

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



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 encuentran en ellos.

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
María Valeria Ochoa Elías  
para optar el grado académico de Licenciada en  
Bioquímica y Microbiología

Guatemala  
2022



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



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 encuentran en ellos.

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
María Valeria Ochoa Elías  
para optar el grado académico de Licenciada en  
Bioquímica y Microbiología

Guatemala  
2022

Vo.Bo:

(f)   
MSc. Isabella García

Tribunal examinador:

(f)   
MSc. Isabella García

(f)   
PhD. Diego Archila

(f)   
PhD. Dalia Lau-Bonilla

Fecha de aprobación: Guatemala 23 de enero de 2023

## PREFACIO

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones involucradas en la realización de este trabajo de graduación. En especial, quiero mencionar:

A mi familia, por su apoyo a lo largo de la carrera y especialmente en la elaboración de este trabajo de graduación. Gracias por no dejar que me rindiera en los momentos donde todo parecía imposible. Agradezco sobre todo a mi mamá, a mi papá y a mi hermano, por ser un ejemplo de perseverancia que me inspira a seguir adelante.

A la MSc. Isabella García, asesora de este trabajo de graduación, por su acompañamiento y asesoramiento durante la realización de este trabajo. Gracias por guiarme en el largo y arduo proceso de su elaboración.

A los directores de carrera PhD. Pamela Pennington y PhD. Diego Archila, por acompañarme y guiarme no solo en el transcurso de la carrera sino también en distintas fases de la realización de este trabajo de graduación.

A la doctora Dalia Lau por su invaluable apoyo en la realización de este trabajo, sin cuyos consejos no hubiera sido posible. También al MSc. Augusto Franco por su apoyo en las dificultades enfrentadas para el análisis de datos de metagenómica.

A mis compañeros, por estar a mi lado durante la carrera y la realización de este proyecto. A mi compañera de laboratorio con quien nos hacíamos compañía en las largas horas de experimentación. A mis amigos, especialmente a Karla Li y Grecia Castañeda por su apoyo incondicional y palabras de motivación cuando las cosas parecían no ir en buena dirección. Por estar dispuestas a ayudarme con lo que fuera. Estarán por siempre en mi corazón.

A los financistas, Ingenio Magdalena y Centro de Estudios en Biotecnología (CEB), por haber brindado los recursos necesarios para que este proyecto se llevara a cabo. Agradezco al Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala, por permitirme llevar a cabo esta investigación en sus instalaciones.

A la Universidad del Valle de Guatemala por proporcionarme los medios para convertirme en una de excelencia y calidad. Gracias por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y como persona durante estos 5 años de estudios y aprendizajes.

A todas las personas que intervinieron en la realización de este trabajo de graduación, ya sea de manera grande o pequeña. Gracias.

# ÍNDICE

<b>PREFACIO</b> .....	<b>V</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>X</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
1. Objetivo general .....	5
2. Objetivos específicos .....	5
<b>IV. MARCO CONTEXTUAL</b> .....	<b>6</b>
<b>V. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>8</b>
1. Agricultura .....	8
1.1. Agricultura en Guatemala .....	9
2. Salud del suelo .....	11
2.1. Degradación de los suelos .....	12
3. Microorganismos del suelo .....	14
3.1. Bacterias promotoras del crecimiento en plantas .....	14
3.2. Mecanismos/Características de las PGPB .....	18
4. Caracterización del microbioma bacteriano del suelo .....	25
4.1. Metagenómica de suelos .....	26
<b>VI. ANTECEDENTES</b> .....	<b>28</b>
1. Tipos de muestra .....	28
2. Tipo de fertilización .....	28
3. pH del suelo .....	28
4. Ingredientes activos de herbicidas colocados en el suelo .....	29
<b>VII. METODOLOGÍA</b> .....	<b>30</b>
1. Sitio de estudio .....	30
2. Sujeto de estudio .....	30
3. Diseño, enfoque y tipo de investigación .....	30
4. Tipo y tamaño de muestra .....	30
5. Criterios de inclusión y exclusión .....	30
6. Variables .....	30
7. Hipótesis .....	31
7.1. Hipótesis principal: .....	31
7.2. Hipótesis secundaria: .....	31
8. Metodología .....	32
8.1. Recolección de muestras de suelo .....	32
8.2. Procesamiento de muestras de suelo y aislamiento de bacterias del suelo. ....	33
8.3. Caracterización de las bacterias .....	33

