

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Evaluación *in vitro* de la capacidad enzimática de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus* para solubilizar fosfatos en suelos de cultivo de caña de azúcar y diseño de una prueba de concepto de una metodología molecular para su detección rápida

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Natalia Valdés Mancilla
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala, 2025

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Evaluación *in vitro* de la capacidad enzimática de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus* para solubilizar fosfatos en suelos de cultivo de caña de azúcar y diseño de una prueba de concepto de una metodología molecular para su detección rápida

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Natalia Valdés Mancilla
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala, 2025

Vo.Bo.:



(f) _____

Ph.D. Dalia Lau-Bonilla

Tribunal Examinador:

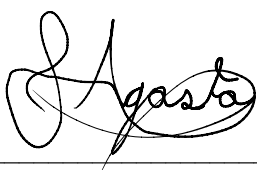


(f) _____

Ph.D. Dalia Lau-Bonilla

(f) _____


M.Sc. Isabella García Caffaro

(f) _____


Lic. Andrés Say-Agosto

Fecha de aprobación: Guatemala, diciembre de 2025

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 General	3
2.2 Específicos	3
3. JUSTIFICACIÓN	4
4. MARCO CONTEXTUAL	7
5. MARCO TEÓRICO	8
5.1 Fósforo en los suelos de cultivo	8
5.1.1 Importancia del fósforo en el crecimiento vegetal	8
5.1.2 Mecanismo de absorción de fósforo	9
5.1.3 Factores que limitan la disponibilidad de fósforo en el suelo	9
5.2 Agricultura convencional y fertilizantes químicos	10
5.2.1 Uso de fertilizantes químicos en la agricultura	10
5.2.2 Problemática del uso excesivo de fertilizantes químicos en suelos de cultivo	10
5.3 Agricultura sostenible y biofertilizantes	12
5.3.1 Concepto de agricultura sostenible	12
5.3.2 Biofertilizantes y sus beneficios en la agricultura sostenible	13
5.4 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	14
5.4.1 Características de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal	14
5.4.2 Especies predominantes	16
5.4.3 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal	16
5.5 Bacterias solubilizadoras de fosfato	17
5.5.1 Características de las bacterias solubilizadoras de fosfato	17

5.5.2 Mecanismos de solubilización de fosfato	18
5.6 Marcaje molecular	19
5.6.1 Métodos moleculares para marcaje de cepas	19
5.6.2 Manejo de la resistencia a antibióticos	20
5.6.3 Medidas de bioseguridad al trabajar con bacterias ambientales	20
5.6.4 Regulación de bacterias genéticamente modificadas	21
6. MARCO METODOLÓGICO	22
6.1 Diseño, enfoque y tipo de investigación	22
6.2 Población y muestra	22
6.3 Variables	22
6.4 Hipótesis	23
6.4.1 Hipótesis alternativa (Ha)	23
6.4.2 Hipótesis nula (Ho)	23
7. METODOLOGÍA	24
7.1 Análisis de actividad de fosfatasas en muestras de suelo	24
7.1.1 Muestreo de suelo	24
7.1.2 Determinación del pH de las muestras	25
7.1.3 Preparación de buffer MUB	25
7.1.4 Curva de calibración de p-nitrofenol	25
7.1.5 Ensayo de actividad de fosfatasas en muestras de suelo – actividad inicial	26
7.1.6 Preparación de los inóculos de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus tropicus</i>	26
7.1.7 Ensayo de actividad de fosfatasas en muestras de suelo tras la inoculación con <i>Bacillus subtilis</i> y/o <i>Bacillus tropicus</i>	26
7.2 Desarrollo de una prueba de concepto, basada en la inserción de un gen enzimático, para la detección rápida de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus tropicus</i> en suelos de cultivo de caña de azúcar	27
7.2.1 Selección del gen de interés	27
7.2.2 Diseño de <i>primers</i>	27
7.2.3 Selección del vector de clonación	27
7.2.4 Selección de las enzimas de restricción	28
7.2.5 Extracción de ADN genómico de <i>E. coli</i>	28
7.2.6 Amplificación del gen seleccionado	28

7.2.7 Purificación del inserto	29
7.2.8 Extracción del plásmido	29
7.2.9 Linealización del plásmido	30
7.2.10 Ensamblaje de Gibson	30
7.2.11 Obtención de <i>E. coli</i> ultracompetente por el método de cloruro de calcio	30
7.2.12 Transformación de <i>E. coli</i> competente	31
7.2.13 Extracción del plásmido recombinante	31
7.2.14 Preparación de cepas de <i>Bacillus</i> ultracompetente	31
7.2.15 Transformación de cepas de <i>Bacillus</i> por electroporación	32
8. RESULTADOS	33
8.1 Análisis <i>in vitro</i> de la actividad de fosfatasas en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar	33
8.1.1 Determinación de la actividad inicial de fosfatasas en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar, previo a la inoculación	33
8.1.2 Determinación del pH de las muestras de suelo	35
8.1.3 Análisis, <i>in vitro</i> , del cambio en la actividad de las fosfatasas del suelo tras la inoculación con <i>Bacillus subtilis</i> y/o <i>Bacillus tropicus</i>	36
8.1.3.1 Análisis <i>in vitro</i> del efecto de la inoculación con <i>Bacillus subtilis</i> , sobre la actividad de fosfatasas en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar	37
8.1.3.2 Análisis <i>in vitro</i> del efecto de la inoculación con <i>Bacillus tropicus</i> sobre la actividad de fosfatasas en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar	40
8.1.3.3 Análisis <i>in vitro</i> , del efecto de la inoculación con <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus tropicus</i> sobre la actividad de fosfatasas en muestras de suelo	43
8.1.3.4 Análisis del efecto de la concentración del inóculo de <i>Bacillus subtilis</i> y/o <i>Bacillus tropicus</i> sobre la actividad de fosfatasas en muestras de suelo	46
8.2 Diseño una metodología molecular para la detección de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus tropicus</i> , basado en la inserción de un gen enzimático	49
8.2.1 Validación de la funcionalidad de la metodología propuesta para la detección de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus tropicus</i>	54
9. DISCUSIÓN	59
10. CONCLUSIONES	73

11. RECOMENDACIONES.....	74
12. BIBLIOGRAFÍA.....	75
13. ANEXOS.....	89
13.1 Material suplementario.....	89
13.2 Protocolos.....	98
13.2.1 Determinación de la actividad de fosfatasas en muestras de suelo	98
13.2.2 Amplificación de gen <i>uidA</i>	102
13.2.3 Obtención de <i>E. coli</i> ultracompetente por el método de cloruro de calcio y su transformación	106

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Variables de la investigación.....	22
Cuadro 2. Información de los puntos de muestreo	24
Cuadro 3. Componentes de la reacción de amplificación del gen seleccionado	28
Cuadro 4. Condiciones de la reacción de amplificación del gen seleccionado	29
Cuadro 5. Componentes de la reacción de linealización del plásmido.....	30
Cuadro 6. Condiciones de la linealización del plásmido seleccionado	30
Cuadro 7. Valores de pH de las muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar	35
Cuadro 8. Características del gen seleccionado para la prueba de concepto	50
Cuadro 9. Características del vector de clonación seleccionado para la prueba de concepto	51
Cuadro 10. Diseño de <i>primers</i> y selección de enzima de restricción para la amplificación del gen uidA en la prueba de concepto	52
Cuadro 11. Absorbancias de los estándares de p-nitrofenol	89
Cuadro 12. Análisis de actividad de fosfatasas previo a la inoculación	90
Cuadro 13. Absorbancias de las muestras de suelo inoculadas con <i>B. subtilis</i>	91
Cuadro 14. Microgramos de p-nitrofenol en las muestras de suelo inoculadas con <i>B. subtilis</i>	92
Cuadro 15. Microgramos de p-nitrofenol por hora, por gramo de suelo en las muestras las inoculadas con <i>B. subtilis</i>	92
Cuadro 16. Absorbancias de las muestras de suelo inoculadas con <i>B. tropicus</i>	93
Cuadro 17. Microgramos de p-nitrofenol en las muestras de suelo inoculadas con <i>B. tropicus</i>	94
Cuadro 18. Microgramos de p-nitrofenol por hora, por gramo de suelo de las muestras las inoculadas con <i>B. tropicus</i>	95
Cuadro 19. Absorbancias de las muestras de suelo inoculadas con <i>B. subtilis</i> y <i>B. tropicus</i>	95
Cuadro 20. Microgramos de p-nitrofenol en las muestras de suelo inoculadas con <i>B. subtilis</i> y <i>B. tropicus</i>	96

Cuadro 21. Microgramos de p-nitrofenol por hora, por gramo de suelo de las muestras las inoculadas con <i>B. subtilis</i> y <i>B. tropicus</i>	97
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Funciones principales del fósforo en los suelos de cultivo	8
Figura 2. Efectos negativos del uso de fertilizantes químicos	12
Figura 3. Beneficios de los biofertilizantes	13
Figura 4. Tipos de asociaciones biológicas entre las bacterias promotoras del crecimiento vegetal y las raíces de los cultivos	14
Figura 5. Características de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal y sus funciones en los cultivos	15
Figura 6. Mecanismo enzimático de solubilización de fosfato.....	19
Figura 7. Determinación de la actividad inicial de fosfatasas en muestras frescas de suelo de cultivo de caña de azúcar	34
Figura 8. Actividad in vitro de fosfatasas en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar, tras la inoculación con <i>Bacillus subtilis</i>	37
Figura 9. Actividad in vitro de fosfatasas en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar, tras la inoculación con <i>Bacillus tropicus</i>	40
Figura 10. Actividad <i>in vitro</i> de fosfatasas en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar, tras la inoculación con <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus tropicus</i>	43
Figura 11. Comparación de la actividad in vitro de fosfatasas en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar, tras la inoculación con <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus tropicus</i> ...	46
Figura 12. Ensamblaje de Gibson <i>in silico</i> del vector recombinante pBsacA-uidA.....	53
Figura 13. Evaluación de la funcionalidad y viabilidad de la prueba de concepto propuesta para la construcción del plásmido recombinante pBsacA-uidA.....	55
Figura 14. Confirmación molecular de la eficiencia del ensamblaje del plásmido recombinante y su transformación en <i>E. coli</i> DH5 α	57
Figura 15. Curva de calibración de p-nitrofenol.....	89

RESUMEN

La disponibilidad de fósforo en los suelos agrícolas es una limitante para la productividad de cultivos como la caña de azúcar, por lo que el uso de microorganismos con capacidad de solubilizar fosfatos representa una alternativa sostenible. Estos microorganismos, como parte de su metabolismo, secretan fosfatasas que hidrolizan moléculas fosfatadas orgánicas para liberar el fósforo inorgánico que las plantas necesitan. Sin embargo, actualmente existe una problemática y es que no existen métodos sencillos ni de bajo costo que permitan detectar y monitorear a los biofertilizantes tras su aplicación en los suelos de cultivo. En este estudio se centró en analizar el cambio en la actividad de las fosfatasas, *in vitro*, tras la inoculación con *Bacillus subtilis* y/o *Bacillus tropicus*. Los resultados evidenciaron una actividad enzimática inicial heterogénea entre las muestras, lo que sugiere que esta depende de factores como la microbiota nativa, la humedad, la disponibilidad de cofactores y las características de cada suelo. Se observó que *B. subtilis* presentó mayor eficacia en concentraciones de 10^8 – 10^{10} UFC/mL, mientras que *B. tropicus* alcanzó sus mejores resultados en el rango de 10^6 – 10^8 UFC/mL. Entre las muestras analizadas, el suelo 1BP (baja productividad) mostró el mayor incremento en la actividad enzimática, evidenciando que la inoculación resulta particularmente beneficiosa en suelos con menor actividad microbiana basal. Adicionalmente, se desarrolló una prueba de concepto para la detección molecular de estas cepas mediante la inserción del gen reportero *uidA*, el cual codifica para la β -glucuronidasa. La selección del vector pBsacA, caracterizado por un alto número de copias y un promotor constitutivo fuerte, permitió garantizar una expresión eficiente del marcador. El diseño del constructo mediante ensamblaje de Gibson *in silico* favoreció a obtener una inserción precisa y en la correcta dirección del gen, confirmando la viabilidad del sistema propuesto. Finalmente, la validación experimental preliminar en *E. coli* DH5 α confirmó la funcionalidad de la estrategia desarrollada. La amplificación eficiente del gen *uidA*, la correcta linealización del vector, el ensamblaje exitoso y la obtención de bacterias transformadas viables evidencian que el constructo recombinante es estable y funcional. En general, estos resultados demuestran el potencial de *B. subtilis* y *B. tropicus* como

biofertilizantes y también establecen las bases para el desarrollo de metodologías sencillas que permitan su monitoreo en suelos agrícolas.

Palabras clave: *solubilización de fosfato, actividad de fosfatasas, biofertilizante, microbiota del suelo, gen uidA, ensamblaje de Gibson*

1. INTRODUCCIÓN

El fósforo es el segundo macronutriente más importante para el desarrollo y crecimiento de los cultivos, después del nitrógeno. Participa en la regulación de mecanismos fisiológicos y moleculares, lo cual lo convierte en un nutriente indispensable (Bechtaoui et al., 2021). Sin embargo, existe una deficiencia de fósforo en los suelos de cultivo, ya que solo el 0.1 % se encuentra disponible para las plantas debido a factores como la inmovilización o a su conformación orgánica (Zhu et al., 2024).

Para lidiar con esta problemática, la agricultura ha dependido en gran medida de la aplicación de fertilizantes químicos. Sin embargo, esta se ha convertido en una práctica poco eficiente, ya que solo el 10-20 % del fósforo que se aplica de esta forma es absorbido y aprovechado por las plantas (Roberts & Johnston, 2015). El excedente suele reaccionar con iones presentes en los suelos, acumulándose en ellos. Con frecuencia, los excedentes también son transportados a fuentes de agua, a través de la lluvia, generando contaminación y otros problemas ambientales (Khan et al., 2023). Por esta razón, en la actualidad los biofertilizantes están cobrando gran relevancia. Estos además de promover la salud del suelo, suelen ser menos costosos, en comparación con fertilizantes químicos (Mitter et al., 2021; Tahat et al., 2020). Dentro de los microorganismos con potencial para ser parte de un biofertilizante se encuentran las bacterias del género *Bacillus*, las cuales, entre otras características, presentan la capacidad de secretar fosfatasas que permiten solubilizar el fosfato en los suelos (Yu et al., 2022). Pese a sus beneficios, actualmente existe una limitante en la disponibilidad de métodos que permitan detectar y monitorear los biofertilizantes, tras su aplicación en los suelos de cultivo. Los análisis microbiológicos o moleculares que se suelen implementar son poco específicos, costosos y requieren de equipo especializado (Raimi et al., 2020; Ruiu, 2020).

Es por eso que la presente investigación se centró en analizar el cambio en la actividad de las fosfatasas, *in vitro*, tras la inoculación con *Bacillus subtilis* y/o *Bacillus tropicus*.

También se planteó diseñar una metodología molecular para la detección rápida de dichas cepas, la cual se evaluó a modo de prueba de concepto.

2. OBJETIVOS

2.1 General

Evaluar *in vitro* la capacidad enzimática de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus* para solubilizar fosfatos en suelos de cultivo de caña de azúcar y desarrollar una prueba de concepto de una metodología molecular para su detección rápida.

2.2 Específicos

- 2.2.1 Determinar la actividad de fosfatasas en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar, a partir de espectrofotometría UV-VIS.
- 2.2.2 Analizar el cambio en la actividad de las fosfatasas del suelo *in vitro*, tras la inoculación con *Bacillus subtilis* y/o *Bacillus tropicus*.
- 2.2.3 Diseñar una metodología molecular para detectar *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*, basado en la inserción de un gen enzimático.
- 2.2.4 Validar molecularmente la funcionalidad de la metodología propuesta para la detección de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*.

3. JUSTIFICACIÓN

El fósforo es un macronutriente que se encuentra en concentraciones abundantes en la litósfera, capa superficial de la Tierra. Se estima que en el suelo hay dos veces más fósforo del que una planta podría necesitar (Fathi & Mehdiniya, 2023). No obstante, entre el 20-80 % de este macronutriente se encuentra en su forma orgánica (Malhotra et al., 2018). Sin embargo, las plantas pueden absorberlo únicamente cuando se encuentra en su forma inorgánica. Este hecho lleva a que exista una deficiencia de fósforo en los suelos de cultivo. Específicamente solo el 0.1 % del fósforo presente en los suelos se encuentra en su forma inorgánica, disponible para las plantas (Khan et al., 2023). Para lidiar con esta problemática, la agricultura ha dependido de la aplicación de fertilizantes químicos, pero la eficiencia de estos suele ser limitada, ya que solo el 10-20 % del fósforo que se aplica es absorbido y aprovechado por las plantas (Roberts & Johnston, 2015). El excedente se acumula en los suelos, generando problemas ambientales a largo plazo (Fathi & Mehdiniya, 2023; Khan et al., 2023).

Se estima que para el 2050, la población total del mundo sea de 9.9 mil millones de personas. Este hecho lleva a que sea necesario mejorar las prácticas relacionadas con la agricultura, con el objetivo de suplir las necesidades alimenticias que se tendrán en ese entonces (Bechtaoui et al., 2021). Una alternativa viable es la implementación de la agricultura sostenible, la cual se basa en aumentar la productividad del suelo y minimizar el impacto ambiental (Khan et al., 2023).

Como parte de la agricultura sostenible, se encuentra el aprovechamiento de características celulares y metabólicas de ciertos microorganismos beneficiosos, los cuales pueden ser aplicados como biofertilizantes. Este tipo de biofertilizante tiene como objetivo mejorar y promover la salud del suelo y el crecimiento de los cultivos de manera sostenible y amigable con el medio ambiente, sin depender del uso excesivo de fertilizantes químicos (Kumar et al., 2021). En este contexto, la aplicación de biofertilizantes ofrece diversos

beneficios como mejorar la salud del suelo, promoviendo la biodiversidad microbiana y la reducción de la contaminación de los ecosistemas, causada por fertilizantes químicos, lo cual los convierte en una alternativa sostenible y rentable (Mitter et al., 2021; Tahat et al., 2020).

Dentro de estos microorganismos beneficiosos, con potencial para ser utilizados como parte de las formulaciones de biofertilizantes, se encuentran bacterias del género *Bacillus*. Se ha demostrado que estas tienen una actividad promotora del crecimiento vegetal predominante (Ramakrishna et al., 2019). Además, son bacterias solubilizadoras de fosfatos, que contribuyen a reducir las acumulaciones de fósforo insoluble en los suelos de cultivo y mejoran su productividad a largo plazo (Yu et al., 2022).

Considerando la gran importancia que tiene el fósforo, como nutriente en los suelos de cultivo (Bechtaoui et al., 2021), durante la presente investigación se busca evaluar si existe un cambio en la actividad de la fosfatasa alcalina, antes y después de inocular muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar con *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*. Además, se plantea analizar si existe diferencia en esta actividad enzimática, al inocular las bacterias en conjunto y por separado. También se busca conocer cuál es la concentración de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus* que permite obtener mejores resultados, en términos de la actividad de la fosfatasa alcalina.

Sin embargo, a pesar de que la formulación e implementación de biofertilizantes ha cobrado gran relevancia en los últimos años, existe una limitante en la disponibilidad de métodos de bajo costo que permitan detectarlos y monitorearlos de forma sencilla. Las herramientas actuales se basan en pruebas microbiológicas y bioquímicas, pero principalmente en métodos moleculares o bioinformáticos. Dentro de estos últimos se encuentran PCR *16S* y secuenciación con análisis de regiones no codificantes, ITS, los cuales son costosos y requieren de conocimientos moleculares (Hernández-Álvarez et al., 2023). Por su parte, las pruebas microbiológicas, a pesar de ser más sencillas y brindar resultados de forma más rápida, estas se han utilizado principalmente para realizar análisis, previo a la aplicación de microorganismos en los suelos, pero no como una estrategia de monitoreo (Raimi et al.,

2020). Este hecho resalta la importancia de desarrollar un método sencillo y de bajo costo que permita detectar y monitorear biofertilizantes ya aplicados en los suelos de cultivo.

4. MARCO CONTEXTUAL

La necesidad de la implementación de elementos biológicos para sustituir compuestos químicos y así mejorar la salud y productividad de los suelos de cultivo en Guatemala, llevó a la creación un proyecto de investigación entre el Centro de Estudios en Biotecnología de la Universidad del Valle de Guatemala (CEB-UVG) y el Ingenio Magdalena. Dicho proyecto se titula “Mejoramiento de la salud del suelo de monocultivo a través de la optimización de procedimientos de compostaje y manejo de microbiología del suelo”. El fin de esta investigación es estudiar las características de microorganismos aislados de la tierra para aprovecharlas y así mejorar la productividad y salud de los suelos de cultivo de caña de azúcar. Otro de los objetivos del proyecto es desarrollar formulaciones de biofertilizantes que podrían aplicarse en los suelos de cultivo a futuro, promoviendo la agricultura sostenible en Guatemala.

Parte del presente trabajo es una continuación de la tesis del autor Xavier Flores titulada “Evaluación de la capacidad de solubilización de fósforo en aislamientos bacterianos de suelo utilizado para cultivo de caña de azúcar”. Cabe destacar que, durante la presente investigación, se utilizaron muestras de tierra de cultivo, así como bacterias aisladas del suelo, pero todos los ensayos se realizaron *in vitro* por lo que ningún microorganismo se liberó al ambiente. Se trata de una prueba de concepto, que en un futuro deberá ser aprobada por un comité de bioseguridad, previo a la aplicación de las bacterias directamente en el suelo.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Fósforo en los suelos de cultivo

5.1.1 Importancia del fósforo en el crecimiento vegetal

El fósforo es el segundo macronutriente más importante para el desarrollo y crecimiento de los cultivos, después del nitrógeno. Participa en la regulación de mecanismos fisiológicos y moleculares, lo cual lo convierte en un nutriente indispensable (Bechtaoui et al., 2021). Este mineral es esencial para que las plantas lleven a cabo procesos fundamentales como la fotosíntesis, formación de membranas celulares, síntesis de ADN y ARN, transferencia de energía a través de ATP y otras reacciones enzimáticas (Lambers, 2022). Adicionalmente, el fósforo está involucrado en procesos como la germinación de las semillas, el fortalecimiento del tallo, el desarrollo de raíces y en la formación de flores y frutos. La concentración de fósforo que una planta necesita para su óptimo desarrollo oscila entre 0.05-0.5 % de su peso seco (Fathi & Mehdiya, 2023). Concentraciones insuficientes de este macronutriente en el suelo, retrasan el crecimiento de las plantas, afectan el desarrollo de las raíces y en general influyen en el rendimiento de los cultivos (Khan et al., 2023). Lo anterior demuestra que el fósforo es esencial durante todas las fases de desarrollo de una planta, desde su germinación hasta su madurez (Malhotra et al., 2018).

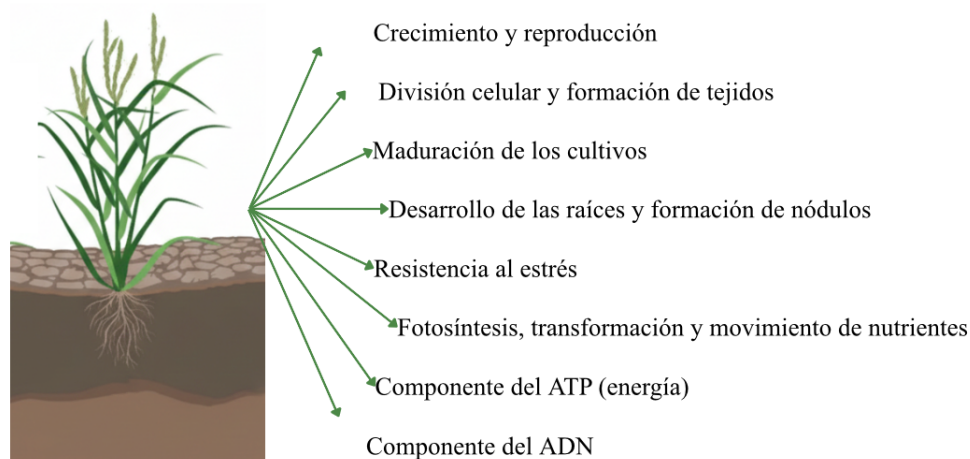


Figura 1. Funciones principales del fósforo en los suelos de cultivo

Adaptado de: Hoque et al. (2023)

5.1.2 Mecanismo de absorción de fósforo

Las raíces de las plantas son capaces de absorber dihidrógeno fosfato ($H_2PO_4^-$) y fosfato de hidrógeno (HPO_4^{2-}), ambas son formas de fósforo inorgánico (Shen et al., 2011). Este proceso se da idealmente a pH de 5-6, ya que bajo estas condiciones predomina la forma inorgánica de fósforo $H_2PO_4^-$ (dihidrógenofosfato) (Malhotra et al., 2018). El proceso de absorción puede darse a través de difusión. Sin embargo, este es un proceso lento, que podría verse afectado por la alta fijación de fósforo en los suelos o por la reactividad de este macronutriente con otros iones (Nadeem et al., 2022). Es por eso que las plantas han desarrollado una forma de absorción de fósforo mediada por un tipo de transporte activo de alta afinidad, el cual permite la movilización de fósforo en contra del gradiente de concentración, a través de la membrana plasmática de las raíces. En concreto, se trata del sistema P_i/H^+ , el cual es un transportador simporte, codificado por la familia de genes *PHT* (Shen et al., 2011).

5.1.3 Factores que limitan la disponibilidad de fósforo en el suelo

El fósforo es un macronutriente que se encuentra en abundancia en la litósfera, capa superficial de la Tierra, tanto en su forma orgánica como la inorgánica. De hecho, se estima que en el suelo hay aproximadamente el doble de fósforo del que una planta podría necesitar (Fathi & Mehdiniya, 2023). No obstante, entre el 20-80 % de este macronutriente se encuentra en su forma orgánica (Malhotra et al., 2018). Este hecho lleva a que exista una deficiencia de fósforo en los suelos de cultivo. Específicamente solo el 0.1 % del fósforo presente en los suelos puede ser fácilmente aprovechado por las plantas, debido a factores como la inmovilización o conformación orgánica (Zhu et al., 2024).

La limitante disponibilidad de fósforo en los suelos de cultivo puede atribuirse a factores físicos y químicos. Los factores físicos hacen referencia a la textura y humedad del suelo. En concreto, cuando la cantidad de arcilla en el suelo aumenta se da una mayor retención de fósforo en el suelo, lo cual disminuye su disponibilidad. Respecto a los factores químicos, estos engloban al pH y la presencia de iones en los suelos. Por una parte, en suelos con pH menor a 5.5, el fósforo puede interactuar con metales como el hierro o el

aluminio, formando complejos con difusión limitada a través de las raíces de las plantas. Mientras que a pH superior a 8, puede que exista una considerable concentración de calcio con la que el fósforo reacciona, dando lugar a la formación de precipitados insolubles. En ambos casos los minerales presentes en el suelo inhiben la absorción de fósforo. Es por eso que, al aplicar fertilizantes químicos, únicamente un pequeño porcentaje es aprovechado por las plantas, ya que el resto suele reaccionar con metales del suelo, según el pH del entorno (Bechtaoui et al., 2021; Cerozi & Fitzsimmons, 2016).

5.2 Agricultura convencional y fertilizantes químicos

5.2.1 Uso de fertilizantes químicos en la agricultura

El crecimiento y desarrollo óptimo de los cultivos puede verse limitado por la concentración de fósforo y otros nutrientes esenciales en el suelo. Para lidiar con esta problemática, la agricultura ha dependido de la aplicación de fertilizantes químicos. Esto, ha favorecido a la producción y rendimiento agrícola, pero ha generado problemas ambientales. En los últimos 50 años, el uso de fertilizantes químicos ha aumentado cinco veces y se estima que para el año 2050, se estarán utilizando 22-27 toneladas de fertilizantes químicos anualmente (Fathi & Mehdiniya, 2023). Sin embargo, esto podría volverse una práctica poco sostenible, debido al aumento de los precios de los fertilizantes fosfatados (Liu et al., 2020). Principalmente porque el fósforo utilizado para su fabricación proviene de la roca fosfórica, la cual es una fuente no renovable (Powers et al., 2020). Además, es importante destacar que la aplicación de fertilizantes químicos para suplir las necesidades de los cultivos podría ser una práctica poco eficiente, ya que solo el 10-20 % del fósforo que se aplica es absorbido y aprovechado por las plantas (Roberts & Johnston, 2015). El excedente suele reaccionar con iones presentes en los suelos, acumulándose allí. Con frecuencia, los excedentes también son a fuentes de agua, a través de la lluvia, generando contaminación y otros problemas ambientales (Khan et al., 2023).

5.2.2 Problemática del uso excesivo de fertilizantes químicos en suelos de cultivo

Pese a que, en las últimas décadas, como parte de la agricultura convencional, los fertilizantes químicos han favorecido a aumentar el rendimiento de los cultivos, supliendo

su demanda nutricional, su uso excesivo ha casado problemáticas ambientales. Estas prácticas han afectado los ecosistemas, la biodiversidad y la salud de los suelos de cultivo (Ramakrishna et al., 2019). En concreto, uno de los principales problemas asociados con los fertilizantes químicos es la degradación del suelo. Su uso prolongado contribuye a la compactación del suelo, formando capas densas y poco porosas que limitan la expansión de las raíces y restringen la absorción de nutrientes esenciales, como el fósforo (Massah & Azadegan, 2016). Además, la constante aplicación de fertilizantes puede alterar significativamente las características físicas y químicas naturales del suelo, como su pH (Liu et al., 2020). En concreto, ciertos fertilizantes con fosfato acidifican el suelo, promoviendo la movilización de iones como el hierro o el aluminio. Estos últimos reaccionan con el fosfato, formando compuestos insolubles que reducen su disponibilidad para las plantas, generando a largo plazo acumulaciones de fosfato no aprovechable (Shen et al., 2011). Esta práctica no solo afecta negativamente la eficiencia de los fertilizantes, sino que también altera las comunidades microbianas del suelo, comprometiendo su fertilidad (Liu et al., 2020).

Además de afectar la estructura y química del suelo, algunos fertilizantes fosfatados contienen metales pesados como cadmio, cobre o mercurio. Estos elementos tóxicos se acumulan progresivamente, degradando la calidad del suelo y representando un riesgo tanto para los cultivos como para la salud humana (Nadeem et al., 2022). Otra de las grandes problemáticas del uso excesivo de fertilizantes químicos, como parte de la agricultura convencional es la eutroficación. La aplicación excesiva de fertilizantes ricos en fósforo provoca su movilización hacia cuerpos de agua, mediante a la lluvia. Esto genera un crecimiento descontrolado de algas y cianobacterias, disminuyendo la disponibilidad de oxígeno en el agua, afectando gravemente los ecosistemas acuáticos y generando problemas ecológicos y de salud pública (Liu et al., 2021).

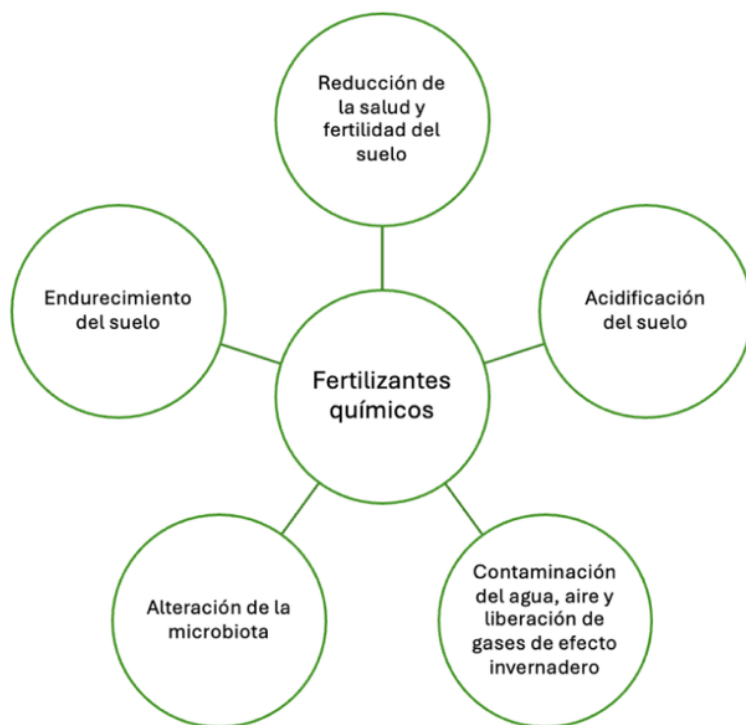


Figura 2. Efectos negativos del uso de fertilizantes químicos

Adaptado de: Thorat & More (2022)

5.3 Agricultura sostenible y biofertilizantes

5.3.1 Concepto de agricultura sostenible

Se estima que para el 2050, la población total del mundo sea de 9.9 mil millones de personas. Este hecho hace que sea necesario mejorar las prácticas relacionadas con la agricultura, con el objetivo de suplir las necesidades alimenticias que se tendrán en ese entonces (Jaggard et al., 2010). Una alternativa viable es la implementación de la agricultura sostenible, la cual se basa en aumentar la productividad del suelo y minimizando el impacto ambiental (Khan et al., 2023).

Un factor clave de la agricultura sostenible es la microbiota del suelo, ya que estos microorganismos juegan un rol importante en la movilización y disponibilidad de los nutrientes, en la descomposición de materia orgánica, en la protección contra patógenos y en la adaptación a cambios ambientales (Eyhorn et al., 2019). Aprovechar las características

celulares y metabólicas naturales podría ser una estrategia prometedora como parte de las prácticas de agricultura sostenible. En concreto, estos microorganismos beneficiosos pueden formar parte de las formulaciones de potenciales biofertilizantes, los cuales podrían aplicarse en los suelos de cultivo. Esto con el objetivo de mejorar su salud y promover el crecimiento de las plantas de manera sostenible y amigable con el medio ambiente, sin depender del uso excesivo de fertilizantes químicos (Kumar et al., 2021).

5.3.2 Biofertilizantes y sus beneficios en la agricultura sostenible

En los últimos 20 años, los biofertilizantes han cobrado gran relevancia, ya que son compatibles con el concepto de agricultura sostenible. En esta línea, un biofertilizante es una formulación líquida o sólida que contiene ya sea una o varias cepas de microorganismos vivos, los cuales favorecen al crecimiento de los cultivos, facilitando la disponibilidad y adquisición de nutrientes en el suelo (Mitter et al., 2021). La aplicación de biofertilizantes ofrece diversos beneficios como mejorar la salud del suelo, promover la biodiversidad microbiana y reducir la contaminación de ecosistemas, causada por fertilizantes químicos. Además, su costo suele ser menor, en comparación con fertilizantes sintéticos. Todos estos factores convierten a los biofertilizantes es una alternativa sostenible y rentable (Mitter et al., 2021; Tahat et al., 2020).

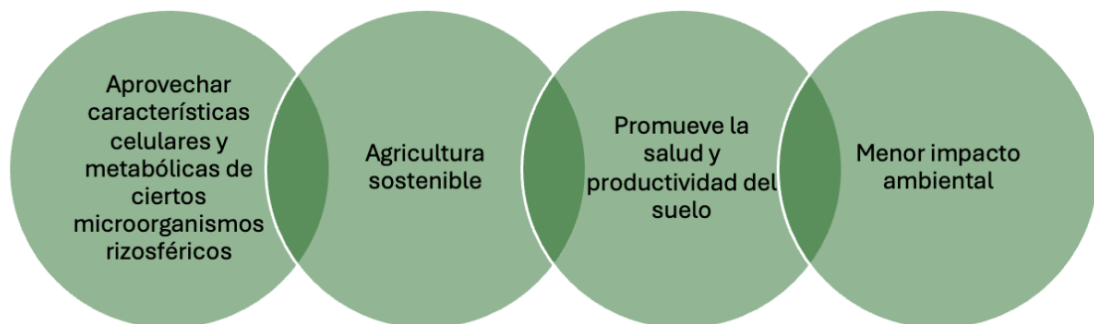


Figura 3. Beneficios de los biofertilizantes

Adaptado de: Aloo et al. (2022)

5.4 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

5.4.1 Características de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPB, por sus siglas en inglés, son parte de un conjunto diverso de bacterias que habitan naturalmente en la rizosfera, ya sea en la superficie de las raíces de las plantas o en asociación con ellas. Su función principal es promover el crecimiento vegetal y brindar protección contra patógenos, así como contra el estrés abiótico y biótico. Estas bacterias favorecen a regular la fertilidad de los suelos de cultivo y promueven la circulación de nutrientes (Ramakrishna et al., 2019). La interacción entre las plantas y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal puede ser de carácter simbiótico, endofítico o de asociación, dependiendo del tipo de asociación establecida (De Souza et al., 2015).

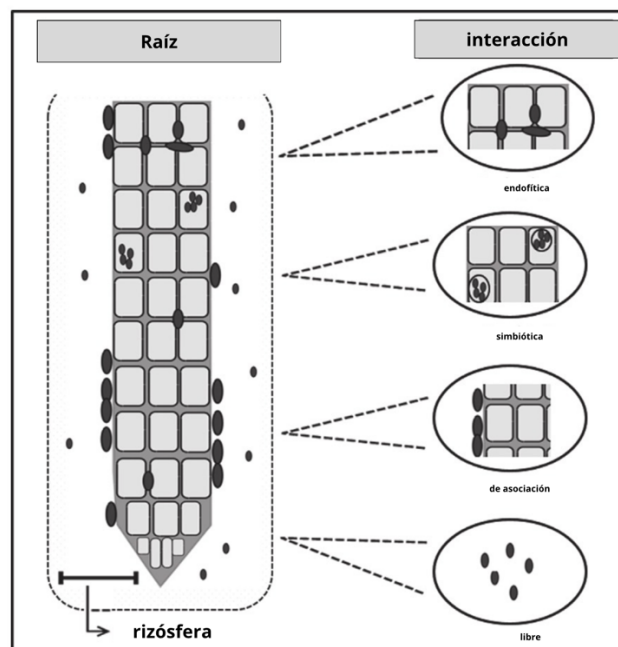


Figura 4. Tipos de asociaciones biológicas entre las bacterias promotoras del crecimiento vegetal y las raíces de los cultivos

Adaptado de: De Souza et al. (2015)

A partir de la década pasada, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal cobraron gran importancia en el ámbito de la agricultura sostenible, debido a su capacidad para mejorar la salud del suelo, aumentar la productividad de los cultivos y favorecer a tolerar el estrés biótico y abiótico (Ramakrishna et al., 2019). Estas características de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, las han posicionado como una buena alternativa para la formulación de biofertilizantes. En este sentido la selección de bacterias, según las necesidades del suelo, puede resultar en una estrategia eficiente para reducir la dependencia de fertilizantes químicos y promover una agricultura más sostenible (De Souza et al., 2015).

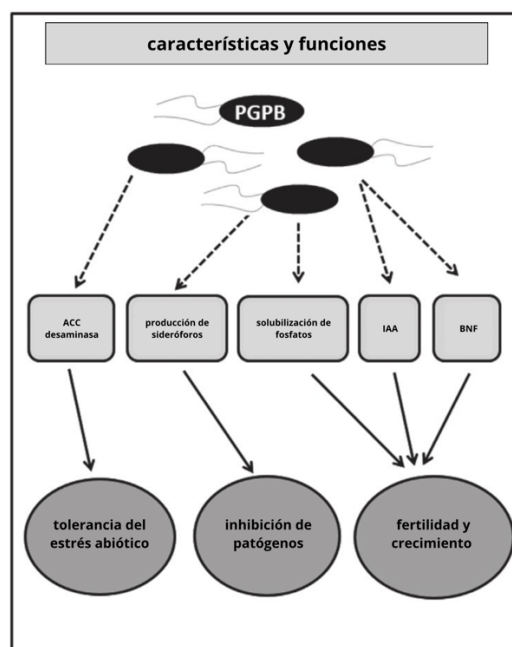


Figura 5. Características de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal y sus funciones en los cultivos

Adaptado de: De Souza et al. (2015)

La eficiencia de este tipo de bacterias en la promoción del crecimiento vegetal depende de varios factores. Por una parte, estos microorganismos son capaces de colonizar las raíces de las plantas, gracias a la modulación de ciertos genes y a mecanismos de comunicación como el *quorum sensing*. Además, estas bacterias secretan metabolitos secundarios que actúan como mensajeros químicos para las plantas, cuando los microorganismos perciben una alteración en el entorno, permitiéndoles responder a estos cambios ambientales (De Souza et al., 2015). Otro aspecto relevante de estas bacterias es que estas suelen presentar

genes de resistencia a antibióticos y a metales pesados, ya que ambos elementos podrían encontrarse en los suelos como contaminantes. Ciertas bacterias presentan estos genes de forma intrínseca, mientras que otras los adquieren. En ambos casos, esta característica resulta beneficiosa para sobrevivir en ese entorno (Ramakrishna et al., 2019).

5.4.2 Especies predominantes

La presencia y abundancia de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal es importante, sin embargo, resulta complicado afirmar cuál es su composición general, ya que esto varía mucho y depende de factores como pH, temperatura, nutrientes disponibles, humedad y tipo de cultivo (Silva et al., 2021). Aun así, en términos generales, se ha demostrado que la mayor parte de bacterias promotoras del crecimiento vegetal pertenecen a los filos Proteobacteria y Firmicutes. Alguno de los géneros bacterianos más estudiados son *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Agrobacterium* (Ruii, 2020). Cabe resaltar que las bacterias del género *Bacillus* son las que presentan una actividad promotora del crecimiento vegetal predominante (Ramakrishna et al., 2019).

5.4.3 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden impulsar el crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos, los cuales varían según la especie bacteriana, las necesidades de la planta y las condiciones ambientales. Cabe destacar que no todas las cepas utilizan los mismos mecanismos, lo que destaca la importancia de seleccionar aquellas con la mayor eficiencia para cada aplicación agrícola (De Souza et al., 2015).

Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal se dividen en directos e indirectos. Por un lado, los mecanismos directos incluyen la facilitación de la adquisición de macronutrientes esenciales como el fósforo, nitrógeno, potasio o magnesio, así como la modulación de las concentraciones de hormonas en la planta. Dentro de los mecanismos directos destaca la secreción de ácidos orgánicos, que acidifica el medio, favoreciendo a solubilizar los nutrientes del suelo y facilitando su absorción por parte de las raíces. Por otra parte, los mecanismos indirectos se centran en brindar protección a las plantas contra

patógenos, secretando metabolitos antimicrobianos. Este tipo de mecanismo también se basa en la secreción de otro tipo de metabolitos secundarios para proteger a las plantas en caso de competencia de nutrientes o espacio. Los mecanismos indirectos participan igualmente en la estimulación de mecanismos de defensa en la planta, por la liberación de mensajeros químicos (Glick, 2012).

5.5 Bacterias solubilizadoras de fosfato

5.5.1 Características de las bacterias solubilizadoras de fosfato

A pesar de ser tan esencial, el fósforo es un macronutriente limitante en la agricultura, ya que este tiene una alta reactividad con metales del suelo, lo que reduce su disponibilidad para las plantas. Una alternativa para reducir la dependencia a la continua aplicación de fertilizantes químicos es la implementación de bacterias solubilizadoras de fósforo (PSB por sus siglas en inglés), un grupo de microorganismos pertenecientes a las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Yu et al., 2022).

Dentro de las bacterias solubilizadoras de fosfato se encuentran las del género *Bacillus*, que habitan naturalmente en la rizosfera y contribuyen a la circulación de nutrientes, fertilidad del suelo y detoxificación de metales pesados (Wang et al., 2023). Las bacterias de este género tienen la capacidad de adaptarse a varios tipos de suelo (Pan & Cai, 2023). Su función principal es convertir el fósforo inorgánico a una forma orgánica soluble, disponible para su absorción por parte de las plantas. Se ha demostrado que la actividad de estas bacterias contribuye a reducir las acumulaciones de fósforo insoluble en los suelos de cultivo, mejorando la productividad a largo plazo y reduciendo problemas de contaminación ambiental (Yu et al., 2022).

Al incrementar la disponibilidad de fosfato en el suelo, las plantas experimentan efectos positivos en su crecimiento y metabolismo, como una mayor tasa fotosintética, extensión de sus raíces, mejor capacidad de defensa ante enfermedades o sequía. Además, al haber más fosfato disponible se promueve la activación de ciertas rutas de señalización que favorecen a la expresión de genes involucrados con la respuesta al estrés ambiental.

Algunas bacterias también promueven la producción de hormonas, que benefician el crecimiento de las plantas, como lo son las auxinas (Wang et al., 2023). Adicionalmente, las bacterias solubilizadoras de fosfato contribuyen a la fijación de nitrógeno y brindan protección contra patógenos, fortaleciendo la salud del suelo y de los cultivos. Su capacidad para solubilizar una amplia variedad de compuestos fosfatados insolubles permite reducir la dependencia de fertilizantes químicos. Por estas razones, la aplicación de PSB como biofertilizantes representa una estrategia sustentable y ecológica con un gran potencial para la agricultura sostenible (Amri et al., 2023).

5.5.2 Mecanismos de solubilización de fosfato

Las bacterias solubilizadoras de fosfato presentan tres mecanismos de solubilización de este macronutriente, los cuales se basan en la producción de enzimas, secreción de ácidos orgánicos y producción de sideróforos (Pan & Cai, 2023). Uno de los mecanismos se centra en la secreción de ácidos orgánicos, los cuales acidifican los suelos, promueven la quelación de iones metálicos para liberarlos del fósforo o formando complejos solubles con los metales que están unidos a este nutriente. La solubilización de fósforo también puede darse por la secreción de enzimas extracelulares o por la liberación directa de fósforo como producto de la degradación de sustratos orgánicos (Yu et al., 2022). En concreto, los ácidos orgánicos, secretados por estas bacterias contienen iones hidroxilo o dióxido de carbono, que acidifican el suelo. Al disminuir el pH, se promueve un intercambio iónico, que disuelve el fosforo. Otro mecanismo se basa en la secreción de compuestos quelantes, también llamados sideróforos. Estos capturan e inmovilizan los iones de aluminio, calcio y hierro, liberando al fósforo al que se encontraban unidos (Mitter et al., 2021). Cabe destacar que el mecanismo principal que emplean las PSB es la secreción de enzimas, denominadas fosfatasas. Estas últimas son enzimas hidrolíticas extracelulares, codificadas por el gen *olpA* y se dividen en alcalinas y ácidas (Pan & Cai, 2023). Por una parte, las fosfatasas alcalinas catalizan la reacción hidrolítica en suelos con pH mayor a 7, mientras que las fosfatasas ácidas lo hacen en ambientes con pH de 4-6.5. Existen varios tipos de fosfatasas, según los enlaces que hidrolizan, pero en términos generales, la reacción general se basa en la hidrólisis de ciertos enlaces en moléculas orgánicas fosforadas para librar fósforo inorgánico (Campdelacreu Rocabruna, Domene, Preece, Fernández-Martínez, et al., 2024).

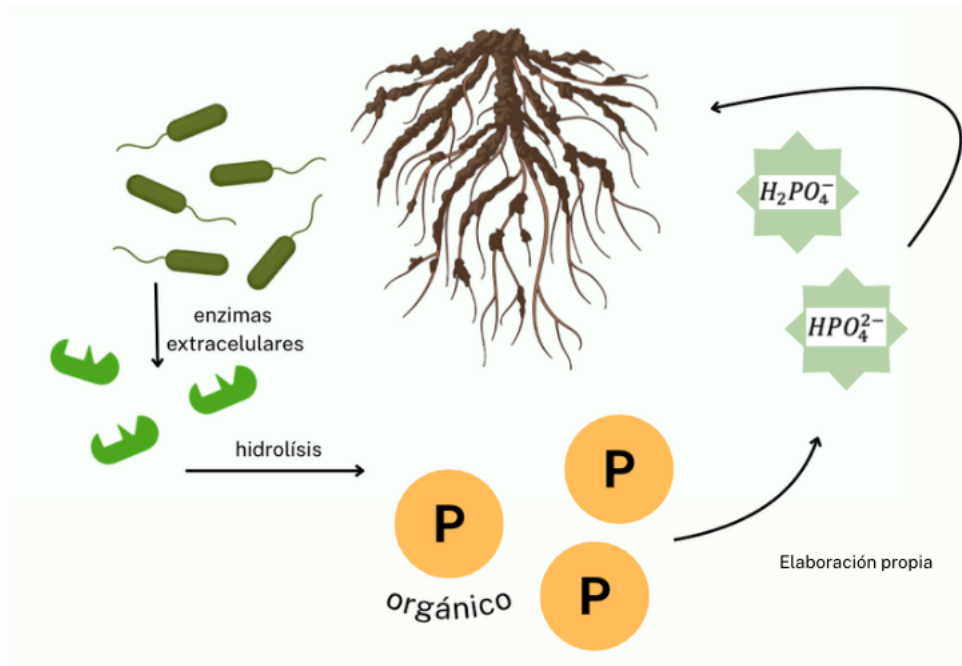


Figura 6. Mecanismo enzimático de solubilización de fosfato

Adaptado de: Shen et al. (2011) y Ruiu (2020)

5.6 Marcaje molecular

5.6.1 Métodos moleculares para marcaje de cepas

Dado a la necesidad de identificación bacteriana, el marcaje de este tipo de organismos está cobrando gran relevancia en varios ámbitos de la ciencia e investigación. Existen varias técnicas de marcaje como lo son el marcaje enzimático o la implementación de etiquetas fluorescentes o anticuerpos (Ji et al., 2022). Sin embargo, una de las técnicas más aplicadas, ya que producen resultados permanentes y controlables es el marcaje molecular mediado por modificaciones genéticas. Esta tecnología se basa en integrar un gen de interés a la cepa que se está estudiando, ya sea de forma constitutiva o no. Esto para permitir que la bacteria produzca una nueva proteína que permita identificarla por medio de ensayos enzimáticos o microbiológicos de forma más fácil y visual (Jiang et al., 2023).

5.6.2 Manejo de la resistencia a antibióticos

En muchos casos, para determinar si una modificación genética se dio adecuadamente, se suelen emplear antibióticos como marcadores de selección. Sin embargo, esto podría ser una desventaja, ya que este tipo de bacterias no pueden ser liberadas al ambiente, debido a la creciente problemática de la resistencia a antibióticos (Ji et al., 2022). En este sentido, existen otras herramientas que permiten la selección de bacterias transformadas sin requerir del uso de antibióticos. Una de estas técnicas se basa en hacer un *knockout* de un gen que sea esencial para el desarrollo y supervivencia de la bacteria. Luego, una copia funcional de este se agrega en el plásmido recombinante que además contiene el gen de interés. Por lo tanto, únicamente las bacterias que tienen el plásmido tanto con el gen esencial como con el gen de interés van a sobrevivir (Terrinoni et al., 2018). Otra forma se centra en la integración de un gen esencial al cromosoma de las cepas en estudio, bajo el control de un promotor inducible. Además, las mismas bacterias se transforman con un plásmido que tiene ese gen esencial y el gen de interés. Después, estas cepas se cultivan en un medio de cultivo sin el inductor por lo que, para poder vivir, las bacterias tienen que recurrir a la expresión de los genes presentes en el plásmido (Jiang et al., 2023). Una tercera alternativa es el uso de marcadores de contra selección. Para ello es posible utilizar el sistema de plásmido integrativo de *Bacillus* (BIP). A grandes rasgos, este sistema incorpora un gen represor, que está controlado por un promotor inducible. Al agregar el inductor, se promueve la expresión del gen represor, el cual al mismo tiempo suprime la expresión del gen de resistencia a antibióticos. Esto se da por un mecanismo de edición génica denominada doble entrecruzamiento (DCO). Por lo tanto, solo las bacterias que hayan experimentado un DCO exitoso pueden sobrevivir en presencia del inductor (Kim et al., 2022).

5.6.3 Medidas de bioseguridad al trabajar con bacterias ambientales

Las bacterias aisladas del ambiente suelen presentar un nivel de bioseguridad 1 (BSL-1), es decir que no son patógenas y su manipulación involucra riesgos mínimos. Aun así, es fundamental tomar ciertas medidas de seguridad a modo de prevención. Estas incluyen la desinfección del lugar de trabajo antes y después de la manipulación de bacterias, uso de equipo de protección personal, evitar el uso de joyas, prendas o pelo suelto, que puedan

contaminarse durante la experimentación, restringir la autorización de la manipulación de las bacterias solo a los involucrados en el proyecto y trabajar en un área exclusiva para evitar contaminación cruzada (Emmert, 2013).

5.6.4 Regulación de bacterias genéticamente modificadas

El acuerdo ministerial 217-2019, establecido por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación de Guatemala (MAGA), aprobado en el 2019, avala la importación, comercialización y siembra de organismos genéticamente modificados, bajo la supervisión de dicho ministerio. Esta entidad publicó un manual titulado “Manual de Procedimientos Técnicos para uso confinado, experimental, pre-comercial y comercial de Semilla Genéticamente Modificada derivada de la Implementación del Reglamento Técnico de Bioseguridad 65.06.01:18” el cual tiene como objetivo ser un instrumento de consulta que debe verificarse y cumplirse al trabajar con este tipo de organismo. Además, se establece que, al realizar modificaciones genéticas, es necesario redactar un protocolo detallado, para que el MAGA lo apruebe y el producto de la investigación pueda ser implementado directamente en el ambiente (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación [MAGA], 2019).

6. MARCO METODOLÓGICO

6.1 Diseño, enfoque y tipo de investigación

La presente investigación tiene un diseño experimental, de carácter experimental tanto cuantitativo como cualitativo. Esto ya que se cuantificará la actividad de las fosfatasas secretadas por dos cepas de *Bacillus* y se verificará la transformación de *E. coli* DH5 α con un plásmido recombinante.

6.2 Población y muestra

Durante la presente investigación se analizaron dos cepas de *Bacillus* previamente aisladas en un estudio anterior titulado “Análisis del microbioma bacteriano de suelos utilizados para el cultivo de caña de azúcar *Saccharum Officinarum*, en Guatemala mediante metagenómica del gen *16S* ARN ribosomal y caracterización de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal que se encuentran en ellos” (Ochoa, 2022). Adicionalmente, se trabajó con cinco muestra de suelo de cultivo de caña de azúcar traídas de las fincas Ingenio Magdalena.

6.3 Variables

Cuadro 1. Variables de la investigación

Variable	Definición	Tipo	Unidades de medida
Actividad de fosfatasas del suelo	Enzimas que hidroliza enlaces en moléculas fosforadas para liberar fósforo inorgánico	Cuantitativa	$\mu\text{g pNPg}^{-1} \text{ suelo } h^{-1}$
Gen <i>uidA</i>	Gen que codifica la enzima hidrolítica beta-blucuronidasa en bacterias como <i>E. coli</i>	Cualitativa	-

Nota: elaboración propia

6.4 Hipótesis

6.4.1 Hipótesis alternativa (Ha)

La actividad de las fosfatasas del suelo, observada *in vitro*, aumenta tras la inoculación con *Bacillus subtilis* y/o *Bacillus tropicus*

6.4.2 Hipótesis nula (Ho)

La actividad de las fosfatasas del suelo, observada *in vitro*, no aumenta tras la inoculación con *Bacillus subtilis* y/o *Bacillus tropicus*.

7. METODOLOGÍA

7.1 Análisis de actividad de fosfatasas en muestras de suelo

7.1.1 Muestreo de suelo

Para el análisis de la actividad de las fosfatasas, se recolectó muestras de suelo de cinco fincas, dentro del Ingenio Magdalena. La información de cada punto de muestreo se encuentra detallada más adelante en el Cuadro 2. Se analizaron muestras de la rizosfera, recolectadas a 15 cm de la raíz y 15cm de profundidad. Tras su recolección, el suelo se almacenó a 4 °C y se analizó dentro de los siguientes siete días (Zheng et al., 2021).

Cuadro 2. Información de los puntos de muestreo

Código de la muestra	Lote	Descripción de la finca	Región	Latitud	Longitud
4MO	037-003-008	Kenia	Central Sur	140.11026	-91.0457864
1AP	351-002-012	San Patricio	Central Norte	14.11768	-90.950378
3AB	Bosque Eucaliptos	Ojo de Agua	Central Sur	14.0058198	-91.0298984
1CA	376-001-002	California	Central Sur	13.9336905	-90.9762527
1BP	011-003-007	Buganvilia	Central Norte	14.117368	-90.9148010

Nota: elaboración propia

7.1.2 Determinación del pH de las muestras

Para la determinación del pH de las muestras, se mezclaron 10 g de suelo con 20 mL de agua destilada en tubos cónicos de 50 mL. Se incubaron a temperatura ambiente por 15 min. Pasado este tiempo, se decantó la fase acuosa y se determinó el pH del agua con un pH-metro, previamente calibrado. Los resultados de esta fase se utilizaron para determinar el pH del buffer MUB, que se utilizaron para los ensayos de actividad de fosfatasas (Banerjee et al., 2012).

7.1.3 Preparación de buffer MUB

Para la preparación del buffer MUB (buffer universal modificado) se disolvió 12.1 g de Tris(hidroximetil)aminometano, 11.6 g de ácido succínico, 14.0 g de ácido cítrico y 6.3 g ácido bórico en 488 mL de solución de NaOH 1 M. Se agregó 522 mL de agua destilada para ajustar el volumen a 1 L. El pH del buffer se ajustó con soluciones de NaOH o HCl 1 M, según se necesitó, hasta alcanzar un valor cercano al de las muestras de suelo. El buffer MUB se almacenó a 4 °C hasta su uso (Lin et al., 2023). Comparar protocolo “Determinación de la actividad de fosfatasas en muestras de suelo” en la sección de anexos.

7.1.4 Curva de calibración de p-nitrofenol

Para la construcción de la curva de calibración, se prepararon 50 mL de una solución madre de p-nitrofenol con concentración de 500 µg/mL de p-nitrofenol. A partir de la solución madre se realizaron los estándares con concentraciones conocidas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 y 100 µg/mL de p-nitrofenol. Tanto la solución madre como los estándares se prepararon con buffer MUB. A continuación, se midió la absorbancia de todas las soluciones, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS *BioTek Power Wave XS* de *Agilent* una longitud de onda de 405nm. Se realizaron tres lecturas de cada estándar para aumentar la precisión. A partir de estos resultados se construyó una gráfica de absorbancia contra concentración de p-nitrofenol (Tabatabai & Bremner, 1969). Comparar protocolo “Determinación de la actividad de fosfatasas en muestras de suelo” en la sección de anexos.

7.1.5 Ensayo de actividad de fosfatasas en muestras de suelo – actividad inicial

Para determinar la actividad de las fosfatasas, se pesaron 0.1 g de suelo y se colocaron dentro de un tubo de 1.5 mL. Se agregaron 400 µL de buffer MUB, 25 µL de tolueno y 100 µL de solución de p-nitrofenil fosfato (0.115 M). Las muestras se mezclaron en vórtex por 2 min y se incubaron a 37 °C por 1h. Pasado ese tiempo se agregaron 100 µL de solución de cloruro de calcio 0.5 M y 400 µL de solución de hidróxido de sodio 0.5 M para detener la reacción. Luego se mezclaron en vórtex por 1 min y se centrifugaron a 10000 rpm por 2 min. Finalmente, se determinó, por triplicado, la absorbancia del sobrenadante amarillo, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 405 nm. Este proceso se realizó para las cinco muestras de suelo (Elsgaard et al., 2002; Lin et al., 2023; Tabatabai & Bremner, 1969). Comparar protocolo “Determinación de la actividad de fosfatasas en muestras de suelo” en la sección de anexos.

7.1.6 Preparación de los inóculos de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*

Se preparó un *overnight* (ON) de ambas bacterias en 15 mL de caldo Luria Bertani (LB) (10 g de peptona, 10 g, de cloruro de sodio, 5 g de extracto de levadura en 1 L de agua destilada). Luego los cultivos se centrifugaron a 8000 rpm por 5 min y el pellet se lavó 2 veces con solución fisiológica salina estéril, haciendo centrifugaciones de promedio. Finalmente, el pellet se resuspendió en un volumen de solución salina hasta obtener concentraciones aproximadas de 10^6 , 10^8 , 10^{10} , UFC/mL. Para confirmar la concentración de cada inóculo, se determinó su densidad óptica a 600 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS. La absorbancia de los inóculos fue de ~0.02, ~0.2 y ~2.0 para cada concentración, respectivamente (Arrieta et al., 2006; Li et al., 2024).

7.1.7 Ensayo de actividad de fosfatasas en muestras de suelo tras la inoculación con *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*

En un contenedor plástico con divisiones, se agregaron 5 g de suelo y se le agregó 2 mL de inóculo. Por cada muestra de suelo se realizaron nueve ensayos, utilizando las tres concentraciones de bacterias, inoculando las cepas tanto juntas como por separado. Se hará un triplicado por cada tratamiento. Tras la inoculación, las muestras de suelo se dejaron incubar por siete días a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se realizó el ensayo de

actividad de fosfatasas, siguiendo el protocolo mencionado en el punto anterior (Li et al., 2024; Lin et al., 2023).

7.2 Desarrollo de una prueba de concepto, basada en la inserción de un gen enzimático, para la detección rápida de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus* en suelos de cultivo de caña de azúcar

7.2.1 Selección del gen de interés

Para el desarrollo de la prueba de concepto que permita detectar las cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*, se seleccionó un gen que podría ser insertado en dichas cepas, mediante a un plásmido recombinante. Los criterios de selección del gen fueron que este debe codificar para una enzima cromogénica, que en presencia de un sustrato específico produzca una coloración distintiva, que permita identificar a las cepas de *Bacillus* en un agar cromogénico comercial. Se buscó en la literatura científica medios cromogénicos existentes, utilizados para la detección de bacterias que no están presentes en los suelos de cultivo. Habiendo seleccionado el medio, se investigará acerca de su principio enzimático, con el objetivo de identificar la enzima cromogénica que podría ser insertada dentro de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*, mediante un plásmido.

7.2.2 Diseño de *primers*

Para la amplificación del gen de interés, que se insertó en *E. coli* DH5 α se diseñaron *primers* empleando la herramienta *Snapgene*, en la opción de *Gibson Assembly*, siguiendo las recomendaciones del kit comercial *GeneArt™ Gibson Assembly HiFi Master Mix* de *Invitrogen*.

7.2.3 Selección del vector de clonación

Para seleccionar un vector de clonación ideal se consideraron varios criterios de selección. Primero, se verificó que fuera un *shuttle vector*, es decir que fuera compatible y pueda replicarse tanto en *E. coli* como en *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*. También se buscó que el plásmido tuviera un marcador de selección, un antibiótico, por ejemplo, así como un promotor y origen de replicación que permitieran su replicación, a futuro, en cepas de

Bacillus (Akamatsu & Taguchi, 2012; Primros & Twyma, 2006). El plásmido seleccionado, pBsac, fue un obsequio de Wenjing Cui (Addgene plasmid # 158650; <http://n2t.net/addgene:158650> ; RRID:Addgene_158650).

7.2.4 Selección de las enzimas de restricción

Para la selección las enzimas de restricción se utilizará la herramienta *NEB cutter* de *New England Biolabs* con el objetivo de identificar cuáles son los sitios de restricción disponibles, dentro del plásmido seleccionado. Se seleccionó una enzima, cuya secuencia no se encontró dentro del gen de interés (Walker et al., 2008).

7.2.5 Extracción de ADN genómico de *E. coli*

Para la extracción de ADN genómico de *E. coli* DH5 α , se preparó un cultivo líquido de la bacteria, el cual se incubó durante la noche a 37 °C y 150 rpm. Pasado ese tiempo se procedió a hacer la extracción de ADN utilizando el kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification kit* de *Promega*, siguiendo las indicaciones del fabricante.

7.2.6 Amplificación del gen seleccionado

Para amplificar el gen seleccionado se realizó una reacción de PCR, la cual primero fue optimizada. Para ello se utilizó agua libre de nucleasas, *GoTaq*, *primer forward*, *primer reverse* y el ADN genómico extraído de *E. coli* DH5 α . La amplificación se validó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.0 %, la cual se corrió por 35 min a 100 V. Se esperó visualizar un fragmento de 1812 pb. Comparar el protocolo “Amplificación de gen *uidA*” en la sección de anexos.

Cuadro 3. Componentes de la reacción de amplificación del gen seleccionado

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen agregado (μ L)
Buffer 2x GoTaq	2 X	1 X	7.5
<i>Primer F</i>	100 μ M	10 μ M	1
<i>Primer R</i>	100 μ M	10 μ M	1
ADN	349.7 ng/ μ L	100 ng	1

H₂O	-	4.5
-----------------------	---	-----

Nota: elaboración propia

Cuadro 4. Condiciones de la reacción de amplificación del gen seleccionado

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	30
Alineamiento	63.6	30 seg	30
Extensión	72	2 min	30
Extensión final	72	5 min	1
Almacenamiento	4	Indefinido	1

Nota: elaboración propia

7.2.7 Purificación del inserto

Para purificar los producto de PCR se tomaron 15 µL de este producto y se mezclaron con una solución concentrada de cloruro de sodio 3 M. Se mezcló por inversión y se le agregaron 60 µL de etanol absoluto frío. Se incubó a -20 °C por 30 min y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso de agregar 60 µL de etanol absoluto frío e incubarlo a -20 °C por 30 min. Pasado este tiempo se volvió a centrifugó a 10000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet por 20 min. Finalmente, el producto purificado se resuspendió en 15 µL de buffer TE estéril.

7.2.8 Extracción del plásmido

Para la extracción del plásmido seleccionado se preparó un cultivo líquido de este, el cual se incubó durante toda la noche a 37 °C y 150 rpm. Pasado ese tiempo se procedió a hacer la extracción del plásmido utilizando el kit comercial *Pure Yield Miniprep* de *Promega*. El plásmido seleccionado, pBsac, fue un obsequio de Wenjing Cui (Addgene plasmid # 158650; <http://n2t.net/addgene:158650> ; RRID:Addgene_158650).

7.2.9 Linealización del plásmido

Para linealizar el plásmido extraído se utilizó la enzima de restricción *EagI* de *ThermoFisher*, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Cuadro 5. Componentes de la reacción de linealización del plásmido

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen agregado (μL)
Buffer	10 X	1 X	5
Enzima EagI	10 U	1 U	1
Plásmido	75 ng/μL	1000 ng	15
H ₂ O	-	-	29

Nota: elaboración propia

Cuadro 6. Condiciones de la linealización del plásmido seleccionado

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Restricción	37	300	1
Inactivación	65	20	1
Almacenamiento	4	indefinido	1

Nota: elaboración propia

7.2.10 Ensamblaje de Gibson

Para ligar el plásmido linealizado al inserto purificado se realizó un ensamblaje de Gibson siguiendo las indicaciones del kit comercial *GeneArt™ Gibson Assembly HiFi Master Mix* de *Invitrogen*. Esperando un fragmento ensamblado de 8699 pb. El proceso se validó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, la cual se corrió a 100 V por 60 min.

7.2.11 Obtención de *E. coli* ultracompetente por el método de cloruro de calcio

Para volver competente la cepa de *E. coli* DH5α se preparó un cultivo *overnight* de la bacteria. Al día siguiente, se incubó en un baño de agua a 4 °C por 15 min. Se centrifugó

por 5 min a 6000 rcf y 4 °C. Se descartó todo el sobrenadante y se resuspendió en 20 mL de solución 0.1 M de cloruro de calcio fría y estéril. Se dejó incubando a 4 °C por 60 min. Se centrifugó por 5 min a 6000 rcf y 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 3 mL de solución fría de cloruro de calcio. Se agregaron 3.5 mL de solución fría y estéril de glicerol al 10 % (Chan et al., 2013; Sun et al., 2013). Comparar el protocolo “Obtención de *E. coli* ultracompetente por el método de cloruro de calcio y su transformación” en la sección de anexos.

7.2.12 Transformación de *E. coli* competente

Para la transformación de *E. coli* DH5 α competente, 100 μ L de estas se mezclaron 1 μ L del plásmido recombinante. Se incubó en hielo por 30 min y luego en un baño con agua caliente a 42 °C por 45 seg. Inmediatamente las muestras se transfirieron a un baño de hielo por 2 min y se les agregó 1 mL de caldo de cultivo LB. Se dejó incubando a 37 °C con agitación constante por 3 horas. Finalmente, se inocularon 50 μ L de las bacterias transformadas en medio de cultivo LB con ampicilina. Esto se incubó a 37 °C por 48 horas. A modo de control, en una placa se inoculó 50 μ L de bacteria sin transformar (Tu, 2016). Comparar el protocolo “Obtención de *E. coli* ultracompetente por el método de cloruro de calcio y su transformación” en la sección de anexos.

7.2.13 Extracción del plásmido recombinante

Para la extracción del plásmido recombinante se siguió la metodología descrita en el punto 7.2.8, utilizando la cepa de *E. coli* DH5 α transformada. Con este producto se realizó una electroforesis en gel de agarosa para validar molecularmente la transformación.

7.2.14 Preparación de cepas de *Bacillus* ultracompetente

Como siguiente paso se propone transformar las dos cepas de *Bacillus* de interés, con el plásmido recombinante construido mediante el ensamblaje de Gibson. Para ello es necesario preparar un cultivo *overnight* de dichas bacterias. Pasado este tiempo, se deja incubando por 5 min en un baño de hielo. Se centrifuga a 5000 g por 10 min, se descarta el sobrenadante y se hacen dos lavados con medio de cultivo para electroporación compuesto por trehalosa 0.5 M, sorbitol 0.5 M, manitol 0.5 M y glicerol al 10 %.

Resuspender las bacterias en 3 mL de medio de cultivo para electroporación (Cao et al., 2011).

7.2.15 Transformación de cepas de *Bacillus* por electroporación

Para la electroporación de las cepas de *Bacillus* ultracompetentes se propone mezclar 60 µL de estas células con 1 µL de plásmido recombinante. Transferir a una cubeta para electroporación fría e incubar en hielo por 5min. Electroporar las bacterias un pulso de 1.2-2.5 kV y capacitancia de 25 µF. Incubar en hielo por 10 minutos y mezclar con 1mL de caldo LB suplementado con sorbitol 0.5 M y manitol 0.38 M. Incubar a 37 °C por 3 horas e inocular 50 µL de las bacterias transformadas en placas con medio de cultivo LB con ampicilina. Incubar por al menos 48 horas (Brigidi et al., 1990; Cao et al., 2011).

8. RESULTADOS

Los ensayos enzimáticos, permitieron evaluar el efecto de la inoculación con *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus* sobre la actividad de las fosfatasas en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar. Inicialmente se presentan los resultados de los análisis realizados con el fin de evaluar la actividad de las fosfatasas en las muestras de suelo, tanto en condiciones iniciales como después de la inoculación. También se evaluó la concentración de los inóculos, así como el efecto de aplicar ambas cepas en conjunto. Esto con el objetivo de determinar las concentraciones de inóculo que permiten obtener mayor actividad de fosfatasas y de identificar posibles interacciones entre las cepas. Seguidamente, se presentan los resultados correspondientes al diseño de la metodología molecular para la detección de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*, basado en la inserción de un gen enzimático. Esto incluye los resultados de la selección de un vector de clonación, del gen enzimático a insertar, de las enzimas de restricción, así como el diseño de *primers* y la selección de la metodología de ensamblaje. En esta misma línea, durante la investigación se validó el correcto ensamblaje del plásmido recombinante y la transformación en *E. coli* DH5 α a modo de prueba de concepto.

8.1 Análisis *in vitro* de la actividad de fosfatasas en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar

8.1.1 Determinación de la actividad inicial de fosfatasas en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar, previo a la inoculación.

Se buscó determinar una posible actividad inicial de fosfatasas en las cinco muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar. Se trató de muestras frescas, analizadas 48 horas después del muestreo. A pesar de no haberlas inoculado, estas ya presentaban actividad enzimática. Estos resultados se tomaron como una actividad enzimática inicial y las características de cada tipo de muestra fueron clave para entender el comportamiento de dicha actividad. La actividad enzimática se expresó como la cantidad de p-nitrofenol (pNP) liberado por hora y por gramo de suelo.

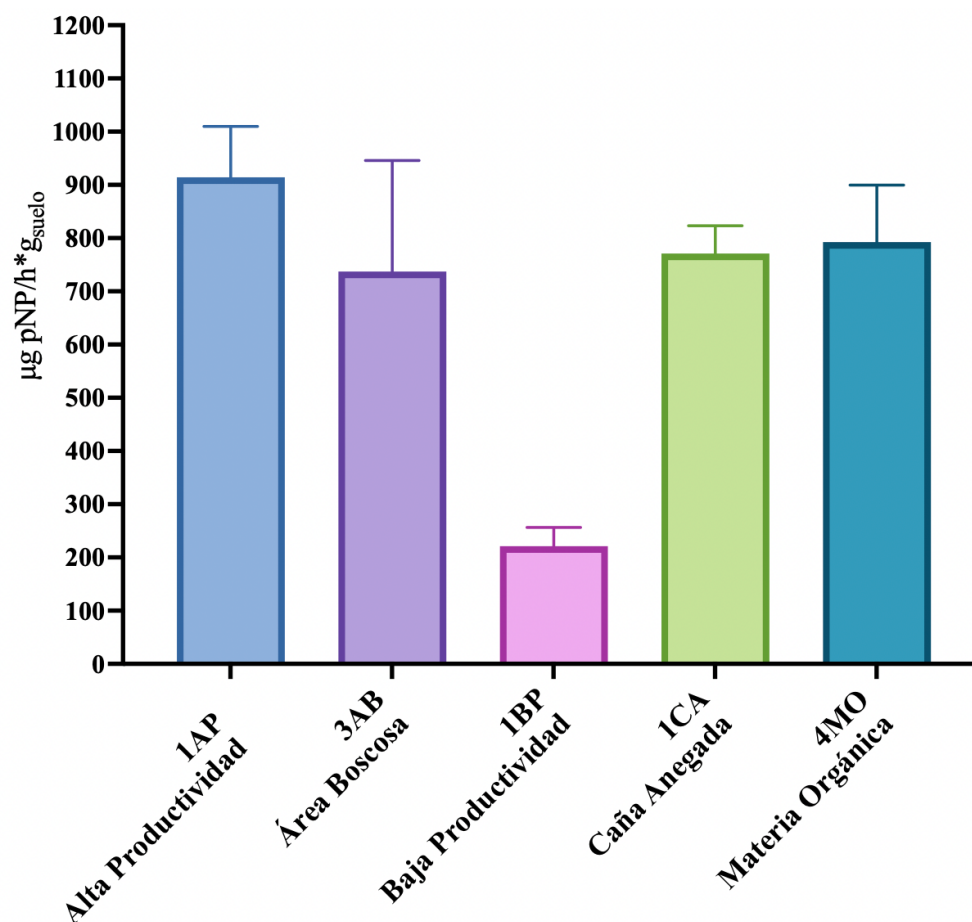


Figura 7. Determinación de la actividad inicial de fosfatasa en muestras frescas de suelo de cultivo de caña de azúcar

La Figura 7 corresponde a la determinación de la actividad inicial de fosfatasa en cinco muestras frescas de suelo de cultivo de caña de azúcar. En el eje vertical se muestra la concentración de p-nitrofenol, expresada en microgramos por hora por gramo de suelo. Dicha concentración hace referencia al producto de la reacción de hidrólisis del p-nitrofenol, catalizada por las fosfatasa presenten en el suelo. Por el contrario, en el eje horizontal se ilustran las cinco muestras de suelo analizadas, con características de cultivo diferentes: alta productividad (1AP), área boscosa (1AB), baja productividad (1BP), caña anegada (1CA) y materia orgánica (4MO). La actividad de fosfatasa representada en la Figura 7 hace referencia a una actividad enzimática inicial, previo a cualquier tratamiento de inoculación bacteriana. Estos resultados permiten establecer la actividad enzimática

inicial, la cual refleja la actividad metabólica de la microbiota nativa del suelo bajo las condiciones fisicoquímicas propias de cada muestra.

La gráfica de barras evidencia que hay una marcada variabilidad en la actividad enzimática entre las cinco muestras analizadas. En la muestra 1AP se produjo la mayor concentración de p-nitrofenil fosfato. Esto indica que en dicha muestra se obtuvo la mayor actividad enzimática correspondiente a $914 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$. En contraste, la muestra 1BP mostró la menor actividad enzimática, equivalente a $221 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, lo que indica una menor tasa de hidrólisis de p-nitrofenil fosfato, en comparación con las demás muestras analizadas. Las muestras 4MO, 3AB y 1CA presentaron niveles intermedios de actividad fosfatasa, correspondientes a 793, 737 y 771 $\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, respectivamente. Estos resultados sitúan a estas tres muestras por debajo de la actividad observada en la muestra 1AP, pero por encima de la obtenida en la muestra 1BP.

8.1.2 Determinación del pH de las muestras de suelo

Con el fin de poder sembrar *in vitro*, las condiciones naturales del suelo, de forma más precisa, durante la experimentación se determinó el pH de las cinco muestras de suelo de cultivo analizadas. Este procedimiento se realizó con las muestras frescas, 48 horas después de su muestreo. Los resultados de este procedimiento permitieron hacer hipótesis sobre la posible fosfatasa presente en los suelos evaluados. Además, fueron el punto de referencia para determinar el pH del buffer MUB que se utilizó para los ensayos enzimáticos.

Cuadro 7. Valores de pH de las muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar

ID muestra de suelo	pH
1AP (alta productividad)	7.36
3AB (área boscosa)	7.86
1BP (baja productividad)	7.36
1CA (caña anegada)	7.33
4MO (materia orgánica)	7.83
PROMEDIO	7.55

El análisis de las cinco muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar permitió determinar que sus valores de pH se ubican dentro un rango entre 7.33 y 7.86, lo que indica que todas

las muestras presentan condiciones neutras a ligeramente alcalinas. La muestra 3AB (área boscosa) registró el valor más alto ($\text{pH} = 7.86$), con una ligera tendencia alcalina, mientras que la muestra 1CA (caña anegada) mostró el valor más bajo ($\text{pH} = 7.33$), lo que indica condiciones más cercanas a la neutralidad. Las muestras 1AP (alta productividad) y 1BP (baja productividad) presentaron valores de 7.36, evidenciando que, a pesar de las diferencias de productividad, las condiciones químicas del suelo en términos de pH son similares. Por su parte, la muestra 4MO (materia orgánica) registró un valor de pH igual a 7.83, cercano al observado en la muestra 3AB, lo que refuerza la idea de que suelos con mayor contenido de materia orgánica tienden a mantener condiciones ligeramente alcalinas. En general, el promedio del pH de las cinco muestras de suelo fue de 7.55. Esta homogeneidad relativa en los valores de pH sugiere que las diferencias y comportamientos observados posteriormente en los ensayos enzimáticos posiblemente no están influenciados por la acidez o basicidad del suelo.

8.1.3 Análisis, *in vitro*, del cambio en la actividad de las fosfatasas del suelo tras la inoculación con *Bacillus subtilis* y/o *Bacillus tropicus*

Tras la determinación de la actividad enzimática inicial y la caracterización del pH de las muestras frescas de suelo de cultivo de caña de azúcar, se evaluó, *in vitro*, el efecto de la inoculación con *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus* sobre la actividad de fosfatasas. Para ello, cada una de las cinco muestras fue inoculada con tres concentraciones de ambas bacterias, tanto de forma individual como en combinación, con el objetivo de determinar si la presencia de estas cepas favorece a incrementar la actividad de las fosfatasas y, en consecuencia, la liberación de fósforo inorgánico potencialmente disponible en los suelos. Con el fin de establecer comparaciones entre tratamientos, se implementó un control, siendo suelo tratado bajo las mismas condiciones, pero sin inocular.

8.1.3.1 Análisis *in vitro* del efecto de la inoculación con *Bacillus subtilis*, sobre la actividad de fosfatasa en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar

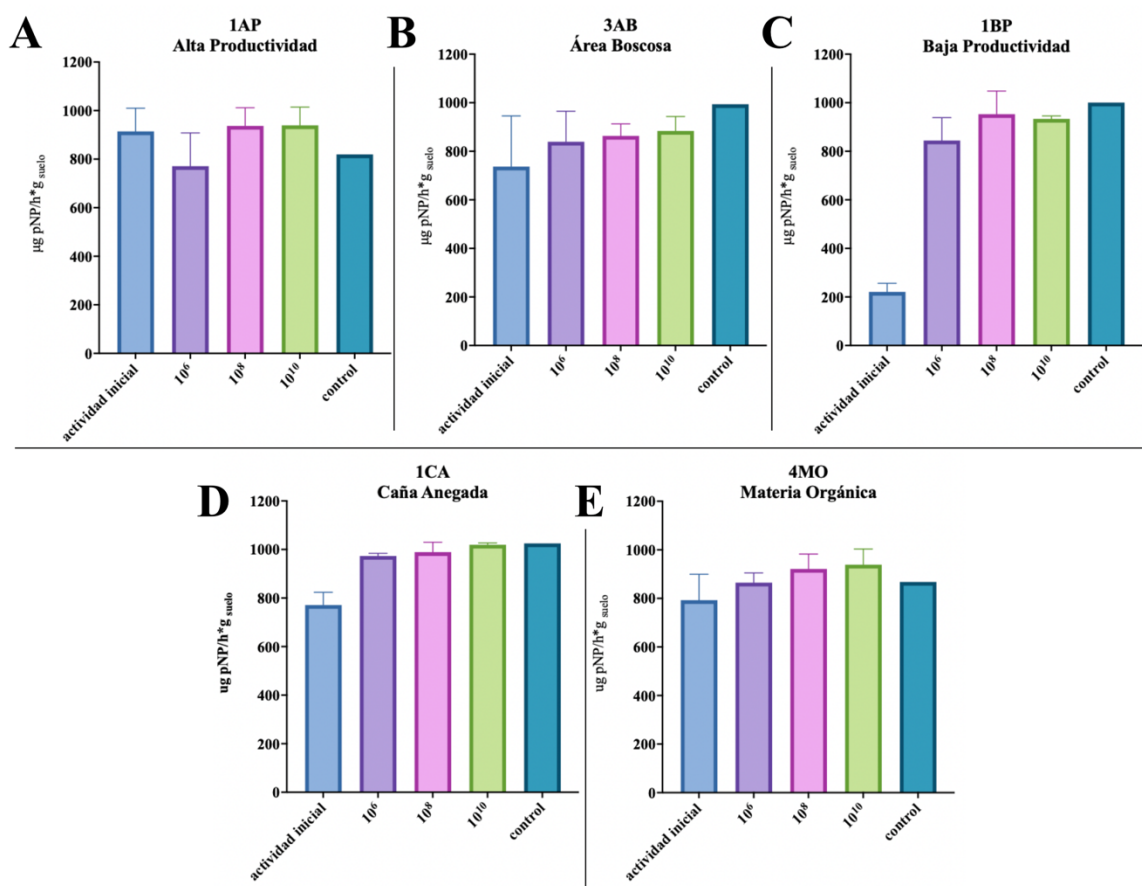


Figura 8. Actividad *in vitro* de fosfatasa en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar, tras la inoculación con *Bacillus subtilis*

La Figura 8 ilustra los resultados del ensayo *in vitro* de la actividad de fosfatasa en suelo, tras la inoculación con *Bacillus subtilis*. Durante dicho ensayo se evaluó el efecto de tres concentraciones bacterianas (10⁶, 10⁸ y 10¹⁰ UFC/mL) sobre cinco muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar. En cada caso, la actividad enzimática obtenida tras la inoculación fue comparada con la actividad inicial de la muestra y con el control sin inocular, con el fin de determinar si la presencia de *B. subtilis* favorece a incrementar la actividad de las fosfatasa del suelo. La actividad enzimática se expresó como la cantidad de p-nitrofenol (pNP) liberado por hora y por gramo de suelo. La Figura 8 contiene paneles con los resultados de una muestra de suelo distinta siendo (A) alta productividad (IAP), (B) área boscosa (1AB), (C) baja productividad (1BP), (D) caña anegada (1CA) y (E) materia orgánica (4MO). En cada una de las gráficas, en el eje vertical se muestra la concentración

de p-nitrofenol, expresada en microgramos por hora por gramo de suelo ($\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de suelo). Dentro de cada gráfica, cada barra corresponde a un tratamiento, comenzando por la actividad inicial, seguido de las concentraciones de bacteria inoculada y el control.

En la muestra 1AP (alta productividad) (Figura 8A), la actividad inicial de fosfatasa fue en promedio de $914 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de suelo. Tras la inoculación con *B. subtilis*, se observó una variación en la actividad enzimática, dependiendo de la concentración bacteriana. Las muestras inoculadas con la concentración 10^6 UFC/mL presentaron una disminución en la actividad de fosfatasa, alcanzando aproximadamente $770 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, lo que representa alrededor de 0.85 veces la actividad inicial. En cambio, en las concentraciones 10^8 y 10^{10} UFC/mL se observó un incremento, superando la actividad inicial, llegando hasta $939 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, lo que corresponde a un aumento aproximado de 1.04, respecto a la actividad inicial. El control presentó una actividad cercana a $820 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, el cual es inferior a la actividad inicial de estas muestras de suelo.

En la muestra 3AB (área boscosa) (Figura 8B), la actividad inicial fue de aproximadamente $737 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Luego de la inoculación se observó un incremento progresivo en la actividad enzimática, conforme aumentó la concentración de *B. subtilis*. El tratamiento con 10^6 UFC/mL alcanzó aproximadamente $840 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, lo que representa 1.15 veces la actividad inicial. Por su parte, las concentraciones 10^8 y 10^{10} UFC/mL reportaron valores cercanos a 860 y 880 $\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, respectivamente, los cuales equivalen a incrementos aproximados de 1.19 y 1.23 veces, respecto a la actividad inicial. El control presentó el valor más alto dentro de esta muestra, con promedio de $994 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, lo cual corresponde a aproximadamente 1.35 veces la actividad inicial. Esto sugiere que factores intrínsecos del suelo también podrían influir en la actividad de las fosfatasa.

En la muestra 1BP (baja productividad) (Figura 8C) se observó la mayor diferencia de actividad de fosfatasa al comparar la actividad inicial con el suelo inoculado. La actividad inicial fue menor que en las demás muestras, con un valor promedio de $221 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Las gráficas de barras ilustran que tras la inoculación con *B. subtilis*, la actividad

enzimática aumentó. El suelo inoculado con una concentración de 10^6 UFC/mL alcanzó aproximadamente $840 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, lo que representa cerca de 4 veces la actividad inicial. Las muestras con concentración de 10^8 UFC/mL mostraron un incremento aún mayor, con un valor promedio de $952 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, equivalentes a aproximadamente 4.3 veces la actividad inicial. Mientras que los suelos con concentración de 10^{10} UFC/mL de la bacteria, presentaron valores cercanos a $930 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$. En este caso, el control obtuvo un resultado promedio de aproximadamente $1000 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, lo que corresponde a cerca de 4.5 veces la actividad inicial. Estos resultados sugieren que, en suelos con baja productividad, donde la actividad enzimática inicial es baja, en comparación con las demás muestras de suelo, la inoculación con *B. subtilis*, podría favorecer a incrementar la actividad de fosfatasas.

En la muestra 1CA (caña anegada) (Figura 8D), la actividad inicial fue cercana a $770 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$. Tras la inoculación con *B. subtilis*, se observó un incremento exponencial en la actividad enzimática para todas las concentraciones evaluadas. El tratamiento con concentración de 10^6 UFC/mL permitió alcanzar en promedio $973 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, equivalente a 1.26 veces la actividad inicial. Por su parte las muestras inoculadas con una concentración de 10^8 UFC/mL alcanzaron valores promedio de $989 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, lo que representa 1.28 veces la actividad inicial. La concentración de 10^{10} UFC/mL de *B. subtilis*, se observaron valores promedio de $1019 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, aproximadamente 1.32 veces la actividad inicial, indicando que, de las tres concentraciones estudiadas, la más alta permite obtener mayor actividad de fosfatasas en las muestras de suelo de cultivo. Sin embargo, el control presentó un resultado similar, cercanos a $1025 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$.

Finalmente, en la muestra 4MO (materia orgánica) (Figura 8E), la actividad inicial fue cercana a $790 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$. Tras la inoculación con *B. subtilis*, se observó un incremento gradual en la actividad enzimática en función de la concentración bacteriana. El inóculo con concentración de 10^6 UFC/mL presentó resultados promedio de $864 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, equivalente a 1.09 veces la actividad inicial. Las muestras inoculadas con 10^8 UFC/mL de *B. subtilis*, alcanzaron en promedio los $921 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, lo que representa 1.17 veces la actividad inicial. Por el contrario, la concentración 10^{10} UFC/mL registró valores promedio

de 939 $\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, aproximadamente 1.19 veces la actividad inicial. En este caso, el control mostró un valor de 867 $\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, similar al resultado observado en la primera concentración evaluada.

8.1.3.2 Análisis *in vitro* del efecto de la inoculación con *Bacillus tropicus* sobre la actividad de fosfatasa en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar

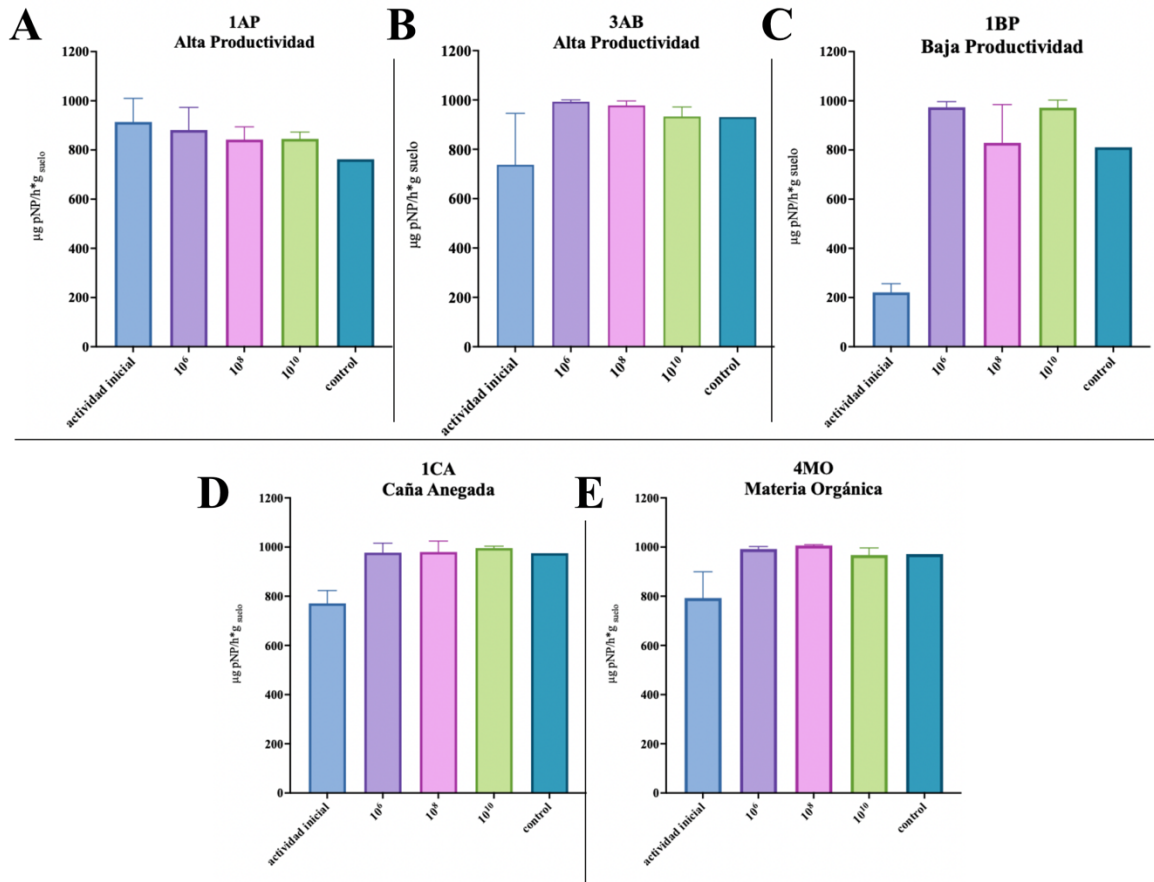


Figura 9. Actividad *in vitro* de fosfatasa en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar, tras la inoculación con *Bacillus tropicus*

La Figura 9 muestra los resultados del ensayo *in vitro* de la actividad de fosfatasa en suelo, tras la inoculación con *Bacillus tropicus*. Durante dicho ensayo se evaluó el efecto de tres concentraciones bacterianas (10⁶, 10⁸ y 10¹⁰ UFC/mL) sobre cinco muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar. En cada caso, la actividad enzimática obtenida tras la inoculación fue comparada con la actividad inicial de la muestra y con el control sin inocular, con el fin de determinar si la presencia de *B. tropicus* favorece a incrementar la actividad de las

fosfatasa del suelo. La actividad enzimática se expresó como la cantidad de p-nitrofenol (pNP) liberado por hora y por gramo de suelo. La Figura 9 contiene paneles con los resultados de una muestra de suelo distinta siendo (A) alta productividad (1AP), (B) área boscosa (1AB), (C) baja productividad (1BP), (D) caña anegada (1CA) y (E) materia orgánica (4MO). En cada una de las gráficas, en el eje vertical se muestra la concentración de p-nitrofenol, expresada en microgramos por hora por gramo de suelo ($\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de suelo). Dentro de cada gráfica, cada barra corresponde a un tratamiento, comenzando por la actividad inicial, las concentraciones de bacteria inoculada y el control.

En la muestra 1AP (alta productividad) (Figura 9A), la actividad inicial fue en promedio de $914 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Tras la inoculación con *Bacillus tropicus* a concentraciones de 10^6 , 10^8 y 10^{10} UFC/mL se reportaron resultados inferiores para la actividad enzimática correspondientes a 881, 842 y 845 $\text{pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, respectivamente. Esto significa que, en comparación con la actividad inicial, se reportaron actividades 0.96, 0.92 y 0.92, veces menores para cada concentración, respectivamente. Por su parte, el control presentó una actividad de $762 \text{ pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, la cual corresponde a 0.84 veces la actividad inicial.

La muestra 3AB (área boscosa) (Figura 9B), reportó una actividad enzimática inicial promedio de $737 \text{ pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, la cual aumentó tras la inoculación con *B. tropicus*. El inóculo con concentración de 10^6 UFC/mL permitió alcanzar una actividad promedio de $992 \text{ pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, lo que corresponde a 1.36 veces la actividad inicial. Mientras que en el tratamiento con concentración de 10^8 UFC/mL se observó una actividad enzimática promedio de $977 \text{ pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, equivalente a 1.37 veces la actividad inicial. Las réplicas inoculadas con *B. tropicus* a concentración de 10^{10} UFC/mL mostraron una actividad enzimática menor, en comparación con los dos primeros inóculos correspondiente a $933 \text{ pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. En este caso el control registró valores cercanos a $930 \text{ pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, equivalentes 1.36 veces la actividad inicial.

En la muestra 1BP (baja productividad) (Figura 9C), se observó el mayor incremento en la actividad enzimática, tras la inoculación con *B. tropicus*. En esta muestra, la actividad inicial fue de $221 \text{ pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, la cual llegó hasta $974 \text{ pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ al inocular con una

concentración de 10^6 UFC/mL. Lo cual significa que en este caso la actividad aumentó 4.41 veces, respecto a la inicial. En los inóculos con concentraciones de 10^8 y 10^{10} UFC/mL se reportaron resultados promedio de 977 y 933 $\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, respectivamente. Estos representan un aumento en la actividad enzimática de 4.42 y 4.22 veces, en comparación con la inicial. El control mostró un valor de 811 $\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$ lo cual corresponde a aproximadamente 1.35 veces la actividad inicial. Esto evidencia una mayor respuesta enzimática en suelos con menor actividad inicial.

En la muestra 1CA (caña anegada) (Figura 9D), la actividad inicial fue de 771 $\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$. Tras la inoculación con *B. tropicus*, se observó un incremento en la actividad enzimática en las tres concentraciones evaluadas. El tratamiento con concentración de 10^6 UFC/mL permitió alcanzar en promedio 977 $\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, equivalente a 1.27 veces la actividad inicial. Por su parte las muestras inoculadas con una concentración de 10^8 UFC/mL alcanzaron valores promedio de 980 $\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, lo que representa 1.27 veces la actividad basal. La concentración de 10^{10} UFC/mL de *B. tropicus*, presentó valores promedio de 996 $\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, aproximadamente 1.29 veces la actividad inicial. Sin embargo, el control presentó un resultado similar, cercano a 975 $\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$.

En la muestra 4MO (materia orgánica) (Figura 9E), la actividad inicial fue cercana a 793 $\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$. Tras la inoculación con *B. tropicus*, se observó un incremento en la actividad enzimática. El inóculo con concentración de 10^6 UFC/mL presentó resultados promedio de 992 $\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, equivalente a 1.25 veces la actividad inicial. Las muestras inoculadas con 10^8 UFC/mL de *B. tropicus*, alcanzaron en promedio los 1006 $\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, lo que representa 1.26 veces la actividad inicial. Por su parte, la concentración 10^{10} UFC/mL registró valores promedio de 966 $\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, aproximadamente 1.22 veces la actividad inicial. En este caso, el control mostró un valor igual a 976 $\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, cercano al resultado observado en la última concentración evaluada.

8.1.3.3 Análisis *in vitro*, del efecto de la inoculación con *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus* sobre la actividad de fosfatasa en muestras de suelo

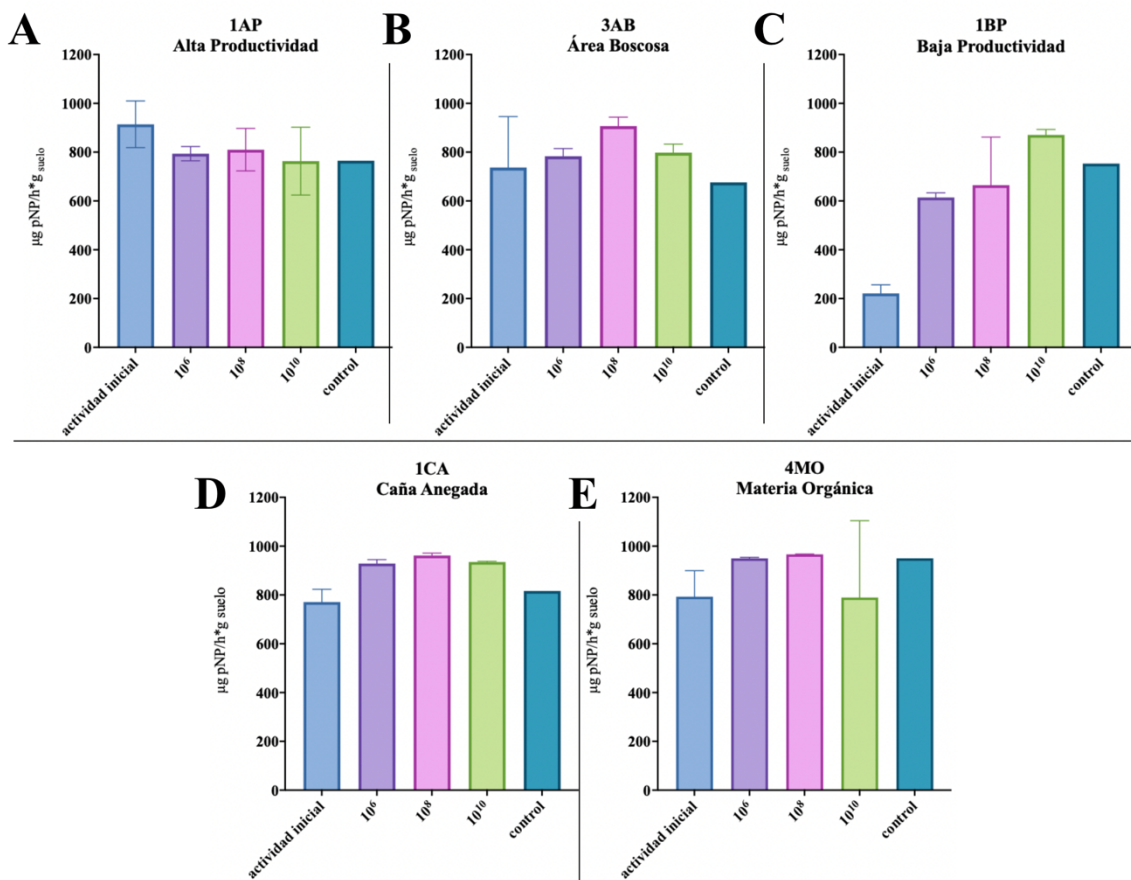


Figura 10. Actividad *in vitro* de fosfatasa en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar, tras la inoculación con *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*

La Figura 10 ilustra los resultados del ensayo *in vitro* de la actividad de fosfatasa en suelo, tras la inoculación combinada con *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*. Durante dicho ensayo se evaluó el efecto de tres concentraciones bacterianas (10⁶, 10⁸ y 10¹⁰ UFC/mL) sobre cinco muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar. En cada caso, la actividad enzimática obtenida tras la inoculación fue comparada con la actividad inicial de la muestra y con el control sin inocular, con el fin de determinar si la presencia de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus* favorece a incrementar la actividad de las fosfatasa del suelo. La actividad enzimática se expresó como la cantidad de p-nitrofenol (pNP) liberado por hora y por gramo de suelo. La Figura 10 contiene paneles con los resultados de una muestra

de suelo distinta siendo (A) alta productividad (1AP), (B) área boscosa (1AB), (C) baja productividad (1BP), (D) caña anegada (1CA) y (E) materia orgánica (4MO). En cada una de las gráficas, en el eje vertical se muestra la concentración de p-nitrofenol, expresada en microgramos por hora por gramo de suelo ($\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de suelo). Dentro de cada gráfica, cada barra corresponde a un tratamiento, comenzando por la actividad inicial, las concentraciones de bacteria inoculada y el control.

En la muestra 1AP (alta productividad) (Figura 10A), la actividad inicial fue de $914 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, la cual disminuyó tras la inoculación con ambas bacterias en conjunto. Las muestras con un inóculo con concentración de 10^6 UFC/mL presentaron una actividad enzimática promedio de $794 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, equivalente a 0.87 veces la actividad inicial. Los tratamientos con concentraciones de 10^8 y 10^{10} UFC/mL mostraron resultados promedio de 810 y $762 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, respectivamente, los cuales representan 0.87 y 0.83 veces menor a la actividad enzimática inicial. El control presentó un resultado de $765 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, similar a lo obtenido con la tercer concentración de inóculo analizada.

La muestra 3AB (área boscosa) (Figura 10B), reportó una actividad enzimática inicial de $737 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Esta actividad aumentó al inocular con una concentración de 10^6 UFC/mL obteniendo un resultado promedio de $783 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, 1.06 veces mayor a la inicial. Se observó una actividad máxima tras la inoculación con ambas bacterias a concentración de 10^8 UFC/mL obteniendo un valor promedio de $907 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Este es 1.23 veces mayor al registrado inicialmente. Sin embargo, la concentración 10^{10} UFC/mL mostró una disminución respecto a la anterior en promedio de $798 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, 1.08 veces mayor a la actividad inicial. Por su parte el control reportó un resultado de $676 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, el cual es inferior a los demás datos de esta muestra.

En la muestra 1BP (baja productividad) (Figura 10C), la actividad inicial fue cercana a $221 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. El inóculo con concentración de 10^6 UFC/mL presentó resultados promedio de $614 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, equivalente a 2.78 veces la actividad inicial. Las muestras inoculadas con 10^8 UFC/mL de ambas bacterias, alcanzaron en promedio los $665 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, lo que representa 3.01 veces la actividad inicial. Por el contrario, la concentración 10^{10}

UFC/mL registró valores promedio de $871 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, aproximadamente 3.94 veces más a la actividad inicial. En este caso, el control mostró un valor igual a $753 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$. Estos resultados sugieren que, en suelos con baja productividad, donde la actividad enzimática inicial es baja, en comparación con las demás muestras de suelo, la inoculación con *B. subtilis* y *B. tropicus* podría favorecer a incrementar la actividad de fosfatasa.

La muestra 1CA (caña anegada) (Figura 10D), la actividad inicial fue de $771 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, la cual aumentó al aplicar un inóculo de ambas bacterias con concentración de 10^6 UFC/mL. En ese caso se obtuvo una actividad enzimática promedio de $929 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, equivalente a 1.20 veces más a la inicial. El tratamiento con concentración de 10^8 UFC/mL mostró un resultado de $962 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, el cual es 1.24 veces mayor a la actividad inicial. Al inocular con una concentración de 10^{10} UFC/mL se observó una disminución en la actividad enzimática, respecto a al último tratamiento mencionado, correspondiente a $953 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$. Este dato es 1.24 veces mayor al inicial. El control presentó un resultado de $816 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, fue menor en comparación con los tratamientos.

En la muestra 4MO (materia orgánica) (Figura 10E), la actividad inicial corresponde a $793 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, la cual aumentó con los primeros dos tratamientos. Se observó que las muestras inoculadas con ambas bacterias a concentración de 10^6 UFC/mL se obtuvo un resultado de 950, equivalente a 1.20 veces más a la actividad inicial. Al inocular con una concentración de 10^8 UFC/mL la actividad aumentó en promedio a $966 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, la cual es 1.22 veces más grande a la actividad inicial. Pero, el tratamiento con concentración de 10^{10} UFC/mL llevó a una disminución en la actividad enzimática de en promedio de $790 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, la cual es 1.00 menor a la actividad inicial. Por su parte, el control presentó una actividad de $950 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$, igual a la reportada con el primer tratamiento analizado.

8.1.3.4 Análisis del efecto de la concentración del inóculo de *Bacillus subtilis* y/o *Bacillus tropicus* sobre la actividad de fosfatasas en muestras de suelo

La investigación también se centró en determinar la concentración óptima de los inóculos de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*, tanto de forma individual como en combinación, con el fin de identificar el tratamiento que permita maximizar la actividad de fosfatasas en las muestras de suelo. En este contexto, se evaluaron distintas concentraciones bacterianas y su efecto sobre la actividad enzimática. La actividad enzimática se expresó como la cantidad de p-nitrofenol (pNP) liberado por hora y por gramo de suelo.

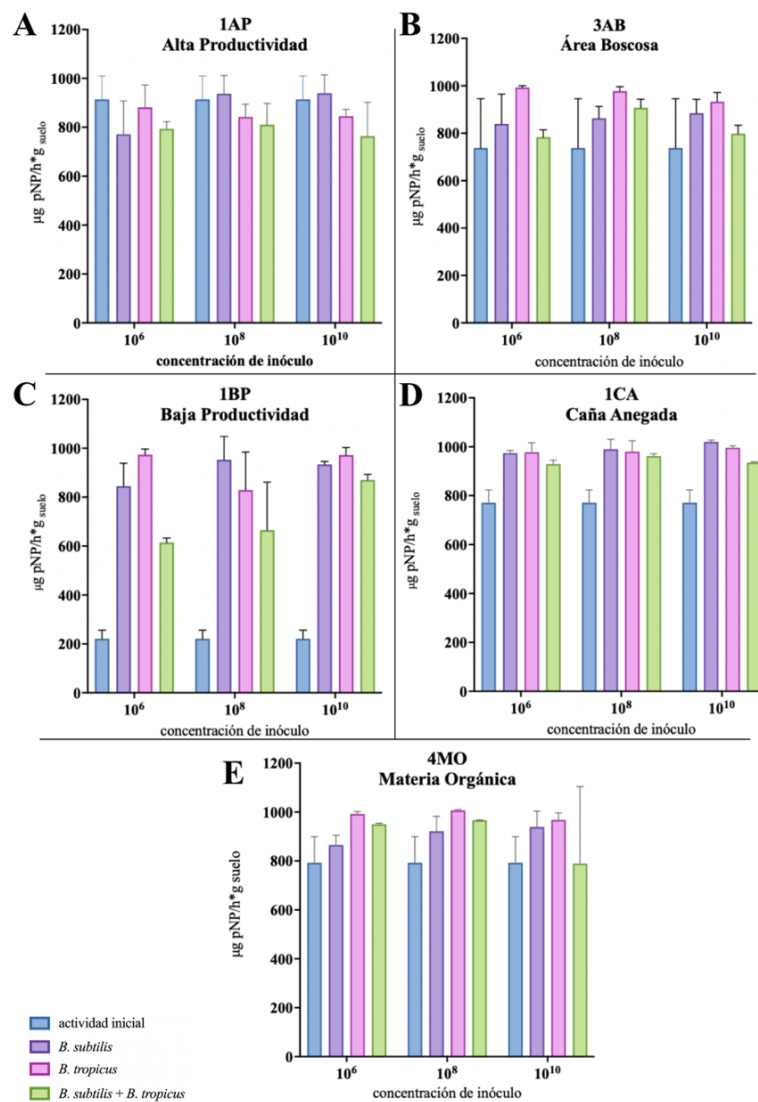


Figura 11. Comparación de la actividad *in vitro* de fosfatasas en muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar, tras la inoculación con *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*

La Figura 11 muestra la actividad enzimática reportada para cada muestra de suelo. En este caso se buscó analizar la concentración óptima de inóculo que permite obtener mayor actividad de fosfatasas en suelos de cultivo. Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones (10^6 , 10^8 y 10^{10} UFC/mL) de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*, tanto de forma individual como en combinación. La actividad enzimática se expresó como la cantidad de p-nitrofenol (pNP) liberado por hora y por gramo de suelo. Cada uno de los paneles contiene los resultados de una muestra de suelo distinta siendo (A) alta productividad (1AP), (B) área boscosa (1AB), (C) baja productividad (1BP), (D) caña anegada (1CA) y (E) materia orgánica (4MO). En cada una de las gráficas, en el eje vertical se muestra la concentración de p-nitrofenol, expresada en microgramos por hora por gramo de suelo ($\mu\text{g pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de suelo). Dentro de cada gráfica, cada barra corresponde a un tratamiento, comenzando por la actividad inicial, siguiendo de tres diferentes inóculos, detallados en la leyenda de la gráfica.

En la muestra 1AP (alta productividad) (Figura 11A) se observó que la mayor actividad de fosfatasas se alcanzó tras la inoculación con *Bacillus subtilis* a concentraciones 10^8 y 10^{10} UFC/mL. En ambos casos, los resultados son muy similares correspondientes a 937 y 939 $\text{pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, respectivamente, los cuales son superiores a los demás tratamientos para esta misma muestra. La actividad enzimática obtenida con *B. subtilis* en dichas concentraciones fue aproximadamente 1.2 veces mayor que la registrada con el inóculo de 10^6 UFC/mL. Por su parte, *Bacillus tropicus* presentó mayor actividad en concentraciones de 10^6 y 10^8 UFC/mL, aunque con resultados menores a los registrados con *B. subtilis*. En concreto, la actividad enzimática en las muestras inoculadas con *B. tropicus* fue cerca de 1.1 veces menor a la alcanzada por *B. subtilis* en sus concentraciones óptimas. Mientras que, las muestras inoculadas con ambas bacterias en combinación, mostró menor actividad en todas las concentraciones evaluadas, siendo hasta 1.3 veces menor que los tratamientos individuales.

En la muestra 3AB (área boscosa) (Figura 11B), la mayor actividad de fosfatasas se alcanzó tras la inoculación con *Bacillus tropicus* a concentraciones de 10^6 y 10^8 UFC/mL,

obteniendo resultados de 993 y 997 pNP h⁻¹ g⁻¹, respectivamente. La actividad registrada, tras la inoculación con *B. tropicus*, a concentración de 10⁶ UFC/mL fue aproximadamente 1.3 veces mayor que la actividad inicial. Al observar la gráfica, es evidente que la diferencia entre los resultados de los tratamientos 10⁶ y 10⁸ es mínima. En cambio, a concentración de 10¹⁰ UFC/mL se observó una disminución en la actividad enzimática, siendo cerca 1.1 veces menor que la obtenida con 10⁶. Por su parte, *B. subtilis*, en comparación con *B. tropicus*, presentó valores inferiores en todas las concentraciones, llegando a ser hasta 1.2 veces menores que los alcanzados por *B. tropicus* en su concentración óptima. La inoculación de ambas bacterias en conjunto tampoco superó a la actividad enzimática registrada con los tratamientos individuales. En conjunto, estos resultados indican que la concentración óptima en este suelo corresponde a 10⁶ UFC/mL de *B. tropicus*.

En la muestra 1BP (baja productividad) (Figura 11C), la mayor actividad se alcanzó con *Bacillus tropicus* a concentraciones de 10⁶ y 10¹⁰ UFC/mL, cuyos resultados fueron muy similares entre sí correspondientes a 974 y 972 pNP h⁻¹ g⁻¹, respectivamente. Estas concentraciones representaron un aumento de aproximadamente 4.5 veces respecto a la actividad inicial, siendo el mayor incremento observado entre todas las muestras analizadas. Por su parte, *B. subtilis* también promovió un aumento en la actividad enzimática, aunque en menor proporción, alcanzando valores aproximados de 3.5 veces la actividad inicial. El consorcio bacteriano mostró una actividad intermedia, siendo cerca de 1.2 veces menor que la obtenida con *B. tropicus* en su punto óptimo. En conjunto, estos resultados evidencian que *B. tropicus* a concentraciones de 10⁶ y 10¹⁰ UFC/mL genera una mayor actividad enzimática.

La muestra 1CA (caña anegada) (Figura 11D) alcanzó la mayor actividad de fosfatasas con los inóculos individuales de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus* a concentraciones de 10⁸ y 10¹⁰ UFC/mL. Estos tratamientos permitieron obtener resultados de 989, 1019, 978 y 996 pNP h⁻¹ g⁻¹, respectivamente. Aun así, al comparar la actividad enzimática obtenida tras la inoculación con 10⁶ y 10¹⁰ UFC/mL, las diferencias son mínimas, dónde de un tratamiento a otro se observó un aumento de 1.1 veces. En términos comparativos, todos los

tratamientos mostraron valores similares. Además, la inoculación en conjunto de ambas bacterias no presentó mejoras significativas, manteniendo la actividad enzimática cerca de 1.1 veces por debajo de los tratamientos individuales.

En la muestra 4MO (materia orgánica) (Figura 11E) se observó un incremento en la actividad de fosfatasas tras la inoculación, con diferencias moderadas entre las concentraciones. La mayor actividad se alcanzó con *Bacillus tropicus* a concentración de 10^8 UFC/mL. En concreto, este tratamiento permitió obtener una actividad enzimática de $1006 \text{ pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, lo cual corresponde a cerca de 1.3 veces la actividad inicial. Respecto a *B. subtilis*, se observó mayor actividad enzimática con el inóculo de concentración 10^{10} UFC/mL, el cual llevó a un resultado de $939 \text{ pNP h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. La combinación de ambas cepas no mostró ser mejor que las bacterias por separado, obteniendo valores de hasta 1.1 veces menores que los tratamientos individuales. En conjunto, estos resultados indican que la concentración óptima en este suelo corresponde a 10^8 UFC/mL de *B. tropicus*, y que la presencia de ambas cepas no favorece a tener un efecto sinérgico en la actividad enzimática.

8.2 Diseño una metodología molecular para la detección de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*, basado en la inserción de un gen enzimático

Una de las problemáticas identificadas, respecto al uso de biofertilizantes bacterianos es la falta de herramientas sencillas, específicas y de bajo costo que permitan detectar y monitorear la persistencia de las cepas aplicadas en los suelos de cultivo. Es por eso que, una parte de la presente investigación se centró en el diseño de una metodología molecular, basada en una prueba de concepto, enfocada en la detección de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus* a partir de la inserción de un gen marcador enzimático. Para ello, se llevó a cabo la selección de un vector de clonación adecuado, así como de un gen reportero y de un método de ensamblaje molecular.

Cuadro 8. Características del gen seleccionado para la prueba de concepto

Característica	Descripción
Nombre del gen	<i>uidA</i>
Proteína codificada por el gen	Enzima hidrolítica β -glucoronidasa (GUS)
Tamaño del gen	1812 pb
Organismo de origen	Presente naturalmente en aproximadamente el 95% de cepas de <i>E.coli</i>
Función (incluir producto)	Enzima que hidroliza β -D-glucurónidos, como el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucurónido (X-Gluc). Esta reacción produce 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto insoluble de coloración azul, fácilmente detectable.
Aplicación como marcador de selección	Ampliamente utilizado como gen reportero cromogénico, ya que los productos de su actividad son visualmente detectables en medios de cultivo.
Ventajas como gen reportero	Es un gen altamente estable con expresión detectable. Hidroliza tanto X-Gluc como 4-metilumbeliferil beta-D-glucurónido (MUG), generando productos cromogénico o fluorescentes detectables.
Método de detección	Actividad enzimática detectable a partir de en cromogénicos, como agar.

