

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Bioformulación a base de bacterias promotoras de crecimiento vegetal para aplicación en cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*)

Trabajo de graduación presentado por Josué David Castañon Castillo para optar al grado académico de Licenciado en Biotecnología Molecular

Guatemala,

2024

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades




Bioformulación a base de bacterias promotoras de crecimiento vegetal para aplicación en cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*)

Trabajo de graduación presentado por Josué David Castañon Castillo para optar al grado académico de Licenciatura en Biotecnología Molecular


Guatemala,


2024

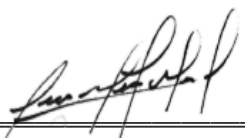
Vo. Bo.

(f) 
M.Sc Isabella García Caffaro

Tribunal examinador

(f) 
M.Sc Isabella García Caffaro

(f) 
Ph. D Dalia Lau-Bonilla

(f) 
M.Sc José Miguel Morales

Fecha de aprobación: Guatemala, 6 de diciembre 2024

PREFACIO

Para iniciar, deseo darle gracias a Dios, por permitirme realizar este trabajo, por brindarme la oportunidad de estudiar esta carrera y por acompañarme a lo largo de mi camino en esta carrera, brindándome fuerzas en las dificultades afrontadas. De igual forma, agradezco a mi familia, por todo su apoyo a lo largo de esta travesía y siempre cuidar de mí.

A mis papás, por estar siempre atentos a mí y brindarme la motivación y la fuerza necesaria para seguir avanzando a lo largo de mi carrera universitaria y por darme ese impulso a seguir creciendo en el ámbito académico y personal. A mi hermano, por ser un gran apoyo a lo largo de este tiempo y por siempre cuidar de mí y darme motivación por seguir continuando este viaje y por todo el apoyo que me brindo para sacar adelante esta investigación.

De igual forma gracias a mis amigos por todos los buenos y divertidos momentos que fuimos creando a lo largo de esta travesía y por ser siempre un apoyo a lo largo de este viaje. Por el cuidado mutuo que tuvimos y los recuerdos que creamos.

Asimismo, agradecer a la Fundación Juan Bautista Gutiérrez por la oportunidad brindada para estudiar en la Universidad del Valle de Guatemala y por su compañía a lo largo de este tiempo, ayudándome a seguir desarrollándome como un profesional y de manera personal.

Agradezco a mi asesora, la MSc., Isabella García, por todo su apoyo y guianza a lo largo de esta investigación. A la Dra. Dalia Lau y la Dra. Patricia Lupo, por todo su

apoyo y consejos brindados y el seguimiento dado. Asimismo, agradecer a todos mis catedráticos que me brindaron un consejos y apoyo en esta investigación y por sus conocimientos impartidos. Por último, agradecer al Centro de Estudios en Biotecnología, la Universidad del Valle y el Ingenio Magdalena, por brindar los insumos y los equipos necesarios para facilitar y llevar acabo esta investigación.

ÍNDICE

PREFACIO	I
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE CUADROS	V
RESUMEN.....	VI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
III. OBJETIVOS.....	4
A. Objetivo general.....	4
B. Objetivos específicos	4
IV. JUSTIFICACIÓN	5
V. MARCO CONTEXTUAL	6
VI. MARCO TEÓRICO	8
A. Agricultura	8
B. Fertilizantes	10
C. Desarrollo vegetal.....	16
D. Monitoreo molecular de bacterias.....	17
VII. METODOLOGÍA	20
VIII. RESULTADOS	26
A. Resultados del crecimiento vegetal.....	26
B. Resultados del marcaje molecular de las cepas utilizadas para la bioformulación ...	37
IX. DISCUSIÓN	40
X. CONCLUSIONES.....	51
XI. RECOMENDACIONES.....	52
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	53
XIII. ANEXOS.....	69
Ensayo de germinación de plantas.....	74
Transformación bacteriana	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de bioformulaciones para agricultura sostenible	14
Figura 2. Representación diagramática de los pasos involucra en el desarrollo de una bioformulación.....	15
Figura 3. Diagrama de flujo de la siembra de semillas y análisis estadístico	24
Figura 4. Metodología transformación bacteriana	25
Figura. 5 Efecto del Biocebado sobre la germinación de las semillas de <i>Raphanus sativus</i>	27
Figura. 6 Efecto de las PGPB y la bioformulación sobre el largo de las hojas de las plantas <i>Raphanus sativus</i>	28
Figura. 7 Efecto de las PGPB y la bioformulación sobre el ancho de las hojas de las plantas <i>Raphanus sativus</i>	29
Figura. 8 Efecto de las PGPB y la bioformulación sobre la cantidad de hojas producidas por las plantas <i>Raphanus sativus</i>	31
Figura. 9 Efecto de las PGPB y la bioformulación sobre el largo del tallo de las plantas <i>Raphanus sativus</i>	32
Figura. 10 Efecto de las PGPB y la bioformulación sobre el largo de la raíz de las plantas de <i>Raphanus sativus</i>	33
Figura. 11 Efecto de las PGPB y la bioformulación sobre el tamaño de las plantas de <i>Raphanus sativus</i>	34
Figura. 12 Efecto de las PGPB y la bioformulación sobre la biomasa de las plantas de <i>Raphanus sativus</i>	35
Figura 13. Desarrollo del crecimiento vegetal a las semanas posteriormente del trasplante (cuatro semanas de desarrollo vegetal).....	36
Figura 14. Electroforesis de los productos de la extracción de plásmido pDawn y pDusk con diferentes kits comerciales.....	37
Figura 15. Cortes enzimáticos de los productos de la extracción de plásmido.....	38
Figura 16. Resultado de la electroporación de <i>E. coli</i> BL21 con diferentes concentraciones del producto de la extracción del plásmido	39
Figura 17. Fluorescencia de <i>E. coli</i> por parte de los plásmidos pDawn y pDusk.....	73

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Definición de las variables de investigación.....	20
Cuadro 2. Cepas bacterianas elegidas para realizar la bioformulación	23
Cuadro 3. Efecto del biocebado a una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL sobre el largo de las hojas de las plantas de <i>Raphanus sativus</i>	28
Cuadro 4. Efecto del biocebado a una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL sobre el ancho de las hojas de las plantas de <i>Raphanus sativus</i>	29
Cuadro 5. Efecto del biocebado a una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL sobre la cantidad de hojas desarrolladas de las planta <i>Raphanus sativus</i>	30
Cuadro 6. Efecto del biocebado a una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL sobre el tallo de las planta <i>Raphanus sativus</i>	31
Cuadro 7. Efecto del biocebado a una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL sobre la raíz de las planta <i>Raphanus sativus</i>	33
Cuadro 8. Efecto del biocebado a una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL sobre el tamaño de las plantas <i>Raphanus sativus</i>	34
Cuadro 9. Efecto del biocebado a una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL sobre la biomasa de la planta <i>Raphanus sativus</i>	35
Cuadro 10. Cuantificación de los productos de la extracción de plásmidos pDawn y pDusk con diferentes kits comerciales.....	37
Cuadro 11. Temperatura y humedad registrados del invernadero.....	69
Cuadro 12. Datos originales crecimiento vegetal a las 2 semanas	70
Cuadro 13. Datos originales crecimiento vegetal a las 4 semanas	71
Cuadro 14. Características de interés de las PGPB propuestas para la bioformulación	72

RESUMEN

La producción de agrícola es una actividad de suma importancia para la alimentación de seres humanos, en Guatemala, uno de los principales productos en producción es la caña de azúcar. Este cultivo es fundamental para la economía guatemalteca y requiere de un continuo mejoramiento de los cultivos. Con el pasar de los años, el aumento del uso de fertilizantes químicos para mejorar la calidad de los cultivos azucareros ha ido en aumento. Dicho abuso de agroquímicos ha ocasionado que las tasas de fósforo y nitrógeno presentes en el suelo hayan aumentado ocasionando un impacto negativo en la salud de los suelos y el medio ambiente.

En base en el uso excesivo de agroquímicos en Guatemala en el periodo de 2022 a 2023 se ha generado la tendencia de sustituir los productos químicos por insumos biológicos los cuales generen una sostenibilidad en el proceso agrícola (Cegicaña, 2024). En dichas alternativas biológicas se encuentran un grupo de bacterias que presentan características promotoras del crecimiento vegetal (PGPB). Dichas PGPB son capaces de utilizar ciertas enzimas o la producción de fitohormonas para aumentar la biodisponibilidad de nutrientes y una protección hacia la planta. Por lo que se ha buscado una alternativa en realizar biofertilizantes los cuales son los consorcios de bacterias PGPB para reducir el uso de agroquímicos.

Géneros bacterianos como *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia sp.* han mostrado capacidades de promover el crecimiento vegetal en distintos cultivos vegetales. Por ello, en esta investigación se buscó realizar un primer acercamiento del uso de un biofertilizante con bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y

Burkholderia con características potenciadoras del crecimiento vegetal en un modelo de biocebado en un cultivo de *Raphanus sativus* con el fin de poder ser posteriormente utilizado en *Saccharum officinarum*. Los resultados obtenidos indican que la concentración inicial de bacterias, así como del consorcio al momento de realizar el biocebado posee un impacto en las tasas e índices de germinación de las semillas. De igual forma, se determinó que las bacterias 2MO12, 2MO14 y 4AP9 presentaron mejoras a nivel de tallo, raíces y hojas de las plantas de *Raphanus sativus*. Con base en todo esto, esta investigación sirve como un primer vistazo al comportamiento de las bacterias con una planta huésped mostrando mejoras a las diferentes características de las plantas, sirviendo como una antesala para su posible aplicación en cultivos de *Saccharum officinarum*.

I. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) ha sido uno de los productos principales para la agroindustria guatemalteca, siendo que la agroindustria azucarera guatemalteca ocupa el quinto país exportador de azúcar a nivel mundial, el segundo a nivel latinoamericano y el tercer lugar en productividad (toneladas métricas de azúcar/ha) a nivel mundial. Además, el azúcar es el segundo producto agrícola en Guatemala en generación de divisas (Melgar et al., 2012). A nivel mundial, la USDA ha estimado que el consumo de azúcar a nivel mundial alcanzará los 173.4 millones de toneladas métricas de zafra en los años 2015-2016 (SIB, 2016). Todo esto ha ocasionado que la producción de azúcar se haya elevado por lo que el área de cultivo de azúcar se ha ampliado y se ha tenido que mejorar la producción de la azúcar en los últimos años para satisfacer la demanda (Melgar et al., 2012).

La alta demanda de azúcar ha ocasionado que los agricultores utilicen fertilizantes inorgánicos los cuales permiten impulsar el crecimiento vegetal. Sin embargo, se ha demostrado que estos fertilizantes poseen un efecto muy negativo en los suelos ocasionando eutrofización, contaminación de los suelos, contaminación de cuerpos de agua, acidificación del suelo o incremento de los gases de efecto invernadero (Carrascosa et al., 2023). Por lo que se buscan alternativas a dichos fertilizantes por medio del aprovechamiento de microorganismos (hongos o bacterias) los cuales presentan características promotoras del crecimiento vegetal, permitiendo aprovechar sus mecanismos de obtención de nutrientes, producción de auxinas y antagonismo contra patógenos para impulsar el crecimiento vegetal de los cultivos, con el fin de reducir el uso de biofertilizantes (Grover et al., 2021).

II. ANTECEDENTES

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es uno de los principales indicadores económicos del producto interno bruto (PIB) de Guatemala. En el año 2021 se exportó una cantidad de caña de azúcar valorada en 434.2 millones de dólares, convirtiendo a Guatemala en el cuarto mayor exportador de caña de azúcar a nivel mundial (Turcios, 2021). Su alta importancia en el sector económico guatemalteco ha ocasionado que las industrias empleen diferentes variedades de caña de azúcar las cuales requieran de menor cantidad de agua y posean mayor resistencia contra plagas, con el fin de mejorar la productividad y sostenibilidad de los cultivos (Turcios, 2021).

La producción de la caña de azúcar es una actividad altamente demandada debido a la producción de azúcar y etanol. Esto ha ocasionado que las producciones de caña se vean en un constante desafío para mantener la producción continua. Con el fin de mejorar los cultivos de caña se ha empleado el uso de fertilizantes inorgánicos para restaurar los nutrientes de nitrógeno, potasio y fósforo en los rebrotes de la caña de azúcar, debido a la alta eliminación de los nutrientes del suelo por parte de los anteriores cultivos (Castro et al., 2023). Los suelos de Guatemala presentan una deficiencia principal de fósforo, sin embargo, los niveles de nitrógeno son mayores en comparación de otras regiones tropicales debido a la acumulación de materia orgánica derivada de la ceniza volcánica (Melgar et al., 2012). La falta de fósforo ocasiona que el rendimiento de los cultivos de caña de azúcar se vea afectado, asimismo, no todos los suelos de Guatemala poseen un alto índice de materia orgánica lo que ocasiona que los cultivos requieran la adición de una fuente de nitrógeno y fósforo para mejorar el rendimiento de producción de la caña de azúcar. El aumento de los nutrientes en el suelo es posible por medio de la adición de fertilizantes en los cultivos de caña usando principalmente difosfato de amonio o monofosfato de amonio como fuentes de fósforo y nitrógeno y urea como fuente de nitrógeno para la planta (Melgar et al., 2012).

Las plantas se encuentran en constante interacción con diversos microorganismos como las bacterias, hongos y virus, entre estos microorganismos existe un grupo conocido como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCP). Las RPCP son una categoría diversa de microorganismos asociados con muchas especies de plantas, las cuales aportan beneficios para el crecimiento vegetal como la solubilización de nutrientes o producción de fitohormonas. Son bacterias capaces de proteger a las plantas de enfermedades y estrés abióticos; por otro lado, los inoculantes bacterianos pueden contribuir en el aumento de la eficiencia agronómica debido a la reducción de costos de producción y a la reducción de contaminación ambiental (Wang et al., 2021; Souza et al., 2015).

La caña de azúcar es uno de los principales productos agrícolas en Guatemala, siendo el tercer país con mayor productividad en el mundo, generando 107,23 toneladas de caña de azúcar por hectárea en el año 2024 (Fundazucar, 2019; Melgar et al., 2012). Sin embargo, el cambio climático ha ocasionado que los cultivos de caña de azúcar se vean afectados por diferentes factores ambientales. La variación de temperatura ambiental es un factor importante que influye en el crecimiento de la caña de azúcar y su productividad. En enero de 2010 se registraron temperaturas mínimas de 14.1 °C y máximas de 36.5 °C, estas temperaturas máximas incrementan la fotosíntesis aumentando los niveles de sacarosa en la planta (Melgar et al., 2012).

El Ingenio Magdalena ha realizado aislamientos y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal, de 222 bacterias obtenidas de muestras de suelo. De las bacterias se identificaron los fenotipos de las bacterias entre ellos la producción de fitohormonas, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de amonio y producción de ácido indol acético. Se eligieron las mejores candidatas para la formulación de biofertilizantes y se realizaron pruebas de antagonismo. Con los resultados se seleccionaron posibles bacterias para realizar bioformulaciones (Caballeros, 2023; Ochoa, 2022).

III. OBJETIVOS

A. Objetivo general

- Elaborar una formulación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

B. Objetivos específicos

- Evaluar la efectividad de las inoculaciones bacterianas en la germinación de las semillas de rábano.
- Evaluar la efectividad de las inoculaciones bacterianas en el crecimiento vegetal.
- Elaborar un marcaje molecular de las cepas elegidas para la formulación.

IV. JUSTIFICACIÓN

La producción agrícola es una actividad importante para sustentar la alimentación de los seres humanos y otras especies. Pero esta actividad puede dañar el ambiente por las técnicas de agricultura intensiva que involucran el uso de fertilizantes y de pesticidas. El uso de estos últimos puede contaminar el suelo, agua, césped y otra vegetación, además el uso excesivo de estos químicos genera un impacto negativo en la salud humana (Aktar et al., 2009; Ray et al., 2023).

El uso excesivo de fertilizantes químicos ha llevado a la búsqueda de tecnologías alternativas las cuales puedan generar los mismos o mejores resultados que el uso de agroquímicos. En Guatemala en el periodo 2022 a 2023, se han tenido la tendencia de sustituir el uso de químicos por insumos biológicos para alcanzar la sostenibilidad del proceso agrícola de la caña de azúcar (Cegicaña, 2024). Las bioformulaciones utilizan las características fisiológicas de distintas cepas microbianas y su obtención de distintos nutrientes (fósforo, potasio y zinc), fijación de nitrógeno, producción de sideróforos y protección de patógenos (Khan et al., 2023). Esto ocasiona que la aplicación de los agroquímicos pueda reducirse y sean las mismas bacterias las cuales puedan brindarle a la planta los nutrientes necesarios para su desarrollo. A su vez se ha encontrado que las mismas cepas bacterianas son capaces de generar competencia contra ciertos patógenos lo cual confiere protección a la planta (Khan et al., 2023).

Con el fin de remplazar un porcentaje del uso de fertilizantes convencionales en las fincas del Ingenio Magdalena, se desea realizar una bioformulación con el fin de mejorar el crecimiento de la caña de azúcar. Una alternativa ecológica a los fertilizantes, son las bioformulaciones con agentes fijadores de nitrógeno y fósforo los cuales pueden ayudar a mejorar los cultivos de caña de azúcar. Para llevar a cabo la bioformulación se cuenta con un cepario con diversas cepas bacterianas, resultados de antagonismo de las cepas, apoyo del Ingenio Magdalena, del Centro de Estudios en Biotecnología y de la Universidad del Valle de Guatemala.

V. MARCO CONTEXTUAL

La agricultura de caña de azúcar es fundamental para la economía guatemalteca y se requiere del continuo mejoramiento de los cultivos, pero utilizando alternativas ecológicamente amigables se están realizando nuevos proyectos con el fin de mejorar los cultivos de caña de azúcar. Por ello en los últimos años se han estado diseñando e implementando alternativas biológicas, como los biofertilizantes, para mejorar el rendimiento de los cultivos, mejorando la disponibilidad de nutrientes reduciendo la necesidad de la adición de elementos químicos para aumentar su biodisponibilidad.

El Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) de la Universidad el Valle de Guatemala ha desarrollado proyectos que involucran soluciones biotecnológicas para industria y agricultura donde se desea catalizar el desarrollo biotecnológico de Guatemala vinculando tanto la investigación como la educación para su aplicación en beneficio de la sociedad y el medio ambiente (CEB, s.f). De esa forma, brinda experiencia para desarrollar proyectos los cuales ofrezcan soluciones biotecnológicas preservando la salud de los suelos y mejorando los cultivos de caña de azúcar.

El CEB en conjunto con el Ingenio Magdalena están llevando a cabo un proyecto denominado “Mejoramiento de la salud del suelo de monocultivo a través de la optimización del procedimiento de compostaje y manejo de microbiología de suelos”, que tiene como objetivo generar alternativas ecológicas a los fertilizantes basados en microorganismos con habilidades promotoras del crecimiento vegetal, El presente trabajo es una continuación de la tesis “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 promotores del crecimiento que se encuentre en ellos”, llevada a cabo por Ochoa Elías (2022) y la tesis “Planteamiento de formulación de biofertilizantes bacterianos partiendo de cepas promotoras del crecimiento aisladas de suelos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en la Costa Sur de Guatemala”, llevada a cabo por Caballeros Matas (2023).

VI. MARCO TEÓRICO

A. Agricultura

La población humana ha registrado un gran aumento en los últimos años esto ha ocasionado que la agricultura ha tenido que aumentar las tasas de producción hasta un 60 % en la producción de alimentos para satisfacer las necesidades humanas. Sin embargo, debido al cambio climático y al aumento de los gases de efecto invernadero; lo cual afecta el rendimiento de los cultivos debido al efecto negativo sobre las tierras fértiles. Los agricultores han tenido que ampliar sus tierras de cultivo hasta un 9 % con el fin de poder compensar las pérdidas de rendimiento de los cultivos (Singh et al., 2021; Hamdan et al., 2022). La agricultura es una actividad muy importante para la humanidad, siendo que dicha actividad proporciona un impulso para el crecimiento económico para muchas naciones y proporcionar alimentos a 7.500 millones de personas donde los principales cultivos son arroz, maíz y trigo (Hamdan et al., 2022; Sishodia et al., 2020).

En Guatemala, el 46 % de sus tierras se encuentran destinadas para la producción agrícola y agropecuaria, las que presentan mejores características se ven ocupadas por la agricultura agroexportadora. Adicionalmente, el 87 % de estos suelos se encuentran dedicados a la agricultura de pequeña escala. Dicha agricultura se desarrolla en uso excesivo del suelo los que ocasiona una reducción en la capacidad para satisfacer alimento, esto ocasionó que en los años 2006 a 2014 se generara una reducción del 20 % de la productividad nacional de alimentos (García y Fálvez, 2022; URL, 2006). De igual forma, tanto el café como la caña de azúcar mantiene un alto porcentaje en los suelos en la categoría de sobreuso, obteniendo un 84 % y 47 % respectivamente (García y Fálvez, 2022).

1. Cultivos de caña de azúcar

La caña de azúcar es una gramínea, la cual pertenece al género *Saccharum* la cual es utilizada para la producción de azúcar. En los años de 1994 a 2018 debido a la creciente demanda de consumo de azúcar se potenció la producción de la caña obteniendo un aumento del 37.04 % a nivel mundial (Som-ard et al., 2021). En regiones favorables, la caña de azúcar presenta una rentabilidad económica, sin embargo, la producción de caña de azúcar requiere de mucha mano de obra y un suministro elevado consumo de agua. En Guatemala, durante el año 2020 se obtuvo ingresos, provenientes del comercio de la caña de azúcar de alrededor de 434.2 millones de dólares americanos. Este dato refleja que esta es una de las industrias más productivas y ambientalmente sostenibles del país debido a que la caña de azúcar guatemalteca requiere

de una menor cantidad de agua y los cultivos presentan una mayor resistencia contra las plagas (Turcios, 2021; Som-ard et al., 2021). La caña de azúcar es sumamente importante en Guatemala siendo que se realizan cultivos en dos áreas principales la costa pacífica y el valle de Polochic, gracias a esto el sector genera aproximadamente 350,000 empleados con 60,000 empleos permanentes y se genera el 3 % de exportación totales a nivel mundial y el 21 % de las exportaciones de agricultura y el 8 % de exportaciones totales del país (Tomei, 2015).

2. Monocultivo

El monocultivo se refiere a la práctica donde se siembra la misma especie de cultivo en un mismo segmento de tierra (Belet y Yadete, 2023). Principalmente es empleado por el sector industrial debido a que este tipo de cultivos suelen demostrar un mayor rendimiento, estabilidad y seguridad alimentaria (Bourke et al., 2021). Sin embargo, se ha demostrado que la práctica continua de monocultivos ocasiona que los suelos pierdan su disponibilidad de nutrientes, que exista una reducción de materia orgánica en el suelo y que cause una erosión significativa en los suelos, lo que ocasiona la pérdida de rendimientos en los cultivos (Belet y Yadete, 2023). En cuanto a la caña de azúcar, se ha evidenciado que en regiones tropicales y subtropicales de China generan monocultivos de caña de azúcar, generando una reducción de los costos de siembra y de labranza, pero provoca una alta degradación del suelo y desencadena enfermedades transmitidas por medio del suelo ocasionando pérdidas económicas para la industria azucarera (Pang et al., 2021).

3. Salud de suelos

La salud de los suelos define como la capacidad que presenta el suelo para operar como un sistema vivo vital dentro de los límites del ecosistema y del uso de la tierra para poder soportar la producción tanto vegetal como animal (Tahat et al., 2020). Debido al uso constante de los suelos y a los monocultivos tanto la salud del suelo como la calidad del suelo han sido de gran interés en los últimos años. Según el informe que emitió la FAO, en el año 2015 el 33 % de los suelos del planeta se encontraban degradados y el 14 % de la degradación mundial ocurría en América Latina y el Caribe (FAO, 2015). Dicha degradación se encuentra correlacionada con la pobreza debido a que el 40 % de las tierras degradadas se encuentran en zonas con altas tasas de pobreza. En dichas zonas los agricultores pobres tienen menor acceso a la tierra y agua y trabajan en tierra

de no apta para la agricultura debido a su alta vulnerabilidad a la degradación. La degradación del suelo posee un impacto negativo tanto en la producción de alimentos como en la provisión de servicios ecosistémicos (FAO, 2015).

B. Fertilizantes

Los fertilizantes son sustancias las cuales permiten el mantenimiento de la fertilidad del suelo, el aumento del rendimiento y la mejora de las cosechas (Krasilnikov et al., 2022). Esto se logra debido a que los fertilizantes mejoran las características del suelo y juega un papel significativo en el crecimiento de la planta, la fertilidad del suelo, seguridad de la comida, desarrollo ambiental y agricultura sostenible (Randive et al., 2021). El uso de los fertilizantes permite suministrar las cantidades suficientes y correcta de nutrientes en el suelo y fuentes orgánicas para suplementar la demanda de nutrientes óptimas para el desarrollo de cultivos (Randive et al., 2021). Debido a la creciente población humana lo que ha demandado a mantener los suelos agrícolas con los niveles adecuados de cantidad y calidad para la producción de alimentos, el uso de dichas sustancias ha aumentado (Barlóg, 2023).

1. Fertilizantes inorgánicos

Los fertilizantes inorgánicos también conocidos como fertilizantes químicos son aquellos fertilizantes que fueron manufacturados de forma industrial y son sustancias que poseen gran cantidad de nutrientes para mejorar los cultivos vegetales (Iqbal et al., 2020). Estos fertilizantes se encuentran conformados principalmente por tres nutrientes principales los cuales son nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), los cuales se pueden encontrar en diferentes formulaciones, en el caso del nitrógeno las plantas pueden tomar nitrógeno en forma de amonio, nitrato o urea (Iqbal et al., 2020; Rashmi et al., 2020). Los agricultores utilizan mayormente fertilizantes que contienen urea y fosfato diamónico para mejorar el rendimiento de los cultivos, sin embargo, esto ha conllevado a múltiples críticas debido a que el uso excesivo de estos fertilizantes plantea amenazas a la salud humana y ambientales (Kakar et al., 2020).

a. Desventajas de los fertilizantes inorgánicos

El uso excesivo y continuo de los fertilizantes inorgánicos causa serios problemas tanto a los cultivos como a la tierra. En los cultivos se ha observado que la aplicación continua de fertilizantes ocasiona un aumento en la absorción de metales pesados que se acumulan en el tejido de las plantas, causando una disminución en la calidad nutricional y en la calidad de los cultivos (Kakar et al., 2020). Por otro lado, el uso continuo de los fertilizantes químicos ocasiona un aumento en la cantidad de nitrógeno disponible en los suelos el cual excede los niveles de nitratos en el ciclo del nitrógeno, dando así tres escenarios uno donde los nitratos permanecen en el suelo, otro escenario donde parte del nitrógeno retorna al aire como nitrógeno atmosférico y el último donde se acumula en cuerpos de agua contaminándolos. Por último, parte del nitrógeno vuelve a la atmosfera como óxido nitroso el cual es un gas de efecto invernadero afectando la atmosfera (Nozaki, 2022).

2. Biofertilizantes

Los biofertilizantes son productos compuestos de microorganismos los cuales impulsan el crecimiento de las plantas por medio del suministro de nutrientes a la planta huésped. Dichos microorganismos se pueden suministrar a las plantas directamente a las semillas, a las plantas germinadas o al suelo (Daniel et al., 2022). Entre los géneros más utilizados al momento de generar los biofertilizantes son hongos micorrízicos arbusculares, rizobacterias y azotobacter las cuales promueven el crecimiento de plantas, tanto las rizobacterias como las azotobacter se encargan principalmente en la liberación de nitrogenonitrógeno disponible para las plantas. Entre los géneros más comunes que se utilizan para la generación de los biofertilizantes se encuentran *Bacillus*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Rhizobium* (Raimi et al., 2021).

a. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) son un grupo de bacterias con características las cuales se pueden emplear para mejorar la tasa del crecimiento de las plantas por medio de la secreción de diversos metabolitos y hormonas (Poria et al., 2022). Utilizan diferentes mecanismos de las bacterias como la producción de exopolisacáridos, colonización de

raíces, mejora en la disponibilidad de nutrientes, ajustes en los niveles metabólicos y de fitohormonas con el fin de mejorar la tasa de crecimiento de la planta (Saeed et al., 2021). De igual forma, se ha encontrado que las PGPB ayudan en la protección de las plantas al utilizar mecanismos de resistencia sistemática inducida, competencia de la rizosfera y producción de sustancias antagonicas (Saeed et al., 2021; Numan et al., 2018). La implementación de PGPB en cultivos agrícolas se ha convertido en un gran interés para la industria agrícola debido al impulso del crecimiento vegetal y son fuentes de bajo costo y fácilmente disponibles para la mitigación de diferentes estrés bióticos y abióticos para las plantas (Numan et al., 2018).

La utilización de PGPB ha demostrado mejoras en las tasas de germinación de las semillas entre un 12 y 20 % (Fiodor et al., 2023), apoya el crecimiento de las plantas con la producción de fitohormonas (como el ácido indol acético). También ayudan en el aumento de flujo de iones de potasio de las raíces hacia los brotes, brindándole a la planta del potasio necesario para llevar a cabo la activación de enzimas importantes, transporte de azúcar, síntesis de proteínas, fotosíntesis y metabolismo de nitrógeno y carbono (Dhawi, 2023; Xu et al., 2020). Las PGPB apoyan en la adquisición de sideróforos, compuestos orgánicos, efectos estimulantes, presentan actividades antagonicas frente a otros microorganismos dotando defensas hacia las plantas (Orozco-Mosqueda et al., 2021).

- **Abundancia en suelos**

Gracias a las características de las PGPB estas han sido estudiadas con el fin de poder manipular el microbioma de la rizosfera. Donde se ha demostrado que la adición de un solo microorganismo o una mezcla sintética de microorganismos es capaz de generar un efecto promotor del crecimiento vegetal (Gu et al., 2020). Entre las principales especies bacterianas con relación al crecimiento vegetal se encuentran miembros de los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus* y *Streptomyces* (Wang, 2021). Sin embargo, no todos los casos en los que se han aplicado PGPB han sido éxitos esto debido a que los inoculantes no son capaces de competir con el microbiota natural de la planta o que los inoculantes sean similares al microbiota natural, evitando así la generación de un aporte nuevo para promover el crecimiento vegetal (Gu et al., 2020).

b. Características de obtención de nutrientes

Las plantas necesitan de macronutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio para cumplir con sus necesidades y funciones básicas de crecimiento y desarrollo (Kaur et al., 2022). Los PGPB son capaces de llevar a cabo distintos procesos para suplementar la necesidad de los macronutrientes en las plantas. Algunas PGPB pueden promover la fijación de nitrógeno. Dicho proceso es fundamental para la distribución de nitrógeno en el ecosistema y es una de las principales fuentes de nitrógeno disponible para las plantas. Siendo que las bacterias convierten del dinitrógeno (N_2) en una forma las cuales las plantas puedan procesar (principalmente NH_4^+) dicha conversión es catalizada por la enzima nitrogenasa (Soumare et al., 2020). De igual forma, la producción de amonio es una de las características esenciales para la promoción del crecimiento vegetal, esto debido a que la producción de amonio suplementa nitrógeno a las plantas y promueve el alargamiento de las raíces y los brotes (Bhattacharyya et al., 2020). Otro nutriente clave es el fosfato el cual es muy abundante en el suelo, pero es insoluble debido a la fijación del fósforo, sin embargo, un grupo de bacterias es capaz de solubilizar el fosfato insoluble del suelo poniéndolo a disposición de las plantas (Mei et al., 2021). Las bacterias transforman los fosfatos de insolubles a solubles al secretar ciertos ácidos (Tariq et al., 2022).

c. Biofertilizantes en caña de azúcar

Aproximadamente el 80 % de la azúcar producida a nivel mundial proviene del cultivo de caña de azúcar, por lo que dicho cultivo es altamente demandado y producido, esto ocasionó que en el año 2020 se produjera 1.9 miles de millones de toneladas de caña de azúcar (Aguado-Santacruz et al., 2024). Existen casos donde se han empleado biofertilizantes para la mejora de los cultivos de caña de azúcar, en Egipto se utilizó biofertilizantes que mejoraban la solubilización de fosfato basado en *Bacillus megatherium*, donde se encontró mejoras significativas en la cantidad de caña molible (la caña que sufrirá de un proceso de molienda para extraer su jugo) por m^2 , la altura de la caña, el diámetro de la caña, el porcentaje de sacarosa y en el rendimientos de caña y azúcar (Aguado-Santacruz et al., 2024). Por otro lado, en África se comercializan diferentes biofertilizantes para combatir agentes fitopatógenos, por último, en Australia se encontró que los biofertilizantes con carga reducida de nitrógeno presentaron mayor rendimiento que los fertilizantes minerales (Ehis-Eriakha et al., 2023; Qiu et al., 2022).

d. Composición

Las bioformulaciones microbianas son productos compuestos de microorganismos, principalmente por una mezcla de bacterias, hongos y en ciertas ocasiones de microalgas (Syromyatnikov et al., 2022). Para realizar una bioformulación se debe de conocer el vehículo el cual contendrá las PGPB (este puede ser sólido o líquido), además de eso, es necesario mantener un buen número de unidades formadoras de

colonias (UFC), por último, la aplicación del biofertilizante debe de ser en las semillas o en la raíz de la planta (según el objetivo de este) (Orozco-Mosqueda et al., 2021).

e. Vehículos

Los vehículos son el mecanismo de entrega de los microorganismos hacia la planta de interés. Permiten mantener en altas concentraciones a los microorganismos y proveerles de un nicho protector ya sea por medio de una superficie protectora o por la provisión de un sustrato (Rojas-Padilla, 2024). Existen diversos vehículos los cuales pueden transportar los PGPB en la *Figura 1* se encuentran los principales vehículos de los biofertilizantes con sus respectivos materiales de transporte. Dichos materiales pueden ser de naturaleza orgánica o inorgánica y su selección depende de la función y objetivo del biofertilizante (Sarhani y Yahaya, 2022). En cuanto a los vehículos sólidos se debe de realizar en polvo o granular y se basan en vehículos orgánicos e inorgánicos, donde se utilizan materiales como turba, vermiculita, carbón, compost, perlas, polisacáridos entre otros (Khan et al., 2023). Los vehículos líquidos están compuestos por los microorganismos deseados, los cuales poseen aditivos que mejoran la viscosidad, constancia y dispersabilidad de la suspensión celular (Khan et al., 2023). En cuanto a los vehículos encapsulados estos se encapsulan y unen los microorganismos en una material insoluble e inerte brindando a los microorganismos mayor resistencia al estrés ambiental (Sarhani y Yahaya, 2022).

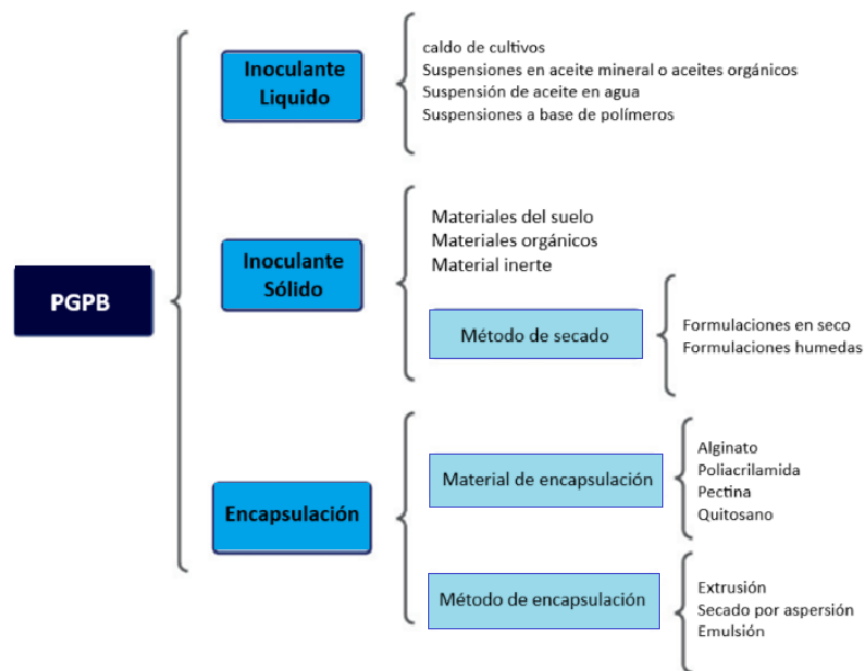


Figura 1. Tipos de bioformulaciones para agricultura sostenible (obtenido y adaptado de: Rojas-Padilla, 2024).

f. Proceso de elaboración

La elaboración de un biofertilizante está formada de múltiples etapas incluyendo la selección de la composición microbiana para la bioformulación, la elección del vehículo adecuado para los microorganismos, el método de administración, estrategia de aplicación y el sustento de las cepas microbianas en el suelo nativo y el ecosistema (Khan et al., 2023). El primer paso es la selección de los microorganismos PGPR para la planta en esta los microorganismos son seleccionados según su efectividad (provisión de nutrientes para la planta), competitividad, generar defensa a la planta y mostrar resistencia contra patógenos (Sarhani y Yahaya, 2022). El portador/vehículo es importante en la bioformulación debido a que es el material de transporte de las cepas microbianas en las plantas brindándoles un ambiente seguro a los microorganismos hasta llegar a la planta (Khan et al., 2023). Tras esto se deben de realizar pruebas para determinar el impacto de la bioformulación en los cultivos, el tiempo de almacenamiento de la bioformulación, la eficacia de la formulación y por último llevar a cabo procesos de validación de la formulación en diferentes áreas, registro de patente y aprobación relacionada con el riesgo antes de su comercialización (Khan et al., 2023).

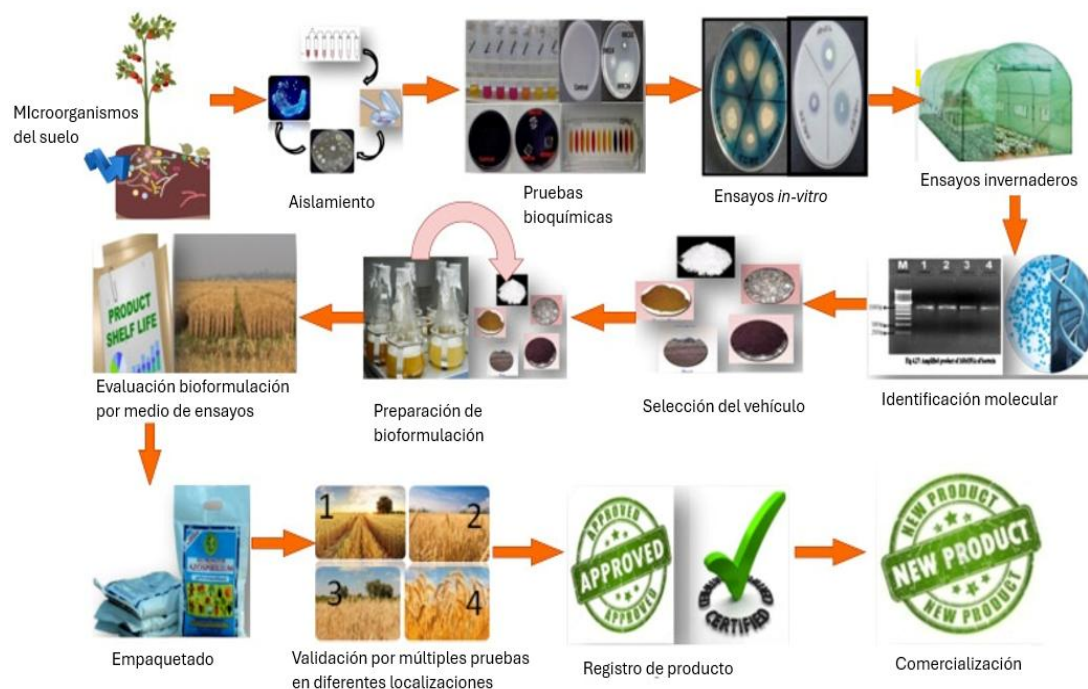


Figura 2. Representación diagramática de los pasos involucra en el desarrollo de una bioformulación (obtenido y adaptado de: Khan et al., 2023)

C. Desarrollo vegetal

1. Ciclo de vida de la plantas

Las plantas terrestres alternan entre la fase haploide multicelular y la diploide al momento de desarrollarse. En un principio la planta produce gametos por medio de mitosis, siendo que los gametos se fertilizan mientras están unidos al gametofito, dando así el desarrollo de un embrión multicelular. Tras esto el embrión multicelular se desarrolla en un esporofito maduro el cual es diploide, este esporofito multicelular genera esporas por medio de meiosis, ocasionando que el ciclo de vida de la planta vuelva a un estado haploide. Dichas esporas son capaces de producir nuevos gametofitos continuando el ciclo. A partir de esto, las plantas evolucionaron para lograr la supervivencia de las plantas en épocas de sequías siendo así que surgió la formación de la semilla que son esporofitos embrionarios con tejido nutritivos encerrados en una cubierta aprueba de agua. Cuando las condiciones ambientales son adecuadas (temperatura y humedad) la semilla germina ocasionando la activación del embrión. Una vez activado el embrión este se desarrolla formando la raíces en el extremo inferior de la radícula y los brotes des del extremo superior los cuales son importante para la captación y retención del agua (Starr et al., 2009).

2. Germinación

La germinación de la semilla es el paso inicial del ciclo de la vida de la planta, esta inicia cuando la semilla inactiva y seca absorbe agua y se completa con una protrusión de la radícula de la cubierta de la semilla (Makhaye et al., 2021). Dicho proceso se ve influenciado por diversos factores ambientales como la temperatura, disponibilidad de agua y en algunos casos la luz (Santos y Garcia, 2023). El proceso de germinación juega un papel fundamental en los cultivos, debido a que la falta de una germinación uniforme puede resultar en el establecimiento deficiente de la población, afectando así considerablemente el rendimiento de los cultivos (Makhaye et al., 2021).

a. Tipos de germinación

Existen dos tipos diferentes de germinación la germinación epígea y la hipógea. En la germinación epígea sucede cuando la división celular en el hipocótilo es más activa y ráoida que la división celular en epicótilo. Esto ocasiona que el meristemo que se encuentra en división activa en el hipocótilo provoque el crecimiento y alargamiento de las células, ocasionando que el hipocótilo, el nudo cotiledonal y el epicótilo se encuentre por encima de la superficie (Michaels et al., 2024). La germinación hipógea el meristemo apica en la punta del epicótilo se encuentra mucho más activo en comparación del hipocótilo. Ocasionando así que la división celular y elongación empuje el epicótilo por encima del suelo, mientras que los cotiledones y el hipocótilo permanecen bajo el suelo (Michaels et al., 2024).

3. Biocebado

El biocebado (también conocido como biopriming) es una técnica de germinación que implica el remojo de las semillas en una suspensión líquida de cultivo bacteriano durante un período determinado (Mitra et al., 2021). Dicho proceso permite impulsar la productividad primaria de la semilla y desencadenar actividades metabólicas previas a la germinación (Singh et al., 2023). La preparación de la semilla consiste en el recubrimiento de la semilla principalmente con PGPR esto permite que las bacterias se inoculen dentro de las semillas y protejan a las semillas del ataque de patógenos. De igual forma, prepara a la semilla impulsando una mayor actividad enzimática hidrolítica, especies reactivas de oxígeno, actividades enzimáticas desintoxicantes y cambios en los niveles hormonales de las plantas permite un mejor crecimiento de las plantas y una mayor resistencia al estrés (Mitra et al., 2021).

El biocebado permite la impregnación de PGPR permite que se inicien los procesos fisiológicos de la semilla, de igual forma ayuda a aumentar la cantidad de PGPB en la espermósfera logrando así que exista una cantidad 10 veces mayor de PGPB en la semilla lo que permite la defensa de la semilla contra bacterias antagónicas (Mahmood et al., 2016). Asimismo, la PGPB generan una relación simbiótica con la planta huésped, promoviendo así la producción de metabolitos químicos, fitohormonas, enzimas y expresión de genes relacionados con el estrés lo cuales ayudan a mitigar diversos efectos de varios tipos de estrés (Shaffique et al., 2023).

D. Monitoreo molecular de bacterias

Las bacterias son organismos los cuales poseen un rol crucial en los ecosistemas, estos juegan diversos roles tanto en el ambiente como en los organismos vivos. Con el fin de identificar las diferentes bacterias y caracterizar su rol en el ecosistema se han desarrollado metodologías basadas en cultivos de placas y pruebas bioquímicas (detección de metabolitos) para la caracterización de microorganismos, sin embargo, dichos métodos poseen limitaciones como la falta diferenciación entre los microorganismos (resultando en falsos positivos) y la incapacidad de detectar células viables, pero no cultivables (Zhang et al., 2021). Por otro lado, el uso de la identificación por medio de genes conservados o del genoma completo permite la identificación de las bacterias por medio del genotipo. Esto permite una mayor sensibilidad, exactitud y especificidad en la determinación de bacterias asimismo permite una detección más rápida y permite la cuantificación de bacterias en tiempo real (Tripathi et al., 2019; Adzitey et al., 2013).

1. Métodos moleculares para la identificación de bacterias

En la actualidad los biofertilizantes están siendo altamente utilizados en las grandes industrias por lo que ha surgido la necesidad de determinar los efectos que son ocasionados por los PGPB inoculados y su eficacia. Es por ello que se han desarrollado metodologías con el fin de monitorear la presencia de los microorganismos inoculados, así como examinación por microscopía directa o métodos dependientes de cultivos. Las técnicas moleculares como la Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) y las técnicas basadas en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten la identificación de polimorfismos para identificar una sola especie bacteriana en una comunidad compleja. También es posible la utilización de PCR en tiempo real (qPCR) para determinar la actividad de los grupos microbianos funcionales (Manfredini et al, 2021).

2. Transformación bacteriana

La transformación es una técnica molecular en el cual un ADN exógeno es introducido en una célula, siendo que dicha técnica es de suma importancia para el estudio de bacterias (Addgene, 2017). Durante la transformación el ADN exógeno se adhiere a la superficie celular y pasa a través del complejo pared-membrana, esta puede ocurrir de forma natural o artificial (Rahimzadeh et al., 2016). El objetivo de la técnica es lograr expresar el ADN exógeno con el fin de obtener diversidad genética u ofrecer ventajas como la resistencia a antibióticos (ThermoFisher Scientific, 2023). La transformación bacteriana permite la inserción de secuencias de ADN reportero los cuales permite el monitoreo de cepas bacterianas, esto se logra por medio de marcadores proteicos, principalmente proteínas que emiten fluorescencia, esto genera un método visible para la detección de cepas bacterianas específicas y de interés por medio de equipos o metodologías que permiten excitar la proteína a cierta longitud de onda para que esta emita fluorescencia y así lograr la visualización de la célula bacteriana transformada (Marro et al., 2022). Esto permite informar la tasa de crecimiento de la población bacteriana, gracias al método de dilución de plásmidos donde de una célula se generan dos copias, pero solo una de las células hijas obtendrá el plásmido, disminuyendo a la mitad la población bacteriana portadora del plásmido (Marro et al., 2022).

a. Electroporación

Existen diversos métodos para generar transformaciones celulares una de estas es la electroporación en el cual se utilizan descargas eléctricas de alto voltaje para introducir ADN exógeno tanto en células procariontas como las eucariotas (Potter, 2003). Esto sucede debido a que las descargas eléctricas ocasionan la creación de poro temporario en la membrana celular lo cual permite el paso de los ácidos nucleicos. El proceso de electroporación ocurre al suspender las células de interés en una solución

conductora y se coloca un circuito eléctrico alrededor donde se genera un impulso eléctrico en un voltaje optimo en cuestión de microsegundos (ThermoFisher Scientific, 2024).

- **Plásmidos**

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómicos comunes en muchas bacterias. Estos son independientes del cromosoma y suelen existir múltiples copias de un plásmido en una célula. Estos pueden transmitirse de forma vertical hacia las células hijas durante la división u horizontalmente entre diferentes células bacterianas (Dewan y Uecker, 2023). Asimismo, son herramientas genéticas las cuales son utilizados para manipular y analizar microorganismos, por medio de la introducción, modificación o delección de ciertos genes de interés (Shitani et al., 2015).

VII. METODOLOGÍA

A. Hipótesis

1. Hipótesis de investigación

La bioformulación con bacterias aisladas del suelo posee el potencial para mejorar el crecimiento de los cultivos vegetales.

2. Hipótesis nula

La bioformulación con bacterias aisladas del suelo no posee el potencial para mejorar el crecimiento de los cultivos vegetales.

B. Diseño, enfoque y tipo de investigación

El diseño experimental de la presente investigación será un diseño cuasiexperimental, debido a que se evalúa el crecimiento de las plantas (variable dependiente) de forma no aleatorizado. Las variables independientes que se modificarán serán las cepas bacterianas y los vehículos de las bioformulaciones. Donde se identificarán si la bioformulación con especies bacterianas que presentan una mejora en el crecimiento de las plantas.

C. Variables

Cuadro 1. Definición de las variables de investigación

Variable	Definición conceptual	Definición operacional
Biofertilizantes	Microorganismos los cuales pueden proveer de nutrientes a las plantas para mejorar su crecimiento (Daniel et al., 2022).	Formulación de inóculos bacterianos utilizados como biofertilizantes para mejorar el crecimiento de la planta.
Germinación	Proceso en el cual las semillas empiezan a desarrollarse, de modo que la radícula perfora las envolturas de las semillas (Cui et al., 2020).	Proceso en el que la semilla revienta y da paso para la formación de una plántula.
Transformación bacteriana	Técnica molecular en el cual	Proceso de inserción de

ADN exógeno es introducido plásmidos los cuales en una célula, siendo una permitirán el monitoreo de técnica de suma importancia las bacterias por medio de para el estudio de bacterias fluorescencia.
(Addgene, 2017).