8.4.	Metagenómica de amplicón rRNA 16S.....	35
8.5.	Cepario .....	35
9.	Alcance y limitaciones .....	36
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
1.	Caracterización de las habilidades promotoras del crecimiento .....	37
1.1.	Aislamiento y descripción de colonias .....	37
1.2.	Tamizaje de características promotoras del crecimiento .....	40
1.3.	Cepario .....	49
2.	Microbioma bacteriano de distintos tipos de muestra.....	49
2.1.	Extracción de ADN .....	49
2.2.	Análisis del microbioma bacteriano .....	50
<b>IX.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>60</b>
<b>X.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>68</b>
<b>XI.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>XII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>70</b>
<b>XIII.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>86</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1:	Bacterias registradas con habilidades promotoras del crecimiento. ....	15
Cuadro 2:	Especies de bacterias asociadas a la caña de azúcar y sus habilidades....	17
Cuadro 3:	Variable de taxones bacterianos.....	30
Cuadro 4:	Variable de bacterias promotoras del crecimiento (PGPB) .....	31
Cuadro 5:	Códigos asignados según el tipo de muestra de la muestra y número de muestras .....	32
Cuadro 6:	Descripción de los parámetros de las muestras.....	37
Cuadro 7:	Concentraciones y pureza del ADN extraído de las muestras por medio de NanoDrop. ....	50
Cuadro 8:	Características de los puntos de muestreo proporcionados por el Ingenio Magdalena. ....	138
Cuadro 9:	Descripción de la morfología de las cepas aisladas de distintos tipos de muestra en cultivos de caña de azúcar. ....	139
Cuadro 10:	Cantidad de cepas aisladas por muestra. ....	150
Cuadro 11:	Tabla con características promotoras del crecimiento por cepa. ....	152

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Posibles interacciones entre la raíz de las plantas y las PGPB.....	15
Figura 2:	El ciclo del nitrógeno inorgánico bacteriano.....	19
Figura 3:	Interacción de las bacterias solubilizadoras de potasio (KSB) o las bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB) con la raíz de la planta para liberar potasio (K) y/o fósforo (P) en formas que pueden ser absorbidas por la planta. ....	21

Figura 4: Toneladas de azúcar por hectárea (TAH) por zafra desde el 2014 hasta el 2022. Clasificadas según el ingenio acorde a los percentiles. ....	28
Figura 5: Diagrama de la metodología. ....	32
Figura 6: Puntos de muestreo ubicados en el mapa. ....	33
Figura 7: Cantidad de bacterias aisladas por tipo de muestra. ....	38
Figura 8: Número de bacterias aisladas por muestra de suelo. ....	38
Figura 9: Conteo de bacterias Gram positivo vrs Gram negativo según el tipo de muestra. ....	39
Figura 10: Porcentajes de morfología con tinción de Gram según tipo de muestra. ....	40
Figura 11: Cantidad de bacterias positivas según pruebas realizadas. ....	41
Figura 12: Número de bacterias que poseen características promotoras del crecimiento según el tipo de muestra. ....	42
Figura 13: Porcentaje de bacterias por muestra positivas para la producción de ACC y la de IAA. ....	43
Figura 14: Porcentaje de bacterias por muestra positivas para la producción de enzimas hidrolíticas. ....	44
Figura 15: Porcentaje de bacterias por muestra positivas para solubilización de fosfato y posible solubilización de silicatos. ....	45
Figura 16: Porcentaje de bacterias por muestra positivas fluorescentes y no fluorescentes entre en agar King B y número de bacterias positivas para la prueba de TrypanBlue ....	46
Figura 17: Porcentaje de bacterias positivas para solubilización de potasio (K).....	47
Figura 18: Porcentaje de bacterias positivas para prