelos y la continuidad en los ciclos de diversos nutrientes. La diversidad de organismos en el suelo y sus interacciones son determinantes para las características físicas del suelo y sus dinámicas de nutrientes. Una vista general de dichas interacciones se puede observar en la Figura 3. Sin embargo, la dificultad para observar estas interacciones *in situ* dificulta trazar una línea clara entre la diversidad de los suelos y las funciones que efectúan (Pavao-Zuckerman, 2008). Los estudios en esta disciplina pueden contribuir a proteger los suelos y reestablecer sus procesos de autorregulación, a la vez que se incrementa su eficiencia (Staak, 2017).

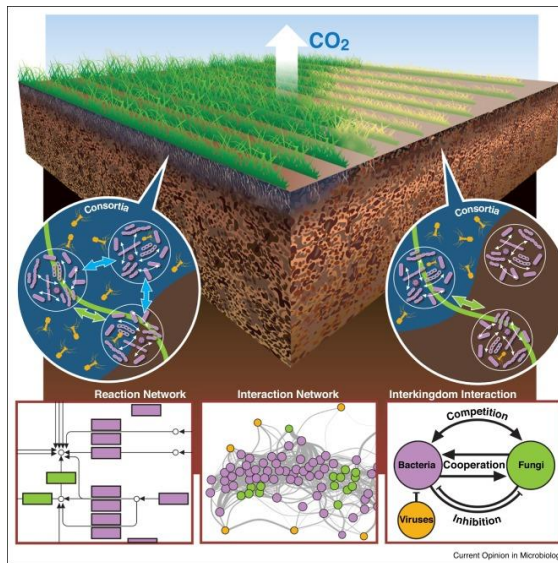


Figura 3: Vista rápida a los tipos de comunidades microbianas del suelo y sus interacciones moleculares. Estas interacciones incluyen interacciones nutricionales complejas, rutas metabólicas interconectadas, alimentación cruzadas e intercambio de metabolitos entre especies. Las interacciones se pueden clasificar en de tipo cooperativo, simbiótico, competitivo o inhibitorio.

(Jansson & Hofmockel, 2018)

Para el análisis de la diversidad de las comunidades se han desarrollado diversos índices para evaluar la diversidad alfa (de la comunidad) y la diversidad beta (entre las comunidades). A la fecha, no existe un consenso sobre qué índices son los mejores para comparar la diversidad entre comunidades microbianas. Para la diversidad alfa, se deben tener en cuenta la riqueza (cantidad de taxones presentes) y la uniformidad (equitatividad en la abundancia de los taxones). Los índices de Shannon y de Simpson son los más comúnmente utilizados para integrar estas dos características. En cuanto a la diversidad beta, se realizan matrices con la medida de disimilitud entre cada par de muestras. Las distancias de Bray-Curtis permiten un análisis cuantitativo de dichas distancias sin la elaboración de un árbol filogenético (Kim y colaboradores, 2017; Wydro, 2022).

4.7. Rol de los hongos en el ecosistema del suelo

Los hongos son organismos heterótrofos, multicelulares o unicelulares y heterótrofos, que pertenecen al reino fungi (Audeserik, Audeserik, & Byers, 2012). Los hongos del suelo juegan un rol crucial en el desarrollo de los ciclos biogeoquímicos, particularmente a los del carbono, nitrógeno y fósforo, debido a su actividad como descomponedores mediada por una amplia gama de actividades catabólicas. Su actividad como descomponedores sobre materia lignocelulósica, es decir restos de plantas, puesto que este es relativamente recalcitrante a bacterias. Esta actividad requiere la producción de celulasas, las cuales están presentes en una amplia gama de hongos y participan no solo en la degradación de restos vegetales, sino que también en la podredumbre parda. Adicionalmente, algunos hongos son capaces de degradar la lignina gracias a la presencia de polifenol-oxidasas, las cuales son menos frecuentes y, de hecho, se encuentran casi exclusivamente en hongos basidiomicetos

y ascomicetos. Además, gracias a su digestión enzimática exógena, los hongos son capaces de mediar la degradación de polímeros, y la inmovilización de metales esenciales o tóxicos gracias a la producción de ácidos orgánicos y sideróforos. Finalmente, estos organismos son capaces de secuestrar nutrientes del suelo por medio del micelio, incluso formando relaciones mutualistas con los organismos vegetales mediante micorrizas (Ritz, 2005). La relación entre la población de hongos presente en el suelo y la calidad de suelo ha sido observada desde la década de 1950, con estudios como el realizado por Garret en 1951 que establecía la relación de los hábitos de crecimiento con el tipo y la distribución de los sustratos y los grupos ecológicos obtenidos en según el método de aislamiento utilizado (Garrett, 1951).

De acuerdo con Frac y colaboradores (2018), los hongos presentes en los suelos se pueden clasificar en tres subgrupos de acuerdo con su función:

- Reguladores del ecosistema: Estos son responsables de formación de estructuras de los suelos y modificación de los hábitats para otros organismos, a través de la regulación de dinámicas fisiológicas en el ambiente del suelo.
- Controles biológicos: Estos son hongos capaces de regular la proliferación de enfermedades, pestes y el crecimiento de otros organismos. Por ejemplo, los hongos micorrícicos pueden contribuir a proteger a las raíces de una planta de patógenos.
- Descomponedores y transformadores de compuestos: A través de esta actividad, los organismos contribuyen a la estabilización de la materia orgánica en el suelo y la descomposición de residuos, haciendo disponibles los nutrientes que contienen.

A pesar de la conocida relevancia ecológica de los hongos, estos son comparativamente poco estudiados, siendo las bacterias los microorganismos reportados con más frecuencia (Vassileva, y otros, 2022).

4.8. Bioproductos: Inoculantes microbianos como biofertilizantes y biocontrolados

Biofertilizante es un término relativamente amplio que se refiere a un producto que contiene microorganismos y que al aplicarlo al suelo, las semillas o las superficies de una planta colonizan el área, induciendo el crecimiento de los organismos vegetales. Un biocontrolador, por otro lado, es un agente microbiano que constituye un método que no involucre químicos sintéticos para el control de fitopatógenos. En el 2021, entre los bioproductos para la agricultura disponibles con publicaciones que los respaldaran, cerca del 13% utilizaban hongos provenientes del suelo (Pirttilä, Parast, Baruah, & Koskimaki, 2021). El proceso de la implementación exitosa de bioproductos que utilizan inoculantes microbianos es complejo, pero se divide en tres etapas generales: Diagnóstico del ambiente y el cultivo; producción, formulación, “entrega” y aplicación en campo; recolección de muestras y experimentación en el laboratorio, que se detallan en la Figura 4:

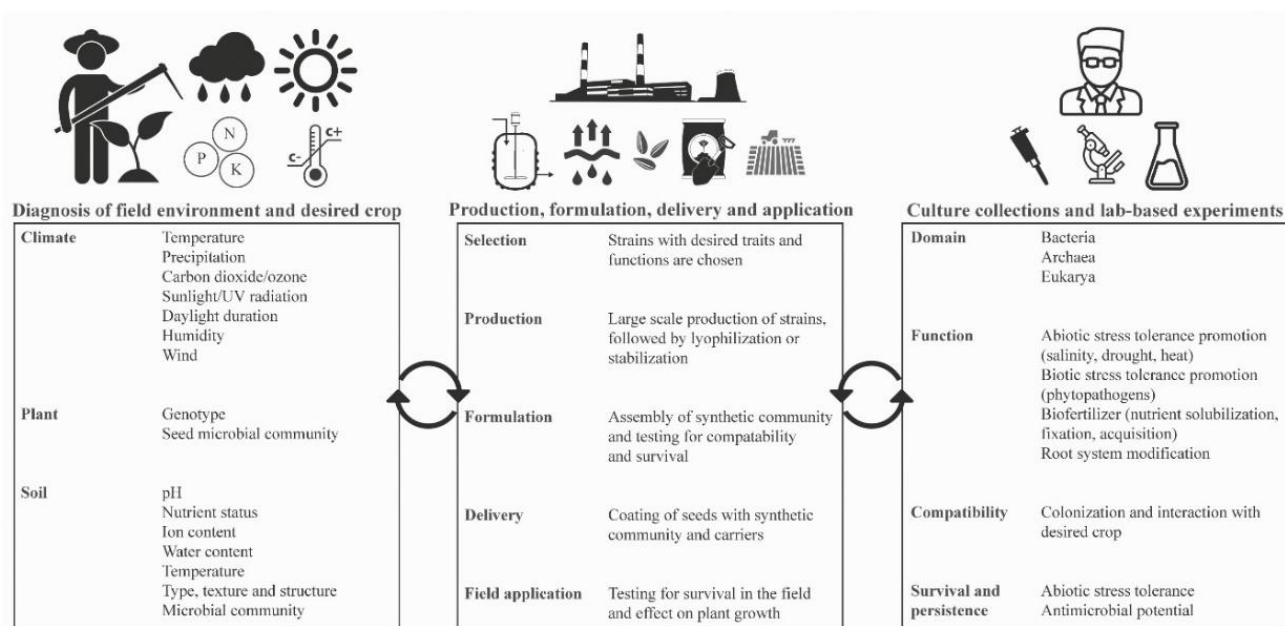


Figura 4: Marco para la aplicación exitosa de inoculantes microbianos en la agricultura propuesta por Saad, Eida y Hirt (2020).

4.9. Taxones de hongos predominantes en suelos de uso agrícola y aplicados como biofertilizantes o biocontroladores.

Al caracterizar el suelo tras someterlo a ciertos tratamientos para su explotación agrícola, por ejemplo, la aplicación de fertilizantes químicos, las comunidades microbianas presentes en el suelo se ven alteradas, de manera que el aumento o disminución de ciertos taxones puede utilizarse indagar sobre el estado del mismo. En el Cuadro 1 se detallan algunos taxones cuya abundancia es afectada por ciertas condiciones comunes en el manejo agrícola del suelo.

Cuadro 1: Taxones de hongos dominantes de acuerdo con las características del ecosistema, con base en el cuadro elaborado por Frac y colaboradores (2018).

Uso de suelo	Taxón fúngico	Función o reacción	Referencia
Agrícola	Agaricales	Incremento en suelos afectados por sequía.	Bastida <i>et al.</i> , 2017
	Hypocreales		
	Sordariales	Reducción en suelos afectados por sequía.	Ding <i>et al.</i> , 2017
	Capnodiales		
	Eurotiales		

Uso de suelo	Taxón fúngico	Función o reacción	Referencia
Agrícola	<i>Mortierella</i>	Hongos dominantes en suelos por fertilizantes nitrogenados, fosforados o de potasio.	Ding <i>et al.</i> , 2017
	<i>Fusarium</i>		
	<i>Gibberella</i>		
	<i>Mortierella</i>	Predominantes en suelos tratados con estiércol.	
	<i>Fusarium</i>		
	<i>Schizothecium</i>		
	<i>Ascomycota</i>	Descomponedores clave. Incrementan tras la aplicación de fertilizantes nitrogenados.	Zifcaková <i>et al.</i> , 2016
	<i>Sordariomycetes</i>		
	<i>Eurotiomycetes</i>		
	<i>Dothideomycetes</i>		
	<i>Leotiomycetes</i>	Disminuye la población en suelos tratados con nitrógeno y fósforo.	
	<i>Helotiales</i>		
	<i>Cuphellophora</i>	Aumento en suelos fertilizados.	
	<i>Penicillium</i>		
	<i>Chloridium</i>		
	<i>Trichoderma</i>	Disminuyen en suelos fertilizados por nitrógeno y fósforo	
<i>Acremonium</i>			
<i>Exophiala</i>			
<i>Clonostachys</i>			
<i>Sarocladium</i>			
<i>Schizothecium</i>	Hongos arbusculares micorrízicos que mejoran el crecimiento de los cultivos incrementando la concentración de fósforo y la ingesta de nutrientes.	Smith y Read, 2008; Bagyaraj y Ashwin, 2017	
<i>Magnaporthe</i>			
<i>Phaeosphaeriopsis</i>			
<i>Glomus</i>			
<i>Gigaspora</i>			
<i>Scutellospora</i>	Hongos arbusculares micorrízicos que mejoran el crecimiento de los cultivos incrementando la concentración de fósforo y la ingesta de nutrientes.	Smith y Read, 2008; Bagyaraj y Ashwin, 2017	
<i>Acaulospora</i>			
<i>Entrophospora</i>			

Uso de suelo	Taxón fúngico	Función o reacción	Referencia
<i>Horticultura</i>	<i>Trichoderma</i>	Hongos arbusculares micorrícicos que mejoran el crecimiento de los cultivos incrementando la concentración de fósforo y la ingesta de nutrientes.	López-Bucio <i>et al.</i> , 2015

Por otro lado, algunos de los hongos ya utilizados en inoculantes formulados para su aplicación agrícola se detallan en el Cuadro 2 a continuación:

Cuadro 2: Algunos productos de inoculantes fúngicos disponibles actualmente.

Tipo	Producto	Inóculo
	Jumpstart	<i>Penicillium bilaiae</i>
	Quick Roots	<i>Bacillus japonicum</i> (bacteria) y <i>Trichoderma virens</i> (hongo)
	TagTeam Soybean	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (bacteria) y <i>Penicillium bilaiae</i> (hongo)
Biofertilizante	MycoApply	<i>Glomus intraradices</i> , <i>G. mossaea</i> , <i>G. aggregatum</i> , <i>G. etunicatum</i> .
	Unite	<i>Trichoderma atroviride</i>
Biocontrolador	Actinocate ®	<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC 108

(O'Callaghan, Ballard, & Wright, 2022)

4.10. Secuenciación de ADN

En la biología, se le denomina secuenciación al proceso mediante el cual se determina la secuencia de unidades que conforman un polímero lineal. Por lo tanto, la secuenciación de ADN es el uso de métodos y tecnología para determinar la identidad y orden de los 4 nucleótidos (Timina, Adenina, Guanina y Citosina) que conforman una cadena de ADN. El orden de estos ácidos nucleicos es relevante porque el orden de los ácidos nucleicos ultimadamente contiene la información para las propiedades hereditarias y bioquímicas de los organismos vivos (Heather & Chain, 2016).

Tomó 25 años tras la dilucidación de la estructura del ADN el desarrollo y publicación del primer método de secuenciación de ADN. Este, incluía la adición de etiquetas radioactivas a los didesoxinucleótidos que permitían identificar los nucleótidos presentes. Más adelante, se introdujeron las etiquetas fluorescentes. En ambos casos, fragmentos de la cadena eran separados según su tamaño y analizados por electroforesis en gel. El método, conocido como secuenciación Sanger, siguió evolucionando y mejorando gracias a la introducción electroforesis capilar y ganó aceptación, siendo denominada “secuenciación

de primera generación”. Sin embargo, este método posee limitaciones debido a que solamente una reacción de secuenciación puede ser analizada a la vez, presentando complicaciones especialmente para cadenas diploides.

Como respuesta, entre 2004 y 2006 la secuenciación de siguiente generación (NGS por sus siglas en inglés) fue introducida a través de distintos métodos. Estas tecnologías facilitaron la adquisición y análisis de datos. Entre ellas se encuentran los procedimientos de *Illumina* y *Torrent*. Finalmente, se ha desarrollado una tercera generación de secuenciación, como las plataformas *Pacific Biosciences* y *Oxford Nanopore*, que se caracterizan por realizar “lecturas largas” que previenen las confusiones derivadas de las repeticiones en el genoma y la detección de variantes estructurales, en contraposición con las “lecturas cortas” de las tecnologías de segunda generación (Hu, Chitnis, Monos, & Dinh, 2021).

La secuenciación en la plataforma *Illumina* se sirve de la secuenciación por síntesis (SBS por sus siglas en inglés). Esta se encuentra dividida en cuatro etapas, como apunta Vázquez (2016):

- (1) Preparación de la genoteca o “librería”: La genoteca está conformada por fragmentos obtenidos de manera aleatoria del ácido nucleicos, así como adaptadores para los extremos 5’ y 3’. Los fragmentos unidos a los adaptadores son simplificados y purificados.
- (2) Generación de cluster: Los moldes para la secuenciación son inmovilizados en un cassette que presenta el ADN de manera que este es accesible para las enzimas, asegurando una alta estabilidad en la unión de nucleótidos identificados con fluorocromos. Cada fragmento e amplificado por PCR de puente (ver Figura 5).

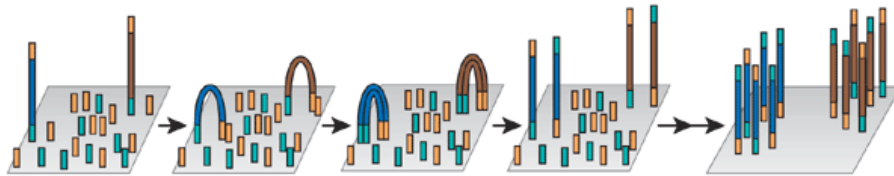


Figura 5: Representación de la amplificación PCR en puente utilizado para la secuenciación con Illumina.

(Vázquez, 2016)

- (3) Secuenciación por síntesis (SBS): Se secuencian las cadenas molde por ciclos repetidos en los que se añaden bases individualmente. Cada una de las cuatro posibles bases está identificada por un fluoróforo diferente, de manera que la señal de cada una se puede distinguir. Luego de terminar la construcción de la cadena, la identidad de las bases es registrada gracias a detectores de fluorescencia inducida por láser de los fluoróforos.
- (4) Análisis de datos: Gracias al software asociado con el equipo, se conservan solamente las lecturas con determinada calidad, de acuerdo con un sistema de

puntuación algorítmico. En el caso de *Illumina*, la puntuación de calidad (Q) se define como

$$Q = -10\log(e)$$

donde e representa la probabilidad de que la base leída sea errónea. Los valores altos de Q indican una menor posibilidad de error. Una Q de 20 representa un error de 1 base de cada 100, y una vez Q llega a 30 virtualmente todas las bases leídas serán correctas (Illumina, Inc., 2022).

4.11. Metagenómica

Las *ómicas* son un grupo de áreas de estudio dentro de las ciencias biológicas que tienen por objetivo identificar, caracterizar y cuantificar moléculas biológicas que están involucradas en la estructura, funcionamiento y dinámicas a nivel celular, a nivel de tejidos y a nivel de organismo. Entre ellas se encuentran la proteómica, genómica, transcriptómica, metabolómica y la metagenómica (Vailati-Riboni, Palombo, & Loor, 2017). La metagenómica es una disciplina que estudia a las comunidades microbianas de un ambiente utilizando la secuenciación de su material genético, específicamente su ADN, de manera de que no se observa el ADN de un solo microorganismo, sino que de todos los presentes en la muestra de manera simultánea (Segre, 2020).

El estudio de suelos desde la metagenómica ha permitido dilucidar la composición y diversidad previamente desconocidas de las comunidades microbianas, esto debido a que este tipo de análisis permite detectar la presencia de microorganismos no cultivables. Esto es relevante ya que el cultivo tradicional de microorganismos por métodos tradicionales de microbiología permite la determinación de menos del 1% del número total de microorganismos que viven en el suelo (Wydro, 2022). Además, la secuenciación profunda de metagenomas ha empezado a revelar el potencial funcional de algunas comunidades microbiana, por ejemplo, trazando la relación entre ciertos genes y la participación el ciclo del carbono. Actualmente el reto de la metagenómica es ir más allá de predicciones genéticas y empezar a comprender las funciones de los microorganismos *in situ*. Esto es especialmente importante para el metagenoma del suelo donde entre el material genético se puede encontrar ADN de células muertas o atrapado en biofilms (Jansson & Hofmockel, 2018).

Al estudiar la composición del microbioma del suelo desde la secuenciación con ADN genómico, se pueden tomar dos rutas dependiendo de lo que se desee dilucidar con la información obtenida. El primero es la secuenciación de genoma completo, realizada en caso de desear dilucidar las funciones de los organismos presentes en el microbioma. El segundo, la secuenciación de amplicones que permite conocer simplemente la composición del microbioma (Gómez-Godínez, Martínez-Romero, Banuelos, & Arteaga-Garibay, 2021). En el caso del estudio del micobioma (microbioma fúngico) a través de amplicones se utiliza como objetivo la región ITS (*Internal Transcribed Spacer*) que contiene dos regiones variables: ITS1 e ITS2 que se pueden usar también por sí mismas (Porrás-Alfaro, Liu, Kuske, & Xie, 2013).

5. METODOLOGÍA

5.1. Materiales y métodos

5.1.1. Muestreo

Se recolectaron 10g de muestra de suelo a 15cm de distancia de la base del tallo y 15 cm de profundidad. Se colocó en una bolsa estéril de muestreo sellada herméticamente. Se identificó la bolsa con: número correlativo de la muestra, lugar de muestreo y fecha de muestreo. A continuación, se colocó en una hielera transportada a 6°C. El procesamiento se realizó entre 24 y 72 horas después de la recolección y previo a ello fueron almacenadas a 4°C (Brooks, 2015). Se utilizó un total de 20 muestras: 6 muestras provenientes de sectores con alto contenido de materia orgánica (MO), 5 muestras de áreas con alta productividad (AP), 4 muestras del área boscosa (AB), 4 muestras de áreas de baja productividad (BP) y 1 muestra suelo para el cultivo de caña con áreas anegadas (CA). Se tomaron datos de georreferenciación de los puntos de muestreo, mostrados en la Figura 6.

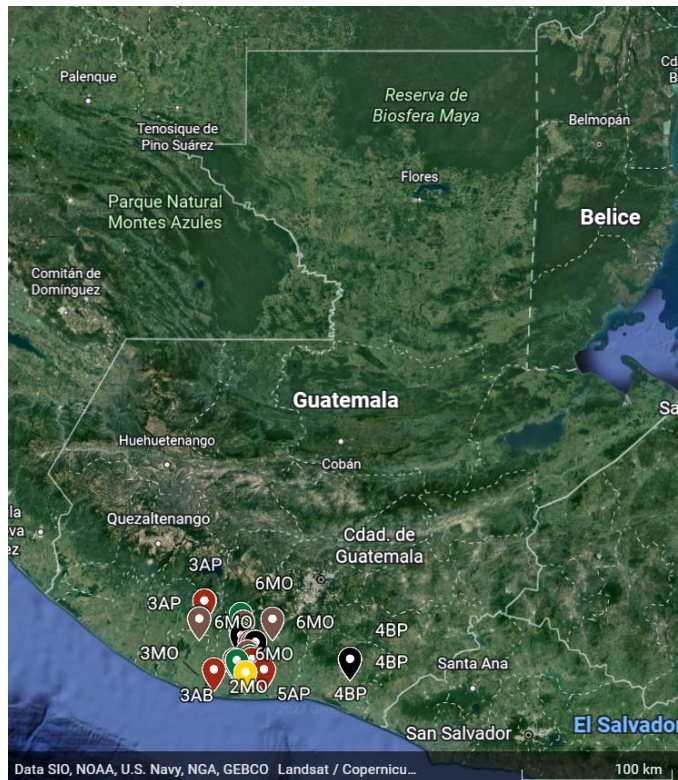


Figura 6: Ubicación de los puntos de muestreo en Guatemala, en base a datos de georreferenciación.

(Elaboración propia utilizando Google Maps)

5.1.2. Realización y siembra de diluciones seriadas

Por cada muestra, se suspendieron 0.5g de suelo en 50mL de agua peptonada en un Erlenmeyer de 125mL estéril. Esta solución se incubó por una hora con agitación a 130rpm. Luego de esto, se realizaron diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} del suelo a un volumen total de 1mL cada una. Se agitó con vórtex entre cada pipeteo para asegurar la homogeneidad de la solución. Se inocularon 100 μ L de cada una de las diluciones en cajas Petri con agar Rosa de Bengala. Se realizó un monitoreo diario del crecimiento. Se determinaron las cepas para realizar un reaislamiento a través de la observación de las características morfológicas macroscópicas de las colonias (Brooks, 2015). Las cepas fueron purificadas a través de pasajes y crecimiento en Agar Rosa de Bengala.