D. Población

La población del presente estudio es un cepario de bacterias de muestras de suelo del Ingenio Magdalena. Estas fueron recolectadas y procesadas por las tesis Ochoa (2022) y Caballeros (2023). A las 222 cepas bacterianas se le realizó pruebas de fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, producción de fitohormonas, pruebas de antagonismo, producción de proteasas, solubilización de potasio, producción de gluconasas y producción de pirrolnitrina.

E. Muestra

Se estableció el uso de una muestra de 11 cepas bacterias, identificadas genómicamente, donde 6 cepas bacterianas son del género *Bacillus*, 3 cepas bacterianas son del género *Pseudomonas*, una cepa perteneciente al género *Burkholderia* y otra al género *Acinetobacter*. Se conoce el antagonismo de las cepas, su capacidad de solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno y producción de ácido indol acético.

F. Metodología

1. Resiembra de bacterias

En condiciones estériles, se tomó 10 µL del cepario bacteriano almacenado a -80 °C y se dispuso en 990 µL de caldo nutritivo en tubos de 1.5 mL. Tras esto se dejaron incubando a 37 °C a 200 rpm. Posterior a 1 o 2 días de incubación se transfirieron los cultivos a tubos cónicos de 15 mL, donde se les agregó 4 mL más de caldo nutritivo y se dejaron incubando bajo las mismas condiciones por 1 o 2 días más. Se tomó 10 µL de los cultivos y se inocularon en una placa Petri con agar nutritivo y se esperó hasta que el agar absorbiera el inóculo. Las placas se dejaron incubar de 1 a 2 días y, por último, se tomó una asada del inóculo anterior y se realizó un aislado de las cepas.

2. Germinación de semillas con PGPB

En el procedimiento operacional estándar (POE) 1 (Anexos) se describe la metodología empleada para germinación de las plantas ante diferentes cepas bacterianas y una bioformulación. Se colocarán 10 semillas por placa y se realizará en duplicado, para el monitoreo de la germinación de las semillas se realizará cada 24h en un intervalo de 7 días. Se considerará como una germinación completa la protrusión de radícula visible. La tasa de germinación se realizará con la ecuación 1 y el índice de germinación se obtendrá con la ecuación 2 y la germinación de semillas relativas se conseguirá por medio de la ecuación 3.

Ecuación 1. Tasa de germinación

$$Tasa\ de\ Germinación = \frac{\% \text{ de germinación } 1er.\ día}{1} + \dots + \frac{\% \text{ de germinación } 10mo.\ día}{10}$$

(Kaymak et al., 2009).

Ecuación 2. Índice de germinación

$$Índice\ de\ Germinación = \frac{\text{numero de semillas germinadas}}{\text{Número total de semillas}} * 100$$

(Fahsi et al., 2021).

Ecuación 3. Germinación de semillas relativas

$$Germinación\ relativa\ de\ semillas = \frac{\text{No. de semillas germinadas por tratamiento}}{\text{No. de semillas germinadas por el control}} * 100$$

(Fiodor et al., 2023).

3. Crecimiento vegetal con PGPB

En el POE 1 (Anexos) se describe la metodología empleada para el desarrollo del crecimiento vegetal de las plantas ante diferentes cepas bacterianas y una bioformulación. Las plantas se dejaron germinando durante 3 semanas, agregando agua y caldo con bacteria cada día. Tras esto las plántulas y las raíces se medirán con ayuda de una regla de metal y se obtendrá el tamaño de la raíz, de la plántula y la cantidad de hojas de la plántula. Los tratamientos realizados fueron para cada una de las bacterias y la bioformulación de todas las bacterias seleccionadas. El tratamiento de las semillas fue realizado de forma aleatorizada.

Cuadro 2. Cepas bacterianas elegidas para realizar la bioformulación

NO.	CEPA	ESPECIE
1	1AB27	<i>Pseudomonas baetica</i>
2	1BP10	<i>Bacillus paramycooides</i>
3	2MO12	<i>Bacillus subtilis</i>
4	2MO14	<i>Burkholderia cepacia</i>
5	4AP9	<i>Bacillus cereus</i>
6	2AP10	<i>Bacillus cereus</i>

4. Transformación bacteriana

En el POE 2 (Anexos) se describe la metodología empleada para la transformación de células bacterianas por medio de electroporación. La replicación del plásmido se realizó en *E. coli* BL21 competente y el plásmido se extrajo según el protocolo del kit comercial *GenElute Plasmid Miniprep Kit* de Promega, Sigma-Aldrich. Para la identificación correcta de la electroporación se realizó por medio de medio LB suplementado con kanamicina y se utilizaron los plásmidos pDawn (7209 bp) y pDusk (6220 bp) los cuales traducen una proteína sensible a la luz UV la cual muestra fluorescencia roja en presencia de luz.

5. Cepario de las bacterianas transformadas

Se realizó un cepario bacteriano de las cepas transformadas. Primeramente, se realizó un cultivo bacteriano en medio nutritivo tomando una colonia bacteriana transformada. Tras esto se dejó incubando durante toda la noche. Posteriormente se tomó 500 μ L de cultivo y se adiciono otros 500 μ L de glicerol al 40 % y de forma inmediata se colocaron las muestras en congelador a -80 °C.

6. Análisis de los datos

Se realizó pruebas de comparación de dos medias para comparar los diferentes tratamientos y evaluar el efecto que posee la bioformulación de bacterias PGPB sobre la germinación de semillas de *Raphanus sativus*. La prueba fue realizada a un nivel de significancia al 95 % ($\alpha = 0.05$). Para el desarrollo de la plántula se realizó en base a la comparación de la media de hojas, largo de las hojas, ancho de las hojas, largo de la planta, biomasa, largo de tallo y de raíces de las plántulas desarrolladas. Se identificaron la normalidad y la varianza de los datos como la presencia de datos atípicos. Se utilizaron mayormente pruebas t con varianzas iguales y en algunos casos pruebas t con varianzas desiguales o prueba de wilcoxon

Figura 3. Diagrama de flujo de la siembra de semillas y análisis estadístico

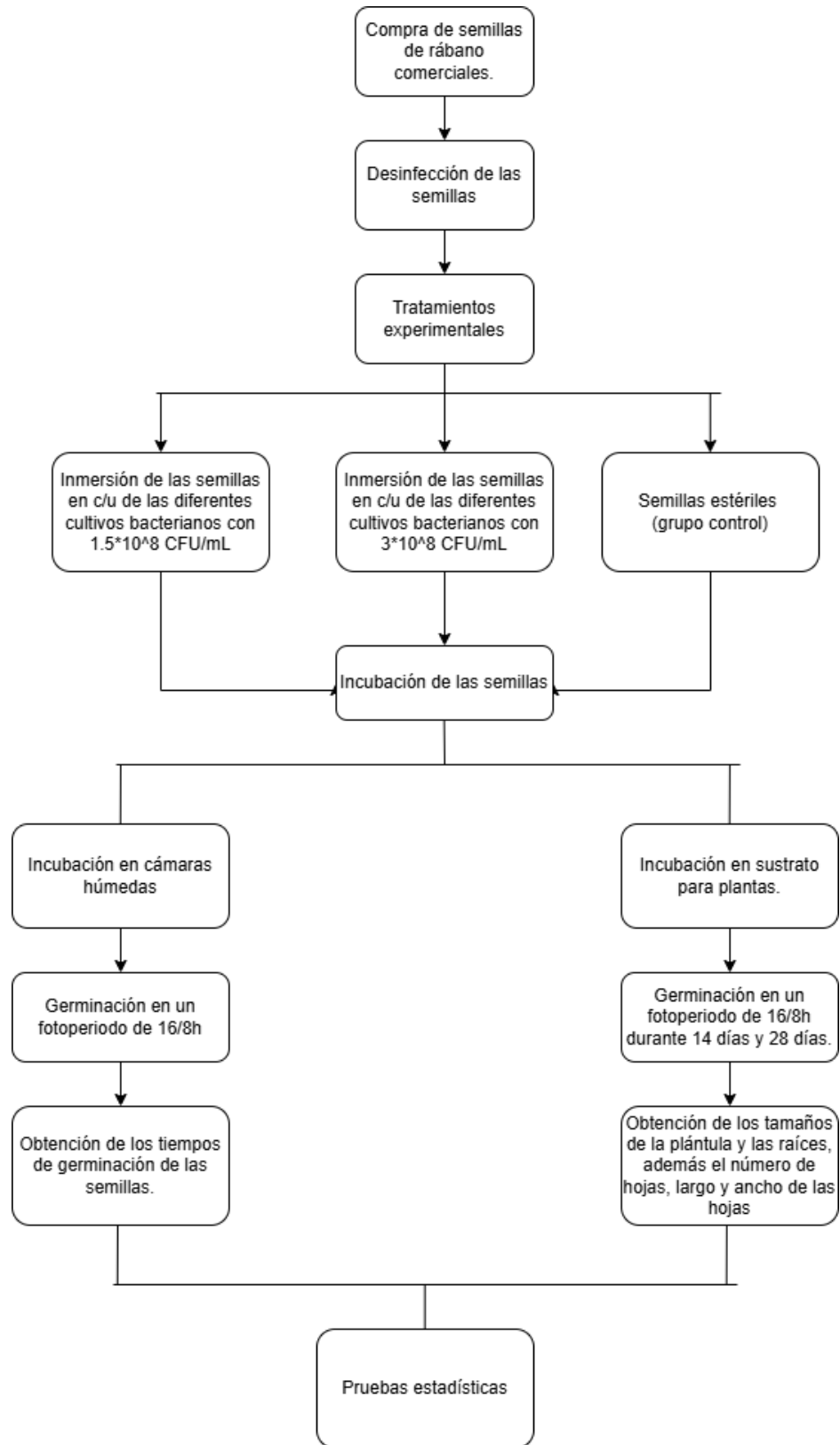
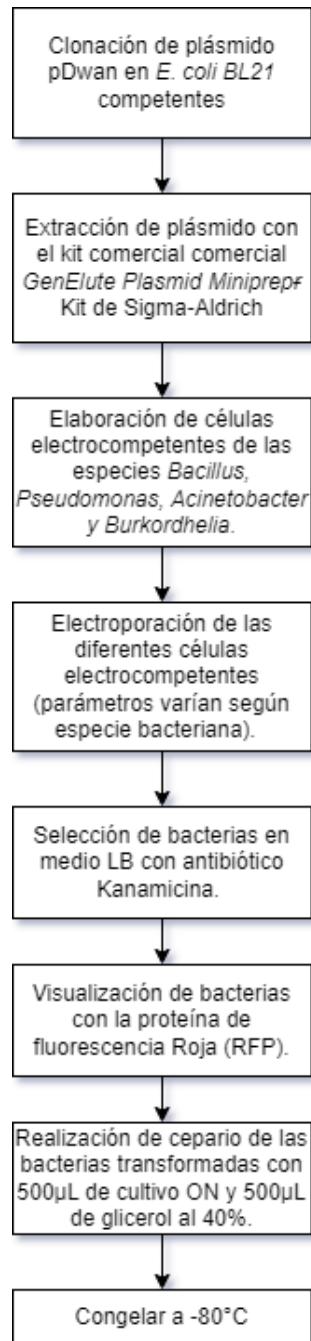


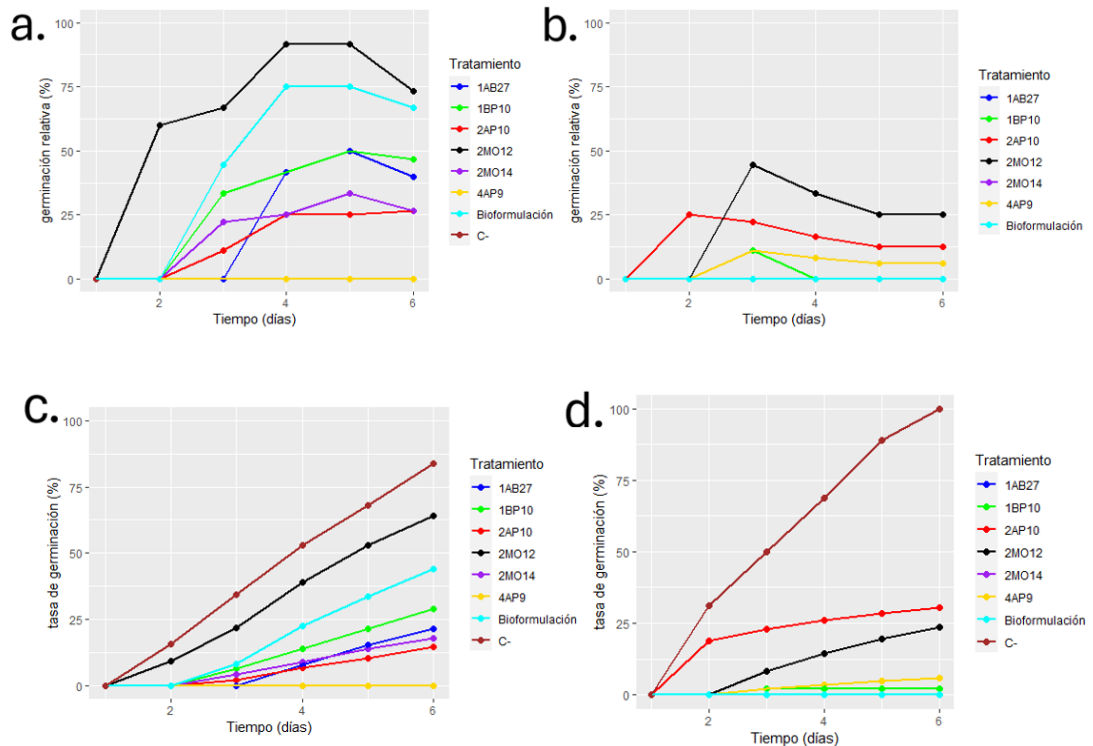
Figura 4. Metodología transformación bacteriana



VIII. RESULTADOS

A. Resultados del crecimiento vegetal

Con el fin de determinar el impacto de las diferentes bacterias y el consorcio sobre las plantas de *Raphanus sativus*, se presentan los resultados de la germinación y desarrollo del crecimiento vegetal. Para la germinación se presenta la tasas e índices de germinación por cada una de las bacterias y el consorcio de estas, utilizando dos diferentes concentraciones bacterianas. En cuanto al desarrollo vegetal, se presentan los resultados de hojas, tallo, raíces y biomasa a las primeras 2 semanas de desarrollo y tras 2 semanas posteriores a un estrés hacía las plantas (trasplante).



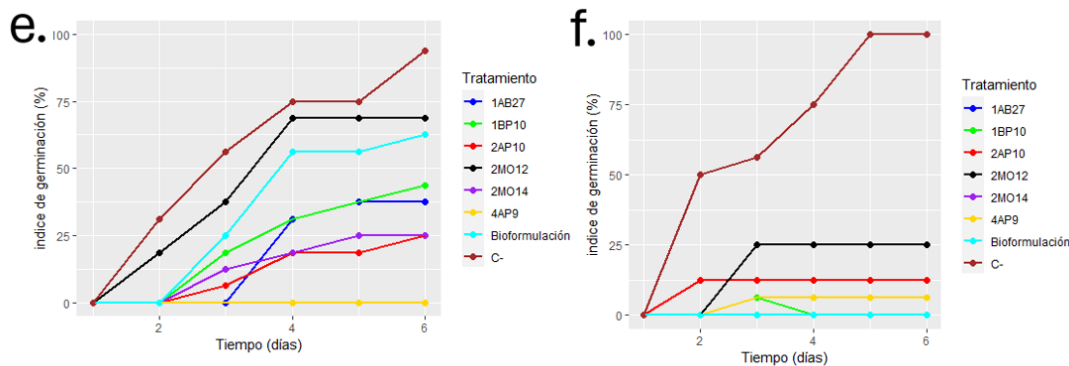


Figura. 5 Efecto del Biocebedo sobre la germinación de las semillas de *Raphanus sativus*, **A, B** Germinación relativa de las semillas de *Raphanus sativus* biocebadadas con una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL (A) y una concentración de $3 \cdot 10^8$ CFU/mL, (B) de las distintas PGPB y bioformulación con respecto al grupo control. C, D Efecto del biocebedo sobre la germinación de las semillas de *Raphanus sativus* a una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL, (C) y una concentración de $3 \cdot 10^8$ CFU/mL, (D) E, F Índice de germinación de las semillas biocebadadas de *Raphanus sativus* a una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL, (E) y una concentración de $3 \cdot 10^8$ CFU/mL (F)

La Figura 5 muestra el impacto de las diferentes concentraciones de biocebedo sobre la tasa e índice de germinación de las semillas *Raphanus sativus* realizadas con cada una de las cepas de las 6 cepas individuales de la bioformulación y el consorcio de estas (bioformulación). Las diferentes gráficas demuestran el efecto de las bacterias sobre la germinación de las semillas y su comparación con respecto al grupo control (semillas no biocebadadas). El biocebedo con una concentración bacteriana de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL (Figura 5 A, C y E) presentó mejores tasas e índices de germinación en comparación de los grupos tratados con una concentración de $3 \cdot 10^8$ CFU/mL (Figura 5 B, D y F). De igual manera se observó que el grupo control presentó las mayores tasas e índice de germinación de las semillas en comparación del resto de tratamientos, seguido de la bacteria 2MO12 en ambos tratamientos. En el caso de la bioformulación se observó mejores índices y tasas de germinación sobre las semillas a una menor concentración de bacterias ($1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL). Estos resultados indican que a mayores concentraciones de biocebedo se ven afectadas las tasa e índice de germinación de las semillas, indicando así que se debe optimizar la concentración de bacterias necesarias para realizar el biocebedo.

Cuadro 3. Efecto del biocebado a una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL sobre el largo de las hojas de las plantas de *Raphanus sativus*

Tiempo	Tratamiento	promedio (cm)	Valor p	Significancia de p
2 semanas	4AP9	1.084	0.0113	*
	Bioformulación	1.406	3.31E-05	****
	2AP10	0.756	0.749	ns
	1AB27	1.113	0.0961	ns
	2MO12	1.077	0.0323	*
	2MO14	1.013	0.0451	*
	1BP10	0.712	0.607	ns
4 semanas	4AP9	1.909	0.0967	ns
	Bioformulación	1.933	0.0307	*
	2AP10	1.530	0.696	ns
	1AB27	1.775	0.353	ns
	2MO12	1.746	0.274	ns
	2MO14	1.741	0.323	ns
	1BP10	1.201	0.422	ns

“****” = valor $p < 0.0001$ (altamente significativo), “***” = valor $p < 0.001$ (muy significativo), “**” = valor $p < 0.01$ (significativo), “*” = $p < 0.05$ (marginalmente significativo), ns = valor $p \geq 0.05$ (no significativo).

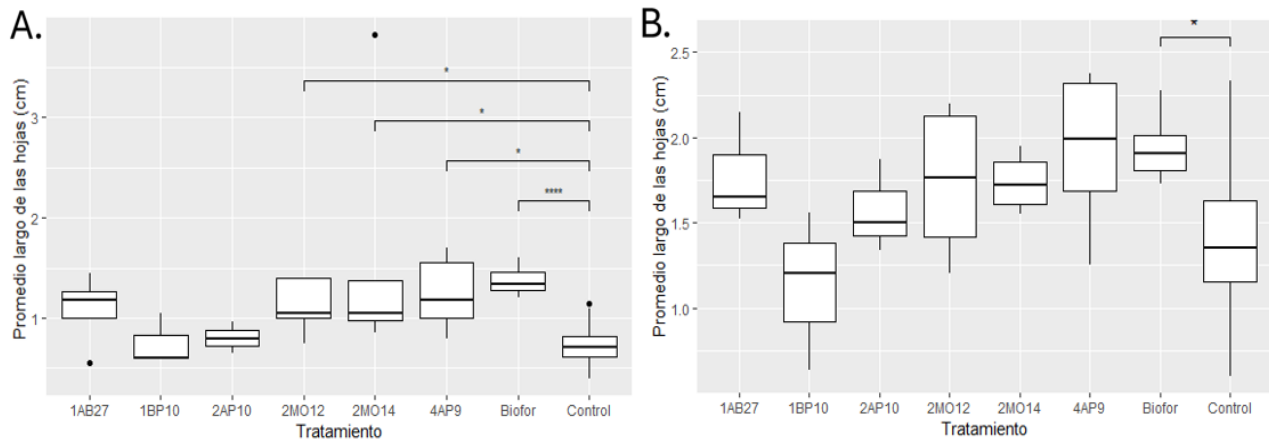


Figura. 6 Efecto de las PGPB y la bioformulación sobre el largo de las hojas de las plantas *Raphanus sativus* **A** durante 2 semanas desarrollo del crecimiento vegetal, **B** durante 2 semanas posteriormente al trasplante vegetal (4 semanas de desarrollo vegetal); **** indica significancia al 0.01 % ($p < 0.0001$), *** significancia al 0.1 % ($p < 0.001$), ** significancia al 1 % ($p < 0.01$ (significativo), * significancia al 5 % ($p < 0.05$), ns sin significancia (valor $p \geq 0.05$).

Se realizaron ensayos para conocer el efecto de cada una de las bacterias como el consorcio de estas (bioformulación) sobre el desarrollo vegetal en plantas de *Raphanus sativus*. En el Cuadro 4 se observa el promedio de largo de las hojas de *Raphanus sativus* según cada tratamiento y su significancia en comparación del largo de las hojas del grupo control. De igual forma en la Figura 6 se observa la

dispersión de los datos según cada tratamiento. Se identificó que a las primeras 2 semanas los tratamientos con las bacterias 2MO12, 2MO14, 4AP9 y el consorcio de las 6 bacterias (bioformulación) tuvieron un impacto significativo sobre el largo de las hojas. Posteriormente tras haber realizado el trasplante únicamente la bioformulación mantuvo el impacto significativo.

Cuadro 4. Efecto del biocebado a una concentración de 1.5×10^8 CFU/mL sobre el ancho de las hojas de las plantas de *Raphanus sativus*

Tiempo	Tratamiento	Promedio (cm)	Valor p	Significancia de p
2 semanas	4AP9	1.084	0.32	ns
	Bioformulación	1.406	0.00124	**
	2AP10	0.756	0.848	ns
	1AB27	1.113	0.312	ns
	2MO12	1.077	0.262	ns
	2MO14	1.013	0.0178	*
	1BP10	0.717	0.848	ns
4 semanas	4AP9	1.295	0.696	ns
	Bioformulación	1.497	0.13	ns
	2AP10	1.230	0.703	ns
	1AB27	1.433	0.468	ns
	2MO12	1.313	0.549	ns
	2MO14	1.282	0.0386	*
	1BP10	0.892	0.869	ns

“*****” = valor $p < 0.0001$ (altamente significativo), “****” = valor $p < 0.001$ (muy significativo), “***” = valor $p < 0.01$ (significativo), “**” = $p < 0.05$ (marginamente significativo), ns = valor $p \geq 0.05$ (no significativo).

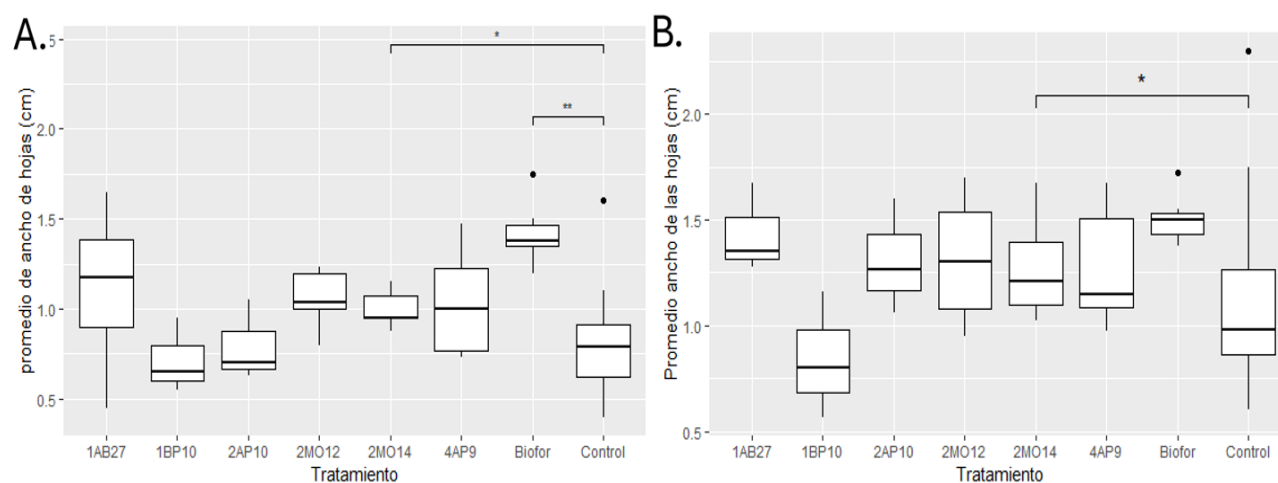


Figura. 7 Efecto de las PGPB y la bioformulación sobre el ancho de las hojas de las plantas *Raphanus sativus* **A** durante 2 semanas desarrollo del crecimiento vegetal, **B** durante 2 semanas posteriormente al

trasplante vegetal (4 semanas de desarrollo vegetal); **** indica significancia al 0.01 % ($p < 0.0001$), *** significancia al 0.1 % ($p < 0.001$), ** significancia al 1 % ($p < 0.01$), * significancia al 5 % ($p < 0.05$), ns sin significancia (valor $p \geq 0.05$).

De igual forma se observó el impacto de las diferentes bacterias como el consorcio de estas (bioformulación) sobre el ancho de las hojas de *Raphanus sativus*. En el Cuadro 5 como en la Figura 7 se observa el promedio del ancho de las hojas por cada tratamiento como su dispersión de los datos. De los datos obtenidos se determinó que la bacteria 2MO14 tuvo un impacto significativo en el ancho de las hojas tanto a las 2 semanas de desarrollo de la planta *Raphanus sativus* al igual que en el trasplante de esta misma. La bioformulación tuvo un impacto significativo solamente en las primeras dos semanas de desarrollo.

Cuadro 5. Efecto del biocebado a una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL sobre la cantidad de hojas desarrolladas de las planta *Raphanus sativus*

Tiempo	Tratamiento	Promedio (cantidad)	Valor p	Significancia de p
2 semanas	4AP9	3	0.0237	*
	Bioformulación	2	0.212	ns
	2AP10	3	0.731	ns
	1AB27	2	0.924	ns
	2MO12	3	1	ns
	2MO14	3	0.499	ns
	1BP10	2	0.72	ns
4 semanas	4AP9	4	0.0813	ns
	Bioformulación	4	0.0105	*
	2AP10	3	0.9	ns
	1AB27	4	0.43	ns
	2MO12	4	0.0204	*
	2MO14	4	0.0418	*
	1BP10	4	0.869	ns

**** = valor $p < 0.0001$ (altamente significativo), *** = valor $p < 0.001$ (muy significativo), ** = valor $p < 0.01$ (significativo), * = $p < 0.05$ (marginalmente significativo), ns = valor $p \geq 0.05$ (no significativo).

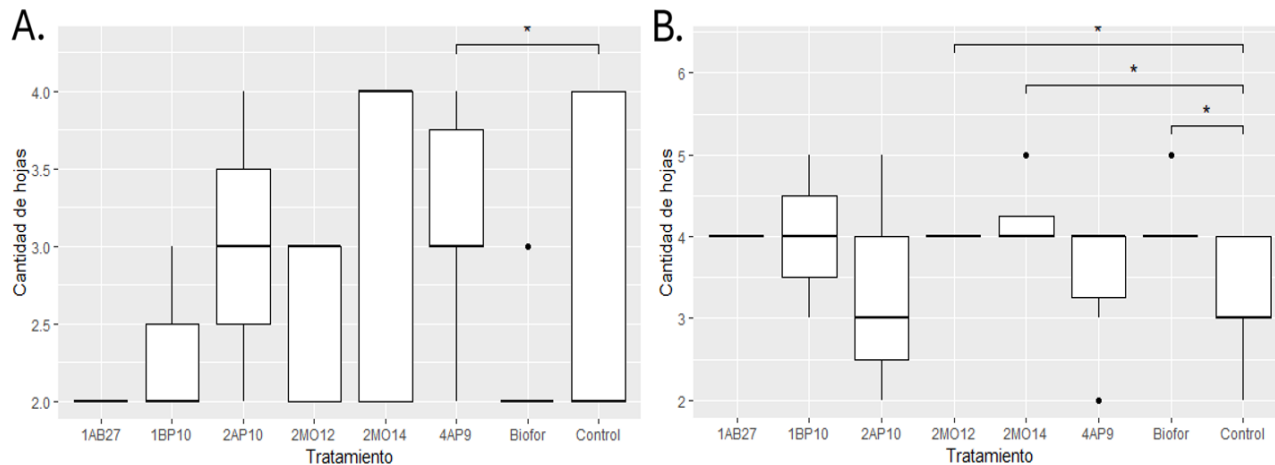


Figura. 8 Efecto de las PGPB y la bioformulación sobre la cantidad de hojas producidas por las plantas *Raphanus sativus* **A** durante 2 semanas desarrollo del crecimiento vegetal, **B** durante 2 semanas posteriormente al trasplante vegetal (4 semanas de desarrollo vegetal); **** indica significancia al 0.01 % ($p < 0.0001$), *** significancia al 0.1 % ($p < 0.001$), ** significancia al 1 % ($p < 0.01$) (significativo), * significancia al 5% ($p < 0.05$), ns sin significancia (valor $p \geq 0.05$).

En el Cuadro 6 y la Figura 8 se observa el efecto de las diferentes bacterias y la bioformulación sobre la producción de hojas por parte de las plantas de *Raphanus sativus*. Se encontró que las bacterias 2MO12 y 2MO14 al igual que la bioformulación tuvieron un impacto significativo sobre la producción de hojas tras haber realizado el trasplante de las plantas (4 semanas de desarrollo vegetal). Por otro lado, solamente la bacteria 4AP9 tuvo un impacto significativo en la producción de hojas en las primeras dos semanas.

Cuadro 6. Efecto del biocebado a una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL sobre el tallo de las planta *Raphanus sativus*

Tiempo	Tratamiento	Promedio (cm)	Valor p	Significancia de p
2 semanas	4AP9	4.450	0.00617	**
	Bioformulación	4.800	9.51E-06	****
	2AP10	3.567	0.502	ns
	1AB27	3.850	0.238	ns
	2MO12	3.120	0.712	ns
	2MO14	4.200	0.0297	*
	1BP10	3.500	0.673	ns
4 semanas	4AP9	4.483	0.8	ns
	Bioformulación	5.413	0.0871	ns
	2AP10	4.100	0.818	ns
	1AB27	5.367	0.331	ns

2MO12	4.450	0.834	ns
2MO14	4.800	0.548	ns
1BP10	3.633	0.503	ns

“****” = valor $p < 0.0001$ (altamente significativo), “***” = valor $p < 0.001$ (muy significativo), “**” = valor $p < 0.01$ (significativo), “*” = $p < 0.05$ (marginamente significativo), ns = valor $p \geq 0.05$ (no significativo).

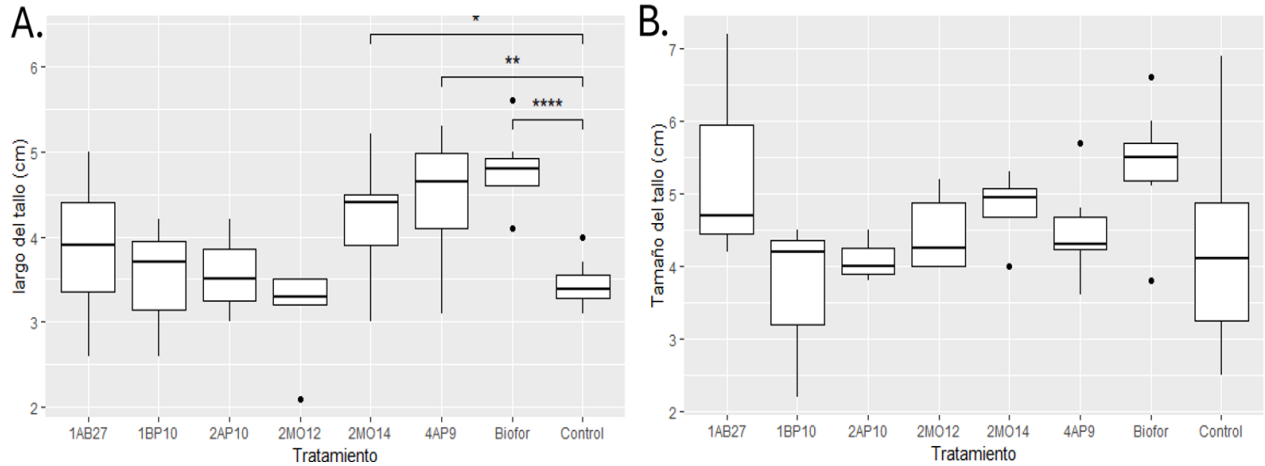


Figura. 9 Efecto de las PGPB y la bioformulación sobre el largo del tallo de las plantas *Raphanus sativus* **A** durante 2 semanas desarrollo del crecimiento vegetal, **B** durante 2 semanas posteriormente al trasplante vegetal (4 semanas de desarrollo vegetal); **** indica significancia al 0.01 % ($p < 0.0001$), *** significancia al 0.1 % ($p < 0.001$), ** significancia al 1 % ($p < 0.01$) (significativo), * significancia al 5 % ($p < 0.05$), ns sin significancia (valor $p \geq 0.05$).

Respecto a la influencia de las diferentes bacterias sobre el largo del tallo la *Figura 9* y *Cuadro 7* se observa tanto la media de los largos de los tallos, así como la dispersión de los diferentes datos obtenidos según cada tratamiento. Se observó que a las dos semanas del desarrollo de las plantas los tratamientos con la bacteria 2MO14, 4AP9 y la bioformulación presentaron mejoras significativas con respecto al grupo control. Sin embargo, posteriormente a las dos semanas del trasplante vegetal todos los tratamientos perdieron su efectividad (*Figura 9 B*).

Cuadro 7. Efecto del biocebado a una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL sobre la raíz de las planta *Raphanus sativus*

Tiempo	Tratamiento	Promedio (cm)	Valor p	Significancia de p
2 semanas	4AP9	4.500	0.193	ns
	Bioformulación	4.263	0.00959	**
	2AP10	3.033	0.499	ns
	1AB27	3.925	0.0967	ns
	2MO12	2.740	0.685	ns
	2MO14	4.060	0.0178	*
	1BP10	2.500	0.915	ns
4 semanas	4AP9	5.217	0.0112	*
	Bioformulación	7.663	0.000931	***
	2AP10	6.700	0.0127	*
	1AB27	5.433	0.0269	*
	2MO12	5.617	0.00515	**
	2MO14	6.850	0.0386	*
	1BP10	3.567	1	ns

**** = valor $p < 0.0001$ (altamente significativo), *** = valor $p < 0.001$ (muy significativo), ** = valor $p < 0.01$ (significativo), * = $p < 0.05$ (marginamente significativo), ns = valor $p \geq 0.05$ (no significativo).

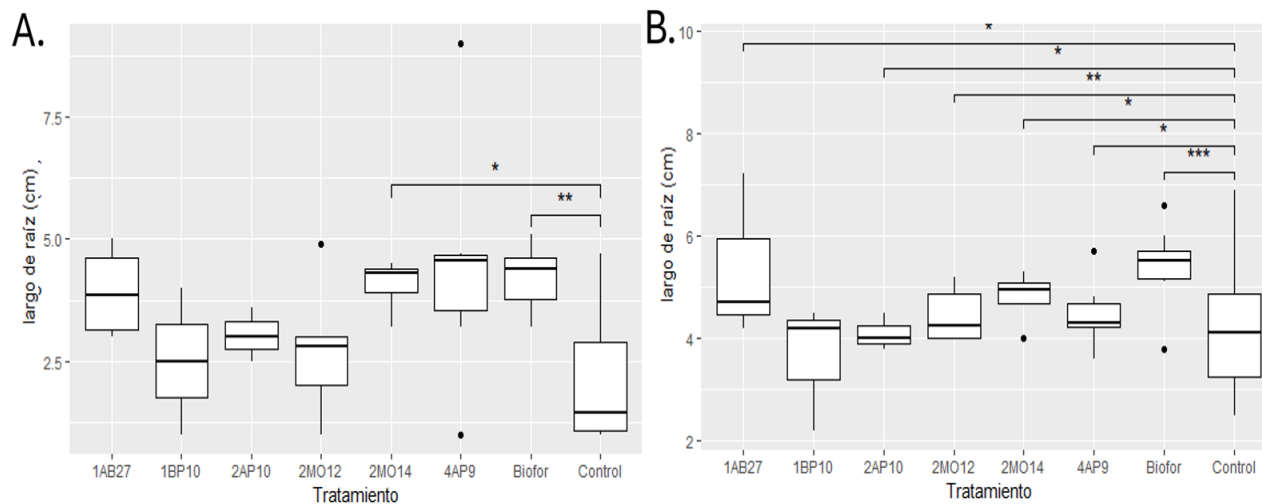


Figura. 10 Efecto de las PGPB y la bioformulación sobre el largo de la raíz de las plantas de *Raphanus sativus* **A** durante 2 semanas desarrollo del crecimiento vegetal, **B** durante 2 semanas posteriormente al trasplante vegetal (4 semanas de desarrollo vegetal); **** indica significancia al 0.01 % ($p < 0.0001$), *** significancia al 0.1 % ($p < 0.001$), ** significancia al 1 % ($p < 0.01$ (significativo), * significancia al 5 % ($p < 0.05$), ns sin significancia (valor $p \geq 0.05$).

Respecto a la raíz se determinó que a las dos semanas del desarrollo vegetal la bioformulación como la bacteria 2MO14 tuvieron un impacto significativo sobre el largo de la raíz (Figura 10 A). Tras las dos semanas posteriores al trasplante se observa que tanto la bioformulación como las bacterias 4AP9, 2MO14, 2MO12, 4AP9, 2AP10 y 1AB27 presentaron mejoras sobre el desarrollo del largo de la raíz (Figura 10 B).

Cuadro 8. Efecto del biocebado a una concentración de 1.5×10^8 CFU/mL sobre el tamaño de las plantas *Raphanus sativus*

Tiempo	Tratamiento	Promedio (cm)	Valor p	Significancia de p
2 semanas	4AP9	10.067	0.00141	**
	Bioformulación	9.913	3.06E-08	****
	2AP10	7.033	0.412	ns
	1AB27	8.650	0.202	ns
	2MO12	6.980	0.463	ns
	2MO14	8.640	0.0478	*
	1BP10	5.800	0.357	ns
4 semanas	4AP9	11.717	0.102	ns
	Bioformulación	14.900	0.000928	***
	2AP10	12.667	0.125	ns
	1AB27	12.433	0.144	ns
	2MO12	12.067	0.0694	ns
	2MO14	13.275	0.024	*
	1BP10	8.600	0.915	ns

**** = valor $p < 0.0001$ (altamente significativo), *** = valor $p < 0.001$ (muy significativo), ** = valor $p < 0.01$ (significativo), * = $p < 0.05$ (marginamente significativo), ns = valor $p \geq 0.05$ (no significativo).

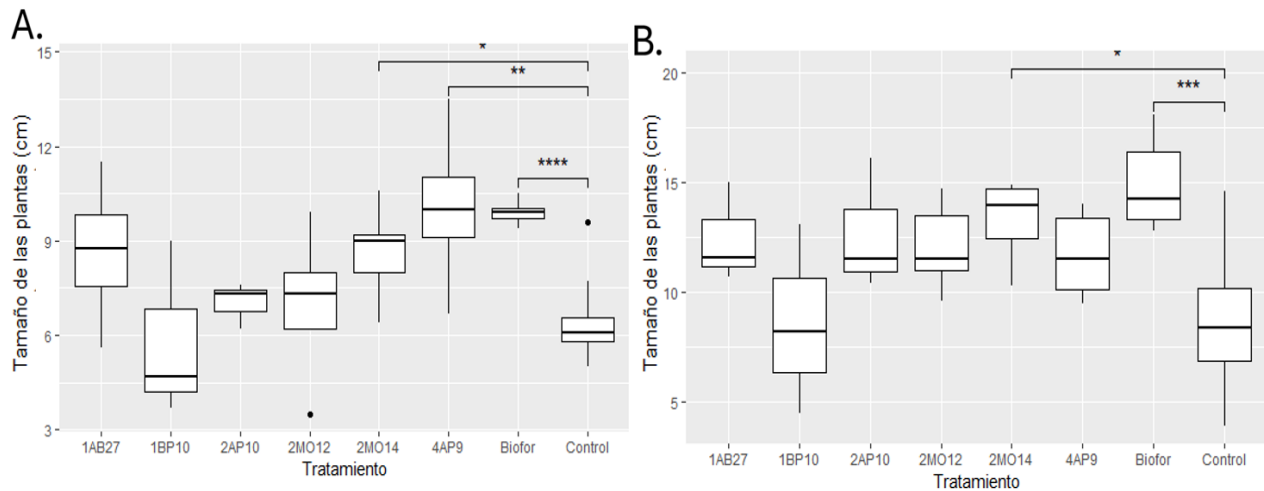


Figura. 11 Efecto de las PGPB y la bioformulación sobre el tamaño de las plantas de *Raphanus sativus* **A** durante 2 semanas desarrollo del crecimiento vegetal, **B** durante 2 semanas posteriormente al trasplante

vegetal (4 semanas de desarrollo vegetal); **** indica significancia al 0.01 % ($p < 0.0001$), *** significancia al 0.1 % ($p < 0.001$), ** significancia al 1 % ($p < 0.01$ (significativo), * significancia al 5 % ($p < 0.05$), ns sin significancia (valor $p \geq 0.05$).

La *Figura 11* y *Cuadro 9* muestran el impacto de los diferentes tratamientos sobre el tamaño de las plantas. La bacteria 4AP9, 2MO14 y la bioformulación presentaron mejoras significativas con respecto al control durante las primeras dos semanas de desarrollo vegetal (*Figura 11 A*). Por otro lado, a las dos semanas posteriores al trasplante vegetal se observa que solo la bioformulación como la bacteria 2MO14 siguieron presentando dicha mejoría.

Cuadro 9. Efecto del biocebado a una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL sobre la biomasa de la planta *Raphanus sativus*

Tiempo	Tratamiento	Promedio (%)	Valor p	Significancia de p
4 semanas	4AP9	27.36	0.0977	ns
	Bioformulación	22.28	0.374	ns
	2AP10	18.83	0.998	ns
	1AB27	23.27	0.48	ns
	2MO12	27.61	0.0838	ns
	2MO14	23.39	0.412	ns
	1BP10	26.13	0.298	ns

***** = valor $p < 0.0001$ (altamente significativo), **** = valor $p < 0.001$ (muy significativo), *** = valor $p < 0.01$ (significativo), ** = $p < 0.05$ (marginamente significativo), ns = valor $p \geq 0.05$ (no significativo).

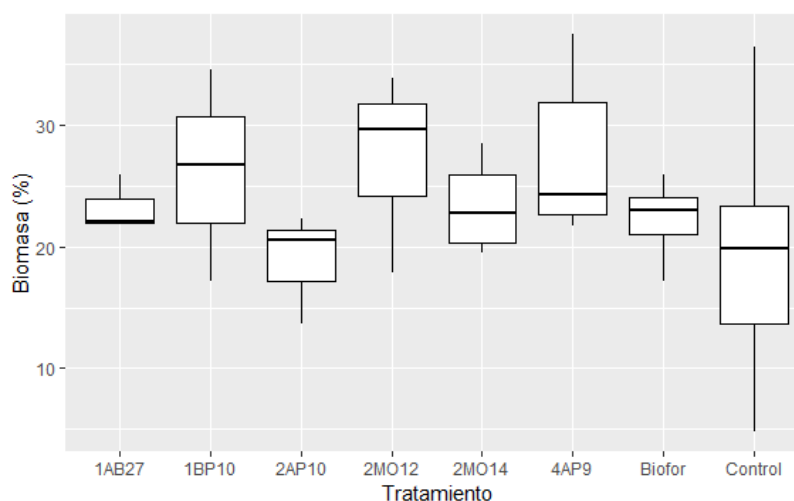


Figura. 12 Efecto de las PGPB y la bioformulación sobre la biomasa de las plantas de *Raphanus sativus*

Por último, se obtuvo la biomasa de las plantas de *Raphanus sativus* según los diferentes tratamientos. El promedio de la biomasa se presenta en el *Cuadro 10*, mientras que la dispersión de los datos, así como la mediana de la biomasa según cada tratamiento se observa en la *Figura 12*. Se observa que la mediana de la biomasa supero el 20 % en los diferentes tratamientos, en comparación del grupo control donde su mediana estuvo al 20 %. De igual manera en la *Figura 13* se observa las plantas de *Raphanus sativus* desarrolladas tras las dos semanas de trasplante (cuatro semanas de desarrollo vegetal).

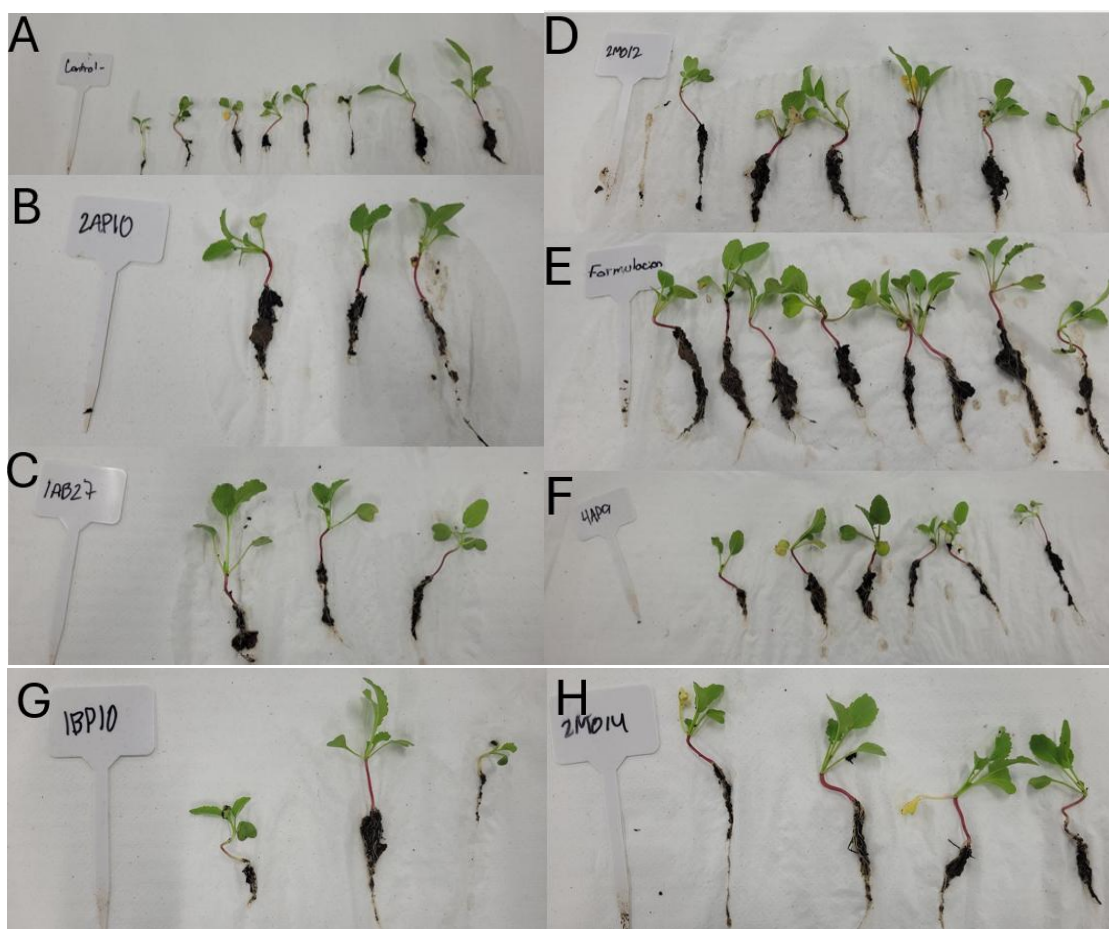


Figura 13. Desarrollo del crecimiento vegetal a las semanas posteriormente del trasplante (cuatro semanas de desarrollo vegetal) **A.** Grupo control, **B.** Plantas tratadas con la bacteria 2AP10, **C.** Plantas tratadas con la bacteria 1AB27, **D.** Plantas tratadas con la bacteria 2MO12, **E.** Plantas tratadas con el consorcio de las bacterias (bioformulación), **F.** Plantas tratadas con la bacteria 4AP9, **G.** Plantas tratadas con la bacteria 1BP10, **H.** Plantas tratadas con la bacteria

B. Resultados del marcaje molecular de las cepas utilizadas para la bioformulación

Cuadro 10. Cuantificación de los productos de la extracción de plásmidos pDawn y pDusk con diferentes kits comerciales

Kit	Plásmido	Concentración ng/uL	A260/A280	A260/A230
PureYield bajo número	pDusk	20.9	1.85	1.79
	pDawn	32.0	1.79	2.27
PureYield Alto número	pDusk	13.6	1.55	0.76
	pDawn	7.5	1.62	1.21
ZymoPURE	pDusk	45.0	2.02	2.49
	pDawn	17.5	2.25	2.32
GenElute	pDusk	20.9	1.84	-2.78
	pDawn	28.7	1.80	-38.09

En el *Cuadro 11* se presentan la concentraciones y purezas de las diferentes extracciones de los plásmidos pDawn y pDusk utilizando los kits de extracción ZymoPURE PlasmidMiniprep Kit y GenElute Plasmid DNA Miniprep Kit Sigma-Aldrich y kit PureYield Plasmid Miniprepr Promega. Las mediciones se realizaron con el espectrofotómetro NanoDrop One marca ThermoScientific. Se obtuvo mayores concentraciones de los plásmidos al realizar el protocolo de bajo número de copias, asimismo, las razones A260/A280 y A260/A230 presentan valores de pureza aceptables para kit PureYield (bajo número de copias) y ZymoPURE.

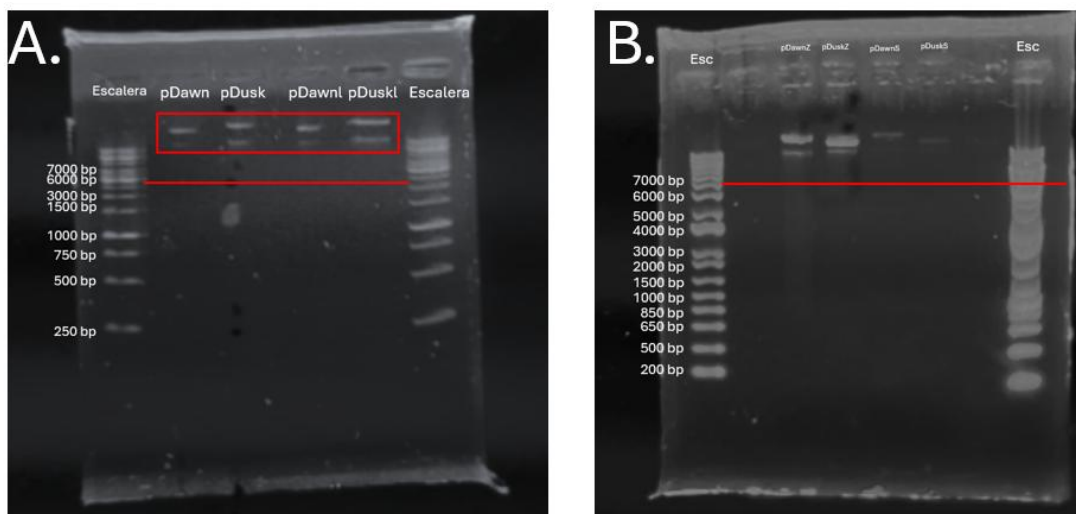


Figura 14. Electroforesis de los productos de la extracción de plásmido pDawn y pDusk con diferentes kits comerciales. **A.** Se observa el producto de la extracción de los plásmidos con el kit PureYield

Plasmid Miniprepr Promega; pDawn: extracción plásmido pDawn con protocolo de alto número de copias, pDusk: extracción plásmido pDusk con protocolo de alto número de copias, pDawnl: extracción plásmido pDawn con protocolo de bajo número de copias, pDuskl: extracción plásmido pDusk con protocolo de bajo número de copias. **B.** Producto de la extracción de plásmidos con los kit ZymoPURE (pozo pDawnZ y pDuskZ) y con el kit GenElute Plasmid DNA Miniprep Kit Sigma-Aldrich (pozo pDawnS y pDuskS). Los geles se realizaron a una concentración de 0.8 % de agarosa y usando una escalera molecular de 1 Kb.

La *Figura 14* se observa la visualización de los resultados de la extracción de plásmidos con diferentes kits comerciales. Se observa que en todas las extracciones no se obtuvo la banda de 6000 bp correspondiente al plásmido pDusk, ni de la banda de 7000 bp correspondiente al plásmido pDawn

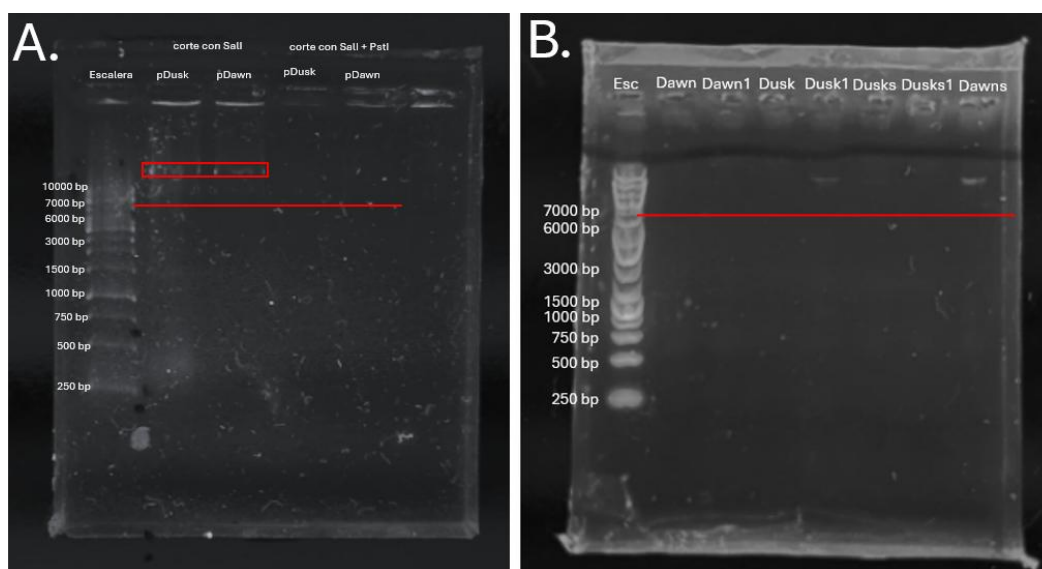


Figura 15. Cortes enzimáticos de los productos de la extracción de plásmido **A.** Producto de los cortes enzimáticos de los productos de la extracción de plásmido con el kit PureYield Plasmid Miniprepr Promega con el protocolo de bajo número de copias. **B.** Producto de la linealización de los diferentes productos de la extracción de plásmido con los kits ZymoPURE PlasmidMiniprep Kit (pozos Dawn y Dusk) y GenElute Plasmid DNA Miniprep Kit Sigma-Aldrich (pozos DawnS y Dusks); los pozos con Dawn1, Dusk1 Y Dusks1 se ajustó la concentración del plásmido a 1 ng/ul. Se utilizaron las enzimas Sall y PstI, la escalera molecular empleada fue de 1Kb, las electroforesis se realizaron en gel de agarosa de 0.8 %.

Se linealizaron los productos de la extracción de plásmidos con la enzima Sall y se realizaron cortes enzimáticos con las enzimas Sall y PstI (*Figura 15*). No se observa la presencia de la banda de 6000 bp

(pDusk) ni de la banda de 7000 bp (pDawn), así como de las bandas de 2000 bp y 4000 bp por el doble corte enzimático (Figura 15 A).

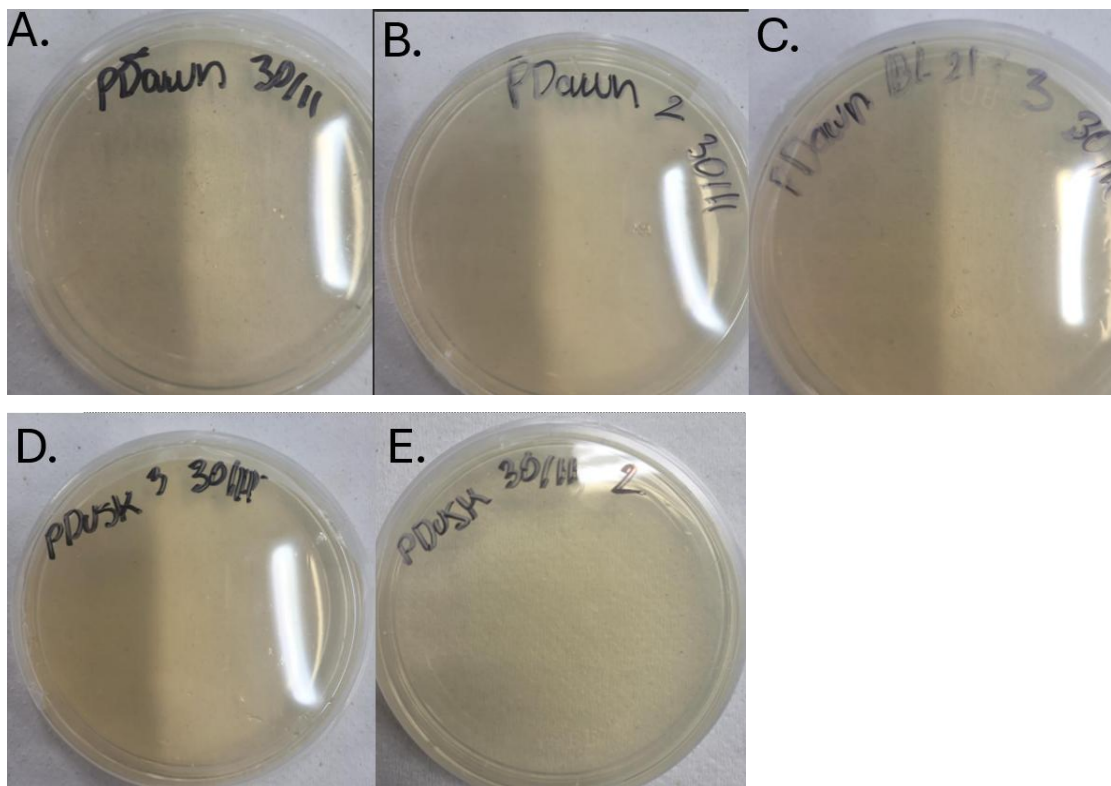


Figura 16. Resultado de la electroporación de *E. coli* BL21 con diferentes concentraciones del producto de la extracción del plásmido **A.** Resultado de la electroporación con 1ug de producto de plásmido (pDawn), **B.** con 2 ug (pDawn), **C.** 3 ug (pDawn), **D.** 3 ug (pDusk) y **E.** 2 ug (pDusk)

Se presentan los resultados de la electroporación de las células bacterianas *E. coli* BL21 con los productos de la extracción de plásmido con el kit PureYield Plasmid Miniprepr Promega utilizando el protocolo de bajo número de copias. Tanto para la transformación con el plásmido pDusk como pDawn no presentaron crecimiento bacteriano en placas de LB con kanamicina (50 ug/mL).

IX. DISCUSIÓN

Las PGPB son un grupo de bacterias las cuales pueden ser aprovechadas como bioproductos para impulsar el crecimiento vegetal de las plantas o ayudar a estas últimas como un método de protección contra virus, bacterias u hongos perjudiciales para las plantas. A pesar de eso, no todos los microorganismos impulsan el crecimiento vegetal de la misma manera, debido a la complejidad del fenómeno de simbiosis entre la planta y la bacteria. Esto es porque involucra la combinación de diferentes mecanismos que pueden afectar los nutrientes disponibles para la planta o en el desarrollo de la raíz (Mantelin y Touraine, 2004). Conforme a esto se evaluó el impacto de las diferentes bacterias propuestas a utilizar para el biofertilizante de forma individual (*Cuadro 2*) y el biofertilizante sobre diferentes características de las plantas de rábano (largo de tallo, largo de raíz, largo de la planta, cantidad de hojas, ancho y largo de las hojas, biomasa) y sobre la germinación de las semillas de rábano.

Las pruebas de crecimiento vegetal y de germinación se realizaron en *Raphanus sativus* como organismo modelo (*Cuadro 14*). Si bien, la caña de azúcar no utiliza semillas para la generación de nuevos cultivos sino trozos de tallo que deben contener como máximo tres yemas o plántulas prebrotadas (tallos los cuales son cultivados en bandejas y se dejan germinar para posteriormente ser cultivados) (Otto et al., 2022; Almeida et al., 2024). Se ha observado que la adición de PGPB en las plántulas prebrotadas han mostrado un mejor desarrollo de las plántulas y una mejor tolerancia a estrés hídrico (Almeida et al., 2024). Este estudio es una primera aproximación entre la interacción de las bacterias con características potenciadoras de crecimiento vegetal (*Cuadro 2 y 14*) y una planta (*Raphanus sativus*) con el fin de conocer el impacto de las bacterias y el consorcio de estas mismas sobre las diferentes características de las plantas. El método de biocebado propuesto para las semillas de *Raphanus sativus* no es similar al utilizado en las plántulas prebrotadas de caña de azúcar, pero permite identificar una concentración óptima de bacterias con el fin de evitar competencia con la planta. Dicha concentración puede llegar a usarse para un futuro estudio donde se aplique las bacterias con características potenciadoras de crecimiento vegetal en plántulas pre-brotadas de caña donde el método de biocebado debe de realizarse a nivel de sustrato (Almeida et al., 2024; Mitra et al., 2021).

En el caso de la germinación de las semillas de *Raphanus sativus*, se observó el efecto del biocebado sobre las tasas de germinación de las semillas bajo diferentes concentraciones de bacterias (Figura 5). Se observó que las variaciones en la concentración de bacterias a las cuales son sometidas las semillas tienen un impacto sobre las tasas de germinación de las semillas (Figura 5 C y D). Una concentración de $1.5 \cdot 10^8$ CFU/mL presentó mejores tasas de germinación en comparación de una concentración de $3 \cdot 10^8$ CFU/mL, sin embargo, en ambas concentraciones ninguna de las bacterias ni la bioformulación presentó mejoras en comparación del grupo control. Una de las causas principales que pudo afectar la germinación en ambas concentraciones de bacterias, es la concentración de IAA expresada por las bacterias. Si bien la fitohormona IAA (ácido indol acético) impulsa el desarrollo y crecimiento de la planta como la tasas de germinación de las semillas, se ha demostrado que altas concentraciones de IAA (1mM) presentes en la semilla logra inhibir el crecimiento y posee efectos negativos tanto en la fisiología de la planta y promueve una latencia de las semillas (Machado-de-Lima et al., 2023). Asimismo, si la cantidad de IAA presente para la planta no es suficiente la germinación de las semillas no presenta mejoras, siendo que dicha mínima cantidad de IAA varía entre las diferentes plantas siendo un estándar una concentración de $1 \cdot 10^{-7}$ M (Lam et al., 2020). Las bacterias que poseen menor producción de IAA de forma individual presentaron las mejores tasas de germinación de las semillas de *Raphanus sativus*, siendo estas la bacteria 2MO12 y 1BP10 (Figura 5 y 14) De igual manera se ha demostrado que mayores concentraciones de bacteria al momento de realizar el biocebado genera una competencia por los nutrientes. Esto ocasiona que los nutrientes disponibles para la semilla se vean reducidos desembocando así una pobre germinación por parte de las semillas (Mitra et al., 2021).

Al observar la germinación relativa de los diferentes tratamientos respecto al control (Figura 5 A y B) se observa que en ambos tratamientos del biocebado la bacteria 2MO12 es la que presenta la mayor germinación. Esto concuerda con otros estudios donde la bacteria *Bacillus subtilis* ha presentado un gran mejoramiento en las tasas de germinación y desarrollo de la planta en condiciones de estrés abiótico, debido a sus mecanismos de protección a las células de las plantas y su mejora en la disponibilidad de nutrientes para la planta (Song et al., 2023; da Silva et al., 2024). Sin embargo, es necesario identificar la concentración ideal de bacteria para realizar el biocebado, así como identificar la temperatura y tiempo adecuado de remojo de las semillas, debido a que estos pueden llegar a variar en función de la bacteria que se va a utilizar (Mahmood et al., 2016). Para el caso de *B. subtilis* se recomienda realizar el biocebado a 25 °C durante 5 horas (Miljaković et al., 2022), en lugar de las 3 horas empleadas por limitaciones de tiempo.

La raíz es la parte de la planta que se encarga de absorber agua y minerales, por lo general dicha estructura suele encontrarse bajo suelo, además dicha estructura sirve como un anclaje para las plantas (Starr et al., 2009). Se encontró que a las 2 semanas de cultivo la Bioformulación tuvo un mayor impacto en el largo de las raíces seguido de 2MO14. Dicho patrón se volvió a evidenciar a las 4 semanas donde la bioformulación tuvo el mayor impacto seguido de 2MO12, 4AP9, 2AP10, 1AB27 y 2MO14. Esto indica que las bacterias 4AP9, 2AP10, 2MO12, 2MO14 y 1AB27 tienen un efecto positivo sobre el desarrollo de la raíz en la planta durante el cultivo por 1 mes. Dicha diferencia en ambos tiempos radica principalmente en el estrés ocasionado hacia la planta durante el trasplante (fluctuaciones en la temperatura, sequía y salinidad) a las 2 semanas de desarrollo, donde al momento de sembrar las plantas se observó la capacidad de las PGPB en soportar el estrés ocasionado por el trasplante y como la presencia de ciertas fitohormona como el IAA impulsa un correcto desarrollo de la plantas de *Raphanus sativus* tras dicho estrés (Poria et al., 2022; Lam et al., 2020).

Una posible causa en la falta de desarrollo de la raíz durante las primeras dos semanas del cultivo pudo haber sido por una reducción del crecimiento de la raíz principal. Esto debido a que se ha demostrado que algunas PGPB pueden ocasionar la reducción de la raíz principal, pero aumenta el número y/o longitud de las raíces laterales, mejorando de esa forma la absorción del agua y nutrientes (Grover et al., 2021), sin embargo, es necesario evaluar la longitud de la raíz principal debido a que un aumento en la longitud de esta raíz permite una mayor exploración en las capas de la tierra y una mayor eficiencia de la toma de nutrientes para la planta, asimismo, la raíz principal determina la organización de las raíces laterales (Tajima, 2021). Por lo que un aumento en el número o longitud de las raíces laterales pudo haber ocasionado que las cepas 2MO12, 4AP9 y 2AP10 no hayan mostrado un aumento estadísticamente significativo (respecto al grupo sin biocebado) en el tamaño de la raíz principal durante las primeras dos semanas. Dicho comportamiento se ha demostrado en algunas especies de *Bacillus* (por ejemplo, *B. megaterium*), donde estas mostraron inhibición en la raíz primaria, pero aumento en la número de raíces laterales, esto ocasionado por la reducción de la elongación y proliferación celulares del meristemo, los cuales se han visto que se encuentran afectados por mecanismos independientes de auxinas y etileno (López-Bucio et al., 2007). Por ello, es necesario identificar el índice LRI para identificar el número de primordios de raíz lateral iniciados en una porción de la raíz principal en una longitud de 100 células corticales (Dubrovsky et al., 2009).

Otra parte fundamental de las plantas son los tallos. Estos soportan el crecimiento hacia arriba de las plantas brindando una ventaja así a las células captadoras de luz solar y permite la conexión entre las hojas y flores con las raíces permitiendo el flujo de agua y nutrientes hacia toda la planta (Starr et al., 2009). En cuanto al crecimiento del tallo, se encontró que a las dos semanas del cultivo de las plantas la bioformulación presentó un mayor efecto sobre el largo del tallo seguido por la bacteria 4AP9 y 2MO14 (*Cuadro 6*). Mientras que al mes de haber sido cultivadas las plantas ninguna de las bacterias ni la formulación presentó mejorías en comparación del control. En comparación del resto de parámetros el tallo fue el único que mostró la ausencia de un mejoramiento significativo en comparación del control al realizar el resembrado de las plantas (*Figura 9*). Esto indicaría que ninguno de los tratamientos potencia el crecimiento del tallo durante largos periodos de tiempo. Dicha falta de influencia por parte de las PGPB puede ser ocasionadas por la baja concentración de IAA (concentración menor a $1 \cdot 10^{-7}$ M) al momento de realizar las resiembras de las plantas. Principalmente se ha observado que las PGPB expresan diferentes niveles de IAA según la etapa de desarrollo de la planta y por las condiciones ambientales de las plantas. Se ha encontrado que durante las etapas de floración la cantidad de IAA expresadas por las bacterias para disposición de la planta disminuye considerablemente, mientras que durante la fase de formación de raíces las concentraciones de IAA aumentan con el fin de mejorar su formación (Rocha et al., 2022; Lopes et al., 2021).

Otro factor que pudo afectar en el crecimiento del tallo fue la concentración de giberelinas que fueron secretadas por las bacterias tras la resiembra de la planta. Esta fitohormona estimula el crecimiento de la planta por medio de la activación de diversos procesos de crecimiento, como la elongación del tallo (Gómez-Godínez et al., 2023). Para la bioformulación se utilizó bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* los cuales han demostrado una capacidad de producción de giberelinas (Gómez-Godínez et al., 2023). Por lo mismo determinar las concentraciones de IAA y giberelinas durante las primeras dos semanas y posteriormente a la resiembra de las plantas, brindaría un mejor panorama sobre el efecto de ambas fitohormonas en los diferentes estadios de la planta.

Otro parámetro observado fue la producción de hojas por parte de la planta bajo los efectos de las diferentes bacterias y la bioformulación (*Cuadro 5 y Figura 8*). Se observa que durante las primeras dos semanas la bacteria 4AP9 posee un aumento significativo en la formación de hojas, el cual pierde a las dos semanas posteriores de resiembra. En el caso de la bioformulación, la bacteria 2MO14 y 2MO12 se presenta un aumento significativo de la cantidad de hojas en comparación del control. Esto concuerda con estudios anteriores donde se ha demostrado que la bacteria *Bacillus subtilis* es capaz

de mejorar tanto la cantidad de hojas producidas como el área de las hojas producidas por las plantas (Badar et al., 2022), asimismo el generó *Burkholderia* ha demostrado mejoras en la hojas producidas por las plantas incrementando el área de las hojas y el contenido de clorofila de estas mismas (dos Santos et al., 2022). Esto concuerda con los datos obtenidos donde la bacteria 2MO12 presentó una mejora en el largo de las hojas las primeras dos semanas del crecimiento vegetal (*Cuadro 3 y Figura 6.B*). Dicha mejora en la producción de hojas permite a la planta mejorar las tasas de fotosíntesis el cual es un proceso vital para el crecimiento de la planta como su producción de energía (Badar et al., 2022).

Si bien no todos los tratamientos presentaron mejoras en los rasgos físicos de las hojas (ancho, largo y producción de hojas), estos pudieron haber afectado la biodisponibilidad de nutrientes para las hojas. Se ha demostrado que la presencia de PGPB en las plantas incrementa la disponibilidad de nitrógeno, fósforo y potasio presentes en las hojas en comparación de las plantas sin tratamiento con PGPB. Esto indica que los mecanismos de fijación de nitrógeno y solubilización de fósforo o potasio permite una mejor absorción de nutrientes por parte de la planta (Badar et al., 2022). Para realizar una cuantificación de los macronutrientes y micronutrientes presentes en las hojas de las plantas de interés se puede realizar el método de combustión y el método digestión con ácido nítrico de los tejidos vegetal y su posterior análisis con espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (Lu et al., 2022). De igual forma las PGPB pueden contribuir a la salud de la hoja por medio de la expresión de ACC-desaminasa, logrando disminuir los niveles etileno en el ambiente. Dicha reducción de etileno es necesaria debido a que altos niveles de etileno ocasionan clorosis foliar, necrosis, senescencia, reducción de fotosíntesis, expansión de hoja y efectos negativos sobre el desarrollo de la raíz (Lopes et al., 2021).

Al observar las diferentes características morfológicas de las plantas se obtuvo que la bioformulación tuvo un impacto positivo sobre el desarrollo de las diferentes partes de la planta durante las primeras 2 semanas de desarrollo de las plantas. Sin embargo, tras realizar los cultivo durante 4 semanas se observan diferentes tendencias en la actividad de la bioformulación, siendo estos: un aumento en la efectividad (raíces y cantidad de hojas), una disminución en la mejora (largo de hojas y tamaño de la planta) o una nula mejoría (ancho de las hojas y tallo). Dichas disminuciones pueden ser atribuidas a una competencia por parte de las mismas bacterias presentes en la bioformulación. Si bien las bacterias propuestas para la bioformulación (*Cuadro 2*) no presentan antagonismo, existe cierta competencia por los nutrientes presentes en el medio. Siendo que los modelos de cinética microbiana mencionan que la demanda de individual de un microorganismo, su tasa de consumo de nutrientes y

la disponibilidad de dicho nutriente ocasione el predominio de algún taxon de microorganismo. Siendo que algunos microorganismos pueden coexistir de manera estable, mientras que otros serán superados por la limitación de nutrientes (Hibbing et al., 2010). Adicionalmente las altas fluctuaciones en las condiciones de temperatura y humedad durante el desarrollo de la planta (*Cuadro 12*) pudieron haber afectado la disponibilidad de los diferentes microorganismos. Esto debido a que cada microorganismo posee condiciones ideales en las cuales proliferaran de mejor manera, pero condiciones climáticas como la temperatura, pH, humedad, salinidad, entre otros son capaces de afectar tanto el crecimiento y sobrevivencia de los microorganismos, así como afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas (Naik et al., 2020).

Algo importante a destacar es que la bacteria 1BP10 no presentó ninguna tipo de mejora significativa en comparación del control en ninguno de las características evaluadas de las plantas. Si bien *Bacillus paramycoides* ha demostrado poseer la capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fosfato, producción de fitohormonas y actividad antimicrobiana (*Cuadro 14*) las cuales son características beneficiosas para las plantas, se sigue evaluando su aplicabilidad en las plantas para el crecimiento de los cultivos (Mghazli et al., 2022).

Los resultados del crecimiento vegetal en el modelo propuesto en *Raphanus sativus* puede verse reflejado al momento de ser aplicado para plantas dicotiledóneas. Esto debido a que se han evaluado diferentes biofertilizante/bioformulaciones en diferentes ambientes y cultivos, siendo que estos suelen expresar beneficios similares que en la planta modelo (planta donde se evaluó el biofertilizante de manera *in vitro* o en condiciones controladas) (Khan et al., 2023). Sin embargo, al verse aplicados en modelos monocotiledóneos se pueden presentar limitaciones ocasionadas por las diferencias morfológicas. En este estudio, se optó por evaluar las diferentes bacterias y la formulación en cultivos de rábano debido principalmente a su corto ciclo de crecimiento siendo que se desarrollan los cultivo en un periodo de 24 a 30 días. De igual forma fue utilizado por su versatilidad de cultivo debido a su pequeño tamaño y por su desarrollo de hojas de forma regular que permite determinar fácilmente los parámetros de crecimiento de las hojas (Kostka-Rick y Manning, 1993). En base a los resultados obtenidos se propone una nueva formulación utilizando las bacterias 2MO12, 2MO14 y 4AP9 debido a su potenciación del desarrollo de las diferentes características de las plantas.

En el caso de su aplicación en *Saccharum officinarum*, al ser una planta monocotiledónea, la efectividad de la bioformulación puede verse reducida principalmente por las diferencias anatómicas entre las monocotiledóneas (*Saccharum officinarum*) y las dicotiledóneas (*Raphanus sativus*). Una de

las principales diferencias ocurre en el desarrollo de las raíces, ya que las monocotiledóneas reemplazan su raíz principal rápidamente por raíces adventicias que crece como extensiones del tallo (Starr et al., 2009). Esta diferencia anatómica ocasiona que las PGPB no se adhieran de forma similar al sistema de raíces de las monocotiledóneas. Además, las plantas secretan diferentes exudados desde sus raíces los cuales poseen un control considerable sobre los microorganismos que se asocian hacia ella misma, por lo que la variación en la exudación radicular en la planta afecta la composición y abundancia de la microbiota asociada a la raíz, dificultando así la adhesión de las PGPB (Backer et al., 2018). Por último, las respuestas ante el estrés sometido a las plantas (como el trasplante) pueden llegar a variar debido a la diferencia en la sensibilidad de las monocotiledóneas, ya que estas reducen la producción de biomasa, raíces y brotes hasta un 90 % ante estrés hídrico, en comparación con las dicotiledóneas, las cuales reducen su producción hasta el 50 % (Braghiere et al., 2020).

Debido a las razones anteriormente descritas, es necesario realizar una transición de un modelo dicotiledóneo a uno monocotiledóneo. El biocebado puede realizarse en plantas monocotiledóneas como el maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*) o *Brachypodium distachyon* para conocer el impacto de las PGPB en una planta monocotiledónea. Estas plantas se pueden utilizar como modelos principalmente debido a la caracterización de su genoma y la composición de sus exudados (Strable y Scanlon, 2009; Yordem et al., 2011). Respecto al maíz se ha observado un incremento de hasta el 16 % de los cultivos al ser estos tratados con PGPB, aunque el tiempo de cultivo puede ser una limitante, llegando a tardar hasta 90 días (Katsenios et al., 2022). Por otro lado, *Brachypodium distachyon* posee una mayor facilidad de cultivo debido a su menor tamaño y posee un menor tiempo de desarrollo vegetal, que puede ser de hasta 40 días (Yordem et al., 2011). Además, se han realizado estudios de la colonización de las raíces de *Brachypodium distachyon* por parte de bacterias fijadoras de nitrógeno mostrando mejoras en su crecimiento (Yang et al., 2022). Respecto al arroz, se han realizado pruebas con PGPB donde se ha observado un incremento del 17 % de la longitud de la raíz y el aumento del 18 % de área superficial de las raíces (Mahreen et al., 2023). Por último, se puede realizar una caracterización de la transcriptómica de las bacterias al encontrarse con los exudados de las plantas monocotiledóneas, de esta forma se puede obtener las respuestas celulares y fisiológicas que establecen las interacciones mutualistas entre las PGPB y la planta huésped (Mavrodi et al., 2021).

Para la aplicación de biofertilizantes en campo utilizando PGPB se desea conocer si los organismos introducidos lograron colonizar y permanecer junto al ambiente de la planta. Sin embargo, factores ambientales y la competencia con la microbiota propia de la planta puede disminuir la sobrevivencia de las PGPB aplicadas a las plantas (Naik et al., 2020). Debido a eso se han empleado métodos

moleculares los cuales permitan el monitoreo de los microorganismos aplicados por medio de la detección de polimorfismos con ayuda de técnicas como PCR o FISH (Manfredini et al, 2021), sin embargo, en esta ocasión se optó por un método fluorescente para el monitoreo de las bacterias aplicadas. El uso de marcajes fluorescentes de las bacterias por medio de la adición de un plásmido el cual permita una expresión de una proteína fluorescente por parte de la bacteria ha permitido el estudio del comportamiento individual y colectivo de las bacterias de interés (Schlechter et al., 2018).

Debido a esto, se deseaba realizar un marcaje molecular de las cepas bacterianas utilizadas en la bioformulación para su monitoreo. Para ello, se utilizaron los plásmidos pDawn y pDusk, los cuales permiten la producción de proteínas recombinantes fluorescentes mediante la inducción de la luz. El plásmido pDusk en ausencia de luz permite la expresión de la proteína fluorescente roja (RFP), mientras que pDawn permite la expresión de la RFP en presencia de luz (Ohlendorf et al., 2012). Gracias a dicha facilidad respecto al uso de los plásmidos se trataron de realizar extracciones estos de una *E. coli BL21* comercial la cual poseía los plásmidos. Sin embargo, al momento de realizar la extracción, no se visualizó la presencia del plásmido (*Figura 14*).

Al observar la ausencia de la banda correspondientes a los plásmidos, se optó por realizar diferentes extracciones utilizando diferentes kits comerciales (*Figura 14* y *Cuadro 11*). Las purezas y concentraciones de las extracciones de plásmido fueron medidas por medio de espectrofotometría con el equipo NanoDrop One (*ThermoFisher Scientific*), donde se observaron diferencias tanto en la concentración como pureza del producto (*Cuadro 11*). El kit que mostró mejor pureza fue el PureYield Plasmid Miniprep Promega con el protocolo para bajo número de copias, seguido del kit ZymoPURE. Esto debido a que un ADN puro es aceptado como puro cuando la tasa de las absorbancias de la muestra a longitudes de onda de 260/280 nm se encuentra alrededor del rango de 1.8-2.0, mientras que una tasa de A260/A230 se encuentre en el rango de 2.0 a 2,2 (Matlock, 2015). En el caso del kit GenElute y el PureYield Plasmid Miniprep Promega con el protocolo para alto número de copias, se observa una contaminación ocasionada por la presencia de fenoles, guanidina o carbohidratos los cuales afectan los valores de las absorbancias A260/A230 al igual que el valor de A260/A280 (*ThermoFisher Scientific*, 2009).

El haber obtenido mejores purezas y concentración para los plásmidos con el kit PureYield Plasmid Miniprep Promega con el protocolo para bajo número de copias, es coherente debido a que los plásmidos son de bajo número de copias (Ohlendorf et al., 2012). Sin embargo, a pesar de tener una óptima concentración y pureza no presentó la banda de 6000 bp (pDusk) o 7000 bp (pDawn) (*Figura*

14) indicando así que no se logró extraer el plásmido de forma correcta o la falta de migración del plásmido en la electroforesis. En caso de no haber logrado haber extraído el plásmido existen diversas causas, primeramente, la aireación del cultivo no pudo ser la óptima, se debe de asegurar una correcta aireación para obtener la cantidad de biomasa óptima a la cual se le extraerá el plásmido (Promega, 2024). En este estudio se utilizó una aireación 1:3 (33 cultivo, 67 % aire) en su lugar se recomienda utilizar un volumen 1:4 (20 % cultivo, 80 % aire) o un volumen 1:5, asimismo es recomendable utilizar matraces con deflectores y determinar una velocidad de agitación que rondé los 200 a 300 rpm (Promega, 2024; Zymo Research, 2023).

Otra de las causas que pudo afectar fue un sobrecrecimiento de la bacteria, para esto es necesario identificar una absorbancia a una longitud de onda de 600 nm que se encuentre entre 0.2 a 0.35 o de 2 a 4 esto varía según el kit a utilizar. Dicha variación en las absorbancias afecta principalmente a la lisis celular donde una gran cantidad de células bacterianas presentes evita la correcta lisis de estas impidiendo la obtención del plásmido (Sigma-Aldrich, 2014; Zymo Research, 2023). Asimismo, los kits comerciales se basan en el método de desnaturalización alcalina con SDS esto permite aprovechar la desnaturalización y renaturalización del ADN plasmídico para separarlo del ADN cromosómico (Promega, 2024). Sin embargo, la lisis alcalina es susceptible a prolongados tiempos, así como a las agitaciones bruscas esto puede ocasionar que se corte el ADN genómico y este se una a la matriz de la columna contaminando la preparación (Sigma-Aldrich, 2014; Zymo Research, 2023). De igual forma, se ha observado que las cepas de *E. coli* varían en su susceptibilidad a la lisis alcalina por lo que es necesario identificar el tiempo y mezclas correctos de la cepa bacteriana para evitar la desnaturalización del ADN plasmídico (Zymo Research, 2019). Asimismo, tratar de utilizar otros métodos de extracción de plásmido como el método de SDS con sal o el método de ebullición rápida para conocer si se logra extraer los plásmidos con otro método de purificación (Promega, 2024).

Con el fin de conocer si el producto de la extracción del plásmido se encontraba superenrollado, se realizaron cortes con enzimas de restricción SalI y PstI. Sin embargo, no se observó la presencia de la banda linear del plásmido, ni de los cortes enzimáticos (*Figura 15*). En base a esto indicaría que la banda obtenida de la extracción no eran el plásmido pDawn ni pDusk en cualquiera de los 3 kits comerciales. Esto fue corroborado por la electroporación donde al aumentar la cantidad de producto de la extracción de plásmido no se logró observar la presencia de bacterias transformadas debido al nulo crecimiento en las placas (*Figura 16*). Una forma de optimizar y corroborar los cortes enzimáticos es aumentar la concentración de la enzima para asegurar mayor eficiencia de corte,

asimismo agregar etanol al producto permite la precipitación del ADN plasmídico y permite la remoción de sales (Promega, 2024).

Algo importante a señalar es la presencia del plásmido pDawn y pDusk en *E. coli* siendo esto evidenciado por la presencia de fluorescencia al momento de realizar los cultivos bacterianos (*Figura 17*). Esto sugiere que las bandas obtenidas en la electroforesis de las extracciones de plásmido corresponden al plásmido junto con la presencia de ADN genómico bacteriano (*Figura 14*). Debido a dicha mezcla entre ADN genómico y ADN plasmídico las concentraciones de ADN plasmídico obtenidas pueden verse reducidas. Por lo tanto, se recomienda realizar una doble cuantificación por medio de espectrofotometría y fluorometría para corroborar la concentración de ADN presente en el producto de la extracción. La fluorometría permite una mejor cuantificación del ADN al realizar una coloración de este por medio de un colorante intercalante, lo que ocasiona que este se una a las cadenas de ADN y la fluorescencia emitida se relacione con la concentración de ADN existente (Brujins et al., 2022). Esto permite una mejor estimación de la concentración del ADN extraído ya que se ha observado que las estimaciones con espectrofotometría muestran inexactitud al momento de ser comparados con los resultados de una estimación con fluorometría (Paul et al., 2021).

La disminución ocasionada por la contaminación de ADN genómico en el producto de la extracción ocasiona dificultades al momento de realizar transformaciones bacteriana, ya que reduce la frecuencia de transformación ocasionada por una introducción aleatoria entre ADN plasmídico y ADN genómico (Classe et al., 2002). Al momento de realizar una electroporación con baja concentración de ADN ocasiona que el complejo ADN/membrana necesaria para una transformación exitosa se vea reducido ocasionando una reducción en la expresión del gen exógeno (Chopra et al., 2020). En casos donde el ADN plasmídico se ve reducido en concentración por la presencia de ADN genómico, se recomienda cuadruplicar el volumen de ADN plasmídico extraído con el fin de mejorar las tasas de transformación de las bacterias (Borralho et al., 2002).

Para mejorar las tasas de transformación de las células bacterianas, se puede realizar una purificación del ADN plasmídico del ADN genómico realizando una lisis alcalina del producto de la extracción con un kit comercial. Además, se puede realizar una cromatografía de afinidad de metales inmovilizado para separar el ADN plasmídico circular del ADN genómico (Cano et al., 2005). Finalmente, en caso de no lograr una purificación del ADN plasmídico se puede modificar la composición iónica del búfer de electroporación alterando las concentraciones de los cationes de calcio y magnesio. Ambos cationes son necesarios para la formación del complejo ADN

plasmídico/membrana; sin embargo, altos niveles de magnesio llevan a una mayor viabilidad celular tras la transformación, pero una menor efectividad de la transformación. En el caso del calcio, encontrar la concentración ideal de este catión (puede rondar entre los 20-100 mmol/L) permite la mayor expresión del transgén (Radzevičiūtė-Valčiukė et al., 2024; Sherba et al., 2020).

X. CONCLUSIONES

- El modelo de biocebado sobre semillas no es aplicable sobre cultivos de caña de azúcar, sin embargo, se identificó que altas concentraciones de bacteria tiene un impacto negativo sobre las tasas de germinación de las semillas, siendo esto ocasionado principalmente por una competencia de los nutrientes entre las bacterias y las semillas.
- La bioformulación presentada con las bacterias 1AB27, 1BP10, 2MO12, 2MO14, 2AP10 y 4AP9 presentó mejoras significativas en características del crecimiento vegetal como un aumento en el tamaño de raíces, tallo, planta, aumento de cantidad de hojas y largo de las hojas a lo largo de las 4 semanas de desarrollo de las plantas.
- Tras realizar la resiembra de las plantas por dos semanas adicionales, la bioformulación presentó 3 diferentes comportamientos: un aumento en la efectividad reflejado en el tamaño de raíces y cantidad de hojas, una disminución en la efectividad reflejado en el largo de las hojas y tamaño de la planta o una ausencia de la efectividad reflejado en el ancho de las hojas y tallo de la planta.
- La bacteria 1BP10 no presentó ningún tipo de mejora sobre las características del crecimiento vegetal, indicando que presenta un neutralismo con la planta.
- No se logró extraer los plásmidos pDawn y pDusk siendo esto corroborado por la electroforesis de los productos de la extracción, la digestión enzimática y la electroporación.
- La principales causas de la falta de extracción de plásmido es ocasionada por una baja lisis celular, un inadecuado volumen inicial de células bacterianas o la presencia de ADN genómico en la muestra lo cual pudo haber interferido al momento de realizar la transformación bacteriana.

XI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda determinar la concentración idónea de bacterias para realizar el biocebado con el fin de no generar competencia entre las bacterias y la semilla. Una vez identificado la concentración idónea se puede generar un modelo de las bacterias impregnadas en el medio con plántulas pregerminadas para su aplicación en caña de azúcar.
- Se recomienda realizar un nuevo biofertilizante utilizando las cepas 2MO12, 2MO14 y 4AP9 debido a que fueron las que presentaron las mayores mejoras en las diferentes características de las plantas.
- Identificar la capacidad de producción de giberelinas por parte de las bacterias, asimismo identificar los niveles de esta fitohormona y el IAA en los diferentes tiempos del desarrollo vegetal para identificar su impacto en el desarrollo de la planta.
- Realizar un análisis de los niveles de fósforo, nitrógeno y potasio presentes en las hojas de las plantas y en el sustrato para conocer el impacto que poseen las bacterias y la bioformulación sobre los niveles de nutrientes disponibles para la planta.
- Identificar el efecto que tiene las bacterias y la bioformulación sobre el desarrollo de raíces secundarias en las plantas por medio del cálculo del índice LRI.
- Realizar otros métodos de purificación de ADN plasmídico ya sea por precipitación con SDS con sal o el método de ebullición rápida.
- Al momento de realizar extracciones con kits comerciales de extracción de plásmido, se debe de utilizar el protocolo de bajo número de copias para mejorar la concentración y pureza de las extracciones de los plásmidos pDusk y pDawn.
- Realizar un marcaje molecular de las cepas el cual permita el monitoreo de estas al momento de ser aplicadas en cultivos vegetales para conocer su sobrevivencia.
- Realizar las mediciones de las concentraciones de los plásmidos por medio de espectrofotometría y fluorometría para identificar la concentración presente en el producto de la extracción.

XII. BIBLIOGRAFÍA

Addgene (2017) *Bacterial Transformation*. <https://www.addgene.org/protocols/bacterial-transformation/>

Adzitey, F., Huda, N., Ali, G. R. (2013). Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *3 Biotech*, 3(2), 97–107. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0074-4>

Aguado-Santacruz, G. A., Arreola-Tostado, J. M., Aguirre-Mancilla, C., García-Moya, E. (2024). Use of systemic biofertilizers in sugarcane results in highly reproducible increments in yield and quality of harvests. *Heliyon*, 10(7). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28750>

Aktar, M. W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>

Almeida, L. C. O., Santos, H. L., Nogueira, C. H. D. C., Carnietto, M. R. A., Silva, G. F. D., Boaro, C. S. F., Silva, M. D. A. (2024). Plant Growth-Promoting Bacteria Enhance Survival, Growth, and Nutritional Content of Sugarcane Propagated through Pre-Sprouted Seedlings under Water Deficit. *Agriculture*, 14(2), 189. <https://doi.org/10.3390/agriculture14020189>

Artika, I. M., Dewi, Y. P., Nainggolan, I. M., Siregar, J. E., Antonjaya, U. (2022). Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes*, 13(12), 2387. <https://doi.org/10.3390/genes13122387>

Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., Smith, D. L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in plant science*, 9, 1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>

Badar, M. A., Mehmood, K., Hassan, I., Ahmed, M., Ahmad, I., Ahmad, N., Hasan, M. U. (2022). Plant growth promoting bacteria (PGPB) enhance growth and yield of strawberry cultivars. *Applied Ecology & Environmental Research*, 20(3). https://doi.org/10.15666/aeer/2003_21872203

- Barlóg, P. (2023). Improving fertilizer use efficiency—Methods and strategies for the future. *Plants*, 12(20), 3658. <https://doi.org/10.3390/plants12203658>
- Belete, T., Yadete, E. (2023). Effect of Mono Cropping on Soil Health and Fertility Management for Sustainable Agriculture Practices: A Review. *Journal of Plant Sciences*, 11(6), 192-197. <https://doi.org/10.11648/j.jps.20231106.13>
- Bhattacharyya, C., Banerjee, S., Acharya, U., Mitra, A., Mallick, I., Haldar, A., Haldar, S., Ghosh, A., & Ghosh, A. (2020). Evaluation of plant growth promotion properties and induction of antioxidative defense mechanism by tea rhizobacteria of Darjeeling, India. *Scientific reports*, 10(1), 15536. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72439-z>
- Borrvalho, T., Chang, Y., Jain, P., Lalani, M., & Parghi, K. (2002). Effect of electroporation versus hanahan protocols on the transformation of Escherichia coli HB101 with chromosomal DNA from Escherichia coli HB101, Escherichia coli B23, and Bacillus subtilis WB746 and the plasmid p328. 5, including an analysis of competent Escherichia coli HB101 cellular freeze tolerance. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* Vol, 2, 194-200. https://www.microbiology.ubc.ca/sites/default/files/roles/drupal_ungrad/JEMI/2/2-194.pdf
- Bourke, P. M., Evers, J. B., Bijma, P., van Apeldoorn, D. F., Smulders, M. J., Kuyper, T. W., Bonnema, G. (2021). Breeding beyond monoculture: putting the “intercrop” into crops. *Frontiers in Plant Science*, 12, 734167. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.734167>
- Braghiere, R. K., Gérard, F., Evers, J. B., Pradal, C., Pagès, L. (2020). Simulating the effects of water limitation on plant biomass using a 3D functional-structural plant model of shoot and root driven by soil hydraulics. *Annals of botany*, 126(4), 713–728. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa059>
- Bruijns, B., Hoekema, T., Oomens, L., Tiggelaar, R., Gardeniers, H. (2022). Performance of spectrophotometric and fluorometric DNA quantification methods. *Analytica*, 3(3), 371-384. <https://doi.org/10.3390/analytica3030025>
- Caballeros, M. (2023) Planteamiento de formulación de biofertilizantes bacterianos partiendo de cepas promotoras del crecimiento aisladas de suelos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en la Costa Sur de Guatemala. [Tesis de Licenciatura, Universidad del Valle de Guatemala] Universidad del Valle de Guatemala.

- Cano, T., Murphy, J. C., Fox, G. E., Willson, R. C. (2005). Separation of Genomic DNA from Plasmid DNA by Selective Renaturation with Immobilized Metal Affinity Capture. *Biotechnology Progress*, 21(5), 1472–1477. doi:10.1021/bp050155g
- Carrascosa, A., Pascual, J. A., López-García, Á., Romo-Vaquero, M., De Santiago, A., Ros, M., Petropoulos, S. A., Alguacil, M. D. M. (2023). Effects of inorganic and compost tea fertilizers application on the taxonomic and functional microbial diversity of the purslane rhizosphere. *Frontiers in plant science*, 14, 1159823. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1159823>.
- Castro, S. G. Q., Coelho, A. P., de Castro, S. A. Q., de Souza Chiacchia, T. R., de Castro, R. A., Lemos, L. B. (2023). Fertilizer source and application method influence sugarcane production and nutritional status. *Frontiers in plant science*, 14, 1099589. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1099589>.
- Cengicano (2024) *Informe Anual 2022-2023*. Extraído de: <https://cengicana.org/info/informe-anual-2022-2023>
- Centro de Estudios en Biotecnología [CEB] (s.f) *Centro de Estudios en Biotecnología – CEB*. Extraído de: <https://www.uvg.edu.gt/investigacion/ceb/>
- Chopra, S., Ruzgys, P., Maciulevičius, M., Jakutavičiūtė, M., Šatkauskas, S. (2020). Investigation of plasmid DNA delivery and cell viability dynamics for optimal cell electrotransfection in vitro. *Applied Sciences*, 10(17), 6070. <https://doi.org/10.3390/app10176070>
- Classen, D., Lee-Son, N. M., Lin, C., Menzies, J., Yew, D. S. (2002). Ability of Escherichia coli to Distinguish Between Self and Foreign DNA as Demonstrated by Trends in Transformation Efficiency. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* Vol, 2, 201-206. https://www.microbiology.ubc.ca/sites/default/files/roles/drupal_ungrad/JEMI/2/2-201.pdf
- Cui, J., Lamade, E., Tcherkez, G. (2020). Seed Germination in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): A Review of Metabolic Pathways and Control Mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4227. <https://doi.org/10.3390/ijms21124227>.
- da Silva, D. M. M., Santos, C. C., Wagner, F. E., Martins, L. O. M., Ozório, J. P. A., da Silva, O. A., Ribeiro, D. M., & Scalón, S. P. Q. (2024). Seed biopriming with *Parachlorella*, *Bacillus subtilis*,

- and *Trichoderma harzianum* alleviates the effects of salinity in soybean. *BMC plant biology*, 24(1), 1149. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05646-9>
- Daniel, A. I., Fadaka, A. O., Gokul, A., Bakare, O. O., Aina, O., Fisher, S., Burt, A. F., Mavumengwana, V., Keyster, M., Klein, A. (2022). Biofertilizer: The Future of Food Security and Food Safety. *Microorganisms*, 10(6), 1220. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061220>.
- Dewan, I., & Uecker, H. (2023). A mathematician's guide to plasmids: an introduction to plasmid biology for modellers. *Microbiology (Reading, England)*, 169(7), 001362. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001362>
- Dhawi F. (2023). The Role of Plant Growth-Promoting Microorganisms (PGPMs) and Their Feasibility in Hydroponics and Vertical Farming. *Metabolites*, 13(2), 247. <https://doi.org/10.3390/metabo13020247>
- dos Santos, I. B., Pereira, A. P. D. A., de Souza, A. J., Cardoso, E. J. B. N., da Silva, F. G., Oliveira, J. T. C., Sobral, J. K. (2022). Selection and characterization of Burkholderia spp. for their plant-growth promoting effects and influence on maize seed germination. *Frontiers in Soil Science*, 1, 805094. <https://doi.org/10.3389/fsoil.2021.805094>
- Dubrovsky, J. G., Soukup, A., Napsucialy-Mendivil, S., Jeknic, Z., Ivanchenko, M. G. (2009). The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Annals of botany*, 103(5), 807–817. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn267>
- Ehis-Eriakha, C. B., Akemu, S. E., Tiamiyu, A. (2023). Formulation and Evaluation of Sugarcane-Bagasse-Based Biocontrol Agents for Sustainable Phytopathogen Management. *In Biology and Life Sciences Forum*, 27(1), 52. <https://doi.org/10.3390/IECAG2023-15992>
- Fahsi, N., Mahdi, I., Mesfioui, A., Biskri, L., Allaoui, A. (2021). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria isolated from the Jujube (*Ziziphus lotus*) plant enhance wheat growth, Zn uptake, and heavy metal tolerance. *Agriculture*, 11(4), 316. <https://doi.org/10.3390/agriculture11040316>
- Fiodor, A., Ajjiah, N., Dziewit, L., Pranaw, K. (2023). Biopriming of seed with plant growth-promoting bacteria for improved germination and seedling growth. *Frontiers in microbiology*, 14, 1142966. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1142966>

- Fiodor, A., Ajjah, N., Dziewit, L., Pranaw, K. (2023). Biopriming of seed with plant growth-promoting bacteria for improved germination and seedling growth. *Frontiers in microbiology*, 14, 1142966. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1142966>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO] (2015) *Los suelos el mayor patrimonio del agricultor*. <https://www.fao.org/guatemala/noticias/detail-events/en/c/284575/>
- Fundazucar (2019) *Azúcar de Guatemala*. <https://www.fundazucar.org/azucar-de-guatemala>
- García, M. & Gálvez, J. (2022) *TERRAS Serie Perfil ambiental de Guatemala*. <https://www.url.edu.gt/publicacionesurl/FileCS.ashx?Id=127476>
- Gómez-Godínez, L. J., Aguirre-Noyola, J. L., Martínez-Romero, E., Arteaga-Garibay, R. I., Ireta-Moreno, J., Ruvalcaba-Gómez, J. M. (2023). A look at plant-growth-promoting bacteria. *Plants*, 12(8), 1668. <https://doi.org/10.3390/plants12081668>
- Grover, M., Bodhankar, S., Sharma, A., Sharma, P., Singh, J., Nain, L. (2021). PGPR mediated alterations in root traits: way toward sustainable crop production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 618230.
- Gu, Y., Dong, K., Geisen, S., Yang, W., Yan, Y., Gu, D., ... & Friman, V. P. (2020). The effect of microbial inoculant origin on the rhizosphere bacterial community composition and plant growth-promotion. *Plant and Soil*, 452, 105-117. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.618230>
- Hamdan, M. F., Mohd Noor, S. N., Abd-Aziz, N., Pua, T. L., Tan, B. C. (2022). Green Revolution to Gene Revolution: *Technological Advances in Agriculture to Feed the World*. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(10), 1297. <https://doi.org/10.3390/plants11101297>
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature reviews. Microbiology*, 8(1), 15–25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
- Iqbal, S., Riaz, U., Murtaza, G., Jamil, M., Ahmed, M., Hussain, A., Abbas, Z. (2020). Chemical Fertilizers, Formulation, and Their Influence on Soil Health. *Microbiota and Biofertilizers*, 1–15. [doi:10.1007/978-3-030-48771-3_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-48771-3_1)

- Kakar, K., Xuan, T. D., Noori, Z., Aryan, S., Gulab, G. (2020). Effects of organic and inorganic fertilizer application on growth, yield, and grain quality of rice. *Agriculture*, 10(11), 544. <https://doi.org/10.3390/agriculture10110544>
- Katsenios, N., Andreou, V., Sparangis, P., Djordjevic, N., Giannoglou, M., Chanioti, S., Kasimatis, C. N., Kakabouki, I., Leonidakis, D., Danalatos, N., Katsaros, G., & Efthimiadou, A. (2022). Assessment of plant growth promoting bacteria strains on growth, yield and quality of sweet corn. *Scientific reports*, 12(1), 11598. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16044-2>
- Kaur, T., Devi, R., Kumar, S., Sheikh, I., Kour, D., Yadav, A. N. (2022). Microbial consortium with nitrogen fixing and mineral solubilizing attributes for growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Heliyon*, 8(4), e09326. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09326>
- Kaymak, H. Ç., Güvenç, İ., Yarali, F., Dönmez, M. F. (2009). The effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*Raphanus sativus* L.) seeds under saline conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 33(2), 173-179. 10.3906/tar-0806-30
- Khan, A., Singh, A. V., Gautam, S. S., Agarwal, A., Punetha, A., Upadhyay, V. K., Kukreti, B., Bundela, V., Jugran, A. K., Goel, R. (2023). Microbial bioformulation: a microbial assisted biostimulating fertilization technique for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1270039. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1270039>
- Kostka-Rick, R., Manning, W. J. (1993). Radish (*Raphanus sativus* L.): A model for studying plant responses to air pollutants and other environmental stresses. *Environmental Pollution*, 82(2), 107–138. doi:10.1016/0269-7491(93)90109-2
- Krasilnikov, P., Taboada, M., Amanullah, A. (2022). Fertilizer use, soil health and agricultural sustainability. *Agriculture*, 12(4), 462. <https://doi.org/10.3390/agriculture12040462>
- Lam, V. P., Lee, M. H., Park, J. S. (2020). Optimization of indole-3-acetic acid concentration in a nutrient solution for increasing bioactive compound accumulation and production of *Agastache rugosa* in a plant factory. *Agriculture*, 10(8), 343. <https://doi.org/10.3390/agriculture10080343>
- Li, Q., Yang, X., Li, J., Li, M., Li, C., Yao, T. (2023). In-depth characterization of phytase-producing plant growth promotion bacteria isolated in alpine grassland of Qinghai-Tibetan Plateau. *Frontiers in microbiology*, 13, 1019383. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1019383>

- Lopes, M. J. D. S., Dias-Filho, M. B., Gurgel, E. S. C. (2021). Successful plant growth-promoting microbes: inoculation methods and abiotic factors. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 606454. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.606454>
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J. C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L. I., Valencia-Cantero, E. (2007). *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 20(2), 207–217. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-2-0207>
- Lu, Q., Miles, C., Tao, H., DeVetter, L. (2022). Evaluation of real-time nutrient analysis of fertilized raspberry using petiole sap. *Frontiers in plant science*, 13, 918021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.918021>
- Machado-de-Lima, N. M., Charlesworth, J., Stewart, J., Ooi, M. K., Muñoz-Rojas, M. (2023). Seed biopriming at different concentrations to assess the effects of Cyanobacteria on germination and seedling performance of keystone arid species. *Journal of Sustainable Agriculture and Environment*, 2(3), 266-275. <https://doi.org/10.1002/sae2.12049>
- Mahmood, A., Turgay, O. C., Farooq, M., Hayat, R. (2016). Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review. *FEMS microbiology ecology*, 92(8), fiw112. [10.1093/femsec/fiw112](https://doi.org/10.1093/femsec/fiw112)
- Mahreen, N., Yasmin, S., Asif, M., Yahya, M., Ejaz, K., Mehboob-Ur-Rahman, Yousaf, S., Amin, I., Zulfiqar, S., Imran, A., Khaliq, S., & Arif, M. (2023). Mitigation of water scarcity with sustained growth of Rice by plant growth promoting bacteria. *Frontiers in plant science*, 14, 1081537. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1081537>
- Makhaye, G., Mofokeng, M. M., Tesfay, S., Aremu, A. O., Van Staden, J., Amoo, S. O. (2021). Influence of plant biostimulant application on seed germination. Biostimulants for crops from seed germination to plant development, 109-135. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823048-0.00014-9>
- Manfredini, A., Malusà, E., Costa, C., Pallottino, F., Mocali, S., Pinzari, F., & Canfora, L. (2021). Current Methods, Common Practices, and Perspectives in Tracking and Monitoring Bioinoculants in Soil. *Frontiers in microbiology*, 12, 698491. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.698491>

- Mantelin, S., Touraine, B. (2004). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of experimental botany*, 55(394), 27–34. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh010>
- Marro, F. C., Laurent, F., Josse, J., Blocker, A. J. (2022). Methods to monitor bacterial growth and replicative rates at the single-cell level. *FEMS microbiology reviews*, 46(6), fuac030. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac030>
- Matlock, B. (2015) Assessment of nucleic Acid Purity. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>
- Mavrodi, O. V., McWilliams, J. R., Peter, J. O., Berim, A., Hassan, K. A., Elbourne, L. D. H., LeTourneau, M. K., Gang, D. R., Paulsen, I. T., Weller, D. M., Thomashow, L. S., Flynt, A. S., Mavrodi, D. V. (2021). Root Exudates Alter the Expression of Diverse Metabolic, Transport, Regulatory, and Stress Response Genes in Rhizosphere *Pseudomonas*. *Frontiers in microbiology*, 12, 651282. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.651282>
- Mei, C., Chretien, R. L., Amaradasa, B. S., He, Y., Turner, A., Lowman, S. (2021). Characterization of phosphate solubilizing bacterial endophytes and plant growth promotion in vitro and in greenhouse. *Microorganisms*, 9(9), 1935. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091935>
- Melgar, M., Meneses, A., Orozco, H., Pérez, O. Espinosa, R. (2012) *Sugarcane Crop in Guatemala. Artemis Edinter, S.A.* <https://cengicana.org/files/20170307162025155.pdf>
- Mghazli, N., Bruneel, O., Zouagui, R., Hakkou, R., Sbabou, L. (2022). Characterization of plant growth promoting activities of indigenous bacteria of phosphate mine wastes, a first step toward revegetation. *Frontiers in microbiology*, 13, 1026991. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1026991>
- Michaels, T., Hoover, E., Tepe, E., Irish, L., Clark, M. Smith, A. (2024) *The Science of Plants- Understanding Plants and How They Grow.* LibreTexts [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Botany/The_Science_of_Plants_-_Understanding_Plants_and_How_They_Grow_\(Michaels_et_al.\)](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Botany/The_Science_of_Plants_-_Understanding_Plants_and_How_They_Grow_(Michaels_et_al.))
- Miljaković, D., Marinković, J., Tamindžić, G., Đorđević, V., Tintor, B., Milošević, D., Ignjatov, M., Nikolić, Z. (2022). Bio-Priming of Soybean with *Bradyrhizobium japonicum* and *Bacillus*

- megaterium: Strategy to Improve Seed Germination and the Initial Seedling Growth. *Plants* (Basel, Switzerland), 11(15), 1927. <https://doi.org/10.3390/plants11151927>
- Mitra, D., Mondal, R., Khoshru, B., Shadangi, S., Mohapatra, P. K. D., Panneerselvam, P. (2021). Rhizobacteria mediated seed bio-priming triggers the resistance and plant growth for sustainable crop production. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100071. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100071>
- Naik, K., Mishra, S., Srichandan, H., Singh, P. K., & Choudhary, A. (2020). Microbial formulation and growth of cereals, pulses, oilseeds and vegetable crops. *Sustainable Environment Research*, 30(10), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s42834-020-00051-x>
- National Institutes of Health [NIH] (2020) What is PCR? <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet>
- National Institutes of Health [NIH] (2024) Fluorescence in situ Hybridization (FISH). <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Fluorescence-In-Situ-Hybridization>
- Norton, G. W., Alwang, J., Masters, W. A. (2021). *Economics of agricultural development: world food systems and resource use*. Routledge. <https://doi.org/10.1080/03031853.2023.2181831>
- Nozaki, S. (2022). Reducing the Environmental Impact of Chemical Fertilizers Is Increasingly Important for Sustainable Agriculture. Mitsui & Co. Global Strategic Studies Institute Monthly Report. https://www.mitsui.com/mgssi/en/report/detail/___icsFiles/afieldfile/2022/12/12/2210m_nozaki_e.pdf
- Numan, M., Bashir, S., Khan, Y., Mumtaz, R., Shinwari, Z. K., Khan, A. L., Khan, A., Al-Harrasi, A. (2018). Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. *Microbiological research*, 209, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.02.003>
- Ochoa, V. (2022) 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 promotores del crecimiento que se encuentre en ellos [Tesis de Licenciatura, Universidad del Valle de Guatemala] Universidad del Valle de Guatemala.

- Ohlendorf, R., Vidavski, R. R., Eldar, A., Moffat, K., Möglich, A. (2012). From dusk till dawn: one-plasmid systems for light-regulated gene expression. *Journal of molecular biology*, 416(4), 534–542. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.001>.
- Orozco-Mosqueda, M. D. C., Flores, A., Rojas-Sánchez, B., Urtis-Flores, C. A., Morales-Cedeño, L. R., Valencia-Marin, M. F., Santoyo, G. (2021). Plant growth-promoting bacteria as bioinoculants: Attributes and challenges for sustainable crop improvement. *Agronomy*, 11(6), 1167. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061167>
- Otto, R., Machado, B. A., da Silva, A. C. M., de Castro, S. G. Q., Lisboa, I. P. (2022). Sugarcane pre-sprouted seedlings: A novel method for sugarcane establishment. *Field Crops Research*, 275, 108336. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2021.108336>
- Pang, Z., Tayyab, M., Kong, C., Liu, Q., Liu, Y., Hu, C., Yuan, Z. (2021). Continuous Sugarcane Planting Negatively Impacts Soil Microbial Community Structure, Soil Fertility, and Sugarcane Agronomic Parameters. *Microorganisms*, 9(10), 2008. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102008>
- Paul, P., Rajput, S., Joshi, P., Naithani, M., Chowdhury, N., Rao, S., Pai, M. O. (2021). Comparison of Fluorometric and UV Spectrophotometric Findings for DNA Isolated From Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Blocks, Fine Needle Aspiration Cytology Smears, and Blood. *Cureus*, 13(11), e19583. <https://doi.org/10.7759/cureus.19583>
- Poria, V., Dębiec-Andrzejewska, K., Fiodor, A., Lyzohub, M., Ajijah, N., Singh, S., Pranaw, K. (2022). Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) integrated phytotechnology: A sustainable approach for remediation of marginal lands. *Frontiers in Plant Science*, 13, 999866. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.999866>
- Potter H. (2003). Transfection by electroporation. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 9, Unit–9.3. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0903s62>
- Promega (2024) *DNA Purification*. <https://worldwide.promega.com/es-es/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/#plasmid-dna-purification-844e18a7-9e45-4538-9427-a3910abd0ea8>

- Promega (2024) *PureYield Plasmid Miniprep System*. https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/pureyield-plasmid-miniprep-system-protocol.pdf?rev=c8e21bd449a1414a9e3b76df33ffd4b1&sc_lang=en
- Qiu, Z., Paungfoo-Lonhienne, C., Ye, J., Garcia, A. G., Petersen, I., Di Bella, L., Hobbs, R., Ibanez, M., Heenan, M., Wang, W., Reeves, S., Schmidt, S. (2022). Biofertilizers can enhance nitrogen use efficiency of sugarcane. *Environmental microbiology*, 24(8), 3655–3671. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16027>
- Radzevičiūtė-Valčiukė, E., Gečaitė, J., Balevičiūtė, A., Szewczyk, A., Želvys, A., Lekešytė, B., Malyško-Ptašinskė, V., Mickevičiūtė, E., Malakauskaitė, P., Kulbacka, J., Novickij, V. (2024). Effects of buffer composition and plasmid toxicity on electroporation-based non-viral gene delivery in mammalian cells using bursts of nanosecond and microsecond pulses. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 12, 1430637. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1430637>
- Rahimzadeh, M., Sadeghizadeh, M., Najafi, F., Arab, S., Mobasheri, H. (2016). Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *Molecular biology research communications*, 5(4), 257–261. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28261629/>
- Raimi, A., Roopnarain, A., Adeleke, R. (2021). Biofertilizer production in Africa: Current status, factors impeding adoption and strategies for success. *Scientific African*, 11, e00694. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00694>
- Randive, K., Raut, T., Jawadand, S. (2021). An overview of the global fertilizer trends and India's position in 2020. *Mineral Economics*. doi:10.1007/s13563-020-00246-z
- Rashmi, I., Roy, T., Kartika, K. S., Pal, R., Coumar, V., Kala, S., Shinoji, K. C. (2020). Organic and Inorganic Fertilizer Contaminants in Agriculture: Impact on Soil and Water Resources. *Contaminants in Agriculture*, 3–41. doi:10.1007/978-3-030-41552-5_1
- Ray, D. P., Benedetti, D., Fry, J. P., Fuad, M. J. Mohd., Hasalkar, S. (2023). Impact of increasing pesticides and fertilizers on human health: A review. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214785323018382>
- Rocha, R., Lopes, T., Fidalgo, C., Alves, A., Cardoso, P., Figueira, E. (2022). Bacteria associated with the roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at different development stages: Diversity and

plant growth promotion. *Microorganisms*, 11(1), 57.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11010057>

Rojas-Padilla, J., Díaz-Rodríguez, A. M., de los Santos Villalobos, S. (2024). Bioformulation of bacterial inoculants. In *New Insights, Trends, and Challenges in the Development and Applications of Microbial Inoculants in Agriculture*, *Academic Press*, 105-116. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18855-8.00011-4>

Saeed, Q., Xiukang, W., Haider, F. U., Kučerik, J., Mumtaz, M. Z., Holatko, J., Naseem, M., Kintl, A., Ejaz, M., Naveed, M., Brtnicky, M., Mustafa, A. (2021). Rhizosphere Bacteria in Plant Growth Promotion, Biocontrol, and Bioremediation of Contaminated Sites: A Comprehensive Review of Effects and Mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 22(19), 10529. <https://doi.org/10.3390/ijms221910529>.

Santos, J. A. S., Garcia, Q. S. (2023). Ethylene in the regulation of seed dormancy and germination: Biodiversity matters. In *The Plant Hormone Ethylene*. *Academic Press*. 61-71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85846-5.00013-8>

Sarhani, N. M. M., Yahaya, N. (2022). Advanced development of bio-fertilizer formulations using microorganisms as inoculant for sustainable agriculture and environment—a review. *Malaysian Journal of Science Health & Technology*, 8(1), 92-101. <https://doi.org/10.33102/mjosht.v8i1.228>

Schlechter, R. O., Jun, H., Bernach, M., Oso, S., Boyd, E., Muñoz-Lintz, D. A., Dobson, R. C. J., Remus, D. M., Remus-Emsermann, M. N. P. (2018). Chromatic Bacteria - A Broad Host-Range Plasmid and Chromosomal Insertion Toolbox for Fluorescent Protein Expression in Bacteria. *Frontiers in microbiology*, 9, 3052. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03052>

Shaffique, S., Imran, M., Kang, S. M., Khan, M. A., Asaf, S., Kim, W. C., Lee, I. J. (2023). Seed Bio-priming of wheat with a novel bacterial strain to modulate drought stress in Daegu, South Korea. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1118941. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1118941>

Sherba, J. J., Hogquist, S., Lin, H., Shan, J. W., Shreiber, D. I., Zahn, J. D. (2020). The effects of electroporation buffer composition on cell viability and electro-transfection efficiency. *Scientific reports*, 10(1), 3053. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59790-x>

- Shintani, M., Sanchez, Z. K., Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in microbiology*, 6, 242. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00242>
- Sigma-Aldrich (2014) *GenElute Plasmid Miniprep Kit*. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/433/883/pln350bul.pdf?srsltid=AfmBOopkbBIZIJZ4mMcgmDWaDMfJE-oxu5bPAOb17MbtSimn4pHSeI2m>
- Singh, G., Kaur, M., Kaushik, P. (2021) Impact of Climate Change on Agriculture and Its Mitigation Strategies: A Review. *Sustainability*, 13(3), 1318. <https://doi.org/10.3390/su13031318>
- Singh, P., Vaishnav, A., Liu, H., Xiong, C., Singh, H. B., Singh, B. K. (2023). Seed biopriming for sustainable agriculture and ecosystem restoration. *Microbial biotechnology*, 16(12), 2212–2222. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14322>
- Som-ard, J., Atzberger, C., Izquierdo-Verdiguier, E., Vuolo, F. Immitzer, M. (2021) Remote Sensing Applications in Sugarcane Cultivation: A Review. *Remote Sens*, 13(20), 4040. <https://doi.org/10.3390/rs13204040>
- Song, P., Zhao, B., Sun, X., Li, L., Wang, Z., Ma, C., Zhang, J. (2023). Effects of *Bacillus subtilis* HS5B5 on maize seed germination and seedling growth under NaCl stress conditions. *Agronomy*, 13(7), 1874. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071874>
- Soumare, A., Diedhiou, A. G., Thuita, M., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Gopalakrishnan, S., Kouisni, L. (2020). Exploiting Biological Nitrogen Fixation: A Route Towards a Sustainable Agriculture. *Plants* (Basel, Switzerland), 9(8), 1011. <https://doi.org/10.3390/plants9081011>
- Souza, R.d, Ambrosini, A., Passaglia, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and molecular biology*, 38(4), 401–419. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Starr, C., Taggart, R., Evers, C., & Starr, L. (2009). *Biología. La unidad y la diversidad de la vida* (12a ed.). Cengage Learning.

- Strable, J., Scanlon, M. J. (2009). Maize (*Zea mays*): a model organism for basic and applied research in plant biology. *Cold Spring Harbor protocols*, 2009(10), pdb.emo132. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo132>
- Super Intendencia de Bancos de Guatemala [SIB] (2016) Sector Azucarero. https://www.sib.gob.gt/c/document_library/get_file?folderId=3789510&name=DLFE-26739.pdf
- Syromyatnikov, M. Y., Nesterova, E. Y., Gladkikh, M. I., Tolkacheva, A. A., Bondareva, O. V., Syrov, V. M., Popov, V. N. (2022). High-Throughput Sequencing as a Tool for the Quality Control of Microbial Bioformulations for Agriculture. *Processes*, 10(11), 2243. <https://doi.org/10.3390/pr10112243>
- Tahat, M., Alananbeh, K., Othman, Y., Leskovar, D. (2020). Soil Health and Sustainable Agriculture. *Sustainability*, 12(12), 4859. <https://doi.org/10.3390/su12124859>
- Tajima R. (2021). Importance of individual root traits to understand crop root system in agronomic and environmental contexts. *Breeding science*, 71(1), 13–19. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.20095>
- Tariq, M. R., Shaheen, F., Mustafa, S., Ali, S., Fatima, A., Shafiq, M., Safdar, W., Sheas, M. N., Hameed, A., & Nasir, M. A. (2022). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from medicinal plants improve growth of mint. *PeerJ*, 10, e13782. <https://doi.org/10.7717/peerj.13782>
- ThermoFisher Scientific (2009) *260/280 and 260/230 ratios*. https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf
- ThermoFisher Scientific (2023) *Introduction to Competent Cell transformation*. <https://www.thermofisher.com/gt/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/competent-cell-basics.html>
- ThermoFisher Scientific (2024) *Electroporation*. <https://www.thermofisher.com/gt/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/methods/electroporation.html>
- Tomei, J. (2015). The sustainability of sugarcane-ethanol systems in Guatemala: Land, labour and law. *Biomass and Bioenergy*, 82, 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.05.018>

- Tripathi, V., Kumar, P., Tripathi, P., Kishore, A. (2019). Microbial Genomics in Sustainable Agroecosystems. doi:10.1007/978-981-13-8739-5
- Turcios, H. (2021) *Sector Agrícola en Guatemala*. https://mapa.gob.es/es/ministerio/ministerio-exterior/america-central-caribe/2021fichaicexagricolaguatemala_tcm30-576578.pdf
- Universidad Rafael Landívar [URL] (2006) *Estado del uso de la tierra y ordenamiento territorial en Guatemala*. <https://www.url.edu.gt/publicacionesurl/FileCS.ashx?Id=41032>
- Vanmare, D. J. (2021). A review on the significance of organic fertilizers. *Agric. Sci. Res. Rev*, 1, 140. https://www.researchgate.net/profile/Dr-Tr-Parashurama/publication/355843557_Agricultural_Science_Research_and_Reviews_Volume_I_I_SBN_978-81-953600-2-4/links/6180d8a0eef53e51e119e642/Agricultural-Science-Research-and-Reviews-Volume-I-ISBN-978-81-953600-2-4.pdf#page=146
- Wang, H., Liu, R., You, M. P., Barbetti, M. J., Chen, Y. (2021). Pathogen biocontrol using plant growth-promoting bacteria (PGPR): Role of bacterial diversity. *Microorganisms*, 9(9), 1988. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091988>
- Xu, X., Du, X., Wang, F., Sha, J., Chen, Q., Tian, G., Zhu, Z., Ge, S., Jiang, Y. (2020). Effects of Potassium Levels on Plant Growth, Accumulation and Distribution of Carbon, and Nitrate Metabolism in Apple Dwarf Rootstock Seedlings. *Frontiers in plant science*, 11, 904. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00904>
- Yang, T., Siddique, K. H., Liu, K. (2020). Cropping systems in agriculture and their impact on soil health-A review. *Global Ecology and Conservation*, 23, <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01118>
- Yang, X., Allen Hill, K., Vessey, J. K., Tian, L. (2022). Colonization of *Brachypodium distachyon* by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on plant growth promotion. *Canadian Journal of Plant Science*, 102(2), 324-335. <https://doi.org/10.1139/cjps-2020-014>
- Yordem, B. K., Conte, S. S., Ma, J. F., Yokosho, K., Vasques, K. A., Gopalsamy, S. N., Walker, E. L. (2011). *Brachypodium distachyon* as a new model system for understanding iron homeostasis in grasses: phylogenetic and expression analysis of Yellow Stripe-Like (YSL) transporters. *Annals of botany*, 108(5), 821–833. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr200>

Zhang, S., Li, X., Wu, J., Coin, L., O'brien, J., Hai, F., Jiang, G. (2021). Molecular methods for pathogenic bacteria detection and recent advances in wastewater analysis. *Water*, 13(24), 3551. <https://doi.org/10.3390/w13243551>

Zymo Research (2019) Dos & Don'ts of plasmid purification. <https://zymoresearch.eu/blogs/blog/do-s-don-ts-of-plasmid-purification>

Zymo Research (2023) ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit. https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4208t_d4209_d4210_d4211_d4212_zymopure_plasmid_miniprep.pdf

XIII. ANEXOS

Cuadro 11. Temperatura y humedad registrados del invernadero

Fecha	Temperatura (°C)	Humedad (%)
26/9/2024	27	69
27/9/2024	28	72
28/9/2024	25.4	74.7
30/9/2024	23.2	87.6
1/10/2024	25.4	73.1
2/10/2024	32.6	54.2
3/10/2024	22.6	91.2
4/10/2024	31.5	58
5/10/2024	31.4	59
7/10/2024	34.3	43.1
8/10/2024	35	45
9/10/2024	30.6	42.2
10/10/2024	41.5	30.3
11/10/2024	29.4	52.8
12/10/2024	25.1	67.4
14/10/2024	38.0	36.9
15/10/2024	40.4	35.7
16/10/2024	40.3	34.5
17/10/2024	29.0	59.3
18/10/2024	30.5	58.2
19/10/2024	28.0	62.3
21/10/2024	35.0	49.7
23/10/2024	33.5	50.3

Las mediciones se realizaron con un sensor de temperatura y humedad marcar LogTag.

Cuadro 12. Datos originales crecimiento vegetal a las 2 semanas

Código	Planta	Tallo (cm)	Raíz (cm)	Tamaño (cm)	Promedio ancho hojas (cm)	Promedio largo hojas (cm)	Cantidad de hojas
Control	1	3.5	4.7	9.6	1.10	1.15	2
	2	3.7	2.5	6.2	0.40	0.60	2
	3	3.3	1	5	0.85	0.70	2
	4	3.2	1	5.5	0.65	0.40	2
	5	3.4	1.3	6.1	1.60	1.10	2
	6	4	1.1	6.1	0.85	0.73	4
	7	3.1	4	7.7	0.55	0.63	4
	8	3.38	1.	5.91	0.73	0.73	4
2AP10	1	4.2	3	7.6	0.70	0.65	4
	2	3.5	2.5	6.2	1.05	0.80	2
	3	3	3.6	7.3	0.63	0.97	3
1AB27	1	4.2	3.2	8.2	1.30	1.20	2
	2	5	5	11.5	1.65	1.45	2
	3	3.6	4.5	9.3	1.05	1.15	2
	4	2.6	3	5.6	0.45	0.55	2
1BP10	1	2.6	2.5	3.7	0.55	0.60	3
	2	4.2	4	9	0.95	1.05	2
	3	3.7	1	4.7	0.65	0.60	2
2MO14	1	5.2	4.4	10.6	1.08	3.83	4
	2	4.4	4.3	9	0.88	0.98	4
	3	3	3.2	6.4	0.95	0.85	2
	4	4.5	4.5	9.2	1.15	1.38	4
	5	3.9	3.9	8	0.95	1.05	2
2MO12	1	2.1	1	3.5	0.80	0.75	2
	2	3.5	3	8	1.03	1.00	3
	3	3.2	2	6.2	1.00	1.05	2
	4	3.3	2.8	7.3	1.23	1.40	3
	5	3.5	4.9	9.9	1.20	1.40	3
Bioformulación	1	4.6	3.8	9.4	1.40	1.60	2
	2	5.6	3.2	9.9	1.45	1.45	2
	3	4.8	4.5	9.9	1.75	1.50	2
	4	4.8	4.3	10.2	1.20	1.33	3
	5	4.6	5	10.5	1.35	1.20	2
	6	4.9	3.7	9.7	1.35	1.20	2
	7	5	4.5	10	1.35	1.30	2
	8	4.1	5.1	9.7	1.50	1.35	2
4AP9	1	4.4	4.6	10.5	1.48	1.70	4

2	5.3	3.2	9	1.17	1.37	3
3	4.9	4.5	11.2	1.25	1.63	4
4	4	4.7	9.5	0.73	0.80	3
5	3.1	9	13.5	0.83	1.00	3
6	5	1	6.7	0.75	1.00	2

Cuadro 13. Datos originales crecimiento vegetal a las 4 semanas

Código	Planta	Tallo (cm)	Raíz (cm)	Tamaño (cm)	Promedio ancho hojas (cm)	Promedio largo hojas (cm)	Cantidad de hojas
Control	1	4	2	6.5	0.60	1.00	3
	2	4.5	3.1	9.2	1.00	1.40	3
	3	3.1	3.7	7.5	0.90	1.30	4
	4	4.2	1.8	7	0.97	1.47	3
	5	3.3	4.6	9.2	1.10	1.20	4
	6	2.5	2.7	3.9	0.75	0.60	2
	7	6	4.3	13.1	2.30	2.33	3
	8	6.9	4.9	14.6	1.75	2.13	4
2AP10	1	3.8	6	11.5	1.06	1.34	5
	2	4	4.6	10.4	1.60	1.50	2
	3	4.5	9.5	16.1	1.27	1.87	3
1AB27	1	4.7	4.3	10.7	1.35	1.65	4
	2	7.2	6.3	15	1.68	2.15	4
	3	4.2	5.7	11.6	1.28	1.53	4
1BP10	1	4.2	2.2	8.2	0.80	1.20	4
	2	2.2	2.1	4.5	0.57	0.63	3
	3	4.5	6.4	13.1	1.16	1.56	5
2MO14	1	4	9.6	14.9	1.13	1.55	4
	2	5.3	7	14.7	1.68	1.95	4
	3	5	6.3	13.2	1.30	1.82	5
	4	4.9	4.5	10.3	1.03	1.63	4
2MO12	1	4.5	6.1	12	0.95	1.20	4
	2	4	5	11	1.55	1.98	4
	3	5.2	7	14.7	1.70	2.18	4
	4	4	6.8	14	1.50	2.20	4
	5	4	5.1	11.1	1.10	1.55	4
	6	5	3.7	9.6	1.08	1.38	4
Bioformulación	1	3.8	9.2	15	1.38	1.73	4
	2	6.6	9.5	18.1	1.45	1.93	4
	3	5.6	5.9	12.9	1.50	1.83	4
	4	5.1	6.3	13.5	1.73	2.28	4
	5	5.5	6	12.8	1.55	1.98	4

	6	5.2	6.2	13.5	1.38	1.88	5
	7	6	9.2	17.3	1.53	2.13	4
	8	5.5	9	16.1	1.50	1.75	4
4AP9	1	4.2	3.5	9.5	1.15	2.35	2
	2	4.8	6.2	14	1.63	2.23	4
	3	5.7	5.5	14	1.68	2.38	4
	4	3.6	4.5	9.7	1.07	1.67	3
	5	4.3	5.3	11.6	1.15	1.75	4
	6	4.3	6.3	11.5	0.98	1.25	4

Cuadro 14. Características de interés de las PGPB propuestas para la bioformulación

Bacteria	FN	SF	SK	PACC	PP	PS	PSi	PL	G	PPi	PQ	IAA (ug/mL)
4AP9												>400
2AP10												>400
2MO12												<10
2MO14												<19
1AB27												156.76
1BP10												<10

FN: Fijación de nitrógeno, SF: solubilización de fosfatos, SK: Solubilización de potasio, PACC: producción de ACC desaminasa, PP: producción de proteasas, PS: producción de silicatos, PSi: producción de sideróforos, PL: producción de lipasas, G: glucanasa, PPI: producción de pirrolnitrina, PQ: producción de quitinasas, IAA: ácido indol acético

Las PGPB presentan diferentes características las cuales pueden ser aprovechadas para mejorar el crecimiento vegetal. Esto incluye características como la solubilización de fósforo y potasio, fijación de nitrógeno, la secreción de enzimas (glucanasas o lipasas) o la secreción de fitohormonas como el IAA. Las diferentes bacterias utilizadas para bioformulación presentan dichas características, exceptuando la producción de lipasas. De igual forma, tres de las bacterias presentan una alta producción de IAA y las otras 3 presentan una baja producción de la auxina (Caballeros, 2023; Ochoa, 2022).

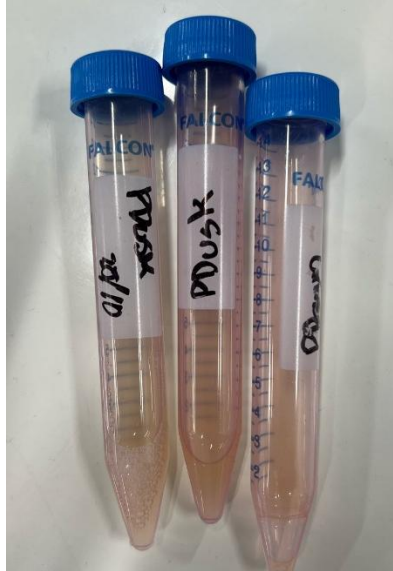


Figura 17. Fluorescencia de *E. coli* por parte de los plásmidos pDawn y pDusk

Se presenta la fluorescencia roja ocasionada por la expresión de RFP por parte de *E. coli* debido a la presencia de los plásmidos en pDawn y pDusk, para pDawn se dejó los cultivos por 18h en presencia de luz, mientras que para pDusk los cultivos bacterianos se dejaron por 18 en ausencia de luz.

Protocolos

Procedimiento Normado de Operación	POE 1
	Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 3
Ensayo de germinación de plantas	Autores: Isabella García Caffaro, Josué Castañon

1. Propósito

Realizar un método de germinación de plantas para la detección de la influencia de los microorganismos seleccionados en el desarrollo de la planta

2. Aplicación

Los bioinoculantes son de las mejores opciones para generar una agricultura sostenible. Estos se desarrollan a partir de cepas microbianas las cuales fueron caracterizadas según sus propiedades las cuales pueden llegar a promover el crecimiento de las plantas. Los métodos para la germinación de semillas sirven para evaluar la calidad física de las plantas y semillas, además son utilizados métodos para la evaluación de la interacción microorganismos-semillas (Calvillo-Aguilar et al., 2023).

3. Referencias

- 3.1. Oo, K. T., Win, T. T., Khai, A. A., Fu, P. (2020). Isolation, screening and molecular characterization of multifunctional plant growth promoting rhizobacteria for a sustainable agriculture. *American Journal of Plant Sciences*, 11(6), 773-792.
- 3.2. Fiodor, A., Ajjjah, N., Dziewit, L., Pranaw, K. (2023). Biopriming of seed with plant growth-promoting bacteria for improved germination and seedling growth. *Frontiers in microbiology*, 14, 1142966. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1142966>
- 3.3. Kaymak, H. Ç., Güvenç, İ., Yarali, F., Dönmez, M. F. (2009). The effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*Raphanus sativus* L.) seeds under saline conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 33(2), 173-179. 10.3906/tar-0806-30

4. Terminología

- 4.1. Germinación: Conjunto de procesos que lleva a cabo la planta para el desarrollo de una plántula.

5. Documentos asociados

- 5.1. Calvillo-Aguilar, F. F., Cruz-Cárdenas, C. I., Chávez-Díaz, I. F., Sandoval-Cancino, G., Ruiz-Ramírez, S., Bautista-Ramírez, E., Ramos-Garza, J., Hernández-Rodríguez, C. H., Zelaya-

Molina, L. X. (2023). Germination test for the evaluation of plant-growth promoting microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 207, 106708. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106708>

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

6.1.1. Formación de aerosoles.

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

6.1.3. Exceso de material o personal.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.

6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.

6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.

6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.

6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles.

6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.

6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.

6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).

6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.

6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.

6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

7.1.1. Autoclave

7.1.2. Campana de flujo laminar

7.1.3. Balanza analítica

7.1.4. Incubadora con agitación (MaxQ4450 marca ThermoFisher)

7.2. Materiales/ Cristalería

7.2.1. Cajas Petri

7.2.2. Regla de metal

- 7.2.3. Caja de plástico con tapadera
- 7.2.4. Erlenmeyer de 1 L
- 7.2.5. Tubos cónicos de 15 mL
- 7.2.6. Tubos cónicos de 50 mL
- 7.2.7. Estándares de McFarland (BD PhoenixSpec)
- 7.2.8. Pinzas
- 7.2.9. Papel filtro

7.3. Reactivos

- 7.3.1. Etanol 70 %
- 7.3.2. NaOCl (Cloro/hipoclorito de sodio)
- 7.3.3. Extracto de levadura
- 7.3.4. NaCl
- 7.3.5. Peptona

7.4. Medicamentos

- 7.4.1. No aplica

7.5. Material biológico

- 7.5.1. Semillas de rábano.
- 7.5.2. Colonias de cepas bacterianas previamente aisladas.

8. Procedimiento

8.1. Formulación de la bioformulación

- 8.1.1. Realizar caldo Luria Bertani (LB) de la siguiente manera para 1 litro pesar lo siguiente: 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 10 g de peptona.
- 8.1.2. Realizar cultivos bacterianos en caldo LB en tubos cónicos de 15 mL utilizando una sola colonia bacteriana. Realizar esto por cada una de las bacterias.
- 8.1.3. Colocar los tubos cónicos en la incubadora con agitación a 150 revoluciones por minuto (rpm) y a una temperatura de 32 °C. Dejar incubando durante 24 h.
- 8.1.4. Observar la turbidez de los cultivos bacterianos y ajustarlos a una concentración de 1×10^7 CFU/mL con ayuda del estándar de McFarland 0.25.
- 8.1.5. En condiciones estériles colocar 1 mL de cada cultivo bacteriano y agregar 5 mL de caldo LB estéril. Dejar incubar durante 24 h.

8.2. Biocebado de las semillas

- 8.2.1. En campana de flujo laminar llevar a cabo la esterilización de las semillas de rábano.
- 8.2.2. Con pinzas estériles colocar 10 semillas de rábano en los cultivos bacterianos que se encuentran a una concentración de 1×10^7 de CFU/mL, adicionar 0.2 % de sacarosa en el

medio de cultivo y dejar incubando en incubadora con agitación durante 3 horas a 150 rpm a una temperatura de 27 °C.

8.2.3. En campana de flujo laminar dejar secando las semillas al aire seco en papel filtro estéril

8.2.4. En cajas Petri o en cajas de plástico colocar un papel filtro remojado con 5 mL de agua estéril con 5 mL de caldo con la bacteria de interés.

8.2.5. Colocar de 5 a 10 semillas en una caja Petri con ayuda de pinzas y cerrar la cámara.

8.2.6. Dejar incubando las cámaras a una temperatura ambiente en un fotoperiodo de 16/8 h durante 7 días.

8.2.7. Diariamente realizar recuento de la cantidad de semillas germinadas y obtener la tasa de germinación, índice de germinación y germinación relativa.

8.3. Germinación de la plántula

8.3.1. En campana de flujo laminar llevar a cabo la esterilización de las semillas.

8.3.2. Realizar tubos de ensayo con agar nutritivo a media concentración de agar.

8.3.3. Realizar cultivos bacterianos con 10^8 CFU/mL de las bacterias de interés.

8.3.4. Sumergir la semilla en el caldo bacteriano y agregar una inoculación de la bacteria en el medio.

8.3.5. Colocar la semilla en el medio y realizar un tapón de algodón con gasa para tapar el tubo de ensayo.

8.3.6. Dejar cultivando las semillas en un fotoperiodo de 16/8 h a una temperatura de 23 °C durante 4 a 7 días.

8.3.7. Realizar mediciones del largo de la raíz, largo de la plántula y número de hojas.

9. Esterilización de material

9.1. Desinfección de las semillas

9.1.1. Seleccionar el grupo de semillas y esterilizar las superficies de las semillas en campana de flujo laminar de la siguiente forma:

9.1.1.1. Sumergir durante 90 s en solución de NaOCl (cloro)

9.1.1.2. 30 s en solución de etanol al 70 %

9.1.1.3. 2 enjuagues seguidos con agua destilada estéril.

9.1.2. Dejar secar las semillas al aire bajo condiciones de aire de flujo laminar.

10. Cálculos

No aplica

11. Control de calidad

- 11.1. Verificar con un check list que se llevó al lugar los implementos necesarios
- 11.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado 4 °C, -20 °C o -80 °C.

12. Conflict solution policy

- 12.1. No aplica

Procedimiento Normado de Operación	POE 2
	Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 3
Transformación bacteriana	Autores: Isabella García Caffaro, Josué Castañon

13. Propósito

Realizar un método para la transformación bacterianas por medio de electroporación.

14. Aplicación

Debido a que no todas las bacterias son naturalmente competentes existen métodos para la generación de células bacterianas capaces de transferir ADN exógeno. Siendo una de estas técnicas la electroporación la cual utiliza un campo eléctrico el fin de generar poros en la membrana de las bacterias lo cual permite la introducción de ADN exógeno en las bacterias. Una de las mayores ventajas de la electroporación es la mayor eficiencia en la toma del plásmido en las células y la producción de células electrocompetentes es menos laborioso.

15. Referencias

- 15.1. Zegeye, E. D., Aspholm, M. (2022). Efficient Electrotransformation of *Bacillus thuringiensis* for Gene Manipulation and Expression. *Current protocols*, 2(11), e588. <https://doi.org/10.1002/cpz1.588>
- 15.2. BIO-RAD (s.f) Fene Pulser Scell Electroporation System Instruction Manual. <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006217A.pdf>

16. Terminología

- 16.1. Electroporación: Técnica la cual utiliza campos eléctricos para generar poros en la membrana de las bacterias los cuales permiten la introducción de ADN exogeno al interior de la bacteria.
- 16.2. Overnight (ON): Cultivos bacterianos los cuales son permitidos crecer por un largo periodo de tiempo usualmente dejándolos crecer toda la noche.

17. Documentos asociados

- 17.1. Cadoret, F., Soccia, C., Voulhoux, R. (2014). Gene transfer: transformation/electroporation. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1149, 11–15.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_2

- 17.2. Lessard, J. C. (2013). Transformation of E. coli Via Electroporation. Laboratory Methods in Enzymology: DNA, 321–327. doi:10.1016/b978-0-12-418687-3.00027-6

18. Seguridad

18.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

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

18.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

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

19. Equipo, materiales y reactivos

19.1. Equipo

- 19.1.1. Autoclave
- 19.1.2. Vortex
- 19.1.3. Centrifuga
- 19.1.4. Electroporador Gene Pulser II (BioRad)
- 19.1.5. Espectrofotometro
- 19.1.6. Shaker

19.1.7. Congelador -80 °C

19.2. Materiales/ Cristalería

19.2.1. Erlenmeyer de 500 mL

19.2.2. Tubos cónicos de 50 mL

19.2.3. Tubos eppendorf de 1.5 mL

19.2.4. Cajas Petri

19.2.5. Puntas P1000, p100 y p10

19.2.6. Micropipeta p10, p100 y p1000

19.2.7. Hielera

19.2.8. Cubeta de electroporador

19.3. Reactivos

19.3.1. Medio BHI

19.3.2. Medio LB

19.3.3. Agar LB

19.3.4. Glicina

19.3.5. D-sorbitol

19.3.6. Glicerol

19.3.7. D(+)-trehalosa

19.4. Medicamentos

19.4.1. Kanamicina

19.5. Material biológico

19.5.1. No aplica

20. Procedimiento

20.1. Preparación solución de lavado/electroporación

20.1.1. Disolver 45.5 g D-sorbitol, 96.4 g D (+)-trehalosa y 118 mL de glicerol al 85 % en 800 mL de agua destilada. Ajustar el volumen a 1 L.

20.1.1.1. Las concentraciones finales deben ser sorbitol 250 mM, trehalosa 250 mM y glicerol al 10 % (v/v).

20.2. Preparación de células electrocompetentes para *Bacilos*

20.2.1. Preparar un cultivo inicial usando una placa de agar LB inoculando 1 µL de la bacteria e incubar a 30 °C ON.

20.2.2. Transferir una sola colonia a 10 mL de medio BHI previamente calentado (30 °C) en un tubo cónico de 50 mL y mezclar bien con vortex. Incubar ON a 30 °C con agitación de 200 rpm.

- 20.2.3. Transferir 1 mL del cultivo ON en 100 mL de medio BHI previamente calentado (30 °C) en un Erlenmeyer de 500 mL dejar incubar a 30 °C con agitación de 200 rpm
- 20.2.4. Monitorear el crecimiento bacteriano por medio de espectrofotometría midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm. Remover de 1 a 0.5 mL para la medición de la densidad óptica he ir realizando mediciones cada 1 o 0.5 hrs.
- 20.2.5. Al obtener un OD600 de 0.5 a 0.7 añadir solución de glicina al 20 % previamente calentada para obtener una concentración final del 2 %. Dejar incubando el cultivo a 30 °C con agitación de 20 rpm por 1 hora.
- 20.2.6. Dividir el cultivo en múltiples tubos cónicos de 50 mL y centrifugar por 10 min a 1690 x g a temperatura ambiente y descartar el sobrenadante.
- 20.2.7. Lavar el pellet usando la solución de lavado/electroporación
- 20.2.7.1. Resuspender las células en 10 mL de solución por tubo, mezclar por pipeteo.
- 20.2.7.2. Combinar las muestras en un solo tubo conico y ajustar el volumen a 40 mL con la misma solución.
- 20.2.7.3. Centrifugar por 5 min a 3005 x g a temperatura ambiente y descartar el sobrenadante
- 20.2.7.4. Repetir la resuspensión en 40 mL y la centrifugación del paso anterior dos veces más.
- 20.2.7.5. Remover el sobrenadante
- 20.2.8. En baño de hielo resuspender el pellet en 1 mL de solución de lavado/electroporación y mezclar por pipeteo
- 20.2.9. En tubos de 1.5mL realizar alícuotas de 100 µL de células (en este momento las células se pueden utilizar para transformación o se pueden almacenar)
- 20.2.10. Congelar las células a -80 °C
- 20.3. Transformación por electroporación
- 20.3.1. Para cada muestra ha electroporar pipetear el ADN (0.05 – 1 µg en 10 µL de agua o buffer TE) en tubo eppendorf de 1.5 mL. Colocar los tubos en hielo y añadir 100 µL células electrocompetentes dejar incubar en hielo por 5 a 10 minutos.
- 20.3.2. Transferir 100 µL suspensión plásmido/células a una cubeta de electroporación de 0.2 cm, dispensar la suspensión hasta el fondo de la cubeta.
- 20.3.3. Tener un tubo con 2 mL de medio LB a temperatura ambiente por cada muestra a electroporar.
- 20.3.4. Configurar el electroporador de a las siguientes condiciones C = 50 µF, PC = 200 ohm; V = 1.0 kV.

- 20.3.5. Colocar la cubeta en ShockPod y colocar la tapa de la cámara hacia abajo
- 20.3.6. Remover la cubeta, extraer la mezcla de células/ADN y colocar en el caldo LB.
- 20.3.7. Revisar los parámetros de la corrida donde el tiempo debe ser de 8.6 mseg y el voltaje 1.0 kV. La fuerza del campo puede ser calculada como los voltios (kV)/ brecha de la cubeta (cm).
- 20.3.8. Incubar las células por 1 a 1.5 hr a 37 °C con agitación a 250 rpm
- 20.3.9. Sembrar alícuotas de las células electroporadas en placas de agar LB con marcador selectivo. Incubar las placas en ON.

21. Esterilización de material

- 21.1. Esterilizar los medios a 121 °C durante 15 minutos en autoclave.

22. Cálculos

No aplica

23. Control de calidad

- 23.1. Verificar con un check list que se llevó al lugar los implementos necesarios
- 23.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado 4 °C, -20 °C o -80 °C.

24. Conflict solution policy

- 24.1. En caso de que el tiempo de la electroporación varíe mucho o es menor es necesario realizar una dilución de la concentración de células con solución de electroporación/lavado.