El Cuadro 8 muestra las características principales del gen seleccionado para el desarrollo de la prueba de concepto propuesta. Se trata del gen *uidA*, el cual codifica para la enzima β -glucuronidasa (GUS). Dicho gen tiene un tamaño aproximado de 1812 pares de bases y se encuentra de manera natural en el 95 % de las cepas de *E. coli*, lo que facilita su obtención. La función de este gen enzimático se basa en catalizar la hidrólisis de β -D-glucurónidos. El resultado de esta reacción genera un producto insoluble de coloración azul, lo que permite una detección visual directa de la actividad enzimática. Adicionalmente, el gen *uidA* presenta ventajas importantes como su alta estabilidad y expresión detectable, así como la capacidad de hidrolizar diferentes sustratos, incluyendo compuestos fluorogénicos como el MUG, lo que amplía las posibilidades de detección.

Cuadro 9. Características del vector de clonación seleccionado para la prueba de concepto

Característica	Descripción
Nombre del vector de clonación	pBsacA
Tamaño	6891pb
Marcador de selección	Presenta genes de resistencia a la ampicilina
Promotor	Promotor Pveg, el cual es fuerte y constitutivo.
Compatibilidad con bacterias	<i>Shuttle vector</i> que se ha utilizado en <i>E. coli</i> (Gram negativo) para la construcción y clonación de plásmidos, así como en <i>B. subtilis</i> (Gram positivo) para la edición genética.
Tipo de origen de replicación	Compatible con <i>E. coli</i> DH5 α y <i>B. subtilis</i> . Utiliza las proteínas repB para obtener una replicación del tipo círculo rodante (<i>rolling circle replication</i>)
Número de copias	Alto número de copias
Sitio de clonación múltiple	No presenta, pero tiene sitios de restricción específicos, ideales para el uso de ensamblaje Golden Gate o ensamblaje de Gibson.
Compatibilidad con ensamblaje de Gibson	Si es compatible y ya se ha utilizado esta método para el ensamblaje del plásmido.
Elementos reguladores adicionales	Presenta sitios de unión al ribosoma (RBS), así como secuencias terminadoras como rrnBT1y rrnBT2
Eficiencia de transformación esperada	Moderada a alta gracias a que se trata de un vector de alto número de copias

El Cuadro 9 resume las características principales del vector de clonación seleccionado para el desarrollo de la prueba de concepto propuesta. Se trata del plásmido pBsacA, el cual es un *shuttle vector* diseñado para su uso en bacterias tanto Gram negativo como Gram positivo, lo que lo hace compatible con *E. coli* DH5 α , *B. subtilis* y *B. tropicus*. Adicionalmente, dicho plásmido presenta un promotor fuerte de tipo constitutivo (Pveg), el cual permite una expresión continua del gen insertado y un alto número de copias, lo que contribuye a incrementar la síntesis del gen de interés. pBsacA también contiene un

marcador de selección basado en la resistencia a la ampicilina, el cual permite la identificación de colonias transformadas mediante el uso de un medio de cultivo selectivo. Otra de las características relevantes del plásmido seleccionado es la presencia de elementos regulatorios esenciales, como secuencias de unión al ribosoma (RBS) y terminadores de transcripción, que garantizan una correcta iniciación y terminación del proceso de expresión génica.

Cuadro 10. Diseño de *primers* y selección de enzima de restricción para la amplificación del gen *uidA* en la prueba de concepto

Elemento	Característica	Descripción
Primers	<i>Primer forward</i> 5' - 3'	AATGTAATTTCTACTGTTGTAGATTCATGTTACG TCCTGTAGAAACCCCA
	<i>Primer reverse</i> 5' - 3'	GAAATCTTGTTATAATCGAGGCTCATTGTTTGCC TCCCTGCTGC
	Regiones funcionales	Extremos 5' (color negro) = secuencias homólogas al plásmido pBsacA Extremos 3' (color verde) = secuencias del gen <i>uidA</i> para su amplificación
	Tamaño esperado del amplicón	1812 pb
Enzima de restricción	Nombre	EagI
	Secuencia de reconocimiento	5'...C GGCCG...3' 3'...GCCGG C...5'
	Tipo de corte	Cohesivo (<i>sticky ends</i>)
	Función dentro de la prueba de concepto	Linealizar el plásmido pBsacA para insertar el fragmento amplificado del gen de interés.

El Cuadro 10 presenta el diseño de los *primers* utilizados para la amplificación del gen *uidA*, así como ciertas características de la enzima de restricción seleccionada para la linealización del vector. Los *primers* fueron diseñados utilizando la herramienta molecular

SnapGene y presentan regiones funcionales específicas. Además, sus extremos 5' contienen secuencias homólogas al plásmido pBsacA, lo que permite la adición de *overhangs*, los cuales son clave para el ensamblaje mediante la técnica de Gibson. Por otra parte, los extremos 3' de cada *primer* corresponden a la secuencia complementaria del gen *uidA*, permitiendo su amplificación específica. Este diseño de *primers* permite obtener un amplicón de alrededor de 1812 pb, el cual contiene regiones homólogas que facilitan su correcta inserción en el vector linealizado. Para la linealización del plásmido, se seleccionó la enzima de restricción *EagI*, la cual reconoce la secuencia específica detallada en el Cuadro 10 y genera extremos cohesivos. Una de las características más importantes de esta enzima es que presenta un único sitio de corte en el vector pBsacA, lo que permite su linealización sin generar fragmentos adicionales.

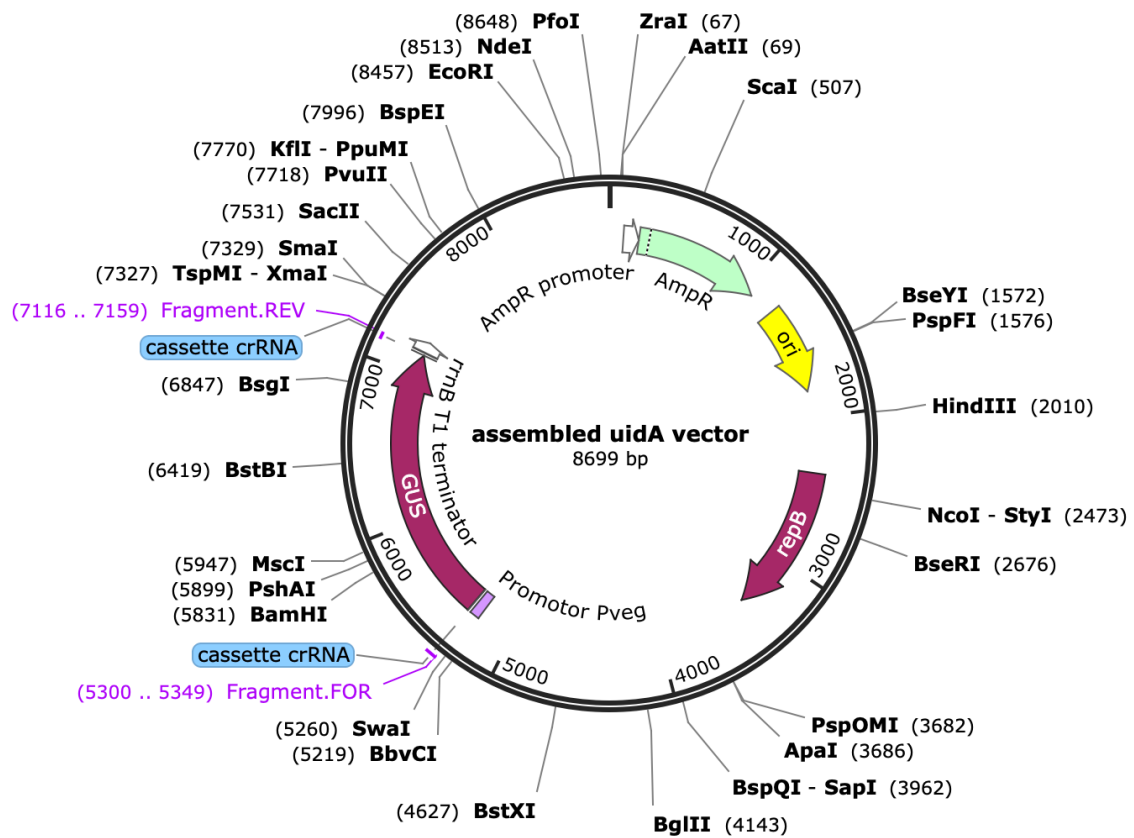


Figura 12. Ensamblaje de Gibson *in silico* del vector recombinante pBsacA-uidA

La Figura 12 ilustra el ensamblaje de Gibson *in silico* realizado a partir de la herramienta molecular *SnapGene*. Dentro de esta se utilizó la opción de “*Gibson Assembly*” para construir el vector recombinante. El mapa resultante de dicho ensamblaje de Gibson *in silico*, muestra un vector recombinante de 8699 pb. El inserto del gen *uidA*, representado en la Figura 12 por la flecha morada (GUS), fue diseñado con regiones homólogas (*overhangs*) en sus extremos, lo que permitió su integración correcta y orientada dentro del vector. Además, este fue insertado aguas abajo (*downstream*) del promotor constitutivo Pveg. Asimismo, el ensamblaje conserva elementos regulatorios, propios del plásmido, como el origen de replicación (*ori*), el gen de resistencia a ampicilina (AmpR) y las secuencias terminadoras. Esto favorece a promover la estabilidad del constructo como su correcta expresión.

8.2.1 Validación de la funcionalidad de la metodología propuesta para la detección de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*

Además del planteamiento de la metodología molecular enfocada en la detección de *B. subtilis* y *B. tropicus* en muestras de suelo de cultivo, se llevó a cabo una validación experimental preliminar de la misma a modo de prueba de concepto. Para ello, se empleó *E. coli* DH5 α como organismo modelo, permitiendo evaluar la funcionalidad de los componentes seleccionados y diseñados, incluyendo la amplificación del gen *uidA*, la linealización del plásmido pBsacA mediante la enzima de restricción EagI y el la ligación de ambos fragmentos a partir de un ensamblaje de Gibson. Esta parte del estudio permitió validar de forma experimental, el diseño adecuado de los *primers*, la correcta integración del inserto en el vector y la obtención de un constructo recombinante, sin extender la validación a organismos del género *Bacillus*. En general, esta fase experimental permitió confirmar la funcionalidad de los elementos propuestos en la prueba de concepto y proporción evidencia preliminar que sustenta su potencial para implementarlos, a futuro, en las cepas del género *Bacillus*.

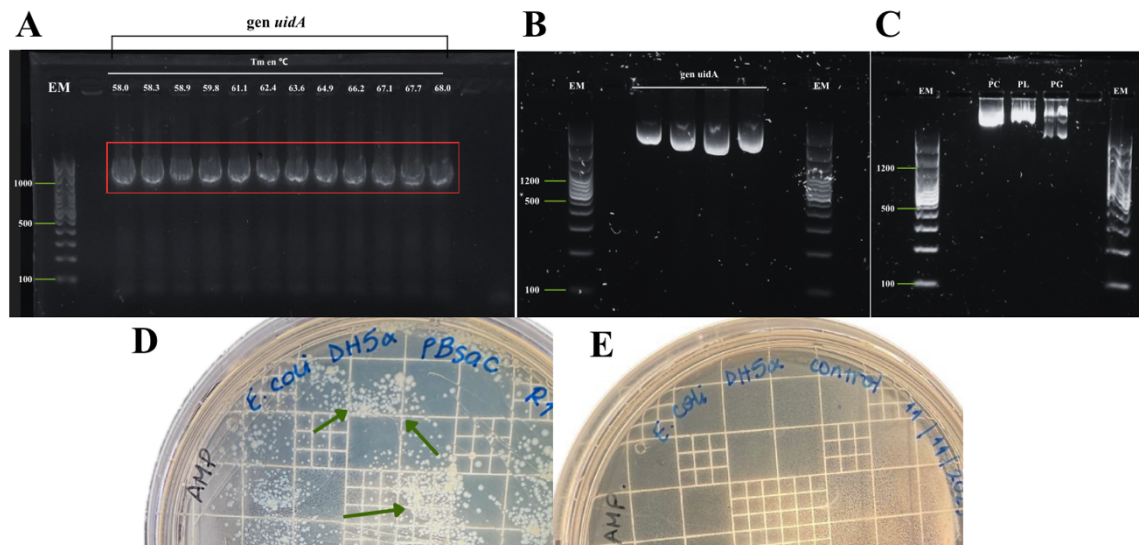


Figura 13. Evaluación de la funcionalidad y viabilidad de la prueba de concepto propuesta para la construcción del plásmido recombinante pBsacA-uidA

La Figura 13A corresponde al gel de electroforesis en agarosa al 1.0 %, cuyas condiciones de corrida fueron de 100 V por 35 min, muestra los productos de amplificación del gen *uidA* bajo distintas condiciones de temperatura de alineamiento (Figura 13A). Al comparar las bandas obtenidas, con el marcador molecular (EM) de 100 pb, se evidencia que el producto presenta un tamaño aproximado de 1812 pb, lo cual coincide con lo esperado. Esto aplica para todos los pozos analizados, independientemente de la temperatura de alineamiento. Este gel de electroforesis muestra bandas con intensidad homogénea, además no hay evidencia de productos inespecíficos ni degradación, lo cual sugiere que el gen *uidA* amplificó de forma específica.

Los productos del PCR anterior fueron purificados y se analizaron en otra electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % (100 V, 35 minutos) (Figura 13B). Se mantuvo la presencia de una única banda definida con un tamaño de 1812 pb. Esto confirma que el proceso de purificación con sales y etanol permitió recuperar el fragmento de interés sin afectar su integridad. Además, la ausencia de bandas adicionales sugiere que el ADN purificado se encuentra libre de contaminantes relevantes, como residuos de la reacción de PCR, lo cual es importante para garantizar la eficiencia del ensamblaje de Gibson.

Para verificar tanto la correcta linealización del plásmido pBsacA como la eficiencia del ensamblaje de Gibson, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa 0.8 %, la cual se corrió a 100 V durante 60 minutos (Figura 13C). En este del se observan tres bandas principales: el plásmido circular (PC), el plásmido linealizado con la enzima EagI (PL) y el plásmido ligado mediante un ensamblaje de Gibson (PG). El tamaño esperado del plásmido circular es de 6991 pb, mientras que el del constructo recombinante corresponde a 8699 pb. La presencia de una banda con mayor peso molecular en el pozo PG, en comparación con el plásmido linealizado, sugiere que el ensamblaje de Gibson fue eficiente.

El vector recombinante se utilizó para la transformación de *E. coli* DH5 α . Luego de la transformación, las bacterias fueron cultivadas en medio de cultivo LB suplementado con ampicilina, tras la transformación e incubadas a 37 °C durante 48 horas. Se observó el crecimiento de múltiples colonias blanquecinas de 1-3 milímetros de diámetro con borde redondo y definido (Figura 12D). Esto indica que la transformación fue exitosa y que el plásmido recombinante mantuvo su funcionalidad, incluyendo el origen de replicación y el gen de resistencia a ampicilina, lo cual permitió la selección de células transformadas. En paralelo, se realizó un control negativo de la transformación en donde células de *E. coli* DH5 α sin transformar se cultivaron bajo las mismas condiciones, en medio LB con ampicilina (Figura 13E). En este caso, no se observó crecimiento bacteriano alguno. Este resultado valida que el crecimiento observado en la Figura 12D se debe a la incorporación del plásmido recombinante, descartando la posibilidad de contaminación o crecimiento no específico.

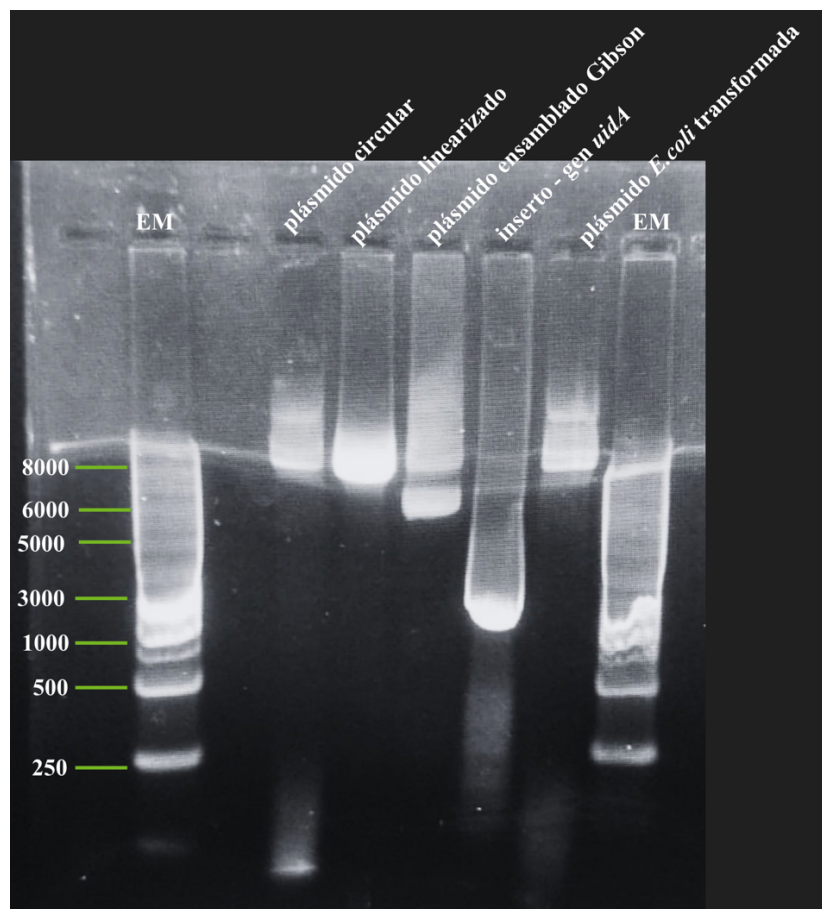


Figura 14. Confirmación molecular de la eficiencia del ensamblaje del plásmido recombinante y su transformación en *E. coli DH5 α*

La Figura 14 muestra el resultado de un gel de electroforesis en agarosa al 0.8 %, corrido a 100 V durante 60 minutos, en el cual se analizaron los distintos estados del vector, el inserto y del producto final extraído de las colonias transformadas. Esta evaluación molecular verificar la eficiencia del ensamblaje de Gibson y la estabilidad del constructo en *E. coli*. Se utilizó una escalera molecular (EM) de 1 kb como referencia para estimar el tamaño de las bandas observadas.

En el pozo correspondiente al plásmido circular, se observó una banda predominante con una migración característica de ADN superenrollado, la cual aparece más abajo de lo esperado en comparación con su tamaño esperado de ~6891 pb, esto debido a su conformación compacta. Mientras que, en pozo del plásmido linealizado, se presentó una banda más definida y con menor migración, ubicada en una posición correspondiente al tamaño esperado del plásmido (~6891 pb). Esta diferencia en la migración, respecto al

plásmido circular, confirma la eficiencia de la enzima de restricción, dando lugar a una linealización correcta del vector. Seguido, se encuentra el pozo correspondientes al plásmido ligado mediante al ensamblaje de Gibson. En este caso se observó una banda de alrededor de 8699 pb. Su mayor tamaño, en comparación con el plásmido circular, sugiere la correcta inserción del fragmento de interés. Por su parte, en el pozo correspondiente al inserto (gen *uidA*), se observó una banda definida de alrededor de 1812 pb, lo cual concuerda con el tamaño esperado de este fragmento. Finalmente, en el siguiente pozo se encuentra el plásmido recombinante, extraído de las colonias de *E. coli* DH5 α previamente transformadas. Se observó un patrón de bandas compatible con la presencia del plásmido recombinante. La migración observada es similar a la del constructo ensamblado, lo cual sugiere que el plásmido recuperado conserva el inserto tras el proceso de transformación.

9. DISCUSIÓN

El primer ensayo realizado con las muestras frescas de suelo de cultivo de caña de azúcar evidenció que dichas muestras presentaban una actividad enzimática inicial (Figura 7). Esto puede deberse a que las muestras de suelo contenían una microbiota nativa, específicamente, se trata de muestras rizosféricas, zona en la que se concentran la mayor densidad de microorganismos del suelo (Liu et al., 2025). Además, parte del diseño experimental de los ensayos enzimáticos se centró en simular y mantener *in vitro*, las condiciones naturales del suelo. Es por eso que las muestras no fueron esterilizadas con calor, permitiendo mantener su microbiota nativa (Querejeta, 2023). Los resultados presentados en la Figura 7 demuestran la actividad inicial de fosfatasas es heterogénea entre las cinco muestras de suelo analizadas. Esta diferencia observada puede deberse a factores como características fisicoquímicas, al manejo de cultivo de cada tipo de parcela, a la disponibilidad de materia orgánica, a la composición de la microbiota del suelo, al contenido de fósforo disponible, entre otros (Campdelacreu Rocabrana, Domene, Preece, & Peñuelas, 2024). Cabe destacar que, durante la presente investigación, el término “tipo de suelo” se utilizó únicamente como una categorización interna para diferenciar las cinco muestras analizadas, siguiendo la nomenclatura empleada por el Ingenio Magdalena. Por lo tanto, dichas denominaciones no corresponden necesariamente a clasificaciones estandarizadas ni describen completamente las propiedades fisicoquímicas o microbiológicas de cada suelo. En consecuencia, los resultados de la presente investigación no deben extrapolarse de forma general a otros suelos que presenten nombres similares, ya que muestras provenientes de otras regiones o sistemas de cultivo podrían presentar características distintas, lo cual influiría en la actividad enzimática y en la respuesta tras la inoculación. Adicionalmente, a lo largo del presente estudio, el término “tipo de suelo” también fue sustituido por “tipo de parcela” o “sitio/punto de muestreo”, sin embargo, todas estas denominaciones hacen referencia a la misma categorización experimental utilizada para diferenciar las muestras analizadas.

La muestra 1AP (alta productividad) presentó la mayor actividad de fosfatasa ($914 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$), lo que sugiere una microbiota activa en la solubilización de fósforo. Este resultado puede estar asociado a que se trata de un suelo altamente productivo y a que el fósforo inorgánico favorece directamente al crecimiento vegetal. Por lo tanto, es posible que haya una mayor tasa de hidrólisis de fósforo orgánico para solubilizarlo, lo cual se refleja en una mayor actividad enzimática (Lizcano-Toledo et al., 2021). Otra posible hipótesis es que el fósforo disponible en este sitio de muestreo no sea suficiente para satisfacer la demanda nutricional del cultivo, lo que lleva a un incremento en la actividad enzimática observada (Cabugao et al., 2021). En contraste, la muestra 1BP (baja productividad) registró la menor actividad de fosfatasas ($221 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$). Este resultado sugiere que en este tipo de suelos hay una microbiota menos activa o una menor disponibilidad de sustratos fosforados en el suelo, lo cual puede estar ligado a que se trata de un suelo poco productivo (Seitz et al., 2021). Otro factor que pudo influir en la baja actividad reportada en la muestra 1BP es el tipo de fósforo disponible en este suelo o el tipo de fosfatasa predominante. Específicamente, estudios han demostrado que la actividad de la monoesterasa, un tipo de fosfatasa alcalina se inhibe en un 23 % cuando el fósforo disponible es inorgánico, pero se incrementa en un 74 % cuando el fósforo disponible es de carácter orgánico (Janes-Bassett et al., 2022). Los resultados obtenidos para la muestra 1BP sugieren que el fósforo predominante es de carácter inorgánico (Figura 7).

Las muestras 3AB, 4MO y 1CA reportaron actividades enzimáticas intermedias, lo cual podría estar relacionado con características fisicoquímicas, específicas de estos tipos de parcela (Figura 7). Por una parte, la muestra 3AB (área boscosa) mostró una actividad de fosfatasas de $737 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$. En este caso, al ser un suelo de área boscosa, es posible que exista mayor diversidad microbiana que contribuya a mantener una actividad enzimática moderada (Hernández-Cáceres et al., 2022). Por su parte, en la muestra 4MO (materia orgánica) se observó una actividad de $793 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$. El alto contenido de materia orgánica favorece a la proliferación de microorganismos además dicha materia podría funcionar como fuente de fósforo. En suelos con alto contenido de materia orgánica, los microorganismos de la rizosfera pueden mineralizar la materia orgánica y liberar iones H_2PO_4^- o HPO_4^{2-} , los cuales sí pueden ser aprovechados por la planta (Lin et al., 2023). En

cuanto a la muestra 1CA (caña anegada), esta presentó una actividad promedio de $771 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$. Este resultado puede estar relacionada con la humedad prolongada a la que se expone este suelo, la cual puede reducir en un 10.2 % la actividad de la fosfatasa alcalina (Pawar et al., 2025). Además, el anegamiento reduce el intercambio gaseoso, en el suelo, aumenta su densidad y suprime el crecimiento microbiano. Asimismo, estas condiciones de humedad limitan la expansión de las raíces, lo que influye negativamente en la absorción de fósforo (Rupngam & Messiga, 2024).

Otro factor importante que pudo haber influido en la variabilidad de actividad de fosfatasas entre muestras es que la fosfatasa alcalina es una metaloenzima que requiere magnesio y zinc como cofactores para asegurar su actividad catalítica y estabilidad (Tang et al., 2025). Partiendo de este hecho, es posible que la concentración de dichos minerales sea variable entre los suelos analizados, lo cual pudo haber intervenido entre la actividad de las fosfatasas. Independientemente de la diversa actividad enzimática identificada en las muestras antes de inocularlas, es posible que todas hayan manifestado una actividad mayor por su alto contenido de humedad. En concreto, el suelo fue muestreado en el mes de julio, es decir en época lluviosa. Se ha demostrado que la humedad está directamente relacionada con la actividad de fosfatasas. Al haber una humedad relativamente alta en los suelo, se crea un ambiente favorable para las bacterias rizosféricas por lo que la síntesis y secreción de fosfatasas aumenta (Sardans et al., 2008).

Como se mencionó con anterioridad, el diseño experimental de la investigación planteó semejar *in vitro* las condiciones naturales del suelo, con el fin de obtener resultados más precisos. Es por ello que, durante la experimentación se determinó el pH de cada muestra de suelo y con ello se ajustó el pH del buffer MUB que se utilizó para los ensayos enzimáticos. Adicionalmente, dicha determinación de pH sirvió para realizar hipótesis más acertadas, relacionadas con el tipo de fosfatasa presente en los suelos estudiados. Estos resultados revelan que el pH de las muestras analizadas es en promedio de 7.55 (Cuadro 7), lo cual sugiere que la fosfatasa predominante en los suelos de estudio es la fosfatasa alcalina. Esto ya que esta presenta mayor actividad en ambientes con pH de 7.5-8.5 (Recio et al., 2024). Mientras que la fosfatasa ácida se manifiesta en suelos con pH de 4.0-6.0 (Piotrowska-Długosz & Wilczewski, 2013).

Siguiendo con este análisis, los resultados presentados en a las Figuras 8, 9 y 10 permiten comparar el efecto de la inoculación con *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus*, tanto de forma individual como en conjunto, sobre la actividad de las fosfatasas en las muestras de suelo con características biológicas y productivas distintas. En términos generales, se observó que la inoculación con *B. subtilis*, promueve un aumento en la actividad de las fosfatasas en comparación con la actividad inicial (Figura 8). Esto concuerda con lo reportado en la literatura, donde se ha descrito la capacidad de dicha bacteria de secretar fosfatasas que promueven la solubilización de fósforo orgánico y en consecuencia aumentan la concentración de fosfato disponible para las plantas (Ren et al., 2025). Además, al tratarse de un inóculo nativo aislado de suelos de cultivo de caña de azúcar, su adaptación al ambiente pudo ser más rápida, potenciando su funcionalidad y eficiencia en la actividad enzimática (Li et al., 2024).

Sin embargo, dicho comportamiento no fue homogéneo entre todas las muestras analizadas. En concreto, la muestra 1BP (baja productividad), caracterizada por reportar la menor actividad enzimática inicial ($221 \mu\text{g pNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$) (Figura 7), presentó el incremento más notable tras la inoculación con *B. subtilis* (Figura 8). Específicamente, se observó que la actividad de las fosfatasas tuvo un aumento de hasta 4.3 veces, respecto a la actividad inicial, con el inóculo a concentración de 10^8 UFC/mL. Este hecho sugiere que, en los suelos poco productivos, que presentan una limitada actividad microbiana inicial, la inoculación con *B. subtilis* tiene un efecto significativo, en comparación con las demás muestras. Lo observado sugiere que el inóculo suple las funciones metabólicas que no se están realizando eficientemente por la microbiota nativa (Yang et al., 2025). Este resultado indica que la inoculación con *B. subtilis* es una estrategia funcional para mejorar la disponibilidad de fósforo, particularmente en los suelos de baja productividad.

En contraste, los otros cuatro suelos que presentaron actividades iniciales altas o moderadas (Figura 7), el efecto de la inoculación con *B. subtilis* generó un aumento moderado en la actividad de las fosfatasas, en comparación con la muestra 1BP (Figura 8). Por ejemplo, en la muestra 1AP (alta productividad), donde se reportó una actividad inicial alta ($914 \mu\text{g}$

pNP h⁻¹ g⁻¹), en comparación con las demás muestras, el efecto de la inoculación con *B. subtilis* fue menos evidente, observando aumentos de hasta 1.04 veces con el inóculo a concentración de 10¹⁰ UFC/mL. Por su parte la muestra 4MO (materia orgánica) cuya actividad inicial fue de 790 µg pNP h⁻¹ g⁻¹, la inoculación con *B. subtilis* produjo aumentos en la actividad de las fosfatasa no mayores a 1.19 veces la actividad inicial, con el tratamiento con concentración de 10¹⁰ UFC/mL (Figura 8E). Este comportamiento sugiere que el efecto de la inoculación depende de las características y condiciones iniciales de cada sitio de muestreo (Pei et al., 2025). Es posible que estos cuatro puntos de muestreo con actividades iniciales altas o moderadas presenten una microbiota biodiversa, activa y funcional que ya es capaz de solubilizar el fosfato de forma eficiente, lo cual explica el efecto observado en donde la inoculación con *B. subtilis* no generó un efecto adicional significativo (Cabrera-Verdezoto et al., 2023). En ese sentido, se recomienda llevar a cabo pruebas microbiológicas para aislar los posibles microorganismos ya presentes en el suelo y determinar su concentración inicial, haciendo un conteo de las unidades formadoras de colonias, según el factor de dilución (Lee et al., 2021).

La inoculación con *B. tropicus* presentó una tendencia similar a la obtenida con *B. subtilis*, observando incrementos en la actividad de fosfatasa en varias de las muestras analizadas (Figura 9). Este comportamiento es consistente con la capacidad de esta especie de producir fosfatasa alcalinas y participar en la solubilización de fósforo orgánico (Li et al., 2025). Al igual que en el caso anterior, la muestra 1BP (baja productividad) vuelve a destacar como la más favorecida tras la inoculación con *B. tropicus*. En concreto, al aplicar dicha cepa, en esta muestra de suelo, se observó un aumento en la actividad de fosfatasa de hasta 4.42 veces la actividad inicial con el tratamiento a concentración de 10⁸ UFC/mL (Figura 8C). Este resultado apoya la hipótesis de que los suelos con menor actividad inicial son los que más se benefician de la inoculación con microorganismos funcionales (Yang et al., 2025). Además, este comportamiento vuelve a evidenciar que el efecto de los inóculos no depende únicamente de del microorganismo aplicado, sino también de las características fisicoquímicas y del manejo del suelo de cultivo (Pei et al., 2025).

Como se mencionó con anterioridad, el efecto de la inoculación puede estar relacionado con las características y condiciones iniciales de cada punto de muestreo analizado (Maćik et al., 2020). Esto explica por qué en los suelos con actividad inicial alta o moderada no se observó el mismo efecto que en la muestra 1BP, tras la inoculación con *B. tropicus*. Para ejemplificar, en las muestras 1CA (caña anegada) la actividad enzimática aumentó hasta 1.29 veces, respecto a la inicial con el inóculo a concentración de 10^{10} UFC/mL (Figura 8D). Mientras que para la muestra 3AP (área boscosa) dicho aumento fue de 1.36 veces con el tratamiento de *B. tropicus* a 10^6 UFC/mL (Figura 8B). Estos resultados sugieren que los suelos con actividad inicial de alta a moderada presentan una microbiota nativa funcional y activa, que es capaz de solubilizar el fosfato de forma eficiente sin necesidad de requerir un microorganismo adicional para ello (Cabrera-Verdezoto et al., 2023).

Parte de la investigación también se centró en analizar el efecto de la inoculación en conjunto de *B. subtilis* y *B. tropicus*. Los resultados revelaron que al aplicar ambas cepas la actividad de fosfatasas es menor en comparación con los tratamientos individuales (Figura 10). Este resultado podría estar relacionado con dos hechos importantes. Primeramente, los inóculos combinados contienen 0.5×10^6 UFC/mL de cada bacteria para alcanzar una concentración final de 1×10^6 UFC/mL, es decir que se redujo a la mitad la concentración de cada microorganismo, en comparación con los tratamientos individuales. Esto aplica para las tres concentraciones. Por lo tanto, también disminuyó la capacidad individual de producción y secreción de fosfatasas por parte de cada cepa, lo que podría explicar la menor actividad observada (Fransson & Jones, 2007). Otra hipótesis que podría explicar el comportamiento observado tras la inoculación en conjunto es la existencia de una posible competencia entre ambas cepas, la cual podría estar ligada por limitación de nutrientes o de un nicho, dentro del suelo. Esta interacción podría limitar el crecimiento y la actividad metabólica de ambas cepas, generando un efecto antagonista en lugar de sinérgico (Utami et al., 2025). Este resultado es especialmente importante desde el punto de vista de formular, a futuro, posibles biofertilizantes con *B. subtilis* y *B. tropicus*.

Un aspecto importante observado tras la inoculación con *B. subtilis* y *B. tropicus* tanto individualmente como en conjunto es que, en algunas muestras, los controles presentaron

una actividad de fosfatasas comparable o incluso superior a las muestras inoculadas (Figuras 8-10). Este es un comportamiento atípico considerando que los controles eran muestras de suelo sin inóculo, que se manejaron e incubaron bajo las mismas condiciones que el suelo tratado. Este fenómeno puede explicarse con el hecho de que las muestras de suelo no fueron esterilizadas, por lo que conservaban su microbiota nativa. Por lo tanto, al incubarlas bajo condiciones favorables de humedad y temperatura, dichas comunidades bacterianas nativas pudieron activarse y aumentar su actividad metabólica, incluyendo la producción de fosfatasas (Gianniny et al., 2024). El comportamiento observado en los controles también podría estar relacionado con una posible competencia microbiana. En concreto, se especula que la microbiota nativa, adaptada a las condiciones de cada suelo haya inhibido la colonización de los inóculos, secretando compuestos antimicrobianos o limitando los nichos y los nutrientes, como un mecanismo de defensa (Wang et al., 2024). Otro factor relevante es que la actividad enzimática depende, indirectamente de otras variables como la disponibilidad de nitrógeno. Este nutriente es esencial para la producción y secreción de estas enzimas hidrolíticas. Por ende, y partiendo de la premisa de que había una microbiota nativa en las muestras de suelo inoculadas, es posible que se haya presentado una competencia de nutrientes en donde el nitrógeno actuó como limitante para suplir las necesidades metabólicas de todas las bacterias, lo cual resultó en una disminución en la producción de fosfatasas y con ello en su actividad (Janes-Bassett et al., 2022). Para futuras investigaciones, se recomienda agregar un control que consista en las mismas muestra de suelo, pero tratadas por un proceso de esterilización a altas temperaturas.

Durante el presente estudio también se buscó determinar cuál es la mejor concentración de inóculo para obtener una mayor actividad de fosfatasas (Figura 11). Se observó que la actividad enzimática no depende solo de la bacteria inoculada, sino que también de la concentración de esta. Además, no se evidenció una relación lineal entre la concentración del inóculo y la actividad de fosfatasas, lo cual sugiere que existe un rango óptimo de concentración en el cual la producción y secreción de fosfatasas es maximizada. Se ha demostrado que dicho rango se encuentra entre $10^5 - 10^{10}$ UFC/mL (Jamaly et al., 2019). En el caso de *B. subtilis*, los resultados indican que la mayor actividad de fosfatasas se alcanza en concentraciones de $10^8 - 10^{10}$ UFC/mL (Figura 11). Esto puede deberse a que la

presencia de una mayor concentración bacteriana incrementa la producción y secreción de fosfatasa extracelulares, favoreciendo a la hidrólisis de fósforo orgánico presente en el suelo (Uddin et al., 2021). Sin embargo, este comportamiento no se observó en todas las muestras por igual, lo cual podría estar relacionado con limitaciones en la disponibilidad de nutrientes, acumulación de metabolitos o competencia entre bacterias (Rai et al., 2023). En contraste, en las muestras inoculadas con *B. tropicus* se observó un comportamiento distinto, en donde la mayor actividad enzimática se alcanzó con los inóculos a concentraciones de 10^6 – 10^8 UFC/mL (Figura 11). Este resultado sugiere que *B. tropicus* podría ser más eficiente a densidades celulares más bajas, en comparación con *B. subtilis* (Liu et al., 2023). Cabe destacar que la aplicación de biofertilizantes no sustituye a los fertilizantes químicos, solo disminuye la cantidad que se debe agregar. Dependiendo de las necesidades y características del suelo es importante ajustar la aplicación de ambos tipos de fertilizante (Bueno et al., 2022). Otro punto importante es que, para proteger a las bacterias, las formulaciones de biofertilizantes líquidos suelen contener glicerol, lactosa o almidones con el fin de transportar las células vivas y promover sus actividades benéficas en los suelos (Kumar et al., 2022). Partiendo de esto, se recomienda diseñar un sistema de protección y transporte de las cepas de *Bacillus* y evaluar su actividad de fosfatasa y comportamiento en los suelos al implementarlo.

Otro de los objetivos de la presente investigación se centró en el planteamiento de una prueba de concepto enfocada en una herramienta molecular que permite identificar cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus* en muestras de suelo. Para ello, se planteó el uso de un medio cromogénico comercial. En concreto, se propuso la implementación del medio de cultivo *Chromocult® Agar*. Esto ya que se trata de un medio de cultivo selectivo y diferencial originalmente utilizado para la detección de coliformes y *E. coli* en muestras fecales o de agua. El mecanismo de funcionamiento de dicho medio de cultivo se basa en la actividad de la enzima β -glucuronidasa, presente en bacterias como *E. coli*. Dicha enzima hidroliza el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido (X-Gluc), presente en el medio de cultivo produciendo 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo. Este último, es un producto insoluble, que las colonias que presentan actividad β -glucuronidasa positiva lo integran, tornándose de color azul intenso (Finney et al., 2003). Sin embargo, esta

formulación comercial contiene sales como el Tergitol 7 (heptadecil sulfato de sodio), que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivo como las del género *Bacillus* (Lawaniya et al., 2015; Merck, 2019). Esta limitante condujo a proponer como alternativa la formulación de un medio cromogénico compatible con las cepas de interés, que mantenga el principio del medio cromogénico comercial *Chromocult® Agar*. Específicamente, se propone el uso de medio de cultivo LB (10g de peptona, 10g, de cloruro de sodio, 5g de extracto de levadura en 1L de agua destilada) (Akami et al., 2021), suplementado con el sustrato cromogénico X-Gluc. Generalmente los medios comerciales, como *Chromocult® Agar* contienen 0.1 gramos del sustrato cromogénico (Merck, 2019).

A partir del principio del medio cromogénico, anteriormente mencionado, se seleccionó el gen *uidA*, el cual codifica para la enzima β -glucuronidasa, como marcador reportero para la metodología propuesta (Cuadro 8). Esta selección se basa en varios aspectos clave. En primer lugar, el gen *uidA* no se encuentra de forma natural en las cepas de *Bacillus subtilis* ni *Bacillus tropicus*, lo que garantiza una alta especificidad en la detección, evitando falsos positivos derivados de la microbiota nativa del suelo (Jeon et al., 2017). En segundo lugar, la β -glucuronidasa posee una actividad enzimática fácilmente detectable mediante sustratos cromogénicos, lo que permite una identificación visual rápida y de bajo costo. En concreto, su funcionamiento se basa en la hidrólisis de β -D-glucurónidos, como el 5-Bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucurónido (X-Gluc) para producir 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto insoluble de coloración azul, que es integrado por las colonias con actividad β -glucuronidasa positiva (Mahran et al., 2020).

Adicionalmente, el gen *uidA* presenta otras ventajas que lo convirtieron en el gen ideal para la prueba de concepto propuesta (Cuadro 8). Primero, es un gen altamente estable es decir que no se degrada con facilidad dentro del hospedero, lo cual favorece a mantener esta información a lo largo de la reproducción de las bacterias que lo contengan (Arul et al., 2008; Jefferson et al., 1986). Además, como mencionado anteriormente, el gen *uidA* presenta una expresión detectable, lo que permite visualizar de forma rápida y fácil las cepas que lo contengan, sin necesidad de recurrir a pruebas adicionales (Mahran et al., 2020). Otra característica importante del gen seleccionado es que tiene la capacidad de

hidrolizar diferentes sustratos, incluyendo compuestos fluorogénicos como el MUG, lo que amplía las posibilidades de detección (Ali et al., 2016). Asimismo, se ha reportado que el gen *uidA* se encuentra de forma natural en cerca del 95 % de las cepas de *E. coli*, lo que facilita su obtención para su posterior amplificación y uso para la prueba de concepto propuesta (Sina et al., 2022).

En cuanto al vector de clonación, se seleccionó el plásmido pBsacA (Cuadro 9), el cual presenta múltiples ventajas que lo convirtieron en el vector adecuado para la prueba de concepto propuesta. Se trata de un vector de 6891pb, al encontrarse dentro del rango de 100-1000 pb, se cataloga como un plásmido pequeño. Dicho tamaño es una ventaja que facilita su manipulación, clonación y transformación (Hall et al., 2021). Además, pBsacA es un vector tipo *shuttle*, es decir que tiene la capacidad de replicarse tanto en *E. coli* como en *B. subtilis*, y posiblemente también en *B. tropicus*. Esto facilita la manipulación y transformación inicial en un organismos modelo como *E. coli* para su posterior transferencia a las cepas de interés (Hao et al., 2020). También, es un plásmido que presenta un alto número de copias, lo cual contribuye a incrementar el rendimiento de la clonación y de la expresión del gen a insertar, mejorando la sensibilidad del sistema propuesto (Gruber et al., 2008). El alto número de copias también favorece a minimizar el riesgo de perder el plásmido durante la división celular y a aumentar la eficiencia de la transformación (Hall et al., 2021). Otra característica relevante del plásmido pBsacA es la presencia del promotor constitutivo fuerte llamado Pveg, el cual permite obtener una expresión alta y continua del gen *uidA* sin necesidad de agregar inductores (Jiang et al., 2018).

Otra de las características importantes del vector pBsacA es que tiene un origen de replicación compatible con *E. coli* y *Bacillus* (Hao et al., 2020). En concreto, el mecanismo de replicación del plásmido es del tipo círculo rodante (*rolling circle*), gracias a las proteínas repB que contiene. Dichas proteínas son compatibles con múltiples especies bacterianas, lo que permite la replicación de este plásmido con las cepas de interés (Ruiz-Masó et al., 2015). Además, pBsacA presenta un marcador de resistencia a la ampicilina, lo cual facilita el proceso de selección en medios de cultivo suplementados con este antibiótico (Hao et al., 2020). Dicho plásmido también contiene elementos reguladores

importantes como lo son los sitios de unión al ribosoma (RBS) y las secuencias terminadoras *rrnBT1* y *rrnBT2*. Por una parte, el sitio de unión al ribosoma es fundamental para que inicie la traducción del ARN mensajero a proteínas (Salis et al., 2009). Mientras que las secuencias terminadoras permiten que la transcripción se detenga después del gen de interés para evitar que se transcriban otras regiones, que podrían intervenir en la estabilidad o en la replicación del plásmido (Xu et al., 2022). Una última peculiaridad del plásmido pBsacA es que este no cuenta con un sitio de clonación múltiple, en cambio, contiene sitios de restricción limitados y específicos. Esto hace que sea un plásmido ideal para el uso de ensamblaje tipo *Golden Gate* o ensamblaje de Gibson. De hecho, al ser un plásmido construido a partir de un ensamblaje de Gibson, su manipulación genética es particularmente adecuada manteniendo el uso de esta técnica de ensamblaje (Hao et al., 2020).

La prueba de concepto también se enfocó en la selección de una estrategia de clonación, se optó por la implementación de un ensamblaje de Gibson, la cual tiene ventajas importantes sobre otros métodos basados en múltiples enzimas de restricción y ligación. Un ensamblaje de Gibson es una metodología molecular que solo requiere una incubación de 60 minutos a 50°C, lo cual permite ahorrar tiempo (Bordat et al., 2015). Además, es un proceso que permite la ligación precisa y en la dirección correcta de fragmentos de ADN mediante la integración de regiones homólogas. Esto reduce la probabilidad de inserciones en sentidos incorrectos, evita la inserción de secuencias adicionales y favorece a no tener que depender de la presencia de múltiples sitios de restricción en el plásmido (Thomas et al., 2015). Esta última ventaja fue particularmente relevante, ya que, como mencionado, el plásmido pBsacA presenta sitios de corte limitados. Con la selección del ensamblaje de Gibson como método de clonación, se diseñaron *primers* especializados (Cuadro 10). Cada uno de ellos se caracteriza por que además de la secuencia para amplificar el gen *uidA*, en sus extremos presentan una secuencia adicional de 22-26 nucleótidos. Esta última permite que el fragmento del gen amplificado presente además regiones (*overhangs*) homólogas a la secuencia del plásmido linealizado para permitir su ensamblaje mediante el método de Gibson (Olszakier & Berlin, 2022).

En este contexto, para la linealización del vector se seleccionó la enzima de restricción EagI (Cuadro 10), ya que esta presenta un único sitio de corte dentro del plásmido, evitan la generación de múltiples fragmentos. Además, el sitio de reconocimiento de esta enzima se ubica aguas abajo (*downstream*) del promotor Pveg, lo cual favorece a obtener una expresión del gen *uidA*, al mantener intacta la funcionalidad del promotor (Busby et al., 1983; Russell et al., 1984). Adicionalmente, el corte con la enzima EagI interrumpe el casete de expresión crARN, presente en el plásmido. Esto para fines de la presente investigación es importante ya que, al tratarse de una prueba de concepto aún no se desea implementar herramientas de edición génica que involucren CRISPR ni la integración de genes al cromosoma de las bacterias analizadas. Además, dicho casete fue diseñado para guiar la eliminación del gen *sacA*, el cual no está relacionado con esta prueba de concepto, por lo que no debería afectarla (Hao et al., 2020).

Durante el estudio se realizó un ensamblaje de Gibson *in silico* con el fin de evaluar, a nivel teórico, la viabilidad estructural del plásmido recombinante (pBsacA-uidA), previo a su implementación experimental (Figura 12). El ensamblaje consistió en la linealización del plásmido pBsacA utilizando el sitio de restricción de la enzima EagI, generando extremos compatibles para la inserción dirigida del fragmento de interés. Este análisis permitió confirmar que la inserción del gen *uidA* en el plásmido pBsacA es compatible en términos de orientación y permite conservar elementos regulatorios importantes como el origen de replicación (*ori*), el gen de resistencia a ampicilina (*AmpR*) y las secuencias terminadoras, favoreciendo a promover la estabilidad del constructo como su correcta expresión (Hao et al., 2020; Salis et al., 2009; Xu et al., 2022).

Finalmente, durante la presente investigación se evaluó experimentalmente, parte de la metodología molecular propuesta. En concreto, se analizó la funcionalidad del constructo recombinante y su capacidad de mantenerse y expresarse en *E. coli* DH5 α , como organismo modelo. Esto con el fin de comprobar la eficiencia de los componentes seleccionados, incluyendo el gen reportero, el vector de clonación, los *primers* y la estrategia de ensamblaje. Los resultados de la electroforesis en gel de agarosa evidencian la correcta amplificación, purificación y ensamblaje del plásmido (Figuras 13A-B). Al observar una

banda definida correspondiente al tamaño esperado de 1812 pb para el gen *uidA* confirma que los *primers* diseñados son específicos y funcionales. Este resultado es relevante, considerando, que como mencionado anteriormente, estos *primers* permiten la adición de extremos homólogos a la secuencia del plásmido para el posterior ensamblaje de Gibson. En ese sentido, observar bandas definidas y ausencia de productos inespecíficos, es posible afirmar que el diseño particular de los *primers* no afectó la amplificación del gen de interés (Olszakier & Berlin, 2022).

Adicionalmente, las bandas observadas en la electroforesis en gel de agarosa permiten confirmar la correcta linealización del plásmido, así como la eficiencia del ensamblaje de Gibson que llevó a la formación de un constructo recombinante (Figuras 13C y Figura 14). Por una parte, a pesar de que el plásmido circular (PC) y el plásmido linealizado con la enzima de restricción EagI (PL) presentan el mismo tamaño (6891pb), se observó que el plásmido circular migró ligeramente más en el gel. Esto se debe a su estructura, al encontrarse en una estructura más compacta y superenrollada, puede migrar con mayor facilidad a través de los poros de la agarosa. Mientras que el plásmido linealizado, al encontrarse extendido migra con mayor resistencia a través del gel, por lo que aparece ligeramente más arriba. Por su parte, el constructo obtenido a partir del ensamblaje de Gibson presentó menor migración, ya que este tiene un tamaño mayor de 8699 pb (Garner & Chrambach, 1992).

Adicionalmente, se confirmó el éxito de la transformación y de la viabilidad del plásmido recombinante dentro de *E. coli* DH5 α , como organismo modelo (Figura 13D). La presencia de colonias en el medio de cultivo con ampicilina indica que dicha bacteria fue capaz de incorporar el plásmido recombinante y expresar el marcador de resistencia, lo cual confirma su capacidad de replicación y funcionamiento dentro del hospedero (Rozwandowicz et al., 2018). Al no observar crecimiento en el control negativo (Figura 13E) refuerza la validez de este resultado, descartando contaminación o crecimiento inespecífico. Asimismo, la morfología homogénea de las colonias sugiere estabilidad del constructo y ausencia de efectos negativos, asociados a la expresión del gen insertado (Tu, 2016).

Es importante mencionar que la validación de la funcionalidad de los elementos seleccionados para la prueba de concepto se realizó en *E. coli* DH5 α como organismo modelo. Los resultados (Figuras 13-14) de esta fase experimental confirman que la prueba de concepto propuesta es funcional por lo que cuenta con un potencial para ser adaptada de forma exitosa en *B. subtilis* y *B. tropicus*. Sin embargo, es necesario considerar que a pesar de que los resultados de la electroforesis y de la selección con ampicilina fueron favorables (Figura 13-14) no permiten confirmar directamente la expresión funcional del gen *uidA* y con ello la actividad enzimática de la β -glucuronidasa. Es por esto que se recomienda completar los resultados haciendo pruebas adicionales con el medio cromogénico propuesto.

10. CONCLUSIONES

- Se determinó que la actividad inicial de fosfatasas es heterogénea entre las cinco muestras de suelo de cultivo de caña de azúcar analizadas. Esto refleja que dicha actividad depende de la microbiota nativa, de la humedad, de la presencia de cofactores o de las características biológicas y de cultivo de cada muestra.
- La inoculación con *B. subtilis* y *B. tropicus* incrementó la actividad de las fosfatasas del suelo, sin embargo, el efecto dependió de las características iniciales de cada suelo, de la cepa utilizada y de la concentración aplicada. El inóculo de *B. subtilis* mostró mayor eficacia en concentraciones de 10^8 – 10^{10} UFC/mL, mientras que el de *B. tropicus* en el rango de 10^6 – 10^8 UFC/mL. La muestra 1BP (baja productividad) fue la más beneficiada, convirtiéndose en el suelo donde el tratamiento mostró mayor relevancia y potencial de aplicación.
- La prueba de concepto demostró la viabilidad de diseñar una metodología molecular para detectar *B. subtilis* y *B. tropicus* mediante la inserción del gen *uidA*. La implementación del vector pBsacA y el ensamblaje de Gibson *in silico* permitieron obtener un constructo estable, funcional y potencialmente útil para una detección cromogénica rápida y confiable.
- La validación experimental preliminar confirmó la funcionalidad de la metodología propuesta en *E. coli* DH5 α como organismo modelo. La amplificación correcta del gen *uidA*, la linealización eficiente del vector pBsacA, el ensamblaje exitoso mediante Gibson y la transformación estable evidenciaron la viabilidad del constructo recombinante y de la estrategia de clonación desarrollada.

11. RECOMENDACIONES

- Se recomienda implementar un control adicional que consista en las mismas muestras de suelo analizadas, pero tratadas a través de un proceso de esterilización a altas temperaturas.
- Se recomienda analizar la concentración de cofactores metálicos y otros nutrientes como magnesio, zinc o nitrógeno con el fin de comprender de manera específica los factores que regulan la actividad enzimática observada y su variabilidad entre muestras.
- Considerando que la respuesta a la inoculación con *Bacillus subtilis* y *Bacillus tropicus* fue dependiente del tipo de parcela y de la concentración del inóculo, se recomienda realizar estudios a mayor escala que incluyan ensayos en campo, incorporando plantas y estrés ambiental. Esto favorecería a evaluar el potencial real de estas cepas como biofertilizantes y permitiría determinar la combinación y concentración adecuada para cada tipo de parcela.
- Tomando en cuenta que en algunos casos los controles presentaron una mayor actividad enzimática que los tratamientos, se recomienda profundizar en el análisis de la microbiota nativa del suelo mediante técnicas microbiológicas y moleculares. Por ejemplo, cuantificar la carga microbiana inicial o realizando un análisis de metagenómica. Esto permitiría evaluar posibles interacciones de competencia o antagonismo que limiten la colonización y efectividad del inóculo.
- Respecto a la prueba de concepto, se recomienda replicar la metodología experimental realizada con *E. coli* DH5 α en *B. subtilis* y *B. tropicus*. También es sugerible validar experimentalmente la expresión del gen *uidA* a partir de ensayos con el medio cromogénico propuesto.
- Previo a su aplicación en los suelos de cultivo, las cepas transformadas deben pasar por más modificaciones genéticas que favorezcan a la eliminación del gen de resistencia a ampicilina. Adicionalmente, antes de su implementación en la agricultura, las bacterias genéticamente modificadas deben someterse a un análisis por parte de un comité de bioseguridad para garantizar que su uso no implique riesgos a la salud o el ambiente.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Akamatsu, T., & Taguchi, H. (2012). Plasmid transformation of competent *Bacillus subtilis* by lysed protoplast DNA. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(2), 138–143. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOOSC.2012.03.002>
- Akami, M., Tamgue, O., Ren, X., Wang, Y., Qi, X., Luther, K. M. M., Ngane, R. A. N., & Niu, C.-Y. (2021). Divergence of Cultivable Bacteria Associated with Larvae and Adult *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) Laboratory-Reared Strains. *Journal of Advances in Microbiology*, 28–40. <https://doi.org/10.9734/jamb/2021/v21i630357>
- Ali, S. Al, Baldanta, S., Fernández-Escobar, M., & Guerra, S. (2016). Use of reporter genes in the generation of vaccinia virus-derived vectors. In *Viruses* (Vol. 8, Number 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v8050134>
- Amri, M., Rjeibi, M. R., Gatrouni, M., Mateus, D. M. R., Asses, N., Pinho, H. J. O., & Abbes, C. (2023). Isolation, Identification, and Characterization of Phosphate-Solubilizing Bacteria from Tunisian Soils. *Microorganisms*, 11(3), 783. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11030783>
- Arrieta, M. C., Leskiw, B. K., & Kaufman, W. R. (2006). Antimicrobial activity in the egg wax of the African cattle tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *Experimental & Applied Acarology*, 39(3–4), 297–313. <https://doi.org/10.1007/S10493-006-9014-5>
- Arul, L., Benita, G., & Balasubramanian, P. (2008). Functional insight for β -glucuronidase in *Escherichia coli* and *Staphylococcus* sp. RLH1. *Bioinformation*, 2(8), 339. <https://doi.org/10.6026/97320630002339>
- Banerjee, A., Sanyal, S., & Sen, S. (2012). Soil phosphatase activity of agricultural land: A possible index of soil fertility. In *Agricultural Science Research Journals* (Vol. 2, Number 7). <http://www.resjournals.com/ARJ>

- Bechtaoui, N., Raklami, A., Kabir, M., Oufdou, K., Hafidi, M., & Jemo, M. (2021, October 27). *Frontiers | Phosphate-Dependent Regulation of Growth and Stresses Management in Plants*. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2021.679916/full>
- Bordat, A., Houvenaghel, M. C., & German-Retana, S. (2015). Gibson assembly: An easy way to clone potyviral full-length infectious cDNA clones expressing an ectopic VPg Plant viruses. *Virology Journal*, 12(1), 89-. <https://doi.org/10.1186/S12985-015-0315-3/FIGURES/5>
- Brigidi, P., Rossi, E., Bertarini, M. L., Riccardi, G., & Matteuzzi, D. (1990). Genetic transformation of intact cells of *Bacillus subtilis* by electroporation. *FEMS Microbiology Letters*, 67(1–2), 135–138. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb13850.x>
- Bueno, C. B., dos Santos, R. M., de Souza Buzo, F., de Andrade da Silva, M. S. R., & Rigobelo, E. C. (2022). Effects of Chemical Fertilization and Microbial Inoculum on *Bacillus subtilis* Colonization in Soybean and Maize Plants. *Frontiers in Microbiology*, 13, 901157. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.901157/BIBTEX>
- Busby, S., Kotlarz, D., & Buc, H. (1983). Deletion mutagenesis of the *Escherichia coli* galactose operon promoter region. *Journal of Molecular Biology*, 167(2), 259–274. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80335-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80335-0)
- Cabrera-Verdezoto, R. P., Zambrano-Molina, J. D., Maytin-Fumero, C., & Vélez-Sánchez, A. B. (2023). La influencia de la microbiota del suelo en el rendimiento agrícola, un análisis científico. *Innova Science Journal*, 1(4), 13–24. <https://doi.org/10.63618/OMD/ISJ/V1/N4/24>
- Cabugao, K. G., Yaffar, D., Stenson, N., Childs, J., Phillips, J., Mayes, M. A., Yang, | Xiaojuan, David, |, Weston, J., & Norby, R. J. (2021). Bringing function to structure: Root-soil interactions shaping phosphatase activity throughout a soil profile in Puerto Rico. *1150 | Ecology and Evolution*, 11, 1150–1164. <https://doi.org/10.1002/ece3.7036>

- Campdelacreu Rocabruna, P., Domene, X., Preece, C., Fernández-Martínez, M., Maspons, J., & Peñuelas, J. (2024). Effect of climate, crop, and management on soil phosphatase activity in croplands: A global investigation and relationships with crop yield. *European Journal of Agronomy*, 161, 127358. <https://doi.org/10.1016/J.EJA.2024.127358>
- Campdelacreu Rocabruna, P., Domene, X., Preece, C., & Peñuelas, J. (2024). Relationship among Soil Biophysicochemical Properties, Agricultural Practices and Climate Factors Influencing Soil Phosphatase Activity in Agricultural Land. *Agriculture (Switzerland)*, 14(2), 288. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE14020288/S1>
- Cao, G., Zhang, X., Zhong, L., & Lu, Z. (2011). A modified electro-transformation method for *Bacillus subtilis* and its application in the production of antimicrobial lipopeptides. *Biotechnology Letters*, 33(5), 1047–1051. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0531-x>
- Cerozi, B. da S., & Fitzsimmons, K. (2016). The effect of pH on phosphorus availability and speciation in an aquaponics nutrient solution. *Bioresource Technology*, 219, 778–781. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.08.079>
- Chan, W. T., Verma, C. S., Lane, D. P., & Gan, S. K. E. (2013). A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. *Bioscience Reports*, 33(6), e00086. <https://doi.org/10.1042/BSR20130098>
- de Souza, R., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Elsgaard, L., Andersen, G. H., & Eriksen, J. (2002). Measurement of arylsulphatase activity in agricultural soils using a simplified assay. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(1), 79–82. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00157-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00157-2)
- Emmert, E. (2013). Biosafety Guidelines for Handling Microorganisms in the Teaching Laboratory: Development and Rationale. *JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOLOGY EDUCATION*, 14, 78–83. <http://dx.doi.org/10.1128/jmbe.v14i1.531>

- Eyhorn, F., Muller, A., Reganold, J. P., Frison, E., Herren, H. R., Luttikholt, L., Mueller, A., Sanders, J., Scialabba, N. E. H., Seufert, V., & Smith, P. (2019). Sustainability in global agriculture driven by organic farming. *Nature Sustainability* 2019 2:4, 2(4), 253–255. <https://doi.org/10.1038/s41893-019-0266-6>
- Fathi, A., & Mehdiniya, J. (2023). Plant Growth and Development in Relation to Phosphorus: A review. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 80(1), 1–7. <https://doi.org/10.15835/BUASVMCN-AGR:2022.0012>
- Finney, M., Smullen, J., Foster, H. A., Brokx, S., & Storey, D. M. (2003). Evaluation of Chromocult coliform agar for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae from faecal samples from healthy subjects. *Journal of Microbiological Methods*, 54(3), 353–358. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00068-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00068-X)
- Fransson, A. M., & Jones, D. L. (2007). Phosphatase activity does not limit the microbial use of low molecular weight organic-P substrates in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(5), 1213–1217. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2006.11.014>
- Garner, M. M., & Chrambach, A. (1992). Resolution of circular, nicked circular and linear DNA, 4.4 kb in length, by electrophoresis in polyacrylamide solutions. *ELECTROPHORESIS*, 13(1), 176–178. <https://doi.org/10.1002/ELPS.1150130136>
- Gianniny, G., Stark, J. M., Abbott, B. W., Lee, R., & Brahney, J. (2024). Soil temperature and moisture as key controls of phosphorus export in mountain watersheds. *Science of The Total Environment*, 921, 170958. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2024.170958>
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012, 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Gruber, D. F., Pieribone, V. A., Porton, B., & Kao, H. T. (2008). Strict Regulation of Gene Expression from a High-Copy Plasmid Utilizing a Dual Vector System. *Protein Expression and Purification*, 60(1), 53. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2008.03.014>

- Hall, J. P. J., Botelho, J., Cazares, A., & Baltrus, D. A. (2021). *What makes a megaplasmid?* <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0472>
- Hao, W., Suo, F., Lin, Q., Chen, Q., Zhou, L., Liu, Z., Cui, W., & Zhou, Z. (2020). Design and Construction of Portable CRISPR-Cpf1-Mediated Genome Editing in *Bacillus subtilis* 168 Oriented Toward Multiple Utilities. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 524676. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.524676/BIBTEX>
- Hernández-Álvarez, C., Peimbert, M., Rodríguez-Martin, P., Trejo-Aguilar, D., & Alcaraz, L. D. (2023). A study of microbial diversity in a biofertilizer consortium. *PLOS ONE*, 18(8), e0286285. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0286285>
- Hernández-Cáceres, D., Stokes, A., Angeles-Alvarez, G., Abadie, J., Anthelme, F., Bounous, M., Freschet, G. T., Roumet, C., Weemstra, M., Merino-Martín, L., & Reverchon, F. (2022). Vegetation creates microenvironments that influence soil microbial activity and functional diversity along an elevation gradient. *Soil Biology and Biochemistry*, 165, 108485. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2021.108485>
- Jaggard, K. W., Qi, A., & Ober, S. (2010). Possible changes to arable crop yields by 2050. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2835. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2010.0153>
- Jamaly, A. S., Koyama, Y., Win, T. A., Toyota, K., Chikamatsu, S., Shirai, T., Uesugi, T., Murakami, H., Ishida, T., & Yasuhara, T. (2019). Effects of inoculation with a commercial microbial inoculant *Bacillus subtilis* C-3102 mixture on rice and barley growth and its possible mechanism in the plant growth stimulatory effect. *Journal of Plant Protection Research*, 59(2). <https://doi.org/10.24425/JPPR.2019.129284>
- Janes-Bassett, V., Blackwell, M. S. A., Blair, G., Davies, J., Haygarth, P. M., Mezeli, M. M., & Stewart, G. (2022). A meta-analysis of phosphatase activity in agricultural settings in response to phosphorus deficiency. *Soil Biology and Biochemistry*, 165, 108537. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2021.108537>
- Jefferson, R. A., Burgess, S. M., & Hirsh, D. (1986). beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(22), 8447. <https://doi.org/10.1073/PNAS.83.22.8447>

- Jeon, H. L., Lee, N. K., Yang, S. J., Kim, W. S., & Paik, H. D. (2017). Probiotic characterization of *Bacillus subtilis* P223 isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 26(6), 1641. <https://doi.org/10.1007/S10068-017-0148-5>
- Ji, Y., Li, G., Wang, J., Piao, C., & Zhou, X. (2022). Recent Progress in Identifying Bacteria with Fluorescent Probes. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 6440, 27(19), 6440. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27196440>
- Jiang, H., Cao, Z., Liu, Y., Liu, R., Zhou, Y., Liu, J., Jiang, H., Cao, Z., Liu, Y., Liu, R., Liu, J., & Zhou, Y. (2023). Bacteria-Based Living Probes: Preparation and the Applications in Bioimaging and Diagnosis. *Advanced Science*, 11(4), 2306480. <https://doi.org/10.1002/ADVS.202306480>
- Jiang, P., Zhang, K., Ding, Z., He, Q., Li, W., Zhu, S., Cheng, W., Zhang, K., & Li, K. (2018). Characterization of a strong and constitutive promoter from the Arabidopsis serine carboxypeptidase-like gene AtSCPL30 as a potential tool for crop transgenic breeding. *BMC Biotechnology*, 18(1), 59-. <https://doi.org/10.1186/S12896-018-0470-X/FIGURES/6>
- Khan, F., Siddique, A. B., Shabala, S., Zhou, M., & Zhao, C. (2023). Phosphorus Plays Key Roles in Regulating Plants' Physiological Responses to Abiotic Stresses. *Plants* 2023, Vol. 12, Page 2861, 12(15), 2861. <https://doi.org/10.3390/PLANTS12152861>
- Kim, M. S., Jeong, D. E., & Choi, S. K. (2022). *Bacillus* integrative plasmid system combining a synthetic gene circuit for efficient genetic modifications of undomesticated *Bacillus* strains. *Microbial Cell Factories*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01989-w>
- Kumar, S., Diksha, Sindhu, S. S., & Kumar, R. (2021). Biofertilizers: An ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100094. <https://doi.org/10.1016/J.CRMICR.2021.100094>
- Kumar, S., Diksha, Sindhu, S. S., & Kumar, R. (2022). Biofertilizers: An ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100094. <https://doi.org/10.1016/J.CRMICR.2021.100094>

- Lambers, H. (2022). Phosphorus Acquisition and Utilization in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 73(Volume 73, 2022), 17–42. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-102720-125738/CITE/REFWORKS>
- Lawaniya, R., Kumar. N., Balhara, M., & Khan, A. (2015). Screening of commercial enrichment media for selective growth of E. coli. *Indian Journal of Dairy Science*, 68(1).
- Lee, J., Kim, H. S., Jo, H. Y., & Kwon, M. J. (2021). Revisiting soil bacterial counting methods: Optimal soil storage and pretreatment methods and comparison of culturedependent and -independent methods. *PLoS ONE*, 16(2 February). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246142>
- Li, C., Chen, X., Jia, Z., Zhai, L., Zhang, B., Grüters, U., Ma, S., Qian, J., Liu, X., Zhang, J., & Müller, C. (2024). Meta-analysis reveals the effects of microbial inoculants on the biomass and diversity of soil microbial communities. *Nature Ecology & Evolution* 2024 8:7, 8(7), 1270–1284. <https://doi.org/10.1038/s41559-024-02437-1>
- Li, J., Che, Y., Chen, S., Liu, M., Diao, M., Yang, C., & Jia, W. (2025). *Bacillus tropicus* YJ33 and *Medicago sativa* L. Synergistically Enhance Soil Aggregate Stability in Saline–Alkali Environments. *Microorganisms*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS13061291>
- Li, M., Li, X., Xue, D., Bao, C., Zhang, K., Chen, L., Li, Q., & Guo, R. (2024). Enhanced Plant Growth Through Composite Inoculation of Phosphate-Solubilizing Bacteria: Insights from Plate and Soil Experiments. *Agronomy*, 14(11), 2461. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY14112461/S1>
- Lin, X. J., Zhang, G. N., Wang, Z., Han, Q. D., & Leng, P. (2023a). Phosphatase activities and available nutrients in soil aggregates affected by straw returning to a calcareous soil under the maize–wheat cropping system. *Frontiers in Environmental Science*, 11, 1208323. <https://doi.org/10.3389/FENVS.2023.1208323/BIBTEX>
- Lin, X. J., Zhang, G. N., Wang, Z., Han, Q. D., & Leng, P. (2023b). Phosphatase activities and available nutrients in soil aggregates affected by straw returning to a calcareous

- soil under the maize–wheat cropping system. *Frontiers in Environmental Science*, 11, 1208323. <https://doi.org/10.3389/FENVS.2023.1208323/BIBTEX>
- Liu, J., Han, C., Zhao, Y., Yang, J., Cade-Menun, B. J., Hu, Y., Li, J., Liu, H., Sui, P., Chen, Y., & Ma, Y. (2020). The chemical nature of soil phosphorus in response to long-term fertilization practices: Implications for sustainable phosphorus management. *Journal of Cleaner Production*, 272, 123093. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2020.123093>
- Liu, L., Zheng, X., Wei, X., Kai, Z., & Xu, Y. (2021). Excessive application of chemical fertilizer and organophosphorus pesticides induced total phosphorus loss from planting causing surface water eutrophication. *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02521-7>
- Liu, M., Kochian, L. V., & Helgason, B. L. (2025). The native soil microbiome is critical for early root-associated microbiota assembly and canola growth. *Environmental Microbiome*, 20(1), 112. <https://doi.org/10.1186/S40793-025-00774-7>
- Lizcano-Toledo, R., Reyes-Martín, M. P., Celi, L., & Fernández-Ondoño, E. (2021). Phosphorus Dynamics in the Soil–Plant–Environment Relationship in Cropping Systems: A Review. *Applied Sciences* 2021, Vol. 11, Page 11133, 11(23), 11133. <https://doi.org/10.3390/APP112311133>
- Maćik, M., Gryta, A., & Frąc, M. (2020). Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Advances in Agronomy*, 162, 31–87. <https://doi.org/10.1016/BS.AGRON.2020.02.001>
- Mahran, E., Keusgen, M., & Morlock, G. E. (2020). New planar assay for streamlined detection and quantification of β -glucuronidase inhibitors applied to botanical extracts. *Analytica Chimica Acta: X*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.acax.2020.100039>
- Malhotra, H., Vandana, Sharma, S., & Pandey, R. (2018). Phosphorus nutrition: Plant growth in response to deficiency and excess. In *Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance* (pp. 171–190). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-9044-8_7

- Massah, J., & Azadegan, B. (2016). *Effect of Chemical Fertilizers on Soil Compaction and Degradation*.
https://www.researchgate.net/publication/303568416_Effect_of_Chemical_Fertilizers_on_Soil_Compaction_and_Degradation
- Merck. (2019). *Technical Data Sheet Chromocult® Coliform Agar acc. ISO 9308-1*.
- Ministerio de Agricultura, G. y A. [MAGA]. (2019). *Acuerdo Ministerial No. 271-2019*.
<https://www.maga.gob.gt/download/manual-semillagen.pdf>
- Mitter, E. K., Tosi, M., Obregón, D., Dunfield, K. E., & Germida, J. J. (2021). Rethinking Crop Nutrition in Times of Modern Microbiology: Innovative Biofertilizer Technologies. In *Frontiers in Sustainable Food Systems* (Vol. 5). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.606815>
- Nadeem, M., Wu, J., Ghaffari, H., Kedir, A. J., Saleem, S., Mollier, A., Singh, J., & Cheema, M. (2022). Understanding the Adaptive Mechanisms of Plants to Enhance Phosphorus Use Efficiency on Podzolic Soils in Boreal Agroecosystems. *Frontiers in Plant Science*, 13, 804058. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.804058/PDF>
- Olszakier, S., & Berlin, S. (2022). A simplified Gibson assembly method for site directed mutagenesis by re-use of standard, and entirely complementary, mutagenesis primers. *BMC Biotechnology*, 22(1), 10. <https://doi.org/10.1186/S12896-022-00740-Y>
- Pan, L., & Cai, B. (2023). Phosphate-Solubilizing Bacteria: Advances in Their Physiology, Molecular Mechanisms and Microbial Community Effects. *Microorganisms*, 11(12), 2904. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11122904>
- Pawar, A. R., Patil, S. S., Patil, M. B., Mahadule, P. A., Gade, K. A., Arunachalam, T., Mahajan, V. B., Abd, D., Moneim, E., Iseki, K., & Kaushik, K. (2025). Effects of waterlogging on microbial activity, soil nutrient availability, nutrient uptake, and yield of tolerant and sensitive onion genotypes. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1692450. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2025.1692450>
- Pei, B., Liu, T., Xue, Z., Cao, J., Zhang, Y., Yu, M., Liu, E., Xing, J., Wang, F., Ren, X., & Zhang, Z. (2025). Effects of Biofertilizer on Yield and Quality of Crops and Properties

- of Soil Under Field Conditions in China: A Meta-Analysis. *Agriculture (Switzerland)*, 15(10), 1066. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE15101066/S1>
- Piotrowska-Długosz, A., & Wilczewski, E. (2013). Soil Phosphatase Activity and Phosphorus Content as Influenced by Catch Crops Cultivated as Green Manure. *Polish Journal of Environmental Studies*, 23.
- Powers, S., Mirsky, E., Bandaranayake, A., Thavarajah, P., Shipe, E., Bridges, W., & Thavarajah, D. (2020). Field pea (*Pisum sativum* L.) shows genetic variation in phosphorus use efficiency in different P environments. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 18940-. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75804-0>
- Querejeta, G. A. (2023). Sterilize Methods Comparison for Soils: Cost, Time, and Efficiency. *International Journal of Methodology*, 2(1), 34–40. <https://doi.org/10.21467/IJM.2.1.6263>
- Rai, P. K., Rai, A., Sharma, N. K., Singh, T., & Kumar, Y. (2023). Limitations of biofertilizers and their revitalization through nanotechnology. *Journal of Cleaner Production*, 418, 138194. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2023.138194>
- Raimi, A., Roopnarain, A., Chirima, G. J., & Adeleke, R. (2020). Insights into the microbial composition and potential efficiency of selected commercial biofertilisers. *Heliyon*, 6(7). <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2020.E04342/ASSET/5C0B0AB9-E47B-445B-9127-2D1E265340B5/MAIN.ASSETS/GR7.JPG>
- Ramakrishna, W., Yadav, R., & Li, K. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. *Applied Soil Ecology*, 138, 10–18. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2019.02.019>
- Recio, M. I., de la Torre, J., Daddaoua, A., Udaondo, Z., Duque, E., Gavira, J. A., López-Sánchez, C., & Ramos, J. L. (2024). Characterization of an extremophile bacterial acid phosphatase derived from metagenomics analysis. *Microbial Biotechnology*, 17(4), e14404. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14404>
- Ren, P., Zhou, B., Bi, Y., Chen, X., & Yao, S. (2025). Study on the Microbial Mechanism of *Bacillus subtilis* in Improving Drought Tolerance and Cotton Yield in Arid Areas.

- Agronomy* 2025, Vol. 15, Page 1932, 15(8), 1932.
<https://doi.org/10.3390/AGRONOMY15081932>
- Roberts, T. L., & Johnston, A. E. (2015). Phosphorus use efficiency and management in agriculture. *Resources, Conservation and Recycling*, 105, 275–281.
<https://doi.org/10.1016/J.RESCONREC.2015.09.013>
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX488>
- Ruii, L. (2020). Plant-Growth-Promoting Bacteria (PGPB) against Insects and Other Agricultural Pests. *Agronomy* 2020, Vol. 10, Page 861, 10(6), 861.
<https://doi.org/10.3390/AGRONOMY10060861>
- Ruiz-Masó, J. A., Machón, C., Bordanaba-Ruiseco, L., Espinosa, M., Coll, M., & Del Solar, G. (2015). Plasmid Rolling-Circle Replication. *Microbiology Spectrum*, 3(1).
<https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.PLAS-0035-2014/ASSET/AA00A2F0-11E2-4F77-AAE5-BAD1B6389949/ASSETS/GRAPHIC/PLAS-0035-2014-FIG4.GIF>
- Rupngam, T., & Messiga, A. J. (2024). Unraveling the Interactions between Flooding Dynamics and Agricultural Productivity in a Changing Climate. *Sustainability* 2024, Vol. 16, Page 6141, 16(14), 6141. <https://doi.org/10.3390/SU16146141>
- Russell, D. R., Auger, E. A., Vermersch, P. S., & Bennett, G. N. (1984). Role of DNA regions flanking the tryptophan promoter of Escherichia coli I. Insertion of synthetic oligonucleotides. *Gene*, 32(3), 337–348. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(84\)90009-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(84)90009-X)
- Salis, H. M., Mirsky, E. A., & Voigt, C. A. (2009). Automated Design of Synthetic Ribosome Binding Sites to Precisely Control Protein Expression. *Nature Biotechnology*, 27(10), 946. <https://doi.org/10.1038/NBT.1568>

- Sardans, J., Peñuelas, J., & Ogaya, R. (2008). Experimental drought reduced acid and alkaline phosphatase activity and increased organic extractable P in soil in a *Quercus ilex* Mediterranean forest. *European Journal of Soil Biology*, 44(5–6), 509–520. <https://doi.org/10.1016/J.EJSOBI.2008.09.011>
- S.B. Primros, & R.M. Twyma. (2006). *Principles of Gene Manipulation and Genomics*.
- Seitz, T. J., Schütte, U. M. E., & Drown, D. M. (2021). Soil Disturbance Affects Plant Productivity via Soil Microbial Community Shifts. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.619711>
- Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., Zhang, W., & Zhang, F. (2011). Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiology*, 156(3), 997. <https://doi.org/10.1104/PP.111.175232>
- Sina, H., Dah-Nouvlessounon, D., Adjobimey, T., Boya, B., Dohoue, G. M. C., N'tcha, C., Chidikofan, V., Baba-Moussa, F., Abdoulaye, I., Adjanohoun, A., & Baba-Moussa, L. (2022). Characteristics of *Escherichia coli* Isolated from Intestinal Microbiota Children of 0–5 Years Old in the Commune of Abomey-Calavi. *Journal of Pathogens*, 2022, 6253894. <https://doi.org/10.1155/2022/6253894>
- Sun, D., Wang, B., Zhu, L., Chen, M., & Zhan, L. (2013). Block and Boost DNA Transfer: Opposite Roles of OmpA in Natural and Artificial Transformation of *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059019>
- Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(4), 301–307. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1)
- Tahat, M. M., Alananbeh, K. M., Othman, Y. A., & Leskovar, D. I. (2020). Soil health and sustainable agriculture. *Sustainability (Switzerland)*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/SU12124859>
- Tang, L., Su, B., & Zheng, X. (2025). Zinc ion increases the effectiveness of phosphorus in agricultural soils through microbial solubilization. *PLOS One*, 20(12), e0327961. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0327961>

- Terrinoni, M., Nordqvist, S. L., Källgård, S., Holmgren, J., & Lebens, M. (2018). A novel nonantibiotic, lgt-based selection system for stable maintenance of expression vectors in *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(4), 2143–2160. https://doi.org/10.1128/AEM.02143-17/SUPPL_FILE/ZAM004188330S1.PDF
- Thomas, S., Maynard, N. D., & Gill, J. (2015). DNA library construction using Gibson Assembly®. *Nature Methods* 2015 12:11, 12(11), i–ii. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.384>
- Tu, A. (2016). Transformation of *Escherichia coli* Made Competent by Calcium Chloride Protocol. *American Society for Microbiology*. <http://www.dnai.org/text/mediashowcase/index2.html?id=1009>
- Uddin, J., Rakibuzzaman, M., Adrita, P., & Sharmin, S. (2021). Influence of Bio-fertilizer concentration on Growth and Yield of Okra (*Abelmoschus esculentus*). *International Journal of Business, Social and Scientific Research*, 10(01), 01–05. https://www.researchgate.net/publication/360217561_Influence_of_Bio-fertilizer_concentration_on_Growth_and_Yield_of_Okra_Abelmoschus_esculentus
- Utami, D. S., Nugraha, D. R., Setiawati, M. R., & Simarmata, T. (2025). Assessments the synergistic effects of selected native plant growth-promoting bacteria in farmers extract organic-biofertilizer formulations for enhancing maize growth. *Journal of Ecological Engineering*, 26(4), 171–181. <https://doi.org/10.12911/22998993/199870>
- Walker, A., Taylor, J., Rowe, D., & Summers, D. (2008). A method for generating sticky-end PCR products which facilitates unidirectional cloning and the one-step assembly of complex DNA constructs. *Plasmid*, 59(3), 155–162. <https://doi.org/10.1016/J.PLASMID.2008.02.002>
- Wang, C., Pan, G., Lu, X., & Qi, W. (2023). Phosphorus solubilizing microorganisms: potential promoters of agricultural and environmental engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1181078. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2023.1181078/BIBTEX>

- Wang, Z., Fu, X., & Kuramae, E. E. (2024). Insight into farming native microbiome by bioinoculant in soil-plant system. *Microbiological Research*, 285, 127776. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2024.127776>
- Xu, M., Chang, Y., Zhang, Y., Wang, W., Hong, J., Zhao, J., Lu, X., & Tan, D. (2022). Development and Application of Transcription Terminators for Polyhydroxyalkanoates Production in Halophilic *Halomonas bluephagenesis* TD01. *Frontiers in Microbiology*, 13, 941306. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.941306/TEXT>
- Yang, J., Lu, X., Hao, B., Wang, S., Kong, L., Shao, Q., Li, W., Wang, X., Xu, Y., Wu, W., Wang, J., Yan, L., Ren, L., & Chen, G. (2025). Bio-organic fertilizers reshape rhizosphere bacterial community and enhance crop productivity in reclaimed soil. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1713125. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2025.1713125/TEXT>
- Yu, H., Wu, X., Zhang, G., Zhou, F., Harvey, P. R., Wang, L., Fan, S., Xie, X., Li, F., Zhou, H., Zhao, X., & Zhang, X. (2022). Identification of the Phosphorus-Solubilizing Bacteria Strain JP233 and Its Effects on Soil Phosphorus Leaching Loss and Crop Growth. *Frontiers in Microbiology*, 13, 892533. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.892533/BIBTEX>
- Zheng, M. M., Wang, C., Li, W. X., Guo, L., Cai, Z. J., Wang, B. R., Chen, J., & Shen, R. F. (2021). Changes of acid and alkaline phosphatase activities in long-term chemical fertilization are driven by the similar soil properties and associated microbial community composition in acidic soil. *European Journal of Soil Biology*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2021.103312>
- Zhu, H., Zheng, B., Nie, W., Fei, L., Shan, Y., Li, G., & Liang, F. (2024). Optimization of maize irrigation strategy in Xinjiang, China by AquaCrop based on a four-year study. *Agricultural Water Management*, 297, 108816. <https://doi.org/10.1016/J.AGWAT.2024.108816>

13. ANEXOS

13.1 Material suplementario

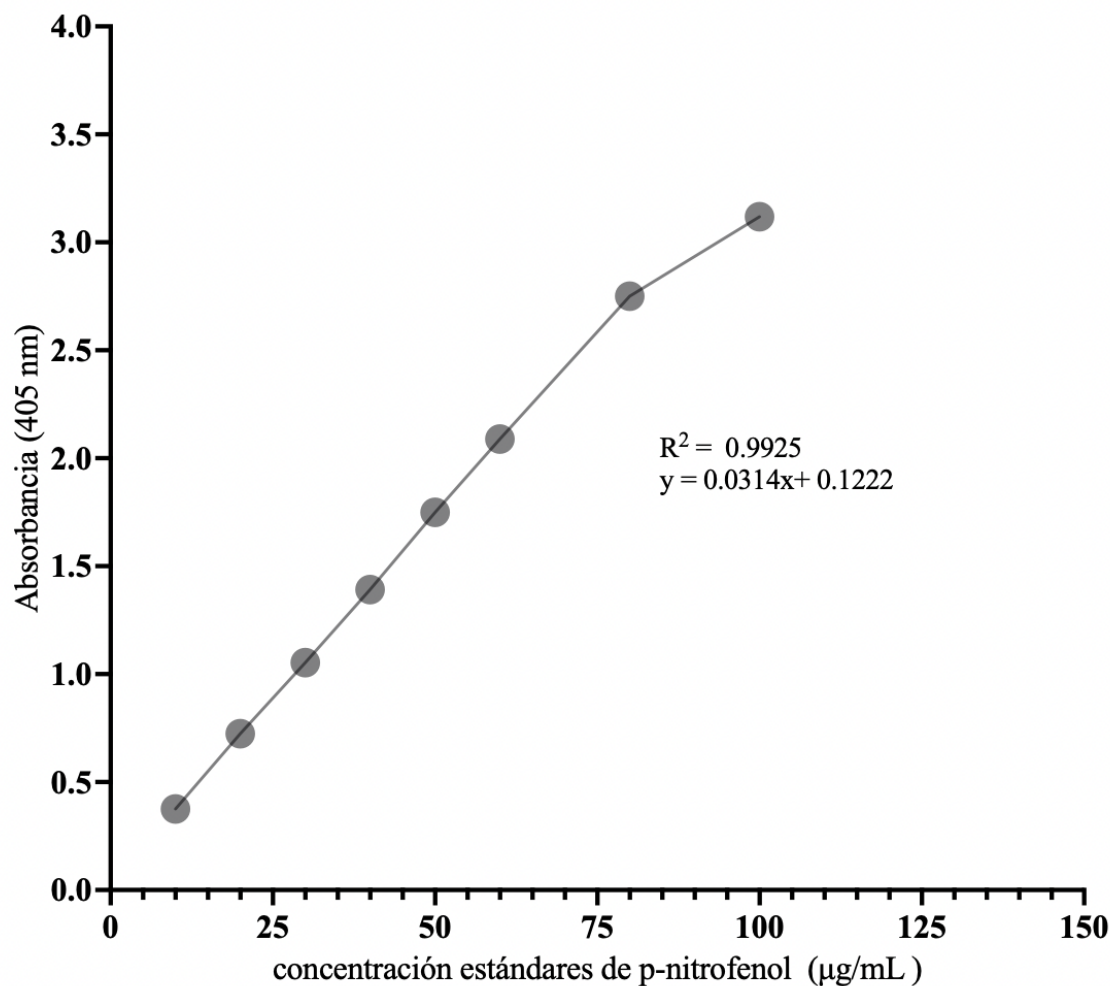


Figura 15. Curva de calibración de p-nitrofenol

La Figura 15 muestra la curva de calibración construida a partir de los estándares de p-nitrofenol, la cual se utilizó para determinar la concentración de p-nitrofenil fosfato, producto de la reacción de hidrólisis catalizada por las fosfatasas secretadas por las bacterias del género *Bacillus*.

Cuadro 11. Absorbancias de los estándares de p-nitrofenol

Concentración				
estándar	réplica 1	réplica 2	réplica 3	promedio
(ug/mL)				
10	0.375	0.379	0.373	0.376
20	0.731	0.706	0.733	0.724
30	1.020	1.095	1.044	1.053
40	1.380	1.407	1.387	1.392
50	1.728	1.750	1.767	1.749
60	2.107	2.050	2.109	2.089
80	2.756	2.752	2.741	2.750
100	3.167	3.064	3.125	3.119
150	3.090	3.168	3.165	3.141
200	3.208	3.210	3.200	3.206
250	3.216	3.200	3.220	3.212
300	3.101	3.142	3.114	3.119
350	3.228	3.201	3.186	3.205
400	3.247	3.221	3.205	3.225
450	3.199	3.267	3.233	3.233
500	3.359	3.272	3.250	3.294

En el Cuadro 11 se muestran los resultados de las absorbancias determinadas durante la construcción de la curva de calibración de p-nitrofenol.

Cuadro 12. Análisis de actividad de fosfatasas previo a la inoculación

	ID muestra	réplica 1	réplica 2	réplica 3	promedio
absorbancias	1AP	2.702	3.263	2.830	2.932
	3AB	2.552	2.930	1.68	2.387
	1BP	0.835	0.889	0.681	0.802
	1CA	2.677	2.414	2.384	2.492
	4MO	2.358	2.381	2.937	2.559
µg pNP	1AP	81.8984127	99.7079365	85.9619048	89.189418

	3AB	77.1365079	89.1365079	49.4539683	71.9089947
	1BP	22.6285714	24.3428571	17.7396825	21.5703704
	1CA	81.1047619	72.7555556	71.8031746	75.221164
	4MO	70.9777778	71.7079365	89.3587302	77.3481481
µg pNP/h*g	1AP	839.45873	1022.00635	881.109524	914.191534
	3AB	790.649206	913.649206	506.903175	737.067196
	1BP	231.942857	249.514286	181.831746	221.096296
	1CA	831.32381	745.744444	735.98254	771.016931
	4MO	727.522222	735.006349	915.926984	792.818519

En el Cuadro 12 se muestran los resultados intermedios y finales del análisis de la actividad fosfatasas en las cinco muestras de suelo, previo a la inoculación con la cepas de interés.

Cuadro 13. Absorbancias de las muestras de suelo inoculadas con *B. subtilis*

ID muestra	réplica 1	réplica 2	réplica 3	promedio	control
1AP - 6	2.165	2.346	2.966	2.492	2.641
1AP - 8	2.736	3.128	3.141	3.002	2.641
1AP - 10	2.777	3.012	3.238	3.009	2.641
3AB - 6	2.721	3.077	2.306	2.701	3.177
3AB - 8	2.780	2.924	2.620	2.775	3.177
3AB - 10	2.997	2.879	2.639	2.838	3.177
1BP - 6	2.385	2.862	2.906	2.718	3.197
1BP - 8	3.062	2.752	3.337	3.050	3.197
1BP - 10	2.988	3.030	2.957	2.992	3.197
1CA - 6	3.151	3.087	3.104	3.114	3.273
1CA - 8	3.247	3.221	3.016	3.161	3.273
1CA - 10	3.272	3.228	3.265	3.255	3.273
4MO - 6	2.662	2.908	2.771	2.780	2.789
4MO - 8	2.746	3.115	2.999	2.953	2.789
4MO - 10	2.821	3.216	2.987	3.008	2.789

En el Cuadro 13 se muestran los valores de las absorbancias obtenidas para cada muestra de suelo, tras la inoculación con *B. subtilis*. Los números 6, 8 y 10 al lado del ID de las muestras hacen referencia a la concentración de inóculo.

Cuadro 14. Microgramos de p-nitrofenol en las muestras de suelo inoculadas con *B. subtilis*

ID muestra	réplica 1	réplica 2	réplica 3	promedio	control
1AP - 6	64.8507937	70.5968254	90.2793651	75.242328	79.9619048
1AP - 8	82.9777778	95.4222222	95.8349206	91.4116402	79.9619048
1AP - 10	84.2793651	91.7396825	98.9142857	91.6444444	79.9619048
3AB - 6	82.5015873	93.8031746	69.3269841	81.8772487	96.9777778
3AB - 8	84.3746032	88.9460317	79.2952381	84.205291	96.9777778
3AB - 10	91.2634921	87.5174603	79.8984127	86.226455	96.9777778
1BP - 6	71.8349206	86.9777778	88.3746032	82.3957672	97.6126984
1BP - 8	93.3269841	83.4857143	102.057143	92.9566138	97.6126984
1BP - 10	90.9777778	92.3111111	89.9936508	91.0941799	97.6126984
1CA - 6	96.152381	94.1206349	94.6603175	94.9777778	100.025397
1CA - 8	99.2	98.3746032	91.8666667	96.4804233	100.025397
1CA - 10	99.9936508	98.5968254	99.7714286	99.4539683	100.025397
4MO - 6	80.6285714	88.4380952	84.0888889	84.3851852	84.6603175
4MO - 8	83.2952381	95.0095238	91.3269841	89.8772487	84.6603175
4MO - 10	85.6761905	98.215873	90.9460317	91.6126984	84.6603175

En el Cuadro 14 se muestran los valores de microgramos de p-nitrofenol (pNP), producto de la reacción de hidrólisis catalizada por las fosfatasas del suelo, tras la inoculación con *B. subtilis*. Estos datos fueron, determinados a partir de la ecuación de la recta de la curva de calibración. Los números 6, 8 y 10 al lado del ID de las muestras hacen referencia a la concentración de inóculo.

Cuadro 15. Microgramos de p-nitrofenol por hora, por gramo de suelo en las muestras las inoculadas con *B. subtilis*

ID muestra	réplica 1	réplica 2	réplica 3	promedio	control
------------	-----------	-----------	-----------	----------	---------

1AP - 6	664.720635	723.61746	925.363492	771.233862	819.609524
1AP - 8	850.522222	978.077778	982.307937	936.969312	819.609524
1AP - 10	863.863492	940.331746	1013.87143	939.355556	819.609524
3AB - 6	845.64127	961.48254	710.601587	839.241799	994.022222
3AB - 8	864.839683	911.696825	812.77619	863.104233	994.022222
3AB - 10	935.450794	897.053968	818.95873	883.821164	994.022222
1BP - 6	736.307937	891.522222	905.839683	844.556614	1000.53016
1BP - 8	956.601587	855.728571	1046.08571	952.805291	1000.53016
1BP - 10	932.522222	946.188889	922.434921	933.715344	1000.53016
1CA - 6	985.561905	964.736508	970.268254	973.522222	1025.26032
1CA - 8	1016.8	1008.33968	941.633333	988.924339	1025.26032
1CA - 10	1024.93492	1010.61746	1022.65714	1019.40317	1025.26032
4MO - 6	826.442857	906.490476	861.911111	864.948148	867.768254
4MO - 8	853.77619	973.847619	936.101587	921.241799	867.768254
4MO - 10	878.180952	1006.7127	932.196825	939.030159	867.768254

En el Cuadro 15 se muestran los valores de microgramos de p-nitrofenol por hora, por gramo de suelo en las muestras inoculadas con *B. subtilis*. Los números 6, 8 y 10 al lado del ID de las muestras hacen referencia a la concentración de inóculo.

Cuadro 16. Absorbancias de las muestras de suelo inoculadas con *B. tropicus*

ID muestra	réplica 1	réplica 2	réplica 3	promedio	control
1AP - 6	3.098	2.535	2.858	2.830	2.465
1AP - 8	2.718	2.548	2.865	2.710	2.465
1AP - 10	2.792	2.625	2.742	2.720	2.465
3AB - 6	3.177	3.194	3.150	3.174	2.982
3AB - 8	3.061	3.171	3.146	3.126	2.982
3AB - 10	3.064	2.851	3.051	2.989	2.982
1BP - 6	3.162	3.148	3.033	3.114	2.615
1BP - 8	2.474	3.215	2.319	2.669	2.615
1BP - 10	3.147	3.180	3.001	3.109	2.615

1CA - 6	2.988	3.185	3.203	3.125	3.119
1CA - 8	2.975	3.222	3.202	3.133	3.119
1CA - 10	3.158	3.204	3.186	3.183	3.119
4MO - 6	3.146	3.162	3.206	3.171	3.108
4MO - 8	3.209	3.228	3.208	3.215	3.108
4MO - 10	3.198	3.040	3.049	3.096	3.108

En el Cuadro 16 se muestran los valores de las absorbancias obtenidas para cada muestra de suelo, tras la inoculación con *B. tropicus*. Los números 6, 8 y 10 al lado del ID de las muestras hacen referencia a la concentración de inóculo

Cuadro 17. Microgramos de p-nitrofenol en las muestras de suelo inoculadas con *B. tropicus*

ID muestra	réplica 1	réplica 2	réplica 3	promedio	control
1AP - 6	94.4698413	76.5968254	86.8507937	85.9724868	74.3746032
1AP - 8	82.4063492	77.0095238	87.0730159	82.162963	74.3746032
1AP - 10	84.7555556	79.4539683	83.168254	82.4592593	74.3746032
3AB - 6	96.9777778	97.5174603	96.1206349	96.8719577	90.7873016
3AB - 8	93.2952381	96.7873016	95.9936508	95.3587302	90.7873016
3AB - 10	93.3904762	86.6285714	92.9777778	90.9989418	90.7873016
1BP - 6	96.5015873	96.0571429	92.4063492	94.9883598	79.1365079
1BP - 8	74.6603175	98.184127	69.7396825	80.8613757	79.1365079
1BP - 10	96.0253968	97.0730159	91.3904762	94.8296296	79.1365079
1CA - 6	90.9777778	97.231746	97.8031746	95.3375661	95.1365079
1CA - 8	90.5650794	98.4063492	97.7714286	95.5809524	95.1365079
1CA - 10	96.3746032	97.8349206	97.2634921	97.157672	95.1365079
4MO - 6	95.9936508	96.5015873	97.8984127	96.7978836	94.7873016
4MO - 8	97.9936508	98.5968254	97.9619048	98.184127	94.7873016
4MO - 10	97.6444444	92.6285714	92.9142857	94.3957672	94.7873016

En el Cuadro 17 se muestran los valores de microgramos de p-nitrofenol (pNP), producto de la reacción de hidrólisis catalizada por las fosfatasa del suelo, tras la inoculación con *B. tropicus*. Estos datos fueron, determinados a partir de la ecuación de la recta de la curva

de calibración. Los números 6, 8 y 10 al lado del ID de las muestras hacen referencia a la concentración de inóculo.

Cuadro 18. Microgramos de p-nitrofenol por hora, por gramo de suelo de las muestras las inoculadas con *B. tropicus*

ID muestra	réplica 1	réplica 2	réplica 3	promedio	control
1AP - 6	844.665079	789.347619	892.498413	842.17037	762.339683
1AP - 8	868.744444	814.403175	852.474603	845.207407	762.339683
1AP - 10	994.022222	999.553968	985.236508	992.937566	930.569841
3AB - 6	956.27619	992.069841	983.934921	977.426984	930.569841
3AB - 8	957.252381	887.942857	953.022222	932.739153	930.569841
3AB - 10	989.14127	984.585714	947.165079	973.630688	811.149206
1BP - 6	765.268254	1006.3873	714.831746	828.829101	811.149206
1BP - 8	984.260317	994.998413	936.752381	972.003704	811.149206
1BP - 10	932.522222	996.625397	1002.48254	977.210053	975.149206
1CA - 6	928.292063	1008.66508	1002.15714	979.704762	975.149206
1CA - 8	987.839683	1002.80794	996.950794	995.866138	975.149206
1CA - 10	983.934921	989.14127	1003.45873	992.178307	971.569841
4MO - 6	1004.43492	1010.61746	1004.10952	1006.3873	971.569841
4MO - 8	1000.85556	949.442857	952.371429	967.556614	971.569841
4MO - 10	844.665079	789.347619	892.498413	842.17037	762.339683

En el Cuadro 18 se muestran los valores de microgramos de p-nitrofenol por gramo de suelo por hora de las muestras inoculadas con *B. tropicus*. Los números 6, 8 y 10 al lado del ID de las muestras hacen referencia a la concentración de inóculo.

Cuadro 19. Absorbancias de las muestras de suelo inoculadas con *B. subtilis* y *B. tropicus*

ID muestra	réplica 1	réplica 2	réplica 3	promedio	control
1AP - 6	2.472	2.652	2.561	2.562	2.473
1AP - 8	2.308	2.714	2.813	2.612	2.473
1AP - 10	2.613	2.802	1.986	2.467	2.473

3AB - 6	2.535	2.623	2.430	2.529	2.200
3AB - 8	3.017	2.793	2.917	2.909	2.200
3AB - 10	2.458	2.602	2.666	2.575	2.200
1BP - 6	1.977	1.976	2.077	2.010	2.437
1BP - 8	1.466	2.496	2.533	2.165	2.437
1BP - 10	2.727	2.862	2.805	2.798	2.437
1CA - 6	2.932	2.969	3.030	2.977	2.631
1CA - 8	3.053	3.11	3.069	3.077	2.631
1CA - 10	2.991	2.992	3.007	2.997	2.631
4MO - 6	3.037	3.056	3.028	3.040	3.042
4MO - 8	3.092	3.089	3.096	3.092	3.042
4MO - 10	1.432	3.104	3.11	2.549	3.042

En el Cuadro 19 se muestran los valores de las absorbancias obtenidas para cada muestra de suelo, tras la inoculación con *B. subtilis* y *B. tropicus*. Los números 6, 8 y 10 al lado del ID de las muestras hacen referencia a la concentración de inóculo

Cuadro 20. Microgramos de p-nitrofenol en las muestras de suelo inoculadas con *B. subtilis* y *B. tropicus*

ID muestra	réplica 1	réplica 2	réplica 3	promedio	control
1AP - 6	74.5968254	80.3111111	77.4222222	77.4433862	74.6285714
1AP - 8	69.3904762	82.2793651	85.4222222	79.0306878	74.6285714
1AP - 10	79.0730159	85.0730159	59.168254	74.4380952	74.6285714
3AB - 6	76.5968254	79.3904762	73.2634921	76.4169312	65.9619048
3AB - 8	91.8984127	84.7873016	88.7238095	88.4698413	65.9619048
3AB - 10	74.152381	78.7238095	80.7555556	77.8772487	65.9619048
1BP - 6	58.8825397	58.8507937	62.0571429	59.9301587	73.4857143
1BP - 8	42.6603175	75.3587302	76.5333333	64.8507937	73.4857143
1BP - 10	82.6920635	86.9777778	85.168254	84.9460317	73.4857143
1CA - 6	89.2	90.3746032	92.3111111	90.6285714	79.6444444
1CA - 8	93.0412698	94.8507937	93.5492063	93.8137566	79.6444444

1CA - 10	91.0730159	91.1047619	91.5809524	91.2529101	79.6444444
4MO - 6	92.5333333	93.1365079	92.247619	92.6391534	92.6920635
4MO - 8	94.2793651	94.184127	94.4063492	94.2899471	92.6920635
4MO - 10	41.5809524	94.6603175	94.8507937	77.0306878	92.6920635

En el Cuadro 20 se muestran los valores de microgramos de p-nitrofenol (pNP), producto de la reacción de hidrólisis catalizada por las fosfatasa del suelo, tras la inoculación con *B. subtilis* y *B. subtilis*. Estos datos fueron, determinados a partir de la ecuación de la recta de la curva de calibración. Los números 6, 8 y 10 al lado del ID de las muestras hacen referencia a la concentración de inóculo.

Cuadro 21. Microgramos de p-nitrofenol por hora, por gramo de suelo de las muestras las inoculadas con *B. subtilis* y *B. tropicus*

ID muestra	réplica 1	réplica 2	réplica 3	promedio	control
1AP - 6	764.61746	823.188889	793.577778	793.794709	764.942857
1AP - 8	711.252381	843.363492	875.577778	810.06455	764.942857
1AP - 10	810.498413	871.998413	606.474603	762.990476	764.942857
3AB - 6	785.11746	813.752381	750.950794	783.273545	676.109524
3AB - 8	941.95873	869.069841	909.419048	906.815873	676.109524
3AB - 10	760.061905	806.919048	827.744444	798.241799	676.109524
1BP - 6	603.546032	603.220635	636.085714	614.284127	753.228571
1BP - 8	437.268254	772.426984	784.466667	664.720635	753.228571
1BP - 10	847.593651	891.522222	872.974603	870.696825	753.228571
1CA - 6	914.3	926.339683	946.188889	928.942857	816.355556
1CA - 8	953.673016	972.220635	958.879365	961.591005	816.355556
1CA - 10	933.498413	933.82381	938.704762	935.342328	816.355556
4MO - 6	948.466667	954.649206	945.538095	949.551323	950.093651
4MO - 8	966.363492	965.387302	967.665079	966.471958	950.093651
4MO - 10	426.204762	970.268254	972.220635	789.56455	950.093651

En el Cuadro 21 se muestran los valores de microgramos de p-nitrofenol por gramo de suelo por hora de las muestras inoculadas con *B. tropicus*. Los números 6, 8 y 10 al lado del ID de las muestras hacen referencia a la concentración de inóculo.

13.2 Protocolos

13.2.1 Determinación de la actividad de fosfatasas en muestras de suelo

Procedimiento Normado de Operación	SOP
	Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 3
Determinación de la actividad de fosfatasas en muestras de suelo	Autores: Natalia Valdés Mancilla, Dalia Lau-Bonilla, Isabella García Caffaro,

1. Propósito

Determinar la actividad de fosfatasas en muestras de suelo de cultivo como indicador de la capacidad de solubilización de fósforo orgánico a fósforo inorgánico. Esto evaluando tanto la actividad asociada a la microbiota nativa como sus cambios tras la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

2. Aplicación

La determinación de la actividad de fosfatasas es un indicador indirecto de la calidad y funcionamiento metabólico del suelo, relacionado con el ciclo del fósforo. Dichas enzimas, producidas principalmente por microorganismos del suelo, catalizan la hidrólisis de fósforo orgánico, liberando fósforo inorgánico disponible para las plantas. Por lo tanto, niveles elevados de actividad fosfatasa se asocian con una mayor capacidad del suelo para solubilizar fósforo, lo que contribuye a mejorar la fertilidad del suelo y el desarrollo de los cultivos.

3. Referencias

- 3.1. Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(4), 301–307.
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1)

4. Terminología

4.1. Buffer MUB: Buffer Universal Modificado

5. Documentos asociados

5.1. No aplica

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.

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 mascarar para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Espectrofotómetro UV-VIS
- 7.1.2. Vórtex
- 7.1.3. Centrífuga para tubos de 1.5 mL
- 7.1.4. pH-metro
- 7.1.5. balanza analítica

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Balón aforado de 1 L
- 7.2.2. Probeta de 250 mL
- 7.2.3. Micropipetas de p10, p100 y p1000
- 7.2.4. Puntas para micropipetas p10, p100 y p1000
- 7.2.5. Placa para espectrofotómetro de 96 pasillos
- 7.2.6. Tubos de 1.5 mL

7.3. Reactivos

- 7.3.1. Tris(hidroximetil)aminometano
- 7.3.2. Ácido succínico
- 7.3.3. Ácido cítrico
- 7.3.4. Ácido bórico
- 7.3.5. Hidróxido de sodio
- 7.3.6. Cloruro de calcio dihidratado
- 7.3.7. p-nitrofenol
- 7.3.8. p-nitrofenil fosfato
- 7.3.9. Tolueno

7.4. Medicamentos

- 7.4.1. No aplica

7.5. Material biológico

7.5.1. No aplica

8. Procedimiento

8.1. Preparación de buffer MUB

8.1.1. Disolver 12.1 g de Tris(hidroximetil)aminometano, 11.6 g de ácido succínico, 14.0 ácido cítrico y 6.3 g ácido bórico en 488 mL de solución de NaOH 1 M.

8.1.2. Agregar 522 mL de agua destilada para ajustar el volumen a 1 L.

8.1.3. Ajustar el pH del buffer con soluciones de NaOH o HCl 1 M, según se necesitó, hasta alcanzar un valor cercano al de las muestras de suelo.

8.1.4. Almacenar a 4 °C hasta su uso.

8.2. Curva de calibración de p-nitrofenol

8.2.1. Preparar 50 mL de una solución madre de p-nitrofenol con concentración de 500 µg/mL de p-nitrofenol. Disolver el reactivo en buffer MUB.

8.2.2. Preparar estándares de p-nitrofenol, en buffer MUB, con concentraciones conocidas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 y 100 µg/mL de p-nitrofenol.

8.2.3. Medir la absorbancia, en triplicado, de todas las soluciones en espectrofotómetro UV-VIS BioTek Power Wave XS de Agilent a una longitud de onda de 405 nm.

8.2.4. Graficar curva de calibración (absorbancia contra concentración de p-nitrofenol) con el promedio de las lecturas

8.3. Ensayo de actividad de fosfatasas en muestras de suelo.

8.3.1. Pesar 0.1 g de suelo y se colocarlo dentro de un tubo de 1.5 mL.

8.3.2. Agregar 400 µL de buffer MUB, 25 µL de tolueno y 100 µL de solución de p-nitrofenil fosfato (0.115 M).

8.3.3. Mezclar en vórtex por 2 min

8.3.4. Incubar a 37 °C por 1 h.

8.3.5. Agregar 100 µL de solución de cloruro de calcio 0.5 M y 400 µL de solución de hidróxido de sodio 0.5 M para detener la reacción.

8.3.6. Mezclar en vórtex por 1 min y se centrifugaron a 10000 rpm por 2 min.

8.3.7. Determinar, la absorbancia del sobrenadante amarillo, utilizando un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 405nm.

9. Esterilización de material

9.1. No aplica

10. Cálculos

10.1. No aplica

11. Control de calidad

11.1. Verificar con un *check list* que se llevó los implementos necesarios a la estación de trabajo.

11.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado a temperatura ambiente o a 4 °C

12. Conflict solution policy

12.1.1. No aplica

13.2.2 Amplificación de gen *uidA*

Procedimiento Normado de Operación	SOP
	Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 3
Amplificación de gen <i>uidA</i>	Autores: Natalia Valdés, Andrés Say

1. Propósito

Amplificar el gen *uidA*, codificante para la b-glucuronidasa, presente en cepas de *E. coli*, para obtener copias de este fragmento específico de ADN para su posterior aplicación.

2. Aplicación

El gen *uidA*, codifica para la b-glucuronidasa, la cual es una hidrolasa que participa en la reacción que convierte el sustrato cromogénico Bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucurónido (X-Gluc) en 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo. Esta propiedad permite su uso como gen reportero en sistemas de detección microbiológica. La amplificación del gen *uidA* es útil para luego insertarlo en un vector de clonación y transformar bacterias con él. Esto con el fin de identificar a estos microorganismos de forma rápida, visual. En otras palabras, la amplificación del gen *uidA* tiene aplicación en procesos de monitoreo de biofertilizantes aplicados en suelos de cultivo.

3. Referencias

- 3.1. Jefferson, R. A., Burgess, S. M., & Hirsh, D. (1986). beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(22), 8447. <https://doi.org/10.1073/PNAS.83.22.8447>
- 3.2. Arul, L., Benita, G., & Balasubramanian, P. (2008). Functional insight for β -glucuronidase in *Escherichia coli* and *Staphylococcus* sp. RLH1. *Bioinformation*, 2(8), 339. <https://doi.org/10.6026/97320630002339>

4. Terminología

- 4.1. PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- 4.2. *uidA*: gen codificante para la enzima hidrolítica b-glucuronidasa

5. Documentos asociados

- 5.1. Promega. (s.f.). GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix. <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-g2-hot-start-green-master-mix-protocol/>

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 mascarar para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Termociclador
- 7.1.2. Vórtex

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Micropipetas de p10, p100 y p1000
- 7.2.2. Puntas para micropipetas p10, p100 y p1000
- 7.2.3. Tubos de 1.5mL

7.2.4. Tubos de 0.5mL para PCR

7.3. Reactivos

7.3.1. *Primer forward*

7.3.2. *Primer reverse*

7.3.3. Agua ultrapura

7.3.4. GoTaq Colorless Master Mix

7.4. Medicamentos

7.4.1. No aplica

7.5. Material biológico

7.5.1. ADN extraído de *E. coli* DH5 α

8. Procedimiento

8.1. Preparar el volumen de Master Mix necesario, de acuerdo con la cantidad de reacciones:

Cuadro 1. Componentes de la reacción de amplificación del gen *uidA*

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen agregado (μ L)
Buffer 2x GoTaq	2X	1X	7.5
Primer F	100 μ M	10 μ M	1
Primer R	100 μ M	10 μ M	1
ADN	349.7 ng/ μ L	100ng	1
H ₂ O		-	4.5

8.2. Agregar

14 μ L de Master Mix a cada tubo de PCR

8.3. Agregar 1 μ L de ADN de *E. coli* DH5 α

8.4. Agitar en vórtex y centrifugar brevemente para homogenizar

8.5. Colocar las muestras dentro del termociclador programado para amplificar el gen:

Cuadro 2. Condiciones de la reacción de amplificación del gen uidA

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2min	1
Desnaturalización	95	30seg	30
Alineamiento	63.6	30seg	30
Extensión	72	2min	30
Extensión final	72	5min	1
Almacenamiento	4	Indefinido	1

8.6. Realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, por 30 min a 100 V

8.7. Visualizar gel de agarosa en transiluminador. El tamaño del fragmento esperado es de 1812 pb

9. Esterilización de material

9.1. No aplica

10. Cálculos

10.1. 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 a temperatura ambiente o a 4°C

12. Conflict solution policy

12.1. No aplica

13.2.3 Obtención de *E. coli* ultracompetente por el método de cloruro de calcio y su transformación

Procedimiento Normado de Operación	SOP
	Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 3
Obtención de <i>E. coli</i> ultracompetente por el método de cloruro de calcio y su transformación	Autores: Natalia Valdés, Andrés Say

1. Propósito

Obtener colonias de *E. coli* DH5 α ultracompetentes por el método de cloruro de calcio, para facilitar la incorporación de ADN exógeno y permitir su transformación con un vector de interés.

2. Aplicación

El método de cloruro de calcio es ampliamente utilizado para obtener células ultracompetentes, facilitando la aceptación de ADN exógeno. Los iones de calcio permiten neutralizar la carga negativa de la membrana celular y del ADN, reduciendo la repulsión. Este tratamiento en combinación con choques térmicos aumenta la permeabilidad de la membrana para facilitar la entrada del plásmido a las células competentes. La preparación de células competentes es un paso importante en procedimientos de clonación molecular, ya que permite la introducción de vectores recombinantes que contienen genes de interés permitiendo su replicación y expresión en el hospedero bacteriano. Estos genes pueden favorecer a la identificación de bacterias con potencial aplicación como biofertilizante.

3. Referencias

- 3.1. Chan, W. T., Verma, C. S., Lane, D. P., & Gan, S. K. E. (2013). A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. *Bioscience Reports*, 33(6), e00086. <https://doi.org/10.1042/BSR20130098>
- 3.2. Sun, D., Wang, B., Zhu, L., Chen, M., & Zhan, L. (2013). Block and Boost DNA Transfer: Opposite Roles of OmpA in Natural and Artificial Transformation of *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059019>
- 3.3. Tu, A. (2016). Transformation of *Escherichia coli* Made Competent by Calcium Chloride Protocol. *American Society for Microbiology*.

4. Terminología

- 4.1. CaCl₂: cloruro de calcio
- 4.2. Caldo de cultivo LB: caldo de cultivo Luria Bertani
- 4.3. Cultivo ON: cultivo *overnight*

5. Documentos asociados

- 5.1. No aplica

6. Seguridad

- 6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:
- 6.2. Formación de aerosoles.
- 6.3. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos.
Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
- 6.4. Exceso de material o personal.
- 6.5. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio
- 6.6. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.7. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.8. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.9. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
- 6.10. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles.
- 6.11. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.12. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.13. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.14. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.15. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.16. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o mascarar para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Centrífuga

7.1.2. Incubadora con agitación

7.1.3. Baño de agua

7.2. Materiales/ Cristalería

7.2.1. Micropipetas de p10, p100 y p1000

7.2.2. Puntas para micropipetas p10, p100 y p1000

7.2.3. Cajas Petri

7.2.4. Tubos Falcon de 50 mL

7.3. Reactivos

7.3.1. Caldo de cultivo LB

7.3.2. Agar LB

7.3.3. Cloruro de calcio

7.3.4. Glicerol

7.4. Medicamentos

7.4.1. No aplica

7.5. Material biológico

7.5.1. *E. coli* DH5 α

8. Procedimiento

8.1. Obtención de *E. coli* ultracompetente por el método de cloruro de calcio

8.1.1. Preparar cultivo *overnight* de *E. coli* DH5 α

8.1.2. Incubar el cultivo ON en un baño de agua a 4 °C por 15 min

8.1.3. Centrifugar por 5 min a 6000 rcf y 4 °C.

8.1.4. Descartar el sobrenadante y resuspender en 20 mL de solución 0.1 M de cloruro de calcio fría y estéril.

8.1.5. Incubar a 4 °C por 60 min.

8.1.6. Centrifugar por 5min a 6000rcf y 4°C.

8.1.7. Descartar el sobrenadante y resuspender en 3 mL de solución 0.1 M de cloruro de calcio fría y estéril.

8.1.8. Agregar 3.5 mL de solución fría y estéril de glicerol al 10 %

8.1.9. Almacenar a -80 °C hasta su uso

- 8.1.10. Transformación de *E. coli* competente
- 8.1.11. Mezclar 100 μL de *E. coli* DH5 α competente con 1 μL del plásmido recombinante.
- 8.1.12. Incubar en hielo por 30 min
- 8.1.13. Incubar en un baño con agua caliente a 42 °C por 45 seg.
- 8.1.14. Transferir las muestras inmediatamente a un baño de hielo por 2 min
- 8.1.15. Agregar 1mL de caldo de cultivo LB.
- 8.1.16. Incubar a 37 °C con agitación constante por 3 horas.
- 8.1.17. Inocular 50 μL de las bacterias transformadas en medio de cultivo LB con ampicilina
- 8.1.18. Incubar a 37 °C por 24-48 horas.

9. Esterilización de material

- 9.1. No aplica

10. Cálculos

- 10.1. 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 a temperatura ambiente o a 4 °C

12. Conflict solution policy

- 12.1. No aplica