5.1.3. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el kit *DNeasy PowerSoil Pro Kit*, de QIAGEN, de acuerdo al Protocolo de inicio rápido (*Quick-Start Protocol*) del fabricante (QIAGEN, 2022), que se encuentra detallado en el apéndice, con las siguientes dos modificaciones: (1) Se utilizaron 500mg de suelo (2) Se agregó un lavado con 300 μ L de fenol:cloroformo:isoamil alcohol, con agitación en vórtex durante 20 segundos, tras el cual se retira una capa acuosa de entre 500 μ L y 600 μ L, tras lo cual los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente a 10,000g durante 5 minutos; todo el líquido fue decantado, se dejó secar al aire el etanol residual y se resuspendió el pellet en 75 μ L de Tris 10mM para proseguir con el procedimiento (QIAGEN, 2022). El ADN fue almacenado a -80°C tras su extracción. El ADN fue cuantificado antes y después de estar congelado utilizando un Nanodrop® One de Thermo Fisher Scientific®.

5.1.4. Secuenciación

La secuenciación para obtención de los datos para el análisis metagenómico fue realizada por el laboratorio externo *Macrogen* para dos amplicones contenidos en la región ITS (ITS1 e ITS2), utilizando los cebadores detallados en el Cuadro 3. La plataforma utilizada fue MiSeq standard v3 300PE, con un aproximado de 250,000 lecturas por muestra. Como producto, el laboratorio proveyó un archivo fastq por muestra y amplicón con los datos crudos.

Cuadro 3: Secuencias del set de cebadores utilizados.

Región objetivo	Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>
ITS1	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS2	GCATCGATGAAGAACGCAGC	TCCTCCGCTTATTGATATGC

5.1.5. Análisis metagenómico (microbioma por *barcoding* ITS1 e ITS2)

Para el análisis de las secuencias crudas se utilizó el paquete *dada2* versión 1.16.0 en R 4.2.2 a través de RStudio. Se filtraron las secuencias de acuerdo con los siguientes parámetros de calidad: el máximo número de bases indeterminadas (N) era 0, un máximo de errores esperados de 2, y se cortaron las lecturas en la primera base con un valor de calidad *phred* menor a 2. A continuación se llevó a cabo el proceso de *Denoising* y *clustering*: crearon los modelos de error para las muestras, se descartaron las lecturas duplicadas, se removieron los errores con base en el modelo de error, se parearon las lecturas y se descartaron las quimeras, obteniendo los ASVs (*Amplicon Sequence Variants*) por muestra (Callahan, McMurdie, Ha, Johnson, & Holes, 2016). Se realizó la asignación taxonómica con la función utilizando la versión general para fungi de la base de datos [UNITE 9.0](#) (Abarenkov, y otros, 2022).

Se creó un objeto *phyloseq* con los ASVs, la taxonomía obtenida, la metadata y un árbol enraizado de manera aleatoria utilizando el paquete [phyloseq](#) (McMurdie & Holmes, 2013). Para el análisis posterior se utilizó el paquete [microbiome](#) (Lahti & Shetty, 2019), obteniendo la abundancia relativa de los taxones, el número ASVs, índice Chao1, índice de Gini-Simpson e índice de Shannon, así como las distancias de Bray-Curtis. Se elaboraron gráficos con los datos obtenidos utilizando [ggplot2](#) (Wickham, 2016).

5.1.6. Siembra en cámara húmeda y tinción con azul de lactofenol

Para la observación de estructuras microscópicas, se sembraron las cepas a partir de las placas de rosa de bengala donde se encontraban purificadas en cámaras húmedas, elaboradas según el manual de micología de Koneman (1985). Estas estaban compuestas por un trozo de una caja Petri vacía, un trozo de papel filtro humedecido por 1mL de agua destilada, dos palillos estériles como soporte, un portaobjetos estéril, un trozo de agar Sabouraud inoculado en los cuatro laterales haciendo uso de una aguja de inoculación y un cubreobjetos estéril, como se muestra en la Figura 7. Se dejaron crecer los hongos durante una semana y luego fueron observados en tinción con azul de lactofenol para identificar las cepas. En base a las observaciones se clasificó a las cepas de las que se pudieron observar características suficientes (micelio, esporas y conidióforos) utilizando la clave dicotómica de la Universidad de Toronto (1981) publicada en [Mycology Web Pages](#).

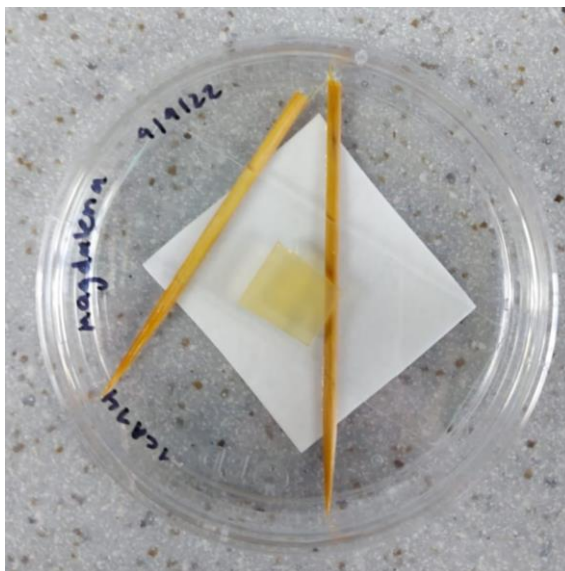


Figura 7: Ejemplo de cámara húmeda.

5.1.7. Preparación de solución de esporas

Las cepas purificadas fueron sembradas en tubos en slant con 5mL de PDA. Se dejaron crecer durante una semana o hasta observar crecimiento suficiente (esporas visibles recubriendo la superficie del agar). Se realizaron 3 lavados con 1mL de agua estéril del slant, agregando el agua y agitando. Previo a la agitación del primer lavado, se utilizó una aguja de inoculación doblada en L para raspar suavemente la superficie (Iqbal, y otros, 2017). El líquido obtenido tras cada lavado fue agregados a un tubo estéril, obteniendo un aproximado de 2.5mL de solución. La solución fue preservada a 4°C hasta su uso para la siembra en agares diferenciales o en el tubo para preservación.

5.1.8. Evaluación de actividades de interés

Las placas con los medios de cultivo diferenciales fueron inoculadas con 50µL de solución de esporas. El procedimiento para la preparación de cada uno de estos agares se encuentra detallado en el apéndice. En la Figura 8 se ejemplifica un resultado positivo para cada una de las actividades evaluadas, enumeradas a continuación:

- Producción de proteasas, con el agar según la receta utilizada por Liu y colaboradores (2021). Una colonia positiva presentaba un halo transparente.
- Producción de quitinasas según las indicaciones de Subramanian *et al* (2020). Una colonia positiva presentaba un halo transparente.
- Producción de lipasas de acuerdo con la metodología de Bharathi, D., & Rajalakshmi, G. (2019). Un resultado positivo corresponde a la formación de precipitado alrededor de la colonia.
- Solubilización de potasio de acuerdo con la metodología de Muthuraja y Muthukumar (2021). Un resultado positivo corresponde a la formación de un halo amarillo alrededor de la colonia.

- Solubilización de fósforo de acuerdo con la metodología de Doilom y colaboradores (2020). Un resultado positivo corresponde a la formación de un halo amarillo alrededor de las colonias.
- Producción de gluconasas (CMCA) de acuerdo con la metodología de Zia y colaboradores (2019). Un resultado positivo corresponde al crecimiento de la colonia.

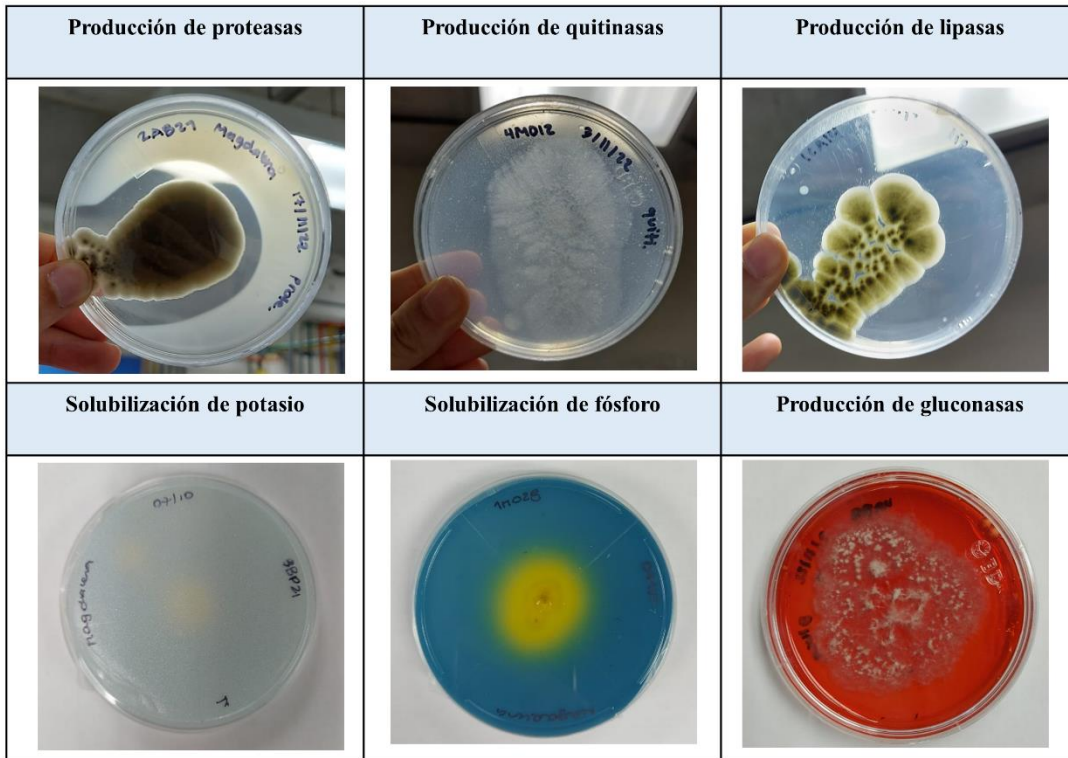


Figura 8: Ejemplo de resultados positivos en cada uno de los agares diferenciales utilizados.

5.1.9. Preservación de hongos filamentosos

Para la preservación de las cepas, se prepararon tubos Falcon estériles de 50mL con una bola de algodón estéril y 5mL de PDA. Se sembraron con 500μL de la solución de esporas preparada previamente y se incubaron hasta obtener micelio abundante (entre 1 y 3 semanas) (Al-Bedak, Sayed, & Hassan, 2019). Tras el crecimiento, los tubos fueron sellados utilizando Parafilm (Dilab) y almacenados en refrigeración a 4°C.

5.1.10. PCR para la identificación de *Fusarium oxysporum* y *F. oxysporum* raza 4.

Tanto la extracción de ADN como los PCR fueron realizados de acuerdo con los protocolos del Laboratorio de Protección Vegetal (LPV) de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG). Este procedimiento fue realizado debido a que una de las cepas aisladas, 1AP30, presentaba características morfológicas correspondientes a las del género *Fusarium*.

Para la extracción de ADN, se pesaron 0.1g de micelio fresco en un tubo Eppendorf de 1.5mL y se le agregaron 600µL de buffer CETAB (2% CTAB, 1% PVP, 100mM Tris-HCl pH 8, NaCl 1.4 M, EDTA 20mM y 0.2% 2-mercaptoetanol) precalentado a 65°C. Se incubó durante 30 minutos a 65°C. Antes de continuar, se mantuvo la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agregaron 500µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló en vórtex. La mezcla se centrifugó a 13,000rpm durante 10 minutos.

El sobrenadante (~500µL) se transfirió a un nuevo tubo. En ese tubo se agregó un volumen (500 µL) de isopropanol frío y 1/10 volumen (50µL) de acetato de amonio 7.5M. Los tubos se mezclaron por inversión y se dejaron incubar a -20°C durante 20 minutos. A continuación, la mezcla se centrifugó por 10 minutos a 13,000rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se secó en el horno a 50°C durante 30 minutos. Se resuspendió el pellet en buffer TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) precalentado a 65°C. El ADN resuspendido fue almacenado a 4°C durante un día.

Previo a la realización del PCR, se estandarizó la concentración de la muestra a ~1.5ng/µL en duplicado y se agregó 1µL de ARNasa. Se realizaron 3 reacciones por par de cebadores (Cuadro 4): Uno por cada réplica y un blanco con agua libre de nucleasas.

Cuadro 4: Pares de cebadores utilizados para las reacciones de PCR.

Par de cebadores	Especificidad	Tamaño esperado (pb)
W106F/W106R	<i>Fusarium oxysporum</i>	729
FOC-1/FOC-2	<i>F. oxysporum</i> raza 4	242

Para el Master Mix se utilizó el buffer 5x PCR Buffer RED (7.5mM MgCl₂) de AMPLIQON. La receta utilizada para las reacciones, con un volumen final de 25µL, fue la siguiente:

Componente	1X (µL)	3X (µL)
Agua destilada	15.8 µL	47.4 µL
Buffer 5x	5 µL	15 µL
dNTPs	1 µL	3 µL
Forward Primer	1 µL	3 µL
Reverse Primer	1 µL	3 µL
Taq Polimerasa	0.2 µL	0.6 µL
ADN	1 µL	-

El PCR para *F. oxysporum* se realizó en un termociclador *flexlid Mastercycle* de la marca Eppendorf con el siguiente programa:

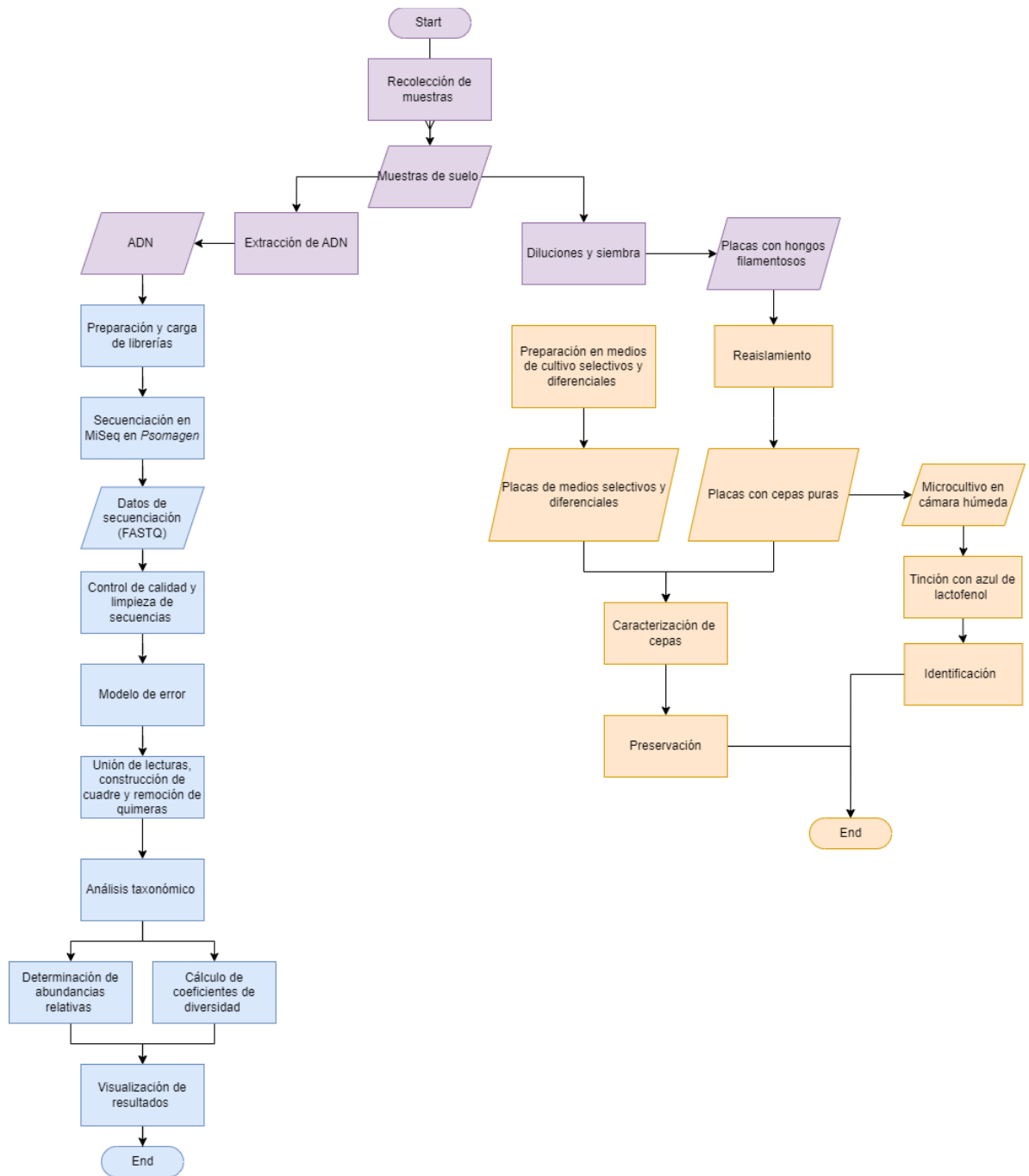
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3:00	1
Desnaturalización	94°C	0:40	
Alineamiento cebadores	61.7°C	0:40	30
Extensión Taq	72°C	1:00	
Extensión final	72°C	10:00	1

El PCR para *F. oxysporum* raza 4 se realizó en un termociclador PTC-100™ *Programmable Thermal Controller* de MJ Research Inc. con el siguiente programa:

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3:00	1
Desnaturalización	94°C	0:40	
Alineamiento cebadores	67.75°C	0:40	30
Extensión Taq	72°C	1:00	
Extensión final	72°C	10:00	1

Los productos de ambos PCR fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%.

5.2. Diagrama de flujo



6. RESULTADOS

6.1. Análisis metagenómico con base en los amplicones ITS1 e ITS2.

Para el ADN extraído de cada una de las muestras de suelo, se realizó una lectura de concentración y las razones A260/280 y A260/230. Como se detalla en el Cuadro 5, las concentraciones obtenidas se encontraban en un rango de 12.60ng/μL a 317.40ng/μL. Solamente para la muestra 1CA se obtuvieron valores de ambas razones que indicaban una pureza aceptable en el producto de la extracción.

Cuadro 5: Concentración y parámetros de pureza del ADN extraído, enviado a *Macrogen* para secuenciación NGS de las regiones ITS1 e ITS2.

Muestra	Concentración (ng/μL)	A260/280	A260/230
1AP	12.60	1.35	0.43
2AP	89.10	1.83	0.22
3AP	55.80	1.43	0.42
4AP	119.10	1.82	1.18
5AP	300.00	1.89	1.58
1BP	46.90	1.7	0.31
2BP	109.50	1.79	0.26
3BP	119.30	1.82	0.21
4BP	116.30	1.82	0.71
1MO	20.10	1.34	0.3
2MO	63.00	1.79	0.19
3MO	130.50	1.44	0.35
4MO	144.90	1.83	0.39
5MO	43.2	1.43	0.56
6MO	31.00	1.44	0.18
1AB	129.40	1.42	0.56
2AB	89.60	1.82	0.61
3AB	111.00	1.84	0.96
4AB	317.40	1.90	1.46
1CA	133.60	1.85	1.91

De la secuenciación en el laboratorio externo, se obtuvieron datos de secuenciación de la región ITS1 para las muestras: 1AP, 4AP, 4MO, 5MO, 6MO, 1AB, 2AB, 3AB, 4AB, 1CA y 1BP; por otro lado, para la región ITS2 se obtuvieron datos de secuenciación de las muestras: 1AB, 1AP, 5MO, 6MO, 1AB, 2AB, 3AB y 4AB. De manera que para las muestras 1MO, 2AP, 2BP, 2MO, 3AP, 3BP, 3MO, 4BP y 5AP no se obtuvieron datos en base a los cuales realizar el análisis.

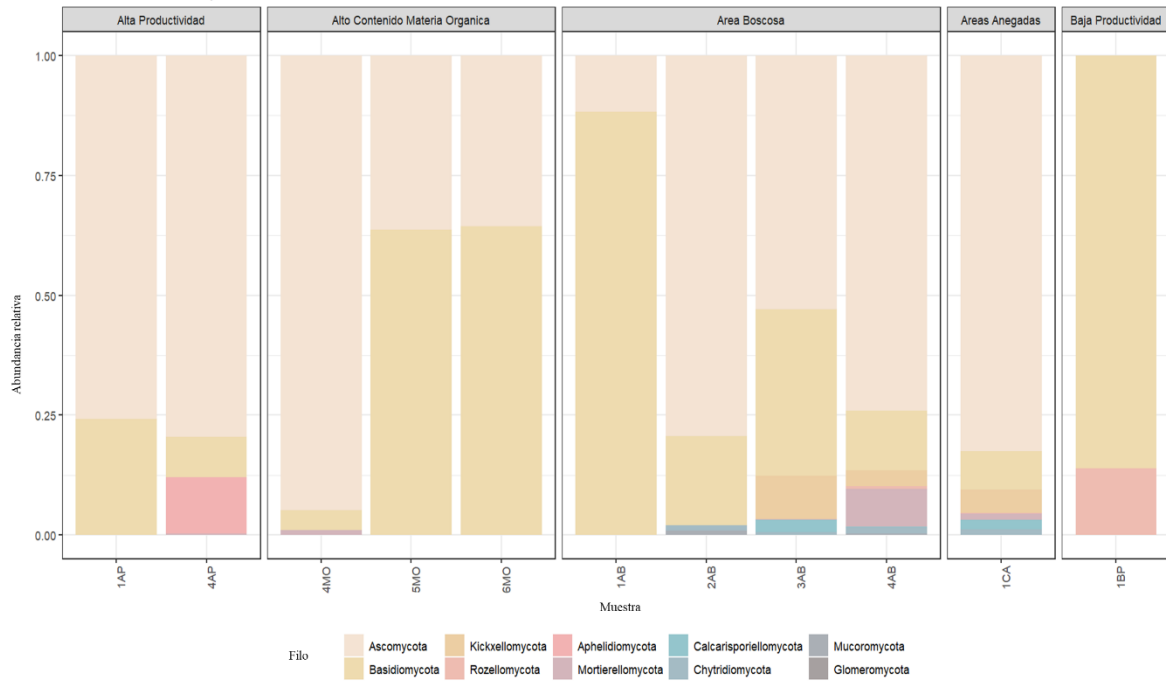
Cuadro 6: Metadata reportada por Ingenio Magdalena sobre los sitios de muestreo para las muestras de las que se obtuvieron resultados de secuenciación. En la columna área, la *B* se refiere a un “Área Boscosa” y *C* a un “Área cultivada”. La columna “Variedad” contiene la variedad de caña de azúcar sembrada en el terreno.

<i>Muestra</i>	<i>Área (B/C)</i>	<i>Tipo</i>	<i>Finca</i>	<i>Región</i>	<i>Variedad</i>	<i>pH</i>
1AB	B	Área Boscosa	Velásquez	Central Norte	NA	NA
1AP	C	Alta Productividad	San Patricio	Central Norte	CP01-1341	6.77
1BP	C	Baja Productividad	Buganvilia	Central Norte	SP83-2847	7.5
1CA	C	Áreas Anegadas	California	Central Sur	CG02-163	7.19
2AB	B	Área Boscosa	Velásquez	Central Norte	NA	NA
3AB	B	Área Boscosa	Ojo de Agua	Central Sur	NA	NA
4AB	B	Área Boscosa	Luceros	Central Norte	NA	NA
4AP	C	Alta Productividad	Remanzo II	Central Sur	CP01-1564	6.6
4MO	C	Alto Contenido Materia Orgánica	Kenya	Central Sur	SP716161	6.9
5MO	C	Alto Contenido Materia Orgánica	Velásquez	Central Norte	CG02-163	5.87
6MO	C	Alto Contenido Materia Orgánica	Mandelville II	Oriente Centro	CP01-1341	5.9

Cuadro 7: Conteo de lecturas de salida tras cada uno de los pasos del *Denoising* y *clustering* de las lecturas obtenidas para la región. Las columnas “*Denoised*” se refiere al número de secuencias restantes para la muestra tras la eliminación de secuencias redundantes.

<i>Región</i>	<i>Muestra</i>	<i>Entrada</i>	<i>Filtradas</i>	<i>Denoised Forward</i>	<i>Denoised Reverse</i>	<i>Fusionadas</i>	<i>No quiméricas</i>
ITS1	1AB	244330	2021	2011	1987	1644	1644
	1AP	110170	2020	1994	1954	1416	1398
	1BP	95264	421	412	392	379	379
	1CA	217270	41875	41514	41210	35854	33962
	2AB	313534	1891	1686	1500	1182	1182
	3AB	177956	23963	23657	23262	21056	19815
	4AB	168575	44360	43552	42890	30187	30029
	4AP	240744	10709	10668	10580	10238	9959
	4MO	92343	24014	23928	23844	21397	20442
	5MO	280244	271	263	261	187	187
ITS2	6MO	272459	534	531	531	363	363
	1AB	43717	14268	14266	14250	13283	13283
	1AP	146297	1585	1578	1570	1242	1242
	1CA	88832	4079	3947	3829	2136	2136
	2AB	196680	31262	30781	30531	25325	24407
	3AB	88312	1975	1807	1674	1094	1094
	4AB	113742	3145	2823	2566	1804	1804
	5MO	37135	4324	4316	4307	3937	3937
6MO	45315	18099	18091	18088	16161	15820	

A. Amplicón ITS1



B. Amplicón ITS2

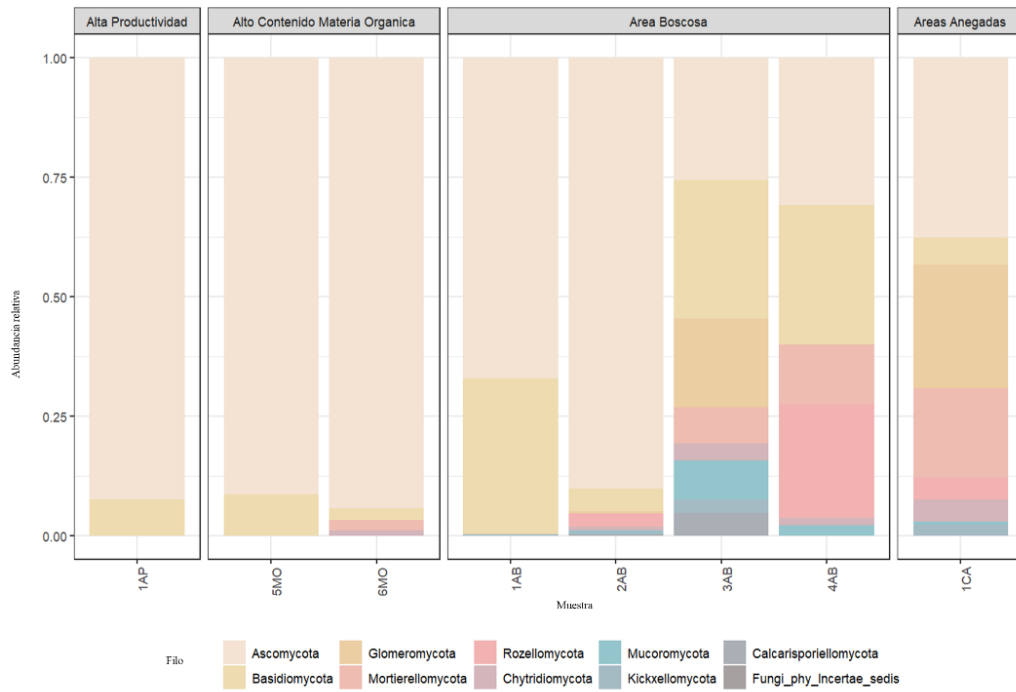
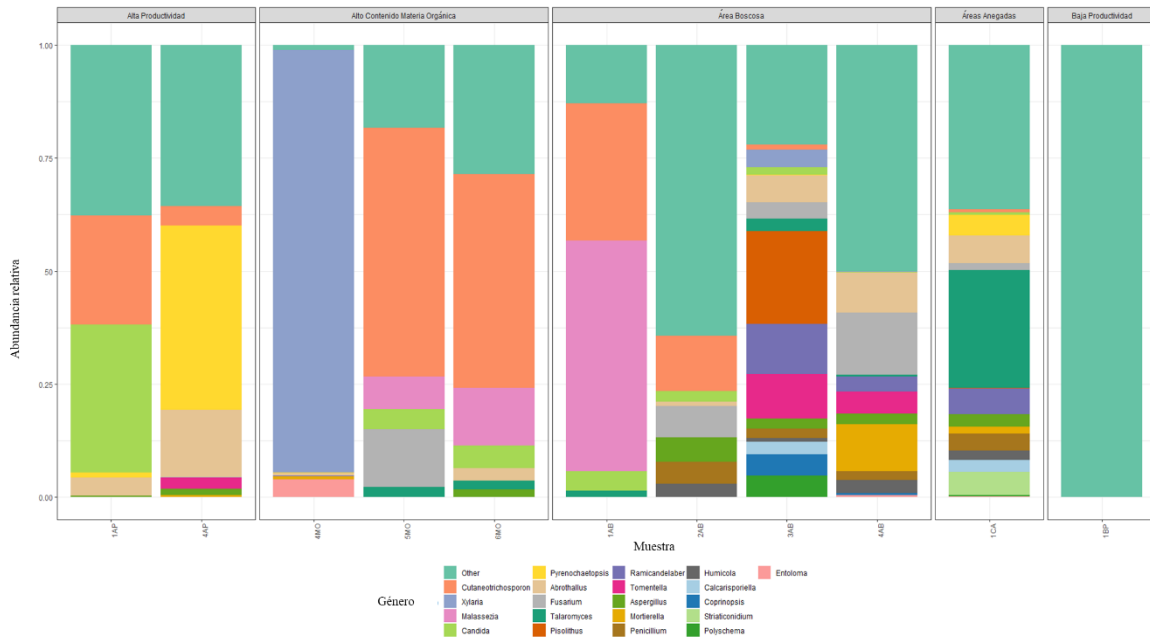


Figura 9: Abundancia relativa de los 10 fillos más comunes por muestra de acuerdo con la secuenciación de ITS2, agrupadas de acuerdo con el tipo de muestra.

A. Amplicón ITS1



B. Amplicón ITS2

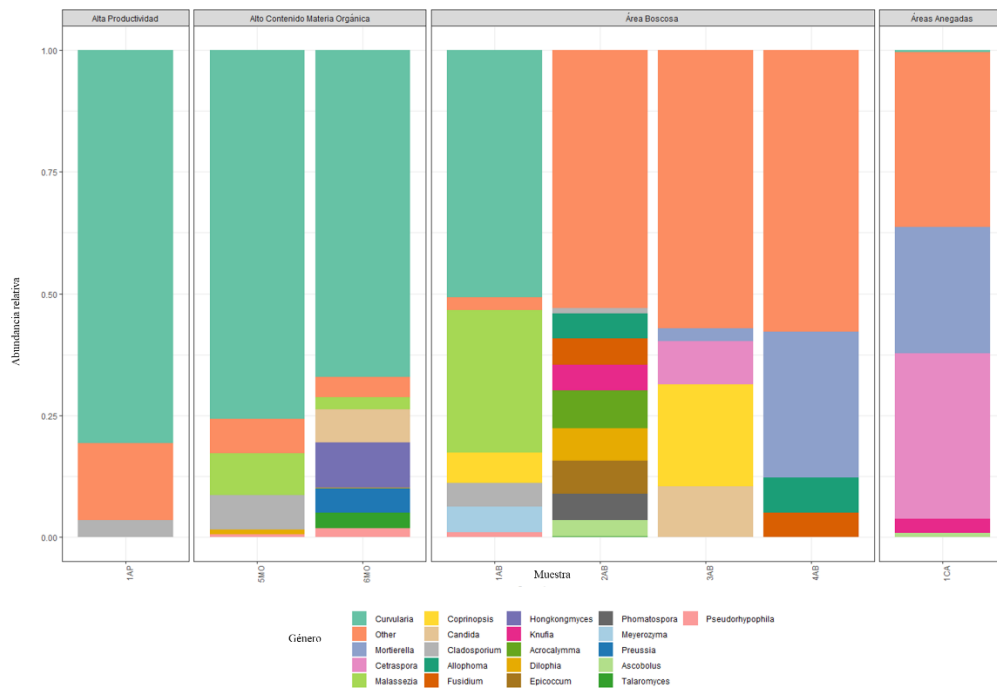
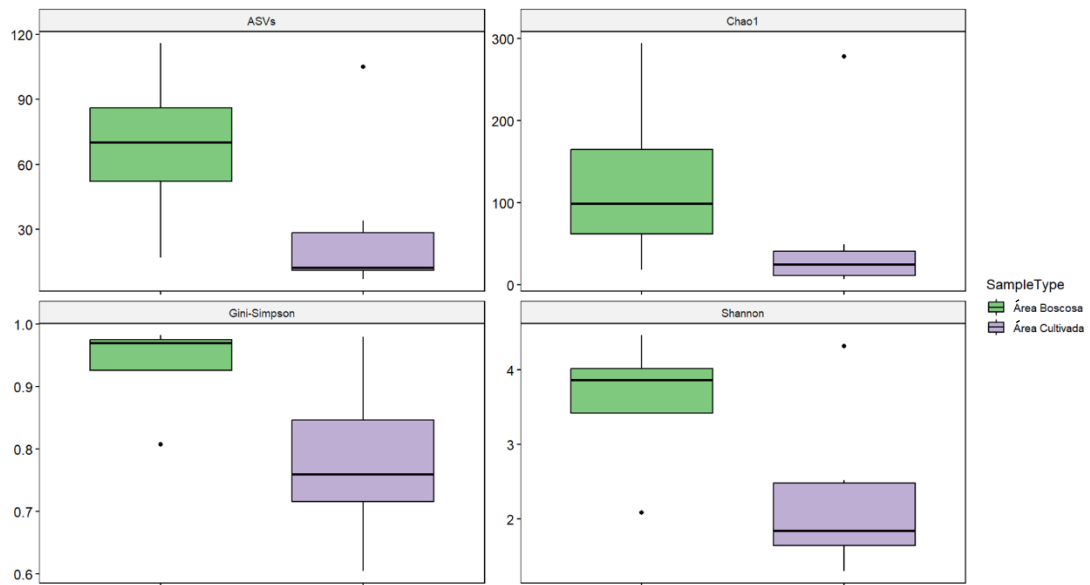


Figura 10: Abundancia relativa de los 19 géneros más comunes para ambos amplicones por muestra, agrupadas por tipo de muestra. El género que apareció con más frecuencia entre las secuencias de ITS1 fue *Cutaneotrichosporon spp.*, mientras que para ITS2 fue *Curvularia spp.*

En la Figura 9 se puede observar que el filo prevalente entre las muestras con ambos amplicones fue *Ascomycota*, seguido por *Basidiomycota*. Del tercer filo más común en adelante, los resultados con cada amplicón difirieron. Los 5 géneros más abundantes al analizar las muestras para las que se obtuvieron datos de secuenciación de ITS1 fueron *Cutaneotrichosporon*, *Xylaria*, *Malassezia*, *Candida* y *Pyrenochaetopsis*; mientras que para las muestras con secuenciación ITS2 fueron *Curvularia*, *Mortierella*, *Cetraspora*, *Malassezia* y *Coprinopsis*, tal y como se muestra en la Figura 10.

Para el paso de rarefacción de las muestras previo a los cálculos de índices de diversidad se utilizó un tamaño de submuestreo de 187 para ITS1 y de 1094 para ITS2, correspondientes al menor número de secuencias en cualquiera de las muestras (ver Cuadro 5). No se excluyó ninguna de las muestras en los cálculos. Tras el submuestreo aleatorio, 1031 ASVs dejaron de estar presentes en cualquiera de las muestras para ITS1 y 700 para las muestras con para ITS2. La Figura 11 muestra que el número de taxones (ASVs) y el valor de los índices de Gini-Simpson y Shannon fue mayor entre las muestras provenientes del área boscosa que del área cultivada. El gráfico PCoA para las distancias de Bray-Curtis entre las muestras no muestra agrupamiento según ninguna de las variables presentes en la metadata, como se observa en la Figura 12.

A. Amplicón ITS1



B. Amplicón ITS2

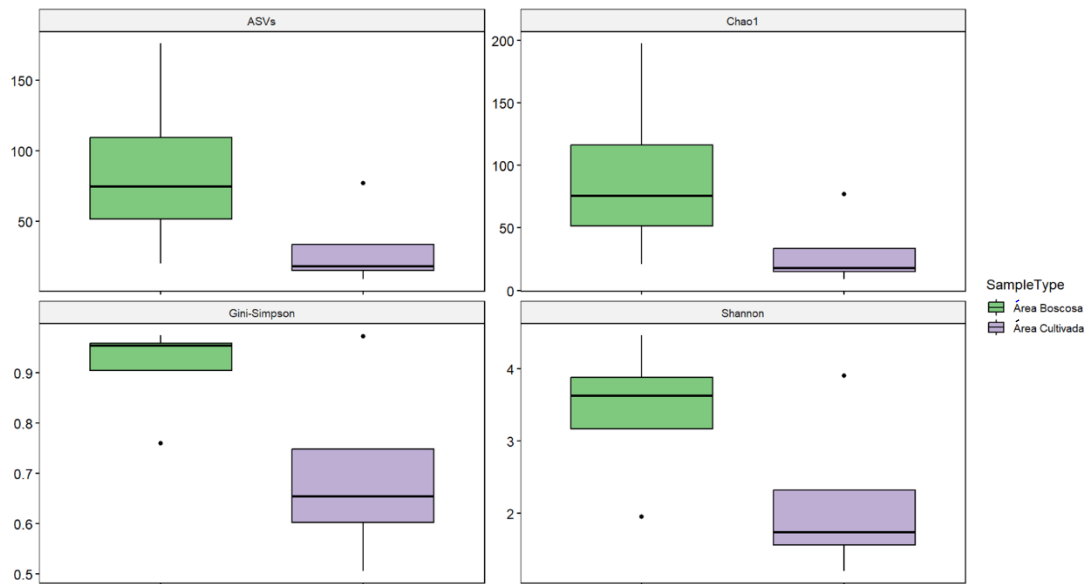


Figura 11: Métricas de diversidad alfa para las muestras evaluadas según el uso del área. Número de ASVs, índice Chao1, índice de Gini-Simpson e índice de Shannon.

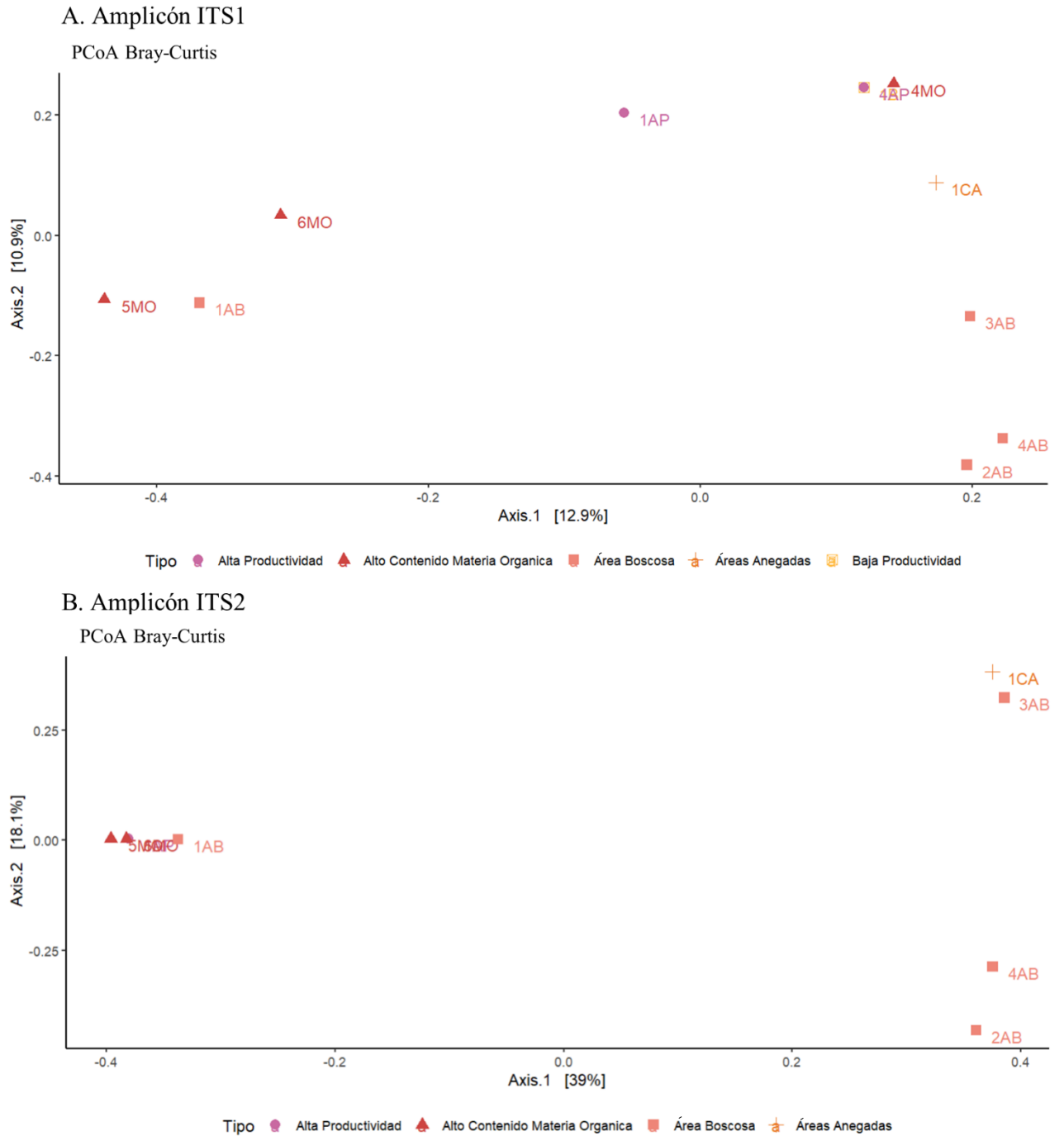


Figura 12: Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de las distancias de Bray-Curtis entre las muestras analizadas para ITS1 e ITS2.

6.2. Caracterización de las cepas aisladas

Se obtuvo un total de 45 cepas del proceso de aislamiento y purificación, provenientes de 15 de las muestras de suelo. Se encontró que las cepas con más resultados positivos para las actividades probadas fueron las siguientes: 4AP14, 4MO12, 4MO13, 5MO16, 5MO17, 2AB21 y 1CA10. La solubilización de fósforo fue la actividad para la que se obtuvo un mayor número de resultados positivos (40), mientras que la producción de lipasas fue la actividad para la cual se obtuvo un menor número de positivos (10). Entre las cepas identificadas los géneros más prevalentes fueron *Penicillium* y *Aspergillus*.

Cuadro 8: Resultados de la siembra en medios diferenciales para la identificación de actividades de interés. La última fila representa la sumatoria de muestras positivas para cada una de las actividades evaluadas. Se resalta con un asterisco rojo las muestras que obtuvieron un resultado positivo para 5 y 6 actividades. Las abreviaturas corresponden a las actividades de la siguiente manera: P → Solubilización de fósforo, K → Solubilización de potasio, Prot → Producción de proteasas, Lip → Producción de lipasas, Qui → Producción de Quitinasas y Glu → Producción de gluconasas. Las siglas NI indican que las observaciones morfológicas obtenidas no bastaban para identificar la cepa.

Cepa	Género tentativo	P	K	Prot	Lip	Qui	Glu
1AP28	<i>Cladosporium sp.</i>	+	-	+	-	-	+
1AP29	NI	-	-	-	+	-	-
1AP30	<i>Fusarium sp.</i>	+	-	-	-	-	+
1AP31*	NI	+	+	+	-	+	+
3AP28	<i>Stachybotrys sp.</i>	+	+	-	-	+	-
4AP14*	<i>Cladosporium sp.</i>	+	+	+	+	+	+
1MO28	<i>Aspergillus sp.</i>	+	+	+	-	-	-
1MO29	<i>Aspergillus sp.</i>	+	-	-	-	+	+
1MO31	<i>Penicillium sp.</i>	+	-	-	-	-	+
1MO32	<i>Oedocephalum sp.</i>	+	+	+	-	-	+
1MO34	<i>Penicillium sp.</i>	+	-	-	-	-	+
1MO36	NI	-	+	-	-	+	-
4MO12*	<i>Penicillium sp.</i>	+	+	+	-	+	+
4MO13*	<i>Penicillium sp.</i>	+	+	+	-	+	+
4MO14	<i>Penicillium sp.</i>	+	+	-	-	-	-
4MO17	<i>Aspergillus sp.</i>	+	+	+	-	-	-
5MO16*	<i>Chrysosporium sp.</i>	+	+	+	-	+	+
5MO17*	<i>Penicillium sp.</i>	+	+	+	-	+	+
5MO18	NI	+	-	+	-	+	+
5MO19	<i>Ulocladium sp.</i>	+	-	+	-	+	+
5MO20	<i>Streptomyces sp.</i>	+	+	+	-	-	+
6MO10	<i>Pithomyces sp.</i>	+	+	-	-	+	+
6MO11	NI	+	+	-	-	-	-
6MO12	NI	+	+	-	-	+	-

Cepa	Género tentativo	P	K	Prot	Lip	Qui	Glu
1BP24	<i>Penicillium sp.</i>	+	-	-	-	+	+
1BP25	<i>Penicillium sp.</i>	+	-	-	-	+	+
2BP18	<i>Acremonium sp.</i>	+	-	-	+	+	+
3BP18	<i>Aspergillus sp.</i>	+	+	+	-	-	+
3BP19	<i>Aspergillus sp.</i>	+	+	-	+	-	+
3BP21	NI	+	+	+	-	-	-
3BP22	NI	+	+	-	-	-	+
3BP23	<i>Cladosporium sp.</i>	+	-	-	-	-	+
3BP24	NI	+	-	-	-	-	-
3BP25	NI	+	-	+	+	-	+
3BP26	NI	-	+	+	+	-	+
4BP13	NI	+	-	-	-	+	-
2AB21*	<i>Geomyces sp.</i>	+	+	+	+	-	+
2AB23	<i>Penicillium sp.</i>	+	-	-	-	+	+
3AB10	<i>Penicillium sp.</i>	+	-	-	-	+	+
4AB8	NI	-	-	-	+	-	+
4AB9	<i>Aspergillus sp.</i>	+	-	-	-	+	+
1CA10*	<i>Penicillium sp.</i>	+	+	+	-	+	+
1CA11	<i>Penicillium sp.</i>	-	-	+	+	+	-
1CA13	<i>Orbilia sp.</i>	+	-	-	-	-	+
1CA14	<i>Geomyces sp.</i>	+	-	+	+	-	+
∑ +	-	40	23	21	10	22	33

Debido a que la cepa 1AP30 presentaba características morfológicas tanto a nivel macroscópico como microscópico de *Fusarium sp.*, un género conocido por contener a múltiples fitopatógenos, se realizó un PCR para evaluar si la cepa pertenecía a la especie *F. oxysporum* y más específicamente a la raza 4 de este, que no se ha reportado hasta la fecha en Guatemala. El resultado obtenido fue negativo para ambos amplicones.

Cuadro 9: Concentración y A260/280 del ADN extraído para el PCR para identificación de *F. oxysporum* y *F.oxysporum* raza 4.

Réplica	Concentración (ng/μL)	Pureza A260/280
1	85	1.42
2	140	1.71

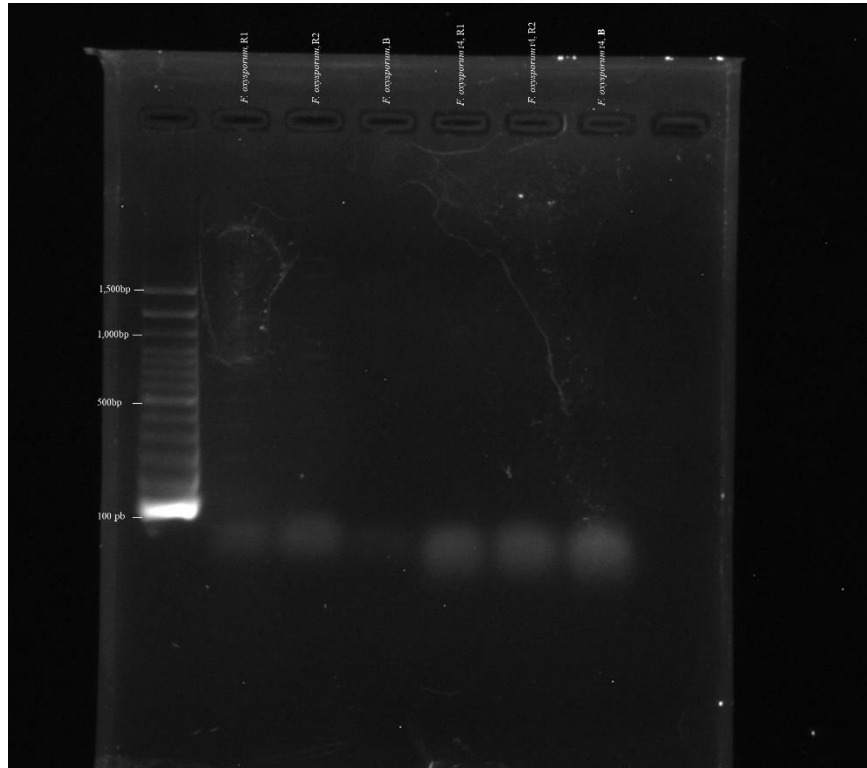


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de PCR para identificar *F. oxysporum* y *F. oxysporum* raza 4. Los pozos contienen, de izquierda a derecha: 1) Escalera 100kb, 2) Producto con objetivo *F. oxysporum* Réplica 1, 3) Producto con objetivo *F. oxysporum* Réplica 2, 4) Producto con objetivo *F. oxysporum* Blanco, 5) Producto con objetivo *F. oxysporum* raza 4 Réplica 1, 6) Producto con objetivo *F. oxysporum* raza 4 Réplica 2, 6)Producto con objetivo *F. oxysporum* raza 4 Blanco y 7) vacío.

7. DISCUSIÓN

El presente trabajo tenía por objetivo determinar la diversidad agrícola de suelos utilizados para el monocultivo de *S. officinarum* y de uso no agrícola, mediante un análisis metagenómico, así como conservar las cepas de hongos filamentosos presentes en el suelo con propiedades fenotípicas de interés agrícola. Para esto, se obtuvieron datos de secuenciación de ADN genómico de las regiones ITS1 e ITS2 que permitieron realizar un análisis de la abundancia relativa de los taxones presentes (Figuras 9 y 10), cálculo de métricas de diversidad alfa (Figura 10) y las distancias de Bray-Curtis entre las muestras de acuerdo con cada amplicón (Figura 11); así mismo, se caracterizaron y preservaron 45 cepas aisladas a partir de las muestras de suelo (Cuadro 8).

En el Cuadro 5 se detallan la concentración, el A260/280 y el A260/230 obtenidos para el ADN extraído de cada una de las 20 muestras de suelo. Para que se considere que una muestra tiene una pureza aceptable, su A260/280 debe encontrarse entre 1.6 y 2.1, mientras que el A260/230 debe estar entre 1.8 y 2.2 (Lucena-Aguilar, y otros, 2016). A pesar de haber utilizado un kit específico para suelos (*DNeasy PowerSoil Pro Kit*) y haber añadido un lavado con feno:cloroformo:alcohol isoamil, en la experimentación, se obtuvieron valores en el rango aceptable en ambos parámetros solamente para la muestra 1CA. Para A260/280 se obtuvieron valores aceptables en otras 11 muestras: 2AP, 4AP, 5AP, 2BP, 3BP, 4BP, 2MO, 4MO, 2AB, 3AB y 4AB. Los valores de A260/280 por debajo de 1.6 obtenidos indican contaminación principalmente con proteínas o bien, compuestos aromáticos, mientras que los A260/230 por debajo de 1.8 indica contaminación con sales, fenoles y otros compuestos orgánicos (Wnuk, y otros, 2020). Para la muestra con una concentración menor a 20ng/uL (1AP) hay que mantener en mente que la confiabilidad de las razones de pureza decae por debajo de dicha concentración en los espectrofotómetros de microvolumen, como el utilizado para realizar las mediciones (Koetsier & Cantor, 2019).

La baja pureza en el ADN extraído se atribuye principalmente a la presencia de ácidos húmicos (AH) en las muestras de suelo, compuestos orgánicos conocidos por su similitud en propiedades fisicoquímicas al ADN, provocando su co-extracción. Entre 0.7ug/uL y 3.3ug/uL de ácidos húmicos se pueden recuperar en una extracción típica de ADN. Su presencia se ve reflejada principalmente en la razón A260/230. Cabe mencionar, que estos compuestos se forman naturalmente en el suelo por la descomposición de biomasa y alojándose en el humus, por lo que los valores desfavorables aún en las áreas boscosas (no cultivadas) son consistentes con la presencia de estos compuestos (Matheson, 2010).

Los AH provocan la inhibición de la reacción de PCR, lo cual es desfavorable para la construcción de librerías requerida para la secuenciación por *metabarcoding* como la realizada en el presente estudio (Wydro, 2022). La inhibición se da debido a que estas sustancias orgánicas interfieren con la actividad de la enzima Taq Polimerasa (Matheson, 2010). Por lo tanto, la presencia de este contaminante puede ser responsable del fallo en la construcción de librerías que llevó a que no se tuvieran secuencias para las muestras 1MO, 2AP, 2BP, 2MO, 3AP, 3BP, 3MO, 4BP y 5AP. Sin embargo, este factor por sí mismo no es suficiente para explicar el fallo en la secuenciación, ya que muestras con valores cercanos a los aceptables o aceptables para A260/280 y con una concentración considerable, por

ejemplo 5AP, no tuvieron datos de secuenciación mientras que otros con menor concentración y que no llegaban al rango aceptable para A260/280 ni A260/230 sí permitieron obtener la secuenciación, por ejemplo 1AP. Para todas las muestras provenientes del área boscosa se obtuvieron datos de secuenciación tanto ITS1 como ITS2, mientras que para ninguno de los otros tipos de suelo se obtuvo secuenciación de todas las muestras, lo que sugiere que algún componente agregado al suelo durante los ciclos de cultivo podría ser otro responsable de la inhibición de los PCR para la construcción de librerías. Para solucionarlo, se propone la optimización de otro método de extracción, como los métodos manitol-PBS-PEG/NaCl, manitol-PBS-PCI, manitol-PBS-CTAB (Fatima, Pathak, & Ratogi, 2014) o el “Protocolo D” del estudio desarrollado por Basim y colaboradores (2020). Además, se pueden agregar pasos de posteriores a la extracción, como la adición de más ADN-polimerasa, o retirar los ácidos húmicos mediante una electroforesis en gel de agarosa, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de filtrado por gel o quelación con distintitos compuestos (Matheson, 2010) para retirar los remanentes de AH de la muestra previo a su secuenciación.

En el Cuadro 7 se muestra el número de secuencias obtenidas tras cada uno de los pasos del *Denoising* y *clustering*. Se puede observar que la mayor parte de las remociones de secuencias se realizaron durante el primer paso: el filtrado, en el cual se descartan todas las secuencias que contengan al menos un nucleótido incierto (N). La calidad de la mayoría de las secuencias decayó alrededor de los 100 ciclos para ITS1 y cerca de los 300 para ITS2, como se observa en la Figura 19 del apéndice, por lo que la longitud de las secuencias utilizadas en adelante para ITS2 fue generalmente mayor que para ITS1. Esto se ve también reflejado en la Figura 16, donde se observa que el porcentaje de lecturas con $30 \geq Q$ y $Q \geq 20$ por muestra, siendo las de peor calidad 1BP, 5MO y 6MO para ITS1, obteniendo alrededor de un 50% de secuencias con $Q \geq 30$, mientras que el control reportado por Illumina para el sistema *MiSeq* es de 89.7% de las bases con $Q \geq 30$ (Illumina, Inc., 2011). Para estas tres muestras se obtuvieron menos de 1000 secuencias tras el paso de filtrado. Dentro de la metadata (Cuadro 6) y la información recopilada sobre la extracción (Cuadro 5) no hay ninguna variable que permita agrupar estas tres muestras para explicar la mala calidad de las lecturas obtenidas. Algunos factores que impactan el valor de calidad de las bases en la secuenciación son la interferencia espacial, las bases en las posiciones vecinas y el número de ciclos de la posición leída en el momento (Zhang, Wang, Wan, & Li, 2017).

En la Figura 9 se muestran los filos más prevalentes en cada una de las muestras, tanto para ITS1 como ITS2. Con ambos *barcodes* el filo más abundante fue *Ascomycota*, seguido por *Basidiomycota*. Esto es congruente con lo reportado en la literatura, ya que se ha encontrado que en los suelos alrededor del mundo el filo *Ascomycota* es predominante (Egidi y otros, 2019; Talbot y colaboradores, 2014; Maestre y otros, 2015). No se observó que agrupando las muestras según alguna de las variables reportadas en la metadata de las muestras fuera evidente un patrón para diferenciar la prevalencia de distintos filos y esto es parcialmente congruente con lo reportado en la literatura, ya que se ha encontrado que las propiedades del suelo no son buenas predictoras de la abundancia relativa de los taxones fúngicos dominantes, por lo que el pH no sería un predictor adecuado. El clima por otro lado es un buen predictor de la composición de las comunidades fúngicas (Egidi, y otros, 2019). Aunque no se cuenta con información sobre variables climáticas, se infiere que todas las muestras provenientes de áreas cultivadas estarían sometidas a condiciones

climáticas similares, teniendo en cuenta que todas las muestras provienen de la costa sur del país. A pesar de esto, no se encontró que las muestras de las áreas cultivadas se diferenciaron de las muestras provenientes de áreas boscosas.

La Figura 10 muestra los principales géneros identificados por muestra para los dos amplicones utilizados. Se encontró que los 5 géneros más abundantes para ITS1 fueron (en orden descendente): *Cutaneotrichosporon*, *Xylaria*, *Malassezia*, *Candida* y *Pyrenochaetopsis*. Los géneros más abundantes en ITS2 fueron *Curvularia*, *Mortierella*, *Cetraspora*, *Malassezia* y *Coprinopsis*. Entre los 20 géneros más comunes de ITS1 e ITS2 solo se encontraron 5 en común: *Candida*, *Coprinopsis*, *Malassezia*, *Mortierella* y *Talaromyces*. Llama la atención del autor que *Aspergillus* sea uno de los géneros presentes entre los 20 más prevalentes de ITS1 y no ITS2 ya que Rolling y colaboradores (2022) observaron un sesgo al utilizar los parámetros estándar en el paso de filtrado con dada2 en secuencias ITS1 que resultaba en un descarte de las lecturas para organismos de ese género. Adicionalmente, destaca la presencia de *Fusarium* como uno de los géneros más presentes al utilizar ITS1, ya que es conocido porque 4 de las especies pertenecientes a este género (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. fujikuroi* y *F. graminearum*) son fitopatógenas (Arie, 2019). *Mortierella* y *Fusarium* se han reportado como dominantes en los suelos suplementados con fertilizantes nitrogenados, fosforados o de potasio. A pesar de no encontrarse dentro de los géneros más abundantes, cabe recalcar la presencia de hongos arbusculares micorrízicos de los géneros *Glomus* y *Scutellospora*, así como el género de biocontroladores *Trichoderma* (ver incisos 10.3.4 y 10.3.5 de anexos) (Frac, Hannula, Belka, & Jedryczka, 2018).

En la Figura 11 se plasman los valores obtenidos para la riqueza de la muestra (ASVs), la riqueza estimada basada en las abundancias (Chao1), índice de diversidad de Gini-Simpson e índice de diversidad de Shannon (Zeleny, 2021). Ambos índices de diversidad consideran tanto la riqueza de especies presente y la uniformidad de las abundancias. Lo que los diferencia es que el índice de diversidad de Shannon proporciona más peso a la riqueza y el de Gini-Simpson a la uniformidad (Kim, y otros, 2017), por lo que se estimó oportuno reportar ambos valores. Se encontró que tanto la riqueza como la diversidad de las muestras fue en promedio mayor entre las muestras provenientes de las áreas boscosas que de las áreas cultivadas. Esta observación se asemeja a la realizada por Shi y colaboradores (2020), quienes encontraron que en suelo utilizado para el monocultivo de lirios durante 6 y 9 años la diversidad era significativamente menor que en el suelo no utilizado para el monocultivo o utilizado de esta manera durante 3 años.

El dato atípicamente bajo en los índices de diversidad alfa de las áreas boscosas corresponde a la muestra 1AB para ITS1 e ITS2. En las muestras provenientes de áreas cultivadas, el valor atípicamente alto en ASVs, Chao1 e índice de Shannon corresponde a la muestra 1CA para ITS1 e ITS2 (inciso 10.3.6 de anexos). El suceso de una diversidad atípicamente alta de 1CA al compararla con las demás muestras provenientes de áreas cultivadas es similar a lo encontrado por Huang y colaboradores (2015), ya que obtuvieron un índice de Shannon indicando una mayor diversidad en muestras de suelo tratado con una “inundación” que previo a este tratamiento. A pesar del aumento de diversidad, es importante tener en cuenta que la privación de oxígeno provocada por la inundación reduce la prevalencia de micorrizas arbusculares (Ellis, 2013) y taxones bacterianos potencialmente benéficos para el cultivo (Francioli, y otros, 2021).

En la Figura 12 están plasmados los PCoAs obtenidos a partir de las distancias de Bray-Curtis de los conjuntos de muestras ITS1 e ITS2, reflejando la β -diversidad. Se esperaba observar que alguna de las variables registradas en la metadata pudiera explicar la agrupación de las muestras para ambos amplicones. Esto, debido a que estudios han mostrado una influencia significativa de la distribución espacial y características físicas como la capacidad de retención de agua y el pH en la β -diversidad de los suelos (Orgiazzi y otros, 2013; Kim y otros, 2017). Sin embargo, ninguna de las variables reportadas en la metadata parece explicar la agrupación de las muestras. La falta de agrupación de las muestras según la región del ingenio en la que se encuentran se puede deber a la poca distancia entre los puntos de muestreo al comparar con otros estudios, así como la uniformidad en el trato del terreno cultivado, ya que el manejo ha mostrado tener un efecto en la β -diversidad de los suelos (Guo, y otros, 2022). A pesar de las diferencias en la diversidad alfa, las muestras provenientes de las áreas boscosas del ingenio no parecen agruparse en un *cluster* independiente de las demás muestras, haciéndose notoria la lejanía de 1AB respecto a las otras tres muestras de áreas boscosas. Es importante mencionar que a lo largo de la literatura la β -diversidad de las plantas en un ecosistema han destacado como predictor de la diversidad (Shen y colaboradores, 2021; Liu *et.al.*, 2022; Wang *et.al.*, 2017). Aunque este parámetro no fue evaluado a través de la experimentación, se infiere que por tratarse de un área de monocultivo la diversidad de especies vegetales presentes es escasa. Por lo tanto, se estima oportuno enriquecer la metadata de las muestras con secuenciación con valores más recientes de contenido de materia orgánica y de nutrientes como NH_4^+ , diversidad de las plantas del ecosistema u otras (McGee, Eaton, Porter, Shokralla, & Hajibabaei, 2019).

Durante el proceso de análisis se observaron algunas diferencias entre los resultados obtenidos con el amplicón ITS1 y el amplicón ITS2. Para las secuencias ITS1 se obtuvo un promedio de 10,851 lecturas tras el proceso de *Denoising* y *clustering* con tres muestras debajo de 1000 lecturas, mientras que se obtuvieron en promedio 7965 para las secuencias ITS2. Además, utilizando ITS1 se obtuvo un mayor número de ASVs para las muestras. Ambas observaciones son consistentes con lo encontrado por Mbareche y colaboradores (2020) entre muestras de bioarsoles en plantas de compostaje. Dichos autores también mencionan que la región elegida como *barcode* en un análisis fue un mejor predictor del contenido microbiano encontrado en las muestras que el ambiente del que fueron tomadas. Con esto en mente, se considera recomendable el abordaje de los estudios en los que los resultados del *metabarcoding* con ambas regiones se utilizan de manera complementaria para reportar los taxones presentes en las muestras y su diversidad, como el desarrollado por McGee y colaboradores (2019) en suelos de reservas costarricenses, el publicado por Hamad y colaboradores (2017) reportando sobre la población fúngica en el tracto gastrointestinal humano y el desarrollado por Orgiazzi y colaboradores (2013) con muestras de suelo en locaciones italianas y francesas.

A través de procedimientos de microbiología clásica, se obtuvieron cepas de hongos filamentosos de 15 de las 20 muestras de suelo recolectadas. Las muestras de las que no se obtuvieron cepas fueron: 2AP, 2MO, 3MO, 2BP y 1AB. Esto se debe a que al realizar la siembra de las diluciones seriadas no se obtuvieron colonias de hongos filamentosos con las cuales seguir el proceso, sino que solamente de colonias de levaduras y en el caso de 2AP de una colonia bacteriana resistente al cloranfenicol. El presente estudio se centró en el aislamiento de hongos filamentosos, excluyendo a las levaduras debido a que, dentro del

estudio de los microorganismos promotores del crecimiento de las plantas, son géneros de hongos filamentosos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* los que se han reportado con más frecuencia y estudiado con más profundidad (Argumendo-Delira, Gómez-Martínez, & Mora-Delgado, 2022), dando un mejor fundamento a su eventual uso como biofertilizantes (O'Callaghan, Ballard, & Wright, 2022).

Se obtuvo un total de 45 cepas de hongos filamentosas, de las cuales 32 lograron ser identificadas a nivel de género a partir de observaciones de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas, asignándolos a 13 géneros distintos. Entre los géneros encontrados, los más abundantes fueron *Penicillium* (11) y *Aspergillus* (6). La abundancia de estos géneros entre los aislados de suelo de diversos tipos es consistente a través de la literatura (Yakop, Taha y Shivanand, 2019; Islam *et al.*, 2019; Aziz & Zainol, 2018; Oliveira *et al.*, 2013). Si bien estos géneros no se encontraban entre los 5 más abundantes para ninguno de los dos amplicones analizados, sí se encontraban entre los 20 más prevalentes al analizar las muestras con la región ITS1. El número de cepas obtenidas se asemeja al obtenido por Elias y colaboradores (2016) en suelo utilizado para el cultivo de caña de azúcar en Etiopía, ya que reportaron el aislamiento de 60 cepas de mohos a partir de 30 muestras de suelo, mientras que en el presente estudio se obtuvieron 45 cepas a partir de 20 muestras, de manera que en ambos casos se obtuvieron aproximadamente 2 cepas por muestra de suelo.

En el Cuadro 8 se pueden observar los resultados obtenidos para cada una de las cepas aisladas y sembradas en los medios diferenciales para las seis actividades evaluadas. La actividad para la que se obtuvo un resultado positivo con mayor frecuencia fue la solubilización de fosfato, estando presente en 40 de las 45 cepas aisladas (88%). Esta proporción es mayor que la obtenida en otro estudio en el que se aislaron mohos a partir de suelos de la rizosfera de distintas plantas y encontraron que la prevalencia de esta actividad entre las cepas aisladas de suelo usado para el cultivo de caña de azúcar fue del 42% (Elias, Woyessa, & Muleta, 2016). Esto es de sumo interés para el desarrollo de biofertilizantes no solo para su aplicación en Ingenio Magdalena, sino que en suelos cultivables en general debido a que su contenido de fósforo en forma biodisponible para las plantas es con frecuencia bajo (George, Hinsinger, & Turner, 2016) y la aplicación de fertilizantes convencionales es ineficiente debido a que forman rápidamente complejos que dejan a la planta sin acceso al nutriente (Roy, y otros, 2016). Por esta razón, la solubilización de fosfatos es una de las características más estudiadas en los microorganismos y ya se han formulado biofertilizantes comerciales con cepas fúngicas con esta capacidad, como *Jumpstart LCO* que contiene *Penicillium bilaii* (Soumare, y otros, 2020).

Un total de 23 de las cepas aisladas mostraron capacidad para la solubilización de potasio, pertenecientes a 9 distintos géneros. En la literatura se han reportado principalmente cepas de hongos solubilizadores de potasio del género *Aspergillus*, al que se le suman otros como *Penicillium*, *Gongronella*, *Trichoderma*, *Paeceiomyces*, *Talaromyces* y *Tolurasporea* (Haro & Benito, 2019; Trivedi, Kalkar & Shanware, 2016; Maity & Sharma, 2019; Marwanto *et al.*, 2020; Mariani, 2022). De los mencionados, solamente *Aspergillus* y *Penicillium* se encuentran entre las cepas positivas para esta actividad dentro del presente estudio. A pesar de que el potasio es uno de los nutrientes principales que requieren las plantas para su desarrollo, la investigación de microorganismos solubilizadores de este nutriente es escasa en comparación con la

realizada sobre otros nutrientes como nitrógeno y fósforo. Sin embargo, es recomendable profundizar en la caracterización y ensayos cuantitativos de hongos solubilizadores de potasio, ya que la aplicación de fertilizantes químicos para *suplementar* el contenido de este nutriente es poco eficaz y su acumulación puede poner en serio peligro la salud humana y el ambiente (Haro & Benito, 2019).

Se encontró que 22 de las cepas aisladas eran productoras de quitinasas y 33 cepas productoras de gluconasas. La producción de ambos tipos de enzima es de interés porque posiciona a las cepas como potenciales agentes biocontroladores. La producción de quitinasas es relativamente común entre los hongos filamentosos, se estima que en su genoma están codificadas entre 10 y 20 distintas quitinasas (Goughenour, Whalin, Slot, & Rappleye, 2021) y estas han sido reportadas en numerosos géneros, incluyendo *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Bauveria*, *Matarhizium* y otros que pueden tener actividad antifúngica o entomopatógena contra fitopatógenos (Poria, y otros, 2021). Las cepas positivas para la producción de quitinasas pertenecen potencialmente a los siguientes géneros: *Stachybotrys*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chrysosporium*, *Ulocladium*, *Pithomyces* y *Acremonium*. En cuanto a las productoras de gluconasas, es importante mencionar que en el presente estudio se tomaron como positivas todas cepas que tuvieron crecimiento en el medio debido a que la única fuente de carbono era CMC (Celulosa Caboximetil), sin embargo en la mayoría de literatura consultada el criterio utilizado es la formación de un halo transparente agregando el indicador rojo de Congo después del crecimiento de la colonia, por lo que si bien los resultados son válidos pues reflejan la capacidad de la cepa de utilizar CMC como fuente de carbono, lo que implica la presencia de enzimas capaces de degradarlo, pueden no ser del todo comparables con los obtenidos por otros estudios. La producción de gluconasas ha sido reportada en los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Acremonium*, *Aphanocladium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Geomyces*, *Penicillium*, *Corticium*, *Wadomyces* y otros (Burtseva *et al.*, 2003; Sukmawati, Dellanerra & Risandi, 2018; Martin *et al.*, 2007). De los géneros anteriormente mencionados, entre las cepas evaluadas en la experimentación de este trabajo se encontró producción de gluconasas en los siguientes: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Fusarium* y *Geomyces*.

Las últimas dos actividades evaluadas en las cepas aisladas fueron la producción de enzimas proteasas y lipasas. Se encontró que 21 de las cepas eran productoras de proteasas y 10 de lipasas, siendo estas las 2 actividades menos frecuentes entre las evaluadas. La producción de proteasas se considera relevante para promover el crecimiento de las plantas debido a que los aminoácidos son una fuente de nitrógeno para los organismos vegetales y las moléculas de proteína no son directamente accesibles para las plantas (Adamczyk, Smolandes, Kitunen, & Godlewski, 2010), además de ser un mecanismo de defensa contra patógenos al igual que las lipasas (Glick, 2012). Los hongos filamentosos se caracterizan por su elevada capacidad de producción de proteasas, entre los que destaca *Aspergillus* sp. así como *Penicillium* y *Fusarium* (El-Gendi, y otros, 2022). Entre las cepas productoras de proteasas se encuentran efectivamente tres cepas identificadas como *Aspergillus* sp., así como *Cladosporium* sp., *Oedocephalum* sp., *Penicillium* sp., *Chrysosporium* sp., *Ulocladium* sp., *Streptomyces* sp. y *Geomyces* sp. En cuanto a las lipasas, se han reportado cepas productoras pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Arthrographis*, *Rhodosporidium*, *Marasmius*, *Trametes* y *Daedalea* (El-Gendi y otros, 2022; Peraza-Jiménez y otros, 2022). Entre las cepas identificadas que producían lipasas

observadas se encuentran los géneros *Cladosporium*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Geomyces* y *Penicillium*.

Se debe destacar que, si bien el principal enfoque de este estudio se encuentra en el potencial como biofertilizantes o biocontroladores de las cepas aisladas, la producción de enzimas por parte de algunas de las cepas también podría ser estudiada y optimizada para su aplicación a nivel industrial (El-Gendi, y otros, 2022).

Para la cepa 1AP30 se realizó un PCR para determinar si pertenecía a la especie *F. oxysporum* y más específicamente a *F. oxysporum* cubense raza 4 (R4T), debido a que presentaba características morfológicas correspondientes al género *Fusarium* sp. Los fitopatógenos del género *Fusarium* para la caña de azúcar son *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. sacchari* y *F. andiyazi* (Yao y colaboradores, 2020; Lin y colaboradores, 2014), mas la presencia de *F. oxysporum* sería relevante para la agricultura del país debido a que R4T es “la mayor amenaza a nivel mundial para la producción de bananos y plátanos” (FAO, 2020), uno de los principales productos agrícolas de Guatemala. La electroforesis de los productos de PCR, Figura 11, muestra que no se obtuvieron bandas correspondientes a un resultado positivo para ninguno de los dos amplicones en la muestra ni el control negativo. No se utilizó un control positivo que corrobore la efectividad del proceso ya que no se contaba con una cepa para utilizar con este fin.

El método utilizado para la preservación de las cepas de hongos filamentosos había sido probada y mostrada efectiva para 8 de los 13 géneros encontrados entre las cepas: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Stachybotrys* y *Ulocladium*. En el artículo donde se detalla el método no se realizaron pruebas en los 7 géneros restantes. Sin embargo, en él todas las especies probadas “revivieron” hasta 24 meses después de la siembra (Al-Bedak, Sayed, & Hassan, 2019).

Para llegar a la formulación de un biofertilizante a partir de las cepas obtenidas durante el desarrollo de este estudio, se debe pasar a un enfoque cuantitativo de la detección de las actividades de interés detectadas. Así mismo, es importante delimitar un objetivo (i.e. antagonismo de un patógeno específico, disminución del uso de fertilizantes fosforados, etc.) para utilizarlo como un criterio de selección de las cepas en las que se realizarán más pruebas. En general, se identifican las cepas 1AP31, 4AP14, 4MO12, 4MO13, 5MO16, 5MO17, 1AB21 y 1CA10 son las de mayor potencial debido a que presentaron resultados positivos en 5 o 6 de las actividades evaluadas y se recomienda priorizar su identificación a nivel molecular.

Entre las limitaciones del presente estudio cabe mencionar la falta de metadata actualizada sobre la composición del suelo, que el número de muestras de cada tipo de suelo no permite evaluar con significancia estadística diferencia de medias entre los parámetros calculados y la falta de optimización de la extracción de ADN para obtener un producto sin contaminación, a pesar de haber utilizado un kit específico para suelo.

8. CONCLUSIONES

- El filo mayoritario entre los hongos del microbioma en las muestras de suelo evaluadas es *Ascomycota*. Los géneros mayoritarios para la secuenciación con ITS1 fueron: *Cutaneotrichosporon*, *Xylaria*, *Malassezia*, *Candida* y *Pyrenochaetopsis* y con ITS2: *Candida*, *Coprinopsis*, *Malassezia*, *Mortierella* y *Talaromyces*. La riqueza, así como los índices de diversidad de Gini-Simpson y de Shannon era mayor entre las muestras provenientes de áreas boscosas que las utilizadas para el cultivo de caña de azúcar. Al observar la diversidad beta en base a las distancias de Bray-Curtis entre las muestras, no se encontró que ninguna de las variables reportadas en la metadata permitiera agrupar a las muestras de la misma manera que se agrupan en base a su disimilitud.
- Se aislaron y caracterizaron 45 cepas de hongos filamentosos provenientes de 15 de las 20 muestras de suelo. Entre ellas, 8 (1AP31, 4AP14, 4MO12, 4MO13, 5MO16, 5MO17, 1AB21 y 1CA10) se consideran de especial interés por haber presentado resultados positivos para al menos 5 de las 6 actividades evaluadas (producción de proteasas, lipasas, gluconasas y quitinasas y solubilización de fósforo y potasio).
- Se obtuvo un cepario con 45 cepas de hongos filamentosos provenientes de suelos utilizados para el cultivo de caña de azúcar por Ingenio Magdalena.

9. RECOMENDACIONES

- Se sugiere la optimización del proceso de extracción de ADN a partir de muestras de suelo. En base a los valores de A260/230 reportados en la revisión realizada por Wydro(2022), se propone la comparación de los métodos manitol-PBS-PEG/NaCl, manitol-PBS-PCI, manitol-PBS-CTAB (Fatima, Pathak, & Ratogi, 2014) y el “Protocolo D” del estudio desarrollado por Basim y colaboradores (2020).
- Algunas estrategias que se pueden implementar para evitar la inhibición por la presencia de sustancias húmicas, teniendo en cuenta que la dilución de las extracciones puede no ser suficiente en los procesos *downstream* que requieren una masa determinada de ADN, son la adición de más ADN-polimerasa, o retirar los ácidos húmicos mediante una electroforesis en gel de agarosa, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de filtrado por gel o quelación con distintos compuestos (Matheson, 2010).
- Enriquecer la metadata para las muestras de las cuales se obtuvo secuenciación con datos actualizados sobre el contenido de materia orgánica y contenido de nutrientes, ya que alguna de estas variables podría ser predictora de la composición de las comunidades microbianas, por ejemplo, el contenido de NH_4^+ (McGee, Eaton, Porter, Shokralla, & Hajibabaei, 2019).
- Estudiar la composición de las comunidades microbianas del suelo en el período de zafra, ya que este conocimiento podría ser de interés para un tratamiento integral del suelo (Guo, y otros, 2022).
- Identificar a nivel molecular al menos las cepas 1AP31, 4AP14, 4MO12, 4MO13, 5MO16, 5MO17, 1AB21 y 1CA10 por su potencial para desarrollar, así como 1AP (*Fusarium* sp.) para determinar si se trata de una especie patógena para la caña.
- Resembrar las cepas preservadas, especialmente las 7 no identificadas como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Stachybotrys* o *Ulocladium* 12 meses o menos tras su preservación para asegurarse de conservar su viabilidad.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abarenkov, K., Zirk, A., Primann, T., Pöhönen, R., Inanov, F., Nilson, R., & Koljag, U. (16 de Octubre de 2022). *UNITE general FASTA release for Fungi*. doi:<https://dx.doi.org/10.15156/BIO/2483911>
- Adamczyk, B., Smolandes, A., Kitunen, V., & Godlewski, M. (2010). Proteins as nitrogen source for plants. *Plant Signaling & Behaviour*, 5(7), 817-819. doi:<https://doi.org/10.4161%2Fpsb.5.7.11699>
- Agroindustrias Successo. (2021). *Catálogo en Línea*. Obtenido de Agroindustrias Successo: <http://www.successo.bio/product/recuperador-de-la-biodiversidad-de-nuestros-suelos/>
- Aguilar, N. (2015). *Ficha Técnica del Cultivo de Caña de Azúcar*. Obtenido de SAGARPA: http://nutriciondebovinos.com.ar/MD_upload/nutriciondebovinos_com_ar/Archivos/File/CA%C3%91A_DE_AZ%C3%91ACAR_FICHA_T%C3%89CNICA.pdf
- Al-Bedak, O., Sayed, R., & Hassan, S. (2019). A new low-cost method for long-term preservation of filamentous fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. doi:10.1016/j.bcab.2019.101417
- Alexander, D., & Zuberer, D. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12, 39-45.
- Argumendo-Delira, R., Gómez-Martínez, M., & Mora-Delgado, J. (2022). Plant Growth Promoting Filamentous Fungi and Their Application in the Fertilization of Pastures for Animal Consumption. *Agronomy*, 12(12), 3033. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/agronomy12123033>
- Arie, T. (2019). Fusarium diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies. *Journal of Pesticide Science*, 44(4), 275-281. doi:<https://doi.org/10.1584%2Fjpestics.J19-03>
- ASAZGUA. (2020). *El Azúcar de Guatemala en el Mundo*. Obtenido de Asociación de Azucareros de Guatemala: <https://www.azucar.com.gt/azucar-de-guatemala-en-el-mundo/>
- ASAZGUA. (2020). *Evolución de la agroindustria Azucarera de Guatemala*. Obtenido de Asociación de Azucareros de Guatemala: <https://www.azucar.com.gt/historia/>
- ASAZGUA. (29 de Julio de 2021). *Ingenios azucareros terminan Zafra 2020/2021 impulsados por variedad de caña Guatemalteca*. Obtenido de Azúcar de Guatemala: <https://www.azucar.com.gt/tag/zafra/>
- Audaserik, T., Audaserik, G., & Byers, B. (2012). *Biología: La vida en la Tierra con Fisiología*. México : Pearson Educación de México. .
- Aziz, N., & Zainol, N. (2018). Isolation and identification of soil fungi isolates from forest soil for flooded soil recovery. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 342. doi:10.1088/1757-899X/342/1/012028
- Brooks, J. (2015). Soil Sampling for Microbial Analyses. En J. Brooks, *Manual of Environmental Microbiology* (Vol. 5). doi:<https://doi.org/10.1128/9781555818821.ch2.6.3>
- Brooks, J. (2015). Soil Sampling for Microbial Analyses. *Manual of Environmental Microbiology*, 5. doi: <https://doi.org/10.1128/9781555818821.ch2.6.3>
- Bull, T. (2000). The Sugar Cane Plant. En T. Bull, *Manual of Canegrowing*. Obtenido de <https://elibrary.sugarresearch.com.au/bitstream/handle/11079/15541/Chapter%204%20The%20Sugarcane%20Plant.pdf?sequence=5&isAllowed=y>
- Burtseva, Y., Verigina, N., Sova, V., Povkin, M., & Zvyaginsteva, T. (2033). Filamentous Marine Fungi as Producers of O-Glycosylhydrolases: b-1,3-Glucanase from Chaetomium indicum. *Marine Biotechnology*, 5, 349-359. doi:10.1007/s10126-002-0070-2

- Callahan, B., McMurdie, P. R., Ha, A., Johnson, A., & Holes, S. (2016). DADA2: A High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 53, 581-583. doi:10.1038/nmeth.3869
- Camero Rodríguez, J., & Linares Gómez, M. (2013). *Implementación para un protocolo para la conservación de hongos filamentosos con potencial biotecnológico de la colección del Laboratorio de Química Microbiológica de la Pontificia Universidad Javeriana*. Obtenido de Pontificia Universidad Javeriana de Colombia: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11837/LinaresGomezMariaFernanda2013.pdf?sequence=1>
- Coleman, D., Callahan, M., & Crossley, D. (2018). *Fundamentals of Soil Ecology*. San Diego, CA: Academic Press.
- Egidi, E., Delgado-Baquerizo, M., Plett, J., Wang, J., Eldridge, D., Bardgett, R., . . . Singh, B. (2019). A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nature Communication*, 10. doi:<https://doi.org/10.1038/s41467-019-10373-z>
- El-Gendi, H., Saleh, A., Badierah, R., Redwan, E., El-Maradny, Y., & El-Fakharany, E. (2022). A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges. *Journal of Fungi*, 8(1). doi:<https://doi.org/10.3390%2Fjof8010023>
- Elias, F., Woyessa, D., & Muleta, D. (2016). Phosphate Solubilization Potential of Rhizosphere Fungi Isolated from Plants in Jimma Zone, Southwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology*. doi:<https://doi.org/10.1155%2F2016%2F5472601>
- Ellis, J. (2013). Post Flood Syndrome and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Journal of Production Agriculture*, 11(2), 200-204. doi:<https://doi.org/10.2134/jpa1998.0200>
- EMAGROGT. (2022). *100% Naturales Productos*. Obtenido de EMAGRO Guatemala: <https://emagrogt.com/productos/>
- FAO. (2019). Chapter 5. Sugar. En FAO, *OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028* (págs. 155-165).
- FAO. (2020). *Directrices para la prevención de raza 4 tropical para productores y profesionales sobre el terreno*. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura: <https://www.fao.org/3/ca8409es/CA8409ES.pdf>
- FAO. (2021). *¿Qué es el suelo?* Obtenido de Portal de Suelos de la FAO: <http://www.fao.org/soils-portal/about/definiciones/es/>
- Fatima, F., Pathak, N., & Ratogi, S. (2014). An Improved Method for Soil DNA Extraction to Study the Microbial Assortment within Rhizospheric Region. *Mol Biol Int*. doi:10.1155/2014/518960
- Figueroide, L., & Lopes, F. (2021). Plant microbiome structure and benefits for sustainable agriculture. *Current Plant Biology*, 26, 2214-6628. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100198>.
- Frac, M., Hannula, S., Belka, M., & Jedryczka, M. (2018). Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health. *Frontiers in Microbiology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00707>
- Francioli, D., Cid, G., Kanukollu, S., Ulrich, A., hajirezaei, M.-R., & Kolb, S. (2021). Flooding Causes Dramatic Compositional Shifts and Depletion of Putative Beneficial Bacteria on the Spring Wheat Microbiota. *Frontiers in Microbiology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.773116>
- FT, M., M, D.-B., TC, J., DJ, E., V, O., B, G., . . . Bran, D. (2015). Increasing aridity reduces soil microbial diversity and abundance in global drylands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(51), 15684-9. doi:10.1073/pnas
- FUNDAZÚCAR. (2019). *Azúcar de Guatemala*. Obtenido de FUNDAZÚCAR: <https://fundazucar.org/azucar-de-guatemala>

- Gadd, G. M. (2018). *Geomycology: fungi as agents of biogeochemical change*. Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy. doi:<https://doi.org/10.3318/bioe.2018.04pr>
- Garrett, S. (1951). Ecological Groups of Soil Fungi: A Survey of Substrate Relationships. *JSTOR*, 50(2), 149-166.
- George, T., Hinsinger, P., & Turner, B. (2016). Phosphorus in soils and plants – facing phosphorus scarcity. *Plant and Soil*, 1-6. doi:<https://doi.org/10.1007/s11104-016-2846-9>
- Glick, B. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*. doi:<https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Gómez-Godínez, L., Martínez-Romero, E., Banuelos, J., & Arteaga-Garibay, R. (2021). Tools and challenges to exploit microbial communities in agriculture. *Current Research in Microbial Sciences*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100062>
- Goughenour, K., Whalin, J., Slot, J., & Rappleye, C. (2021). Diversification of Fungal Chitinases and Their Functional Differentiation in *Histoplasma capsulatum*. *Molecular Biology and Evolution*, 38(4), 1339-1355. doi:<https://doi.org/10.1093/molbev/msaa293>
- GRACE Communications Foundation. (2021). *How Industrial Agriculture Affects Our Soil*. Obtenido de FoodPrint: <https://foodprint.org/issues/how-industrial-agriculture-affects-our-soil/#easy-footnote-bottom-10-1260>
- Grupo Magdalena . (2017). *Quiénes Somos* . Obtenido de Magdalena Tierra Dulce: https://www.imsa.com.gt/quienes_somos.html
- Guo, Z., Liu, C.-A., Wnag, D., Wan, S., He, C., & Zhan, L. (2022). Temporal variation of management effects on soil microbial communities. *Geoderma*, 418. doi:<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2022.115828>.
- Hamad, I., Ranque, S., Azhar, E., Yasir, M., Jiman-Fatani, A., Tissot-Dupont, H., . . . Bittar, F. (2017). Culturomics and Amplicon-based Metagenomic Approaches for the Study of Fungal Population in Human Gut Microbiota. *Scientific Reports*, 7. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-017-17132-4>
- Haro, R., & Benito, B. (2019). The Role of Soil Fungi in K+ Plant Nutrition. *International Journal of Molecular Sciences*. doi:<https://doi.org/10.3390%2Fijms20133169>
- Heather, J., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: THE history of sequencing DNA. *Genomics*, 1-8.
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An Overview. *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics* .
- Huang, X., Liu, L., Wen, T., Zhu, R., Zhang, J., & Cai, Z. (2015). Illumina MiSeq investigations on the changes of microbial community in the *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense infected soil during and after reductive soil disinfestation. *Microbiological Research*, 181, 33-42. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.08.004>
- Illumina, Inc. (2011). *Quality Scores for Next-Generation Sequencing*. Obtenido de illumina: https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf
- Illumina, Inc. (2022). *What is a Quality Score in Sequencing?* Obtenido de Experiments and Protocols: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/quality-scores.html>
- Illumina Proprietary. (Abril de 2020). *iSeq100: Sequencing System Guide*. Obtenido de Illumina Support: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/iseq100/iseq-100-system-guide-1000000036024-07.pdf

- Iqbal, S., Ashfaq, M., Humayun, A., Inam-ul-haq, Khan, K., & Mathews, P. (2017). Isolation, preservation and revival of *Trichoderma viride* in culture media. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3), 1640-1646. Obtenido de <https://www.entomoljournal.com/archives/2017/vol5issue3/PartW/5-3-119-171.pdf>
- ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PHOSPHATE SOLUBILIZING FILAMENTOUS FUNGI FROM SUBTROPICAL SOILS IN OKINAWA. (2019). *Applied Ecology and Environmental Research*, 9145-9157. doi:http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1704_91459157
- Jansson, J., & Hofmockel, K. (2018). The soil microbiome - from metagenomics to metaphenomics. *Current Opinion in Microbiology*, 162-168.
- Killebrew, K., & Wolff, H. (17 de Marzo de 2010). *Environmental Impacts of Agricultural Technologies*. Obtenido de Evans School of Public Affairs: <https://econ.washington.edu/sites/econ/files/old-site-uploads/2014/06/2010-Environmental-Impacts-of-Ag-Technologies.pdf>
- Kim, B.-R., Sinh, J., Guevarra, R., Lee, J., Kim, D., Seol, K.-H., . . . Isaacson, R. (2017). Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 27(12), 2089-2093. doi:<https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Koetsier, G., & Cantor, E. (2019). *A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration (Technocal Note)*. Obtenido de New England BioLabs : https://www.neb.com/-/media/nebus/files/application-notes/technote_mv5_analysis_of_nucleic_acid_concentration_and_purity.pdf?rev=c24cea043416420d84fb6bf7b554dbbb
- Lahti, L., & Shetty, S. (2019). *Microbiome R package*. Obtenido de GitHub: <http://microbiome.github.io>
- Lin, Z., Xu, S., Que, Y., Wang, J., COMstock, J., Wei, J., . . . Zhang, M. (2014). Species-Specific Detection and Identification of *Fusarium* Species Complex, the Causal Agent of Sugarcane Pokkah Boeng in China. *PLOS ONE*, 9(8). doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104195>
- Liu, D., Liu, G., Chen, L., Ha, W., & Wang, D. (2022). Plant diversity is coupled with soil fungal diversity in a natural temperate steppe of northeastern China. *Soil Ecology Letters*, 454-469. doi:<https://doi.org/10.1007/s42832-021-0113-3>
- Liu, Y., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y. (2021). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein & Cell*, 12(5), 315-330. doi:<https://doi.org/10.1007/s13238-020-00724-8>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J., López-Guerrero, J., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264-270. doi:<https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Magdoff, F., & Van Es, H. (2019). *Building Soils for Better Crops: Ecological Management for Healthy Soils*. University of Maryland Printing Services.
- Maity, A., Sharma, J., & Pal, R. (2019). Qualitative In Vitro Evaluation of Plant Growth Promoting Activity of Selected Microbial Isolates Used for Biofertilizer Application. *Scientia Horticulturae*, 255, 14-20.
- Malloch, D. (28 de Junio de 202). *Moulds: Their Isolation Cultivation and Identification*. Obtenido de New Brunswick Museum: <http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Moulds.html>
- Mariani, T. (2022). Diversity of potassium solubilizing microbes on andisol soil affected by the eruption of Mount Sinabung, North Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas*, 1759-1764. doi:10.13057/biodiv/d230406
- MARN. (2017). *Informe Ambiental del Estado de Guatemala*. Ciudad de Guatemala: Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales .

- Martin, K., McDougall, B., McIlroy, S., Jayus, J., Chen, J., & Seviour, R. (2007). Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal β -(1,3)- and β -(1,6)-glucanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(2), 168-192. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00055.x>
- Marwanto, Bustaman, H., Handajaningsih, M., Supanjani, & Gonggo, B. (2020). Qualitative In Vitro Evaluation of Plant Growth Promoting Activity of Selected Microbial Isolates Used for Biofertilizer Application. *Advances in Biological Sciences Research*, 13.
- Matheson, C. (2010). Assessing PCR Inhibition from Humic Substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, 3, 38-45. doi:[10.2174/1874940201003010038](https://doi.org/10.2174/1874940201003010038)
- Maumita, S., Sarakar, S., Sarkar, B., Kumar, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Sciences and Pollution Research Int*, 3985-99. doi:[10.1007/s11356-015-4294-0](https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0)
- McGee, K., Eaton, W., Porter, T., Shokralla, S., & Hajibabaei, M. (2019). Soil microbiomes associated with two dominant Costa Rican tree species, and implications for remediation: a case study from a Costa Rican conservation area. *Applied Soil Ecology*, 137. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.007>
- McMurdie, P., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome. *PLoS ONE*, 8(4). Obtenido de <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mendes dos Santos, R., Escobar, P., Bentes, L., & Cid, E. (2020). Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Maize and Sugarcane: Characteristics and Applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. doi:[10.3389/fsufs.2020.00136](https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00136)
- Monsalve, S., & Emanuelli, M. (2009). *Monocultures and Human Rights*. Habitat International Coalition Regional Office Latin America: Misereor.
- NC State University. (2021). *Soil Ecology*. Obtenido de Crop and Soil Sciences : <https://cals.ncsu.edu/crop-and-soil-sciences/soil-ecology/>
- O'Callaghan, M., Ballard, R., & Wright, D. (2022). Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: Limitations and opportunities. *Soil Use Manage*, 1340-1369. doi:[10.1111/sum.12811](https://doi.org/10.1111/sum.12811)
- OCDE-FAO. (2021). 5. Azúcar. En OCDE-FAO, *OCDE-FAO Perspectivas agrícolas*. doi:<https://doi.org/10.1787/22184376>
- Oliveira, L., Cavalcanti, M., & Fernandez, D. (2013). Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. *Journal of Arid Environments*, 96, 49-54. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2013.03.007](https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2013.03.007)
- Orgiazzi, A., Bianciotto, V., Bonfante, P., Daghino, S., Ghignone, S., Lazzari, A., . . . Girlanda, M. (2013). 454 Pyrosequencing Analysis of Fungal Assemblages from Geographically Distant, Disparate Soils Reveals Spatial Patterning and a Core Mycobiome. *Diversity*, 5(1), 79-98. doi:<https://doi.org/10.3390/d5010073>
- Pavao-Zuckerman, M. (2008). Soil Ecology. En S. Jorgensen, & B. Fath, *Encyclopedia of Ecology*. Academic Press. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00850-8>.
- Peraza-Jiménez, K., De la Rosa-García, S., Huijara-Vasconcelos, J., Reyes-Estebanez, M., & Gómez-Cornelio, S. (2022). Enzymatic Bioprospecting of Fungi Isolated from a Tropical Rainforest in Mexico. *Journal of Fungi*, 8(1). doi:<https://doi.org/10.3390/jf8010022>
- Pirttilä, A., Parast, H., Baruah, N., & Koskimäki, J. (2021). Biofertilizers and Biocontrol Agents for Agriculture: How to Identify and Develop New Potent Microbial Strains and Traits. *Microorganisms*, 9(4). doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms9040817>

- Poria, V., Rana, A., Kumari, A., Gewal, J., Pranaw, K., & Singh, S. (2021). Current Perspectives on Chitinolytic Enzymes and Their Agro-Industrial Applications. *Biology*, *10*(12). doi:<https://doi.org/10.3390/biology10121319>
- Porras-Alfaro, A., Liu, K.-L., Kuske, C., & Xie, G. (2013). From Genus to Phylum: Large-Subunit and Internal Transcribed Spacer rRNA Operon Regions Show Similar Classification Accuracies Influenced by Database Composition. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(3). doi:10.1128/AEM.02894-13.
- Ritz, K. (2005). FUNGI: Nutrient Cycling. En K. Ritz, *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Academic Press.
- Rolling, T., Zhai, B., Frame, J., Hohl, T., & Taur, Y. (2021). Customization of a DADA2-based pipeline for fungal internal transcribed spacer 1 (ITS1) amplicon data sets. *JCI Insight*. doi:<https://doi.org/10.1172/jci.insight.151663>
- Rolling, T., Zhai, B., Frame, J., Hohl, T., & Taur, Y. (2021). Customization of a DADA2-based pipeline for fungal internal transcribed spacer 1 (ITS1) amplicon data sets. *JCI Insight*. doi:<https://doi.org/10.1172/jci.insight.151663>
- Roy, E., Richcards, P., Martinelli, L., Della Coletta, L., Machado, R., Vazquez, F., . . . Porder, S. (2016). The phosphorus cost of agricultural intensification in the tropics. *Nature Plants*, <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.43>.
- Saad, M., Eida, A., & Hirt, H. (2020). Tailoring plant-associated microbial inoculants in agriculture: a roadmap for successful application. *Journal of Experimental Botany*, 3878-3901.
- Segre, J. (2020). *Metagenomics*. Obtenido de National Human Genome Research Institute : <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Metagenomics>
- SEMIAGRO. (2018). *Productos*. Obtenido de Portafolio: <https://semiagro.com/#productos>
- Shen, C., Wang, J., He, J.-Z., Yu, F.-H., & Ge, Y. (2021). Plant Diversity Enhances Soil Fungal Diversity and Microbial Resistance to Plant Invasion. *Applied and Environmental Microbiology*, e00251-21. doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.00251-21>
- Shi, G., Sun, H., Calderón-Urrea, A., Jia, X., Yang, H., & Su, G. (2020). Soil Fungal Diversity Loss and Appearance of Specific Fungal Pathogenic Communities Associated With the Consecutive Replant Problem (CRP) in Lily. *Frontiers in Microbiology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01649>
- Soumare, A., Boubekri, K., Lyamloui, K., Hafidi, M., Oudouch, Y., & Kousini, L. (2020). From Isolation of Phosphate Solubilizing Microbes to Their Formulation and Use as Biofertilizers: Status and Needs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00425>
- Staak, A. (03 de Julio de 2017). *Department of Soil Ecology*. Obtenido de Helmholtz Centre for Environmental Research: <https://www.ufz.de/index.php?en=34229>
- Sukmawati, D., Dellanerra, D., & Risandi, A. (2018). Screening the capabilities of Indonesian indigenous mold in producing cellulase enzyme. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. doi:10.1088/1757-899X/434/1/012125
- Suman, J., Rakshit, A., Ogireddy, S., S., S., Gusta, C., & Chandrakala, J. (2022). Microbiome as a Key Player in Sustainable Agriculture and Human Health. *Frontiers in Soil Science*. doi:<https://doi.org/10.3389/fsoil.2022.821589>
- Talbot, J., Bruns, T., Taylor, J., Smith, D., Branco, S., Glassman, S., . . . Peay, K. (2014). Endemism and functional convergence across the North American soil mycobiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(17), 6341-6346. doi:10.1073/pnas.1402584111
- Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp.*, *2*(1), 3. doi:10.1186/2042-5783-2-3

- Trivedi, M., Kalkar, S., & Chanware, A. (2016). ISOLATION, CHARACTERIZATION & DEVELOPMENT OF LIQUID FORMULATIONS OF POTASSIUM SOLUBIZING FUNGI. *International Journal of Advanced Research*, 999-1003. doi:10.21474/IJAR01/1574
- U.S Bureau of Labor Statistics. (2022). *Producer Price Index by Industry: Pesticide and Other Agricultural Chemical Manufacturing: Agricultural and Commercial Pesticides and Chemicals [PCU3253203253201]*. Recuperado el Octubre de 28 de 2022, de Federal Reserve Bank of St. Louis: <https://fred.stlouisfed.org/series/PCU3253203253201>
- Universidad Rafael Landívar. (s.f.). *Agricultura*. Obtenido de infoiarna: <http://www.infoiarna.org.gt/temas/agricultura/>
- Vailati-Riboni, M., Palombo, V., & Loor, J. (2017). What Are Omics Sciences? *Ametaj B. (eds) Periparturient Diseases of Dairy Cows*. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-43033-1_1
- Vassileva, M., Oliveira, G., Agostino, M., di Benedetto, G., Flor-Peregrin, E., Mocali, S., . . . Vassilev, N. (2022). Fungi, P-Solubilization, and Plant Nutrition. *Microorganisms*, 10(9). doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms10091716>
- Vázquez, A. (2016). *Técnicas de secuneciación de nueva generación*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense.
- Vega, C. (Julio de 2017). *Trabajo de fin de grado: Problemas ambientales y de salud derivados del uso de fertilizantes nitrogenados*. Obtenido de Universidad Complutense : <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/CRISTINA%20VEGA%20OLIVA.pdf>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Obtenido de Springer-Verlag New York: <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Wnuk, E., Wasko, A., Walkiewicz, A., Bartminski, P., Bejger, R., Mielnik, L., & Bieganski, A. (2020). The effects of humic substances on DNA isolation from soils. *The Open Access Journal for Life & Environment Research*, 8. doi:<https://doi.org/10.7717%2Fpeerj.9378>
- Wydro, U. (2022). Soil Microbiome Study Based on DNA Extraction: A Review. *water*, 14. doi:<https://doi.org/10.3390/w14243999>
- Yakop, F., Taha, H., & Shivanand, P. (2019). Isolation of fungi from various habitats and their possible bioremediation. *Current Science*, 116(5). Obtenido de <https://www.currentscience.ac.in/Volumes/116/05/0733.pdf>
- Yao, Z., Zou, C., Peng, N., Zhu, Y., Bao, Y., Zhou, Q., . . . Zhang, M. (2020). Virome Identification and Characterization of Fusarium sacchari and F. andiyazi: Causative Agents of Pokkah Boeng Disease in Sugarcane. *Frontiers in Microbiology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00240>
- Zeleny, D. (3 de Marzo de 2021). *Analysis of community ecology data in R*. Obtenido de Diversity Analysis: <https://www.davidzeleny.net/anadat-r/doku.php/en:div-ind>
- Zhang, S., Wang, B., Wan, L., & Li, L. (2017). Estimating Phred scores of Illumina base calls by logistic regression and sparse modeling. *BMC Bioinformatics*. doi:<https://doi.org/10.1186%2Fs12859-017-1743-4>
- Zhong, F., Fan, X., Ji, W., Hai, Z., Hu, N., Li, X., . . . Zhang, J. (2022). Soil Fungal Community Composition and Diversity of Culturable Endophytic Fungi from Plant Roots in the Reclaimed Area of the Eastern Coast of China. *Journal of Fungi*, 8(2). doi:<https://doi.org/10.3390/jof8020124>

11. ANEXOS

11.1. Microbiología

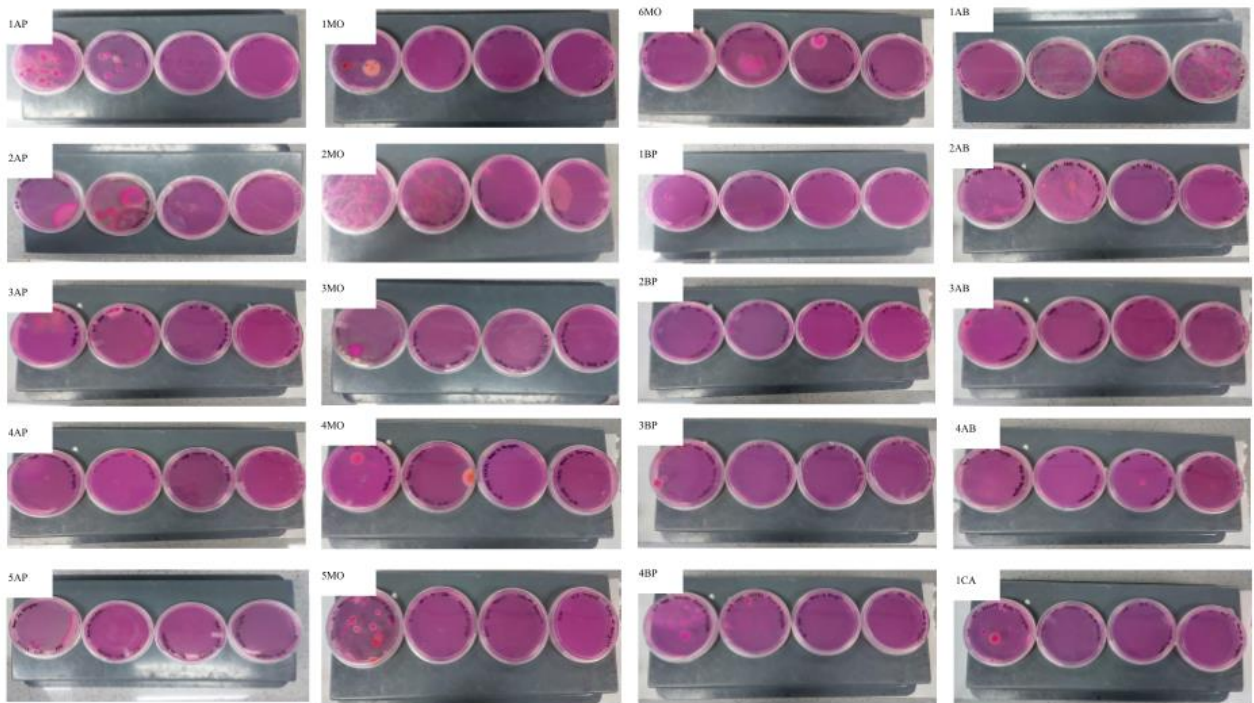


Figura 14: Diluciones seriadas (10^{-2} a 10^{-4}) de las muestras de suelo utilizadas para el aislamiento de las cepas de hongos filamentosos de interés

11.2. Datos y gráficos sobre el análisis bioinformático

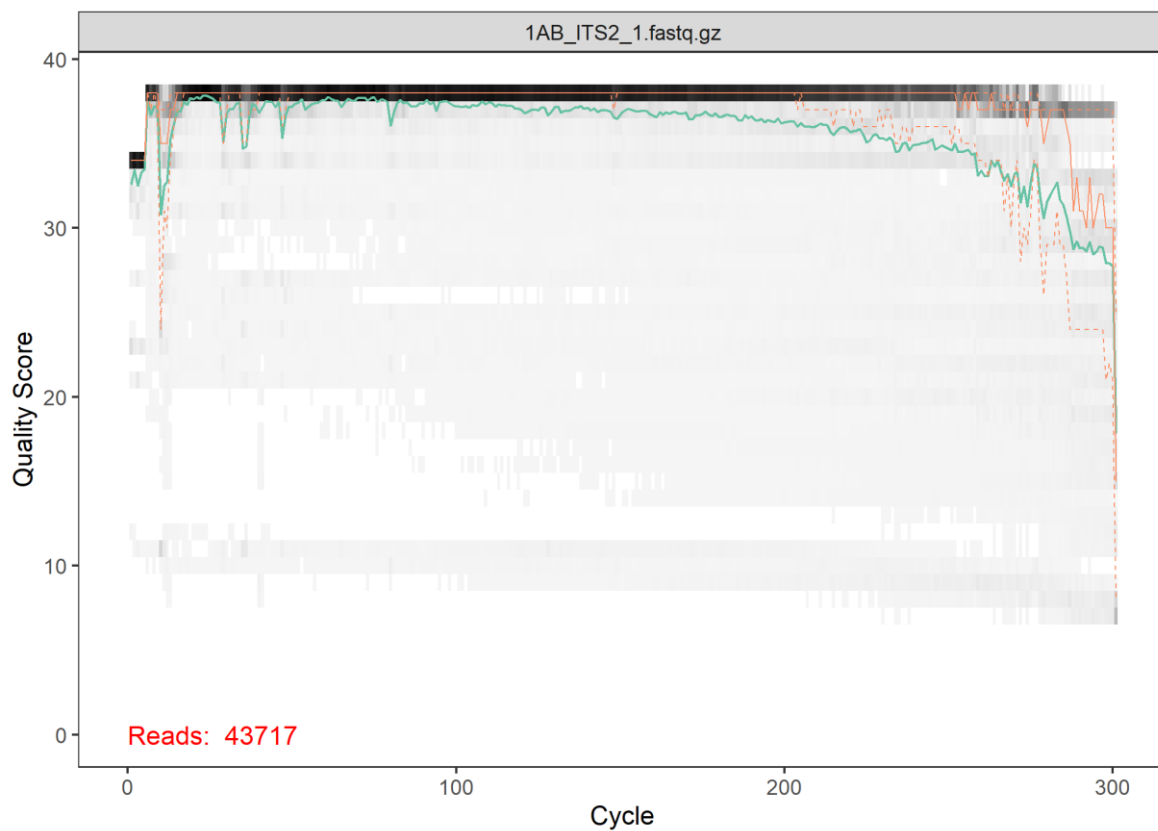


Figura 15: Ejemplo de gráfico de calidad obtenido para cada una de las lecturas forward de la secuenciación de las muestras.

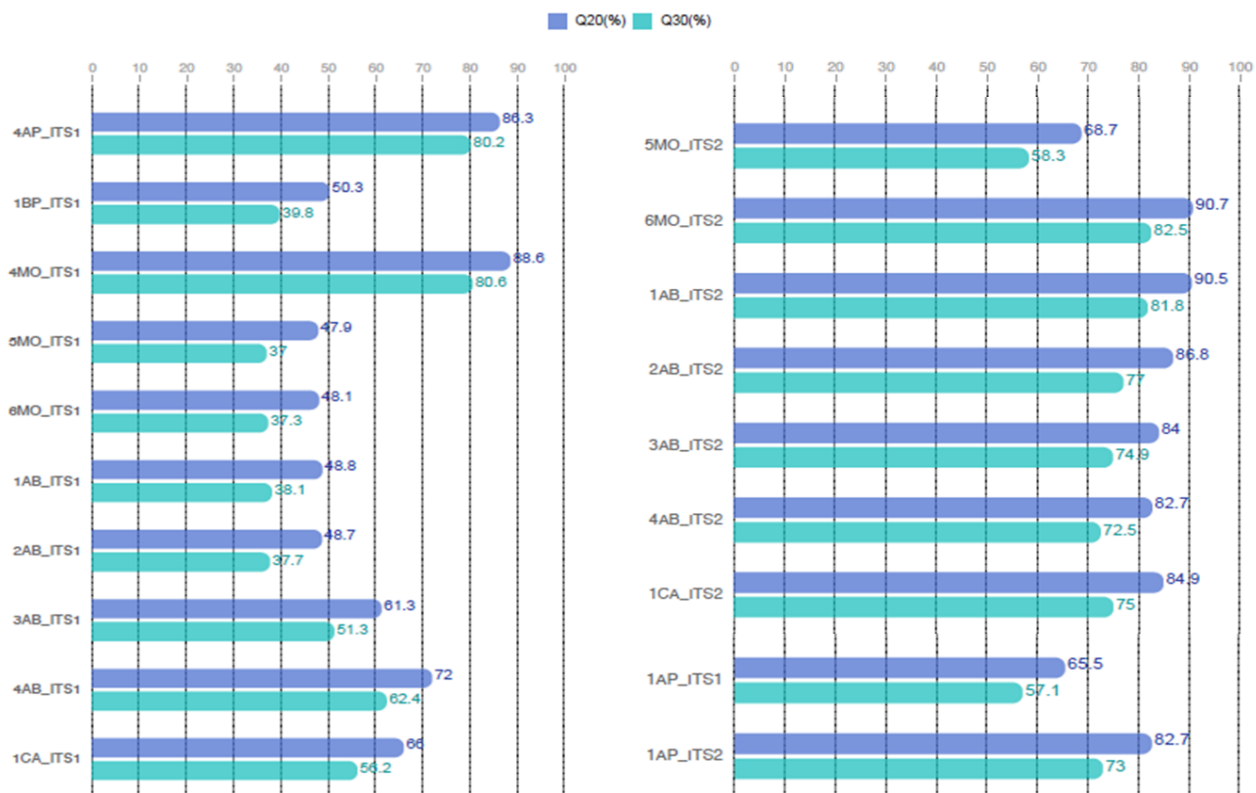
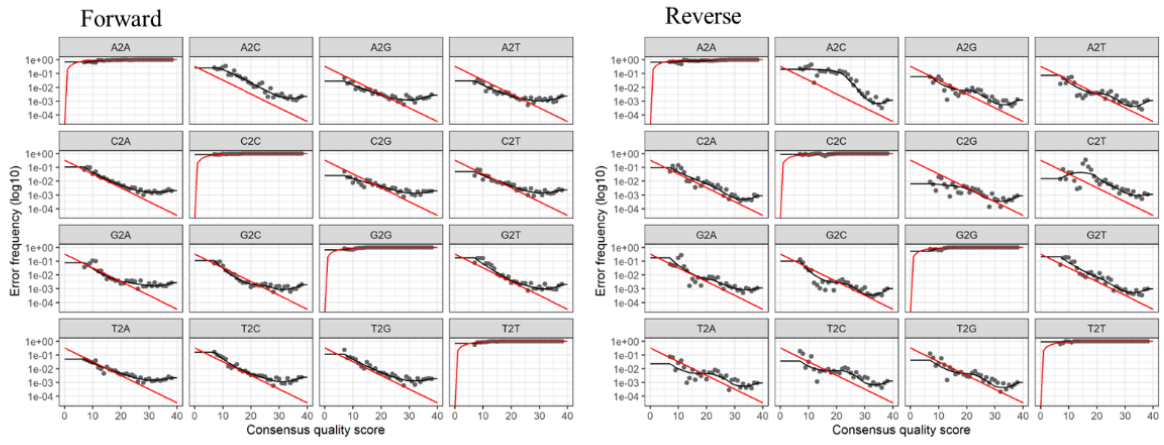


Figura 16: Porcentaje de Q20 y Q30 entre las bases de las lecturas de cada muestra proveídas por *Macrogen* tras la secuenciación en el sistema MiSeq en la plataforma Illumina.

A. Amplicón ITS1



B. Amplicón ITS2

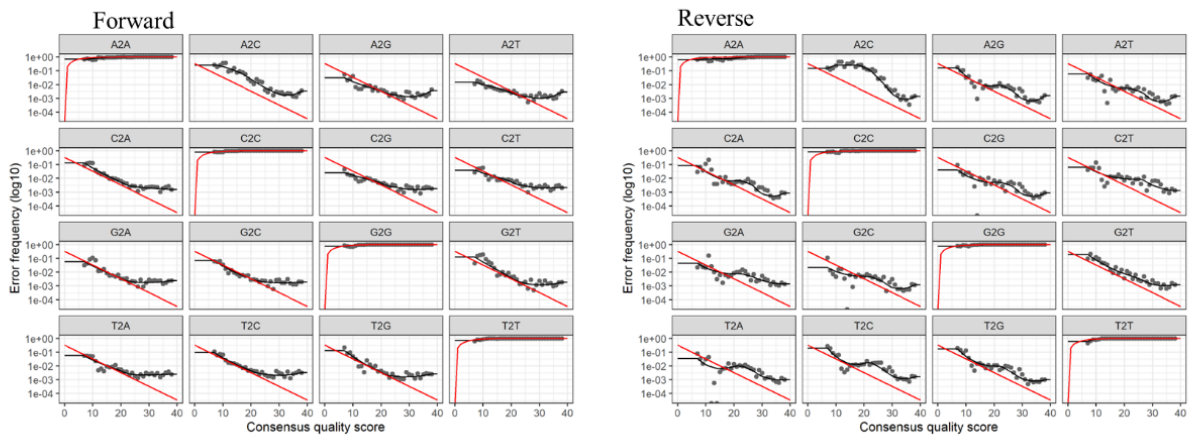
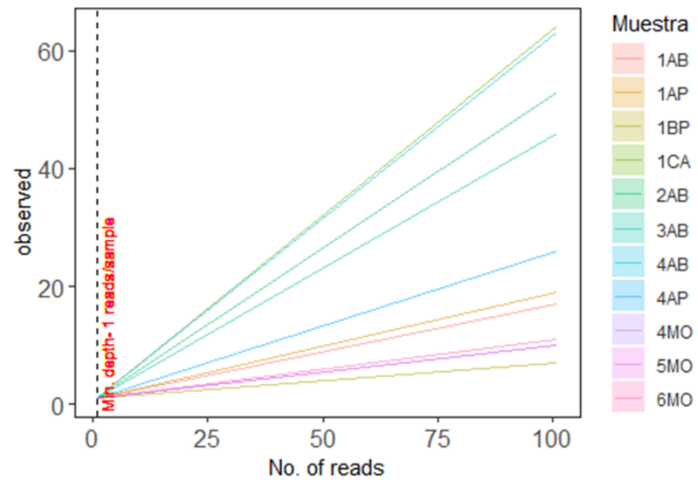


Figura 17: Modelos de error.

A. Amplicón ITS1



B. Amplicón ITS2

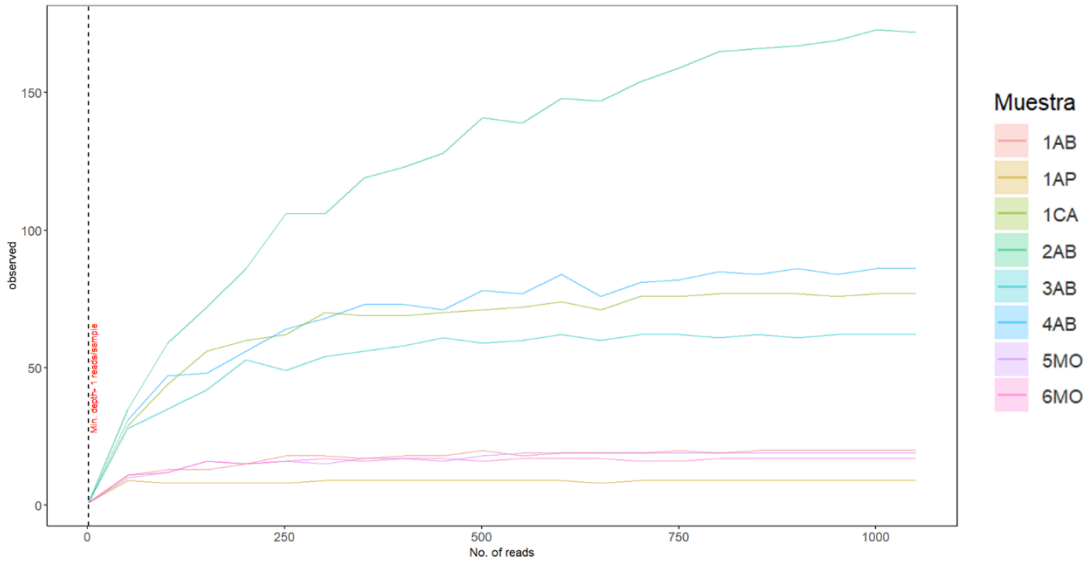


Figura 18: Gráficos de rarefacción

Cuadro 10: Valores de métricas de diversidad alfa para muestras ITS1 e ITS2

Amplicón	Muestra	ASVs	Chao1	Gini-Simpson	Shannon
ITS1	1AB	17	18.5	0.8070	2.0814
	1AP	23	25	0.8641	2.4477
	1BP	7	7	0.7154	1.5606
	1CA	105	278.44	0.9800	4.3189
	2AB	64	76.35	0.9722	3.8682
	3AB	76	121.32	0.9659	3.8651
	4AB	116	294.5	0.9823	4.4685
	4AP	34	49.17	0.8280	2.5161
	4MO	12	33	0.6041	1.2992
	5MO	10	10	0.7154	1.7226
ITS2	6MO	12	13	0.7588	1.8352
	1AB	20	21	0.7600	1.9538
	1AP	9	9	0.5056	1.2014
	1CA	77	77.17	0.9718	3.9060
	2AB	176	197.67	0.9741	4.4636
	3AB	62	62	0.9534	3.5696
	4AB	87	89.33	0.9526	3.6873
	5MO	19	19	0.6337	1.6844
6MO	17	17	0.6737	1.7899	

Cuadro 11: Distancias de Bray-Curtis ITS1

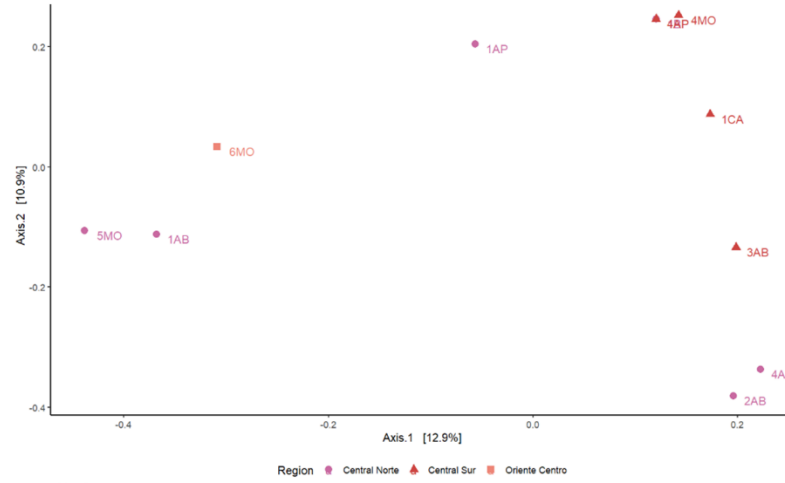
	1AB	1AP	1BP	1CA	2AB	3AB	4AB	4AP	4MO	5MO	6MO
1AB	0.0000000	0.9839572	1	1.0000000	0.9893048	1.0000000	1.0000000	1	1.0000000	0.8663102	0.9625668
1AP	0.9839572	0.0000000	1	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1	1.0000000	0.9893048	0.9572193
1BP	1.0000000	1.0000000	0	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1CA	1.0000000	1.0000000	1	0.0000000	0.9893048	0.9946524	0.9893048	1	0.9893048	1.0000000	1.0000000
2AB	0.9893048	1.0000000	1	0.9893048	0.0000000	0.9732620	0.9465241	1	1.0000000	0.9893048	1.0000000
3AB	1.0000000	1.0000000	1	0.9946524	0.9732620	0.0000000	0.9839572	1	0.9946524	1.0000000	1.0000000
4AB	1.0000000	1.0000000	1	0.9893048	0.9465241	0.9839572	0.0000000	1	1.0000000	1.0000000	0.9946524
4AP	1.0000000	1.0000000	1	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	0	1.0000000	1.0000000	1.0000000
4MO	1.0000000	1.0000000	1	0.9893048	1.0000000	0.9946524	1.0000000	1	0.0000000	1.0000000	1.0000000
5MO	0.8663102	0.9893048	1	1.0000000	0.9893048	1.0000000	1.0000000	1	1.0000000	0.0000000	0.8983957
6MO	0.9625668	0.9572193	1	1.0000000	1.0000000	1.0000000	0.9946524	1	1.0000000	0.8983957	0.0000000

Cuadro 12: Distancias de Bray-Curtis ITS2

	1AB	1AP	1CA	2AB	3AB	4AB	5MO	6MO
1AB	0.0000000	0.5676417	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	0.4771481	0.5274223
1AP	0.5676417	0.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	0.3610603	0.4003656
1CA	1.0000000	1.0000000	0.0000000	0.9917733	0.9488117	0.9972578	1.0000000	1.0000000
2AB	1.0000000	1.0000000	0.9917733	0.0000000	1.0000000	0.9689214	1.0000000	1.0000000
3AB	1.0000000	1.0000000	0.9488117	1.0000000	0.0000000	0.9698355	1.0000000	1.0000000
4AB	1.0000000	1.0000000	0.9972578	0.9689214	0.9698355	0.0000000	1.0000000	1.0000000
5MO	0.4771481	0.3610603	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	0.0000000	0.3976234
6MO	0.5274223	0.4003656	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	0.3976234	0.0000000

A. Ampliación ITS1

PCoA Bray-Curtis



B. Ampliación ITS2

PCoA Bray-Curtis

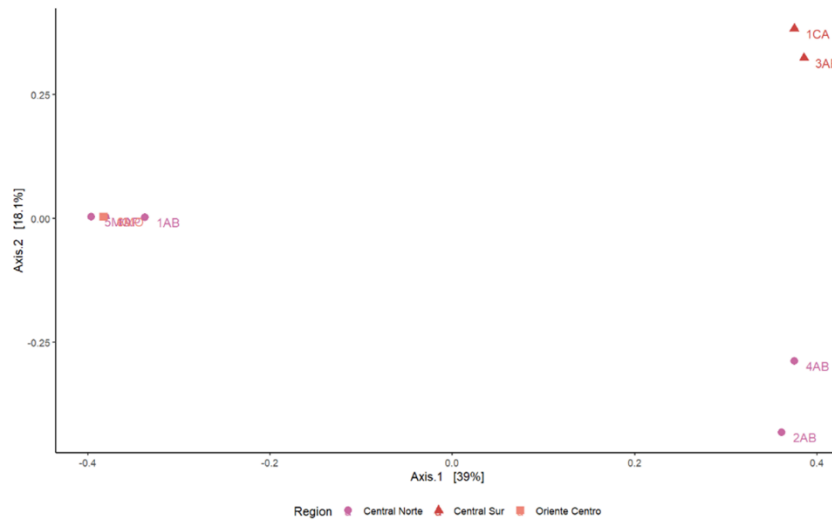


Figura 19: PCoA de las distancias de Bray-Curtis obtenidas agrupadas por región de la cual provino la muestra.

11.3. Enlaces a documentos con información suplementaria

11.3.1. [Coordenadas de muestreo](#)

11.3.2. [Abundancia relativa de los filos y géneros más prevalentes](#)

11.3.3. [Asignación taxonómica ASVs](#)

11.3.4. [Scripts R](#)

11.3.5. [GoogleMaps Sitios de Muestreo](#)

11.3.6. [Datos crudos de secuenciación ITS1 e ITS2](#)

11.3.7. [Imágenes de las características microscópicas y macroscópicas de las cepas aisladas.](#)

11.4. Protocolos

11.4.1. Procedimiento de extracción de ADN

Extracción de ADN con kit DNeasy® PowerSoil® Pro Kit, Quick-Start Protocol con lavado de cloroformo.

Reagents

- PowerBead Pro Tube: beads for sample dispersion, humic acid dissolution and to protect genetic material
- CD1: Solution for cell lysis
- CD2: Solution with IRT, reagent specialized to remove organic and inorganic pollutants.
- CD3: Solution with high concentration of salts. Contributes to DNA binding to silica columns.
- EA: Washing solution. Removes proteins and aqueous pollutants.
- CD5: Base don ethanol, removes salts, humic acid and other pollutants. Maintains the DNA binned to the column.
- C6: Elution solution. Frees the DNA from the column.

Modified Protocol

- Ensure that the PowerBead Pro Tubes rotate freely in the centrifuge without rubbing.
 - If Solution CD3 has precipitated, heat at 60°C until precipitate dissolves.
 - Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
 - Leve the CD2 solution 15 – 20 min before use.
1. Spin the PowerBead Pro Tube briefly to ensure that the beads have settled at the bottom.
 2. Add 250 mg of soil
 3. Add 800 µl of Solution CD1.
 4. Vortex briefly to mix.
 5. Secure the PowerBead Pro Tube horizontally on a Vortex Adapter for 10-20 min on the Bead Beater at maximum speed.
 6. Add 300 µl de Phenol:cloroformo:isoamil alcohol and vortex for 20 seg
 7. Centrifuge the PowerBead Pro Tube at 15,000 x g for 5 min.
 8. Remove slowly without touching the phenol transfer the aqueous solution (Expect 500–600 µl).
 9. Add 200 µl of Solution CD2 and vortex.
 10. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min at room temperature.
 11. Avoiding the pellet, transfer up to 700 µl of supernatant to a clean 2 ml Microcentrifuge Tube (Expect 500–600 µl).
 12. Add 600 µl of Solution CD3 and vortex.
 13. Load 650 µl of the lysate onto an MB Spin Column.
 14. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min.
 15. Discard the flow-through and repeat step 12 to ensure that all of the lysate has passed through the MB Spin Column.
 16. Carefully place the MB Spin Column into a clean 2 ml Collection Tube. Avoid splashing any flow-through onto the MB Spin Column. (discard the supernatant)
 17. Add 500 µl of Solution EA to the MB Spin Column.
 18. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min.
 19. Discard the flow-through
 20. Place the MB Spin Column back into the same 2 ml Collection Tube.
 21. Add 500 µl of Solution C5 to the MB Spin Column.

9. Add 200 μ l of Solution CD2 and vortex.
10. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min at room temperature.
11. Avoiding the pellet, transfer up to 700 μ l of supernatant to a clean 2 ml Microcentrifuge Tube (Expect 500–600 μ l).
12. Add 600 μ l of Solution CD3 and vortex.
13. Load 650 μ l of the lysate onto an MB Spin Column.
14. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min.
15. Discard the flow-through and repeat step 12 to ensure that all of the lysate has passed through the MB Spin Column.
16. Carefully place the MB Spin Column into a clean 2 ml Collection Tube. Avoid splashing any flow-through onto the MB Spin Column. (discard the supernadant)
17. Add 500 μ l of Solution EA to the MB Spin Column.
18. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min.
19. Discard the flow-through
20. Place the MB Spin Column back into the same 2 ml Collection Tube.
21. Add 500 μ l of Solution C5 to the MB Spin Column.
22. Centrifuge at 15,000 x g for 1 min.
23. Discard the flow-through and place the MB Spin Column into a new 2 ml Collection Tube
24. Centrifuge at **max. velocity** for 2 min.
25. Carefully place the MB Spin Column into a new 1.5 ml Elution Tube.
26. Add 50–100 μ l of Solution C6 to the **center** of the white filter membrane.
27. Incubate for 2 min.
28. Centrifuge at 15,000 x g for 3 min.
29. Discard the MB Spin Column. The DNA is now ready for downstream applications.
30. Store the DNA frozen (–30 to –15°C or –90 to –65°C) as Solution C6 does not contain EDTA.
31. Quantify DNA concentration of each sample.
 - a. Pure gDNA typically has an A₂₆₀/A₂₈₀ of 1.7–1.9
 - b. A₂₆₀/A₂₃₀ of 1.8–2.5.

11.4.2. Preparación de medio diferencial para solubilizadores de fósforo

Procedimiento Normado de Operación	SOP 3 Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 3
Detección de microorganismos solubilizantes de fosfato	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sanchez, Valeria Ochoa

1. **Propósito**
Muestreo de suelos en busca de microorganismo solubilización de fosfatos con el objetivo de aislar microorganismos beneficiosos para el crecimiento de *Saccharum officinarum* (caña de azúcar).
2. **Aplicación**
El uso de medios selectivos para aislar microorganismos permite el aislamiento selectivo. El fósforo es uno de los nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. Sin embargo, este se encuentra en su mayoría insoluble en el suelo. Una gran parte del fósforo inorgánico aplicado en fertilizantes se inmoviliza después de su aplicación. Inocular el suelo con bacterias solubilización de fosfatos ha demostrado ayudar a poner e mayor disponibilidad el fósforo y obtener mejores cosechas. Por lo que un medio de cultivo selectivo para este tipo de microorganismo permite su rápida identificación para su posterior estudio y uso (Nautiyal, 1999).
3. **Referencias**
 - 3.1. Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 170(1), 265-270.
 - 3.2. Mehta, S., & Nautiyal, C. S. (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current microbiology*, 43(1), 51-56.
4. **Terminología**
 - 4.1. Solubilización de fosfatos: Aquellos microorganismos que son capaces de solubilizar fósforo inorgánico a partir de compuestos insolubles.
 - 4.2. NBRIP: Medio selectivo para la identificación de microorganismo solubilización de fosfatos. Por sus siglas en inglés: "National Botanical Research Institute 's phosphate growth medium (NBRIP)".
 - 4.3.
5. **Documentos asociados**
 - 5.1. UnitedStates: Patent Application Publication (2002). *COMPOSITION FOR QUALITATIVE SCREENING OF PHOSPHATE SOLUBILIZING MICROORGANISMS AND AQUALITATIVE METHOD FORSCREENING MICROORGANISMS*.<https://patentimages.storage.googleapis.com/3b/cf/5a/2df7839dbf60fb/US20020172993A1.pdf>
6. **Seguridad**
 - 6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:
 - 6.1.1. Formación de aerosoles.
 - 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Con concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
 - 6.1.3. Exceso de material o personal.
 - 6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
- 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles .
- 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Incubadora
- 7.1.2. Refrigeradora
- 7.1.3. Balanza analítica
- 7.1.4. Micropipetas
- 7.1.5. Espátula
- 7.1.6. Autoclave
- 7.1.7. Campana de flujo laminar
- 7.1.8. Sistema de gas
- 7.1.9. Estufa con agitador magnético
- 7.1.10. Medidor de pH.

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Puntas de micropipeta
- 7.2.2. Parafilm
- 7.2.3. Cajas Petri
- 7.2.4. Erlenmeyers
- 7.2.5. Mecheros
- 7.2.6. Agitador magnético
- 7.2.7. Esparcidores
- 7.2.8. Asas microbiológicas en punta

7.3. Reactivos

- 7.3.1. Glucosa
- 7.3.2. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- 7.3.3. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 7.3.4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 7.3.5. KCl
- 7.3.6. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 7.3.7. Azul de bromotimol
- 7.3.8. Agar microbiológico

7.4. Medicamentos

- 7.4.1. NA

7.5. Material biológico

- 1.1.1. Colonias aisladas de agar nutritivo de muestras de suelo

8. Procedimiento

8.1. Preparación de Medio NBRIP

- 8.1.1. Pesar en balanza analítica

11.5. Preparación de medio diferencial para solubilizadores de potasio

Procedimiento Normado de Operación	SOP 4 Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 3
Aislamiento de microorganismos solubilizadores de potasio	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sánchez, Valeria Ochoa

1. **Propósito**
Aislar microorganismos solubilizadores de potasio a partir de muestras de suelo obtenidas de la rizósfera de plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).
2. **Aplicación**
Entre los múltiples nutrientes que las plantas necesitan para su desarrollo, está el potasio el cual en ocasiones es abundante en el suelo mas no en la forma que los organismos vegetales pueden consumir, ya que más del 90% del potasio se encuentra en forma de minerales insolubles. Este ión es necesario para múltiples procesos metabólicos, entre los que se encuentran la fotosíntesis, el crecimiento y la acumulación de azúcares (dos Santos et al., 2020). Si bien la aplicación de fertilizantes químicos de tanto potasio como otros nutrientes puede aumentar la producción agrícola a corto plazo, su uso causa un desbalance químico y ecológico que a largo plazo deteriora el suelo y disminuye la producción. Es por esto, que resulta de interés el aislamiento y eventual aplicación de microorganismos solubilizadores de potasio, generalmente rizobacterias, que tienen la capacidad de transformar los minerales de potasio de manera que este pueda ser absorbido por las raíces de las plantas (Kumar & Singh, 2019).
3. **Referencias**
 - 3.1. dos Santos, R.M., Díaz, P.A., Lobo, L. & Rigobelo, E. 2020. <<Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Maize and Sugarcane: Characteristics and Applications>>. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4(September), 1-15. Extraído de: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00136>
 - 3.2. Elsevier Inc. 2008. <<Advances in Applied Microbiology>>. Volume 65. San Diego, California: *Academic Press*.
 - 3.3. Fatharani, R. & Rahayu, R. 2018. <<Isolation and Characterization of Potassium-Solubilizing Bacteria from Paddy Rhizosphere (*Oryza sativa* L.)>>. *Journal of Physics: Conf. Series*. 1108. doi: doi :10.1088/1742-6596/1108/1/012105
 - 3.4. Kumar, A., & Singh, V. 2019. <<Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability. From Theory to Practices>>. Singapore: *Springer Nature*.
4. **Terminología**
 - 4.1. Rizobacteria: Son bacterias originarias del suelo que viven en o alrededor de las raíces de una planta en el área llamada la rizósfera, una zona del suelo que se extiende algunos milímetros más allá de los límites de las raíces (Elsevier Inc. , 2008).
 - 4.2. Solubilización de potasio: Es un proceso mediante el cual el potasio presente en minerales insolubles del suelo reacciona con otros compuestos obteniendo iones solubles de potasio (K^+). El principal mecanismo de solubilización del potasio es la acidólisis por la producción de ácidos orgánicos, como el ácido oxálico y el ácido succínico, ácidos inorgánicos y/o protones por parte de bacterias (Kumar & Singh, 2019) (dos Santos et al., 2020).
5. **Documentos asociados**
 - 5.1. Etesami, H., Emami, S. & Alikhani, H. 2016. <<potassium solubilizing bacteria (KSB): Promotion of Plant Growth, and Future Prospects – A review>>. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 897-911.
 - 5.2. Parmar, P. & Sindhu, S. 2013. <<Potassium Solubilization by Rhizosphere Bacteria: Influence of Nutritional and Environmental Conditions>>. *Journal of Microbiology Research*, 1, 25-31.

- 5.3. Singh, A., Singh, S. Tyagi, S. & Saxena, A. 2016. *Pedosphere*, 5, 768-773. doi: 10.1016/S1002-0160(15)60080-7

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

- 6.1.1. Formación de aerosoles.
- 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Con concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
- 6.1.3. Exceso de material o personal.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
- 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles.
- 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Balanza semianalítica
- 7.1.2. Potenciómetro
- 7.1.3. Filtro esterilizante de 0.2 μm .
- 7.1.4. Estufa con agitación
- 7.1.5. Mechero
- 7.1.6. Esparcidor de vidrio
- 7.1.7. Autoclave

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Agitador magnético
- 7.2.2. Probeta de 1000mL
- 7.2.3. Pipeta graduada 2.0mL
- 7.2.4. Placas Petri
- 7.2.5. Erlenmeyer 1000mL
- 7.2.6. Papel encerado
- 7.2.7. Micropipetas de 100 μL
- 7.2.8. Puntas 100 μL
- 7.2.9. Asa en punta

7.3. Reactivos

- 7.3.1. Glucosa
- 7.3.2. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 7.3.3. CaCO_3
- 7.3.4. FeCl_3
- 7.3.5. $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- 7.3.6. Mica
- 7.3.7. Agar microbiológico
- 7.3.8. Azul bromotimol (solución $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en etanol al 70%).
- 7.3.9. Agua destilada desionizada

7.4. Medicamentos

N/A

7.5. Material biológico

7.5.1. Colonias aisladas de agar nutritivo de muestras de suelo

8. Procedimiento

8.1. Preparación de medio de cultivo (Medio de Aleksandrov modificado de acuerdo con las sugerencias de Rajawat *et al.*)

8.1.1. Disolver en 1L de agua desionizada con agitación continua y calor:

- 5.0g de glucosa
- 0.5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 0.1g $CaCO_3$
- 0.006g de $FeCl_3$
- 2.0g de $Ca_3(PO_4)_2$
- 3.0g de Mica
- 20.0g de agar

8.1.2. Llevar a ebullición.

8.1.3. Agregar 10mL de solución de azul bromotimol 5% en etanol al 70%.

8.1.4. Ajustar pH a 7.2 ± 0.2

8.1.5. Autoclavear el medio preparado.

8.1.6. Verter en placas Petri dentro del halo de esterilidad de un mechero y esperar a que se solidifiquen.

8.2. Inoculación de placas con la muestra de suelo

8.2.1. Segmentar la placa Petri en 12 e inocular con 5ul de ON.

8.2.2. Seguir el procedimiento de SOP 1 "Muestreo de Suelos, diluciones seriadas y aislamiento de microorganismos en el suelo" en el apartado de "Inoculación en agares selectivos y diferenciales"

8.2.3. Incubar durante 3-4 días a 28.0 ± 2.0 °C.

8.2.4. Observar el crecimiento. Las colonias solubilizadoras de fósforo tendrán un halo amarillo sobre el medio azul.

Luego... Llene un cuadro con la siguiente información.

- Código de colonia
- Prueba realizada
- Reacción positiva o negativa y cuantificación si se obtuvo
- Observaciones
- Fotografía

9. Esterilización de material

Es necesario esterilizar el medio de cultivo y contar con puntas estériles.

11.6 Medio diferencial para productores de proteasas

Procedimiento Normado de Operación	SOP 6 Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 3
Determinación de producción de proteasas	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sanchez, Valeria Ochoa

1. Propósito

Las bacterias aisladas con potencial para ser de utilidad en el crecimiento de las plantas deben ser evaluadas por sus actividades promotoras del crecimiento como la producción de ácido indol acético (IAA), producción de amoníaco, solubilización de fosfato, producción de enzimas hidrolíticas como quitinasas, proteasas y lipasas (Geetha, *et al*, 2014). La mayoría de materia orgánica en los suelos son polímeros de alto peso molecular que no están disponibles directamente. Las enzimas extracelulares secretadas por bacterias logran degradar estos polímeros en pequeñas moléculas que pueden ser absorbidos y metabolizados. Las proteasas rompen proteínas complejas en aminoácidos y péptidos. Por lo que hacen una contribución importante en el ciclo de la materia orgánica del suelo (Lui, Lui, Xing, Zhang, He, *et al*, 2021). Por lo que con este procedimiento se busca encontrar dichos organismos productores de proteasas en el suelo.

2. Aplicación

La producción de proteasas es una característica importante en las bacterias promotoras del crecimiento, ya que degradan proteínas en aminoácidos y péptidos, por lo que su determinación ayuda a determinar bacterias con mayor potencial para ser de utilidad en cultivos (Silva, *et al*, 2018). Las proteasas son enzimas importantes en la industria ya que representan alrededor del 60% del mercado de enzimas global. Tienen aplicaciones en la biofarmacéutica, en el campo médico/clínico y en la agricultura. Las de origen microbiana son preferidas en la industria debido a su diversidad bioquímica, su rápida proliferación, su fácil cultivo en células bacterianas (Luang-In, Yotchaisam, Saengha, *et al*, 2019).

3. Referencias

- 3.1. Geetha, K., Venkatesham, E., Hindumathi, A., & Bhadrarajah, B. (2014). Isolation, screening and characterization of plant growth promoting bacteria and their effect on *Vigna Radita* (L.) R. Wilczek. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 3(6), 799-899.
- 3.2. Liu, J., Liu, W., Xing, S., Zhang, X., He, H., Chen, J., ... & Zhou, M. (2021). Diversity of protease-producing bacteria in the soils of the South Shetland Islands, Antarctica. *Antonie van Leeuwenhoek*, 114(4), 457-464.
- 3.3. Luang-In, V., Yotchaisam, M., Saengha, W., Udomwong, P., Deeseenthum, S., & Maneewan, K. (2019). Protease-Producing Bacteria from Soil in Nasimuan Community Forest, Mahasarakham Province, Thailand. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(2), 587-595.
- 3.4. Silva, C., Brito, T. L. D., Taniguchi, C. A., Lopes, L. A., Pinto, G. A., & de Carvalho, A. C. (2018). Growth-promoting potential of bacterial biomass in the banana micropropagated plants. *Embrapa Agroindústria Tropical-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.

4. Terminología

- 4.1. Proteasas: Enzimas degradativas que vuelven proteínas complejas en péptidos y aminoácidos.

5. Documentos asociados

- 5.1. De Oliveira, C. T., Pereira, J. Q., Brandelli, A., & Daroit, D. J. (2017). Prospecting soil bacteria from

subtropical Brazil for hydrolases production. *Biología*, 72(2), 130-139.

- 5.2. Himedia (2018). *SM Agar*. <https://himedialabs.com/td/m763.pdf>
- 5.3. Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 110.
- 5.4. Tsegaye, Z., Yimam, M., Bekele, D., Chaniyalew, S., & Assefa, F. (2019). Characterization and Identification of Native Plant Growth-Promoting Bacteria Colonizing Tef (*Eragrostis Tef*) Rhizosphere During the Flowering Stage for A Production of Bio Inoculants. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 21(5), 16444-16456.

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

- 6.1.1. Formación de aerosoles.
- 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
- 6.1.3. Exceso de material o personal.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
- 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles .
- 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Incubadora
- 7.1.2. Refrigeradora
- 7.1.3. Balanza analítica
- 7.1.4. Micropipetas
- 7.1.5. Espátula
- 7.1.6. Autoclave
- 7.1.7. Campana de flujo laminar
- 7.1.8. Sistema de gas
- 7.1.9. Estufa con agitador magnético
- 7.1.10. Medidor de pH.

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Puntas de micropipeta
- 7.2.2. Parafilm
- 7.2.3. Cajas Petri
- 7.2.4. Erlenmeyers
- 7.2.5. Mecheros
- 7.2.6. Agitador magnético
- 7.2.7. Esparcidores

7.3. Reactivos

- 7.3.1. Agar microbilógico
- 7.3.2. Leche descremada
- 7.3.3. Peptona (Tripton o hidrolizado enzimático de caseína)
- 7.3.4. Extracto de levadura
- 7.3.5. Dextrosa (Glucosa, en algunas recetas no lo agregan)

7.4. Medicamentos

7.4.1. N/A

7.5. Material biológico

7.5.1. Colonias aisladas de agar nutritivo de muestras de suelo

8. Procedimiento

8.1. Preparación del medio

8.1.1. Pesar

- 20 gr de polvo de leche descremada (skim milk powder)
- 5 g de peptona
- 2.5 g de extracto de levadura
- 1 g de glucosa
- 15 g de agar microbiológico.

8.1.2. Diluir los ingredientes en agua destilada.

8.1.3. Calentar hasta que hierva con un agitador magnético hasta que se disuelvan todos los ingredientes.

8.1.4. Medir pH y asegurarse que este a 7.

8.1.5. Esterilizar

8.1.6. Enfriar a 45-50°C y verter en placas Petri.

8.1.7. Dejar enfriar.

8.1.8. Guardar en refrigeradora hasta su uso.

8.2. Inoculación

8.2.1. Segmentar la placa Petri en 12 e inocular con 5ul de ON.

8.2.2. Seguir el procedimiento de SOP 1 “Muestreo de Suelos, diluciones seriadas y aislamiento de microorganismos en el suelo” en el apartado de “Inoculación en agares selectivos y diferenciales”

8.2.3. *Incubar a 30°C por 24 hrs* (Pueden ser hasta 48 hrs).

8.2.4. Si se observa un halo transparente/claro alrededor de las colonias se toman como positivas las muestras.

Luego... Llene un cuadro con la siguiente información.

- Código de colonia
- Prueba realizada
- Reacción positiva o negativa y cuantificación si se obtuvo
- Observaciones
- Fotografía

9. Esterilización de material

Es necesario esterilizar el medio de cultivo y contar con puntas estériles.

10. Cálculos

No aplica

11.7 Medio diferencial para productores de lipasas

Procedimiento Normado de Operación	SOP 9 Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 3
Determinación de producción de lipasas	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sanchez, Valeria Ochoa

1. Propósito

Las bacterias aisladas con potencial para ser de utilidad en el crecimiento de las plantas deben ser evaluadas por sus actividades promotoras del crecimiento como la producción de ácido indol acético (IAA), producción de amoníaco, solubilización de fosfato, producción de enzimas hidrolíticas como quitinasas, proteasas y lipasas (Geetha, *et al*, 2014). Las lipasas son una clase de enzimas hidrolíticas que catalizan la hidrólisis de triglicéridos insolubles a glicerol, acil glicerol y ácidos grasos libres. Las lipasas son altamente efectivas tanto en medios acuosos como en no-acuosos debido a su alta estabilidad en temperaturas extremas, pH y en solventes orgánicos (Bharathi, Rajalakshmi, 2019). Las lipasas de origen microbiano han cobrado importancia en los últimos años debido a características como estabilidad en solventes orgánicos, no necesitan de cofactores, reacción específica a una gran variedad de sustratos (Rabbani, Shafiee, Shayegh, MirMohammadSadeghi, *et al*, 2015).

2. Aplicación

La producción de lipasas es una característica importante en las bacterias promotoras del crecimiento ya que ayudan a catalizar la hidrólisis de triglicéridos a ácidos grasos libres, por lo que su determinación ayuda a determinar bacterias con mayor potencial para ser de utilizad en cultivos: Las lipasas también tiene un uso en la industria en varios proceso de la industria alimenticia y farmacéutica (Silva, *et al*, 2018).

3. Referencias

- 3.1. Bharathi, D., & Rajalakshmi, G. (2019). Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101368.
- 3.2. Geetha, K., Venkatesham, E., Hindumathi, A., & Bhadraiah, B. (2014). Isolation, screening and characterization of plant growth promoting bacteria and their effect on Vigna Radita (L.) R. Wilczek. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 3(6), 799-899.
- 3.3. Joshi, S., Jaggi, V., Tiwari, S., Sah, V. K., & Sahgal, M. (2019). Multitrate phosphate solubilizing bacteria from Dalbergia sissoo Roxb. Rhizosphere in natural forests of Indian Central Himalayas. *Environ Ecol*, 37(3A), 894-908.
- 3.4. Rabbani, M., Shafiee, F., Shayegh, Z., MirMohammadSadeghi, H., Samsam Shariat, Z., Etemadifar, Z., & Moazen, F. (2015). Isolation and Characterization of a New Thermoalkalophilic Lipase from Soil Bacteria. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 14(3), 901-906.
- 3.5. Silva, C., Brito, T. L. D., Taniguchi, C. A., Lopes, L. A., Pinto, G. A., & de Carvalho, A. C. (2018). Growth-promoting potential of bacterial biomass in the banana micropropagated plants. *Embrapa Agroindústria Tropical-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.

4. Terminología

- 4.1. Lipasas: Son enzimas que catalizan la hidrólisis de los triglicéridos convirtiéndolos en glicerol y ácidos grasos en una interfase aceite-agua (Javed, *et al*, 2018).
- 4.2. Tween 80 (polisorbato 80, monooleato de polioxietilensorbitán): Es un emulsionante no iónico que es ampliamente utilizado en cosméticos, productos farmacéuticos y alimentos (Nielsen, *et al*, 2018).

5. Documentos asociados

- 5.1. Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., ... & Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Progress in biophysics and molecular biology*, 132,

23-34.

- 5.2. Nielsen, C. K., Kjems, J., Mygind, T., Snabe, T., & Meyer, R. L. (2016). Effects of Tween 80 on growth and biofilm formation in laboratory media. *Frontiers in microbiology*, 7, 1878.

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

- 6.1.1. Formación de aerosoles.
- 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
- 6.1.3. Exceso de material o personal.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
- 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles .
- 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Incubadora
- 7.1.2. Refrigeradora
- 7.1.3. Autoclave
- 7.1.4. Estufa con agitador magnético
- 7.1.5. Micropipetas 100ul
- 7.1.6. Micropipetas 10ul

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Cajas Petri
- 7.2.2. Tubos Falcon (15 ml)
- 7.2.3. Esparcidores de placa
- 7.2.4. Asa
- 7.2.5. Parafilm
- 7.2.6. Puntas de micropipeta 100ul
- 7.2.7. Puntas de micropipeta 10ul

7.3. Reactivos

- 7.3.1. Tween 80
- 7.3.2. Agar nutritivo

7.4. Medicamentos

- 7.4.1. NA

7.5. Material biológico

- 7.5.1. Colonias aisladas de agar nutritivo de muestras de suelo

8. Procedimiento

- 8.1. Preparación de agar nutritivo suplementado

8.1.1. Preparar agar nutritivo y suplementar con 1g de Tween 80 (1% p/v)

8.2. Inoculación y Determinación de producción de lipasas.

8.2.1. Seguir el procedimiento de SOP 1 "Muestreo de Suelos, diluciones seriadas y aislamiento de microorganismos en el suelo" en el apartado de "Inoculación en agares selectivos y diferenciales"

8.2.2. *Dejar incubar por 24hrs a 37°C.*

8.2.3. Si hay precipitado alrededor de la colina se toma como positivo.

Luego... Llene un cuadro con la siguiente información.

- Código de colonia
- Prueba realizada
- Reacción positiva o negativa y cuantificación si se obtuvo
- Observaciones
- Fotografía

9. Esterilización de material

Es necesario esterilizar el medio de cultivo y contar con puntas estériles.

10. Cálculos

No aplica

11.8 Medio diferencial de productores de gluconasas

Procedimiento Normado de Operación	SOP Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 4
SOP Gluconasas	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sanchez, Valeria Ochoa

1. Propósito

Detección y aislamiento de microorganismos en el suelo capaces de producir enzimas liticas, específicamente gluconasas. Por lo que con este procedimiento se busca encontrar dichos organismos productores de gluconasas en el suelo.

2. Aplicación

Los microorganismos del suelo constantemente interactúan con las raíces de las plantas en busca de comida, generalmente estas interacciones no causan enfermedades a las plantas. Las raíces de las plantas están colonizadas por todo tipo de bacterias entre las que se encuentran bacterias promotoras del crecimiento (PGPR por sus siglas en inglés), las cuales tienen un rol importante tanto en el crecimiento de la planta como en combatir estreses bióticos y abióticos. Como método de protección producen compuestos bioactivos tales como enzimas liticas. Una de estas enzimas son las gluconasas. La producción de gluconasas en bacterias es conocida por ser uno de los mayores mecanismos de biocontrol conocidos que poseen las bacterias promotoras del crecimiento. Las gluconasas son enzimas liticas que se encargan de degradar la pared celular de hongos patógenos. Entre las enzimas que secretan estas bacterias se encuentran las β -1,3-gluconasa. Bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son normalmente capaces de producir estas enzimas (Benjumeda Muñoz, 2017) (Jha, Dehury, Kumar, *et al*, 2022).

3. Referencias

- 3.1. Anónimo (2010). CMCA (*Carboxymethylcellulose agar*). Extraído de: [https://wiki.bugwood.org/CMCA_\(Carboxymethylcellulose_agar\)](https://wiki.bugwood.org/CMCA_(Carboxymethylcellulose_agar))
- 3.2. Benjumeda Muñoz, D. (2017). Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal: Mecanismos y Aplicaciones. Extraído de: <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/65140/BENJUMEDA%20MUÑOZ%2C%20DANIEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- 3.3. Jha, Y., Dehury, B., Kumar, S., Chaurasia, A., Singh, U. B., Yadav, M. K., Angadi, U. B., Ranjan, R., Tripathy, M., Subramanian, R. B., Kumar, S., & Simal-Gandara, J. (2022). Delineation of molecular interactions of plant growth promoting bacteria induced β -1,3-gluconases and guanosine triphosphate ligand for antifungal response in rice: a molecular dynamics approach. *Molecular biology reports*, 49(4), 2579–2589. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-07059-5>
- 3.4. Zia, M. A., Yasmin, H., Shair, F., Jabeen, Z., Mumtaz, S., Hayat, Z., ... & Hassan, M. N. (2019). gluconolytic rhizobacteria produce antifungal metabolites and elicit ROS scavenging system in sugarcane. *Sugar Tech*, 21(2), 244-255.

4. Terminología

- 4.1. Gluconasas: Las gluconasas son enzimas liticas que hidrolizan los b-gluconos de la pared celular de fitopatógenos de suelo (González, Infante, *et al*, 2011).

5. Documentos asociados

- 5.1. González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., González, N., & Miranda, I. (2011). Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. II. Expresión de actividad gluconasa. *Revista de Protección Vegetal*, 26(1), 23-29.

6. Seguridad
 - 6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:
 - 6.1.1. Formación de aerosoles.
 - 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
 - 6.1.3. Exceso de material o personal.
 - 6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio
 - 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
 - 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
 - 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
 - 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
 - 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles .
 - 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
 - 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
 - 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
 - 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
 - 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
 - 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).
7. Equipo, materiales y reactivos
 - 7.1. Equipo
 - 7.1.1. Incubadora
 - 7.1.2. Refrigeradora
 - 7.1.3. Balanza analítica
 - 7.1.4. Micropipetas
 - 7.1.5. Espátula
 - 7.1.6. Autoclave
 - 7.1.7. Campana de flujo laminar
 - 7.1.8. Sistema de gas
 - 7.1.9. Estufa con agitador magnético
 - 7.1.10. Medidor de pH.
 - 7.2. Materiales/ Cristalería
 - 7.2.1. Puntas de micropipeta
 - 7.2.2. Parafilm
 - 7.2.3. Cajas Petri
 - 7.2.4. Erlenmeyers
 - 7.2.5. Mecheros
 - 7.2.6. Agitador magnético
 - 7.2.7. Esparcidores
 - 7.3. Reactivos
 - 7.3.1. Agar microbiológico.
 - 7.3.2. Laminarin
 - 7.3.3. CMC (carboximetil celulosa)
 - 7.3.4. Almidón
 - 7.3.5. Congo Red (Rojo de Congo)
 - 7.3.6. Laminarina
 - 7.4. Medicamentos
 - 7.4.1. N/A
 - 7.5. Material biológico

- 7.5.1. Colonias aisladas de agar nutritivo de muestras de suelo
- 7.5.2. Nagpure, A., Choudhary, B., & Gupta, R. K. (2014). Mycolytic enzymes produced by *Streptomyces violaceusniger* and their role in antagonism towards wood-rotting fungi. *Journal of Basic Microbiology*, 54(5), 397-407.

8. Procedimiento

- 8.1. Preparar una solución de NaCl a 1M.
- 8.2. Preparación del medio
- 8.2.1. Pesar (Preparación para 1 litro)
- 8.2.1.1. 1 gramo de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.
- 8.2.1.2. 0.2 gramos de KCL
- 8.2.1.3. 1 gramo de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 8.2.1.4. 1 g de extracto de levadura.
- 8.2.1.5. Mezclar.
- 8.2.1.6. Agregar lo siguiente:
- 8.2.1.7. 26g de CMC
- 8.2.1.8. Laminarina 0.2% w/v (algunas recetas prescinden de esto)
- 8.2.1.9. Almidón (algunas recetas prescinden de esto)
- 8.2.1.10. 3 gramos de agar. (revisar)
- 8.2.2. Diluir los ingredientes en agua destilada.
- 8.2.3. Calentar hasta que hierva con un agitador magnético hasta que se disuelvan todos los ingredientes.
- 8.2.4. Medir pH y asegurarse que este a 7.
- 8.2.5. Esterilizar
- 8.2.6. Enfriar a 45-50°C y verter en placas Petri.
- 8.2.7. Dejar enfriar.
- 8.2.8. Guardar en refrigeradora hasta su uso.
- 8.3. Inoculación
- 8.3.1. Segmentar la placa Petri en 12 e inocular con 5ul de ON.
- 8.3.2. Seguir el procedimiento de SOP 1 "Muestreo de Suelos, diluciones seriadas y aislamiento de microorganismos en el suelo" en el apartado de "Inoculación en agares selectivos y diferenciales"
- 8.3.3. Incubar a 30-37°C por 48 hrs (Pueden ser hasta 4 días).
- 8.3.4. Bañar con una solución al 0.1% (w/v) (algunas recetas dicen al 0.3%) Congo Red y dejar por 20 min. Algunas recetas dicen que hasta por 6 horas.
- 8.3.5. Quitar la solución de Congo Red y lavar con NaCl (1M). Algunas fuentes lo dejan por 20 min.
- 8.3.6. La producción de gluconasas es determinada midiendo el diametro del halo alrededor de las colimias después de desteñirlas.

Luego... Llene un cuadro con la siguiente información.

- Código de colonia
- Prueba realizada
- Reacción positiva o negativa y cuantificación si se obtuvo
- Observaciones
- Fotografía

9. Esterilización de material

Es necesario esterilizar el medio de cultivo y contar con puntas estériles.

10. Cálculos

N/A

11. Control de calidad

- 11.1. Verificar con un check list que se llevó al lugar los implementos necesarios

11.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado 4°C, -20°C o -80°C.

12. Conflict solution policy

12.1.

11.9 Medio diferencial para productores de quitinasas

Procedimiento Normado de Operación	SOP Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 3
SOP Quitinasas	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sanchez, Valeria Ochoa

1. Propósito

Detección y aislamiento de microorganismos en el suelo capaces de producir enzimas líticas, específicamente quitinasas. Por lo que con este procedimiento se busca encontrar dichos organismos productores de quitinasas en el suelo.

2. Aplicación

Las bacterias promotoras del crecimiento son conocidas por mejorar y reducir la severidad de enfermedades fúngicas. Estas bacterias ayudan a la planta a utilizar diferentes mecanismo para combatir el crecimiento de los patógenos. Una de enzimas líticas producida es la quitinasa, la cuál es considerada uno de las mayores antagonistas ya que la quitina es uno de los principales componentes presentes en la pared celular de los hongos. La acción hidrolítica de estas enzimas tiene como resultado la degradación de la pared celular fúngica. Algunos de los principales exponentes son las *Pseudomonas* spp (Viswanathan, Samiyappan, 2001)(Sastoque,

3. Referencias

- 3.1. N Murthy, B Bleakley. (2012) Simplified Method of Preparing Colloidal Chitin Used For Screening of Chitinase- Producing Microorganisms. *The Internet Journal of Microbiology*. Volume 10 Number 2.
- 3.2. Sastoque Cala, E.L (2005). Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial bioconductor.
- 3.3. Viswanathan, R., & Samiyappan, R. (2001). Antifungal activity of chitinases produced by some fluorescent pseudomonads against *Colletotrichum falcatum* Went causing red rot disease in sugarcane. *Microbiological Research*, 155(4), 309-314.

4. Terminología

- 4.1. Quitinasa: Son enzimas es capaces de hidrolizar quitina en sus componentes oligo y monoméricos.

5. Documentos asociados

- 5.1. Castro, R., Álvarez, A., Machado, E., Mendoza, M., Gómez, R., & Garcia, P. (2011). Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(2), 101-108.
- 5.2. Sakai, K., Yokota, A., Kurokawa, H., Wakayama, M., & Moriguchi, M. (1998). Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. *Applied and environmental microbiology*, 64(9), 3397-3402. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3397-3402.1998>

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

- 6.1.1. Formación de aerosoles.
- 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.

- 6.1.3. Exceso de material o personal.
- 6.2. **Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio**
 - 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
 - 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
 - 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
 - 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
 - 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles .
 - 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
 - 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
 - 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
 - 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
 - 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
 - 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).
- 7. **Equipo, materiales y reactivos**
 - 7.1. **Equipo**
 - 7.1.1. Incubadora
 - 7.1.2. Refrigeradora
 - 7.1.3. Balanza analítica
 - 7.1.4. Micropipetas
 - 7.1.5. Espátula
 - 7.1.6. Autoclave
 - 7.1.7. Campana de flujo laminar
 - 7.1.8. Sistema de gas
 - 7.1.9. Estufa con agitador magnético
 - 7.1.10. Medidor de pH.
 - 7.2. **Materiales/ Cristalería**
 - 7.2.1. Puntas de micropipeta
 - 7.2.2. Parafilm
 - 7.2.3. Cajas Petri
 - 7.2.4. Erlenmeyers
 - 7.2.5. Mecheros
 - 7.2.6. Agitador magnético
 - 7.2.7. Esparcidores
 - 7.3. **Reactivos**
 - 7.3.1. Agar microbiológico
 - 7.3.2. Quitina-Quitina húmeda (puede ser quitina coloidal, lavarse la quitina o cutícula de coleópteros molida (cucarrón) o larvas de garrapata o incluso cáscara de camarón(cran shell quitin (Sigma??))
 - 7.3.3. K_2HPO_4
 - 7.3.4. KH_2PO_4
 - 7.3.5. $MgSO_4 \cdot 5H_2O$
 - 7.3.6. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
 - 7.3.7. $ZnSO_4$
 - 7.3.8. $MnCl_2$
 - 7.4. **Medicamentos**
 - 7.4.1. N/A
 - 7.5. **Material biológico**
 - 7.5.1. Colonias aisladas de agar nutritivo de muestras de suelo
- 8. **Procedimiento**
 - 8.1. Preparación de quitina húmeda (Hay diferentes formas de hacer esto)

- 8.1.1. "Hojuelas" de cascara de crangejo se molieron manuellamente en un mortero durante 5 min.
- 8.1.2. Se filtró por un filtro de 130 mm.
- 8.1.3. Se pesó 20 gramos de este polvo.
- 8.1.4. Se trató con 150 ml de HCL (12M) en un beaker de 1000 ml. El HCL se debe agregar despacio y se revuelve cada 5 min por 60 min bajo campana a temperatura ambiente.
- 8.1.5. Se coló a traves de 8 capas de tela para hacer queso para remover los grumos grandes de quitina.
- 8.1.6. Los aproximadamente 100 ml de líquido claro que se deben obtener son tratados con 2 litro con agua destilada fria.
- 8.1.7. Se observa un precipitado.
- 8.1.8. Se incubo por la noche a 4°C grados.
- 8.1.9. Pasar a través de dos capas de papel de filtro de café, alojado en un embudo Buchner (130 mm) asentado en un matraz de filtración al vacío.
- 8.1.10. Pasar aproximadamente por 3 litros de agua del grifo (pH de ~8,0) a través de la torta de quitina coloidal utilizando el filtro, hasta que el pH del filtrado se eleve a 7,0 (Se puede estimar con por papel de pH).
- 8.1.11. Prensar entre papeles de filtro de café (para eliminar la humedad adicional)
- 8.1.12. Colocar en un vaso de vidrio de 100 ml y cubrirlo con dos capas de papel de aluminio
- 8.1.13. Esterilizar en autoclave a temperatura y presión estándar (STP) (15 psi, 20 minutos, 121°C).
- 8.2. Pesar
 - 8.2.1. 0.7 g K₂HPO₄,
 - 8.2.2. 0.3 g KH₂PO₄
 - 8.2.3. 0.5 g MgSO₄ X 5H₂O
 - 8.2.4. 0.01 g FeSO₄ X 7H₂O
 - 8.2.5. 0.001 g ZnSO₄,
 - 8.2.6. 0.001 g MnCl₂, 0.0
 - 8.2.7. 20 g de quitina húmeda (2%)
 - 8.2.8. 20 g de agar
 - 8.2.9. Diluir los ingredientes en agua destilada.
 - 8.2.10. Calentar hasta que hierva con un agitador magnético hasta que se disuelvan todos los ingredientes.
 - 8.2.11. Medir pH y asegurarse que este a 7.
 - 8.2.12. Esterilizar
 - 8.2.13. Enfriar a 45-50°C y verter en placas Petri.
 - 8.2.14. Dejar enfriar.
 - 8.2.15. Guardar en refrigeradora hasta su uso.
- 8.3. Inoculación
 - 8.3.1. Segmentar la placa Petri en 12 e inocular con 5ul de ON.
 - 8.3.2. Seguir el procedimiento de SOP 1 "Muestreo de Suelos, diluciones seriadas y aislamiento de microorganismos en el suelo" en el apartado de " Inoculación en agares selectivos y diferenciales"
 - 8.3.3. Incubar a 30-37°C por 24 hrs (Pueden ser hasta 48 hrs).
 - 8.3.4. Si se observa un halo transparente claro alrededor de las colonias se toman como positivas las muestras.
9. Esterilización de material
Es necesario esterilizar el medio de cultivo y contar con puntas estériles.
10. Cálculos
No aplica
11. Control de calidad
 - 11.1. Verificar con un check list que se llevó al lugar los implementos necesarios
 - 11.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado 4°C, -20°C o -80°C.
12. Conflict solution policy
 - 12.1. N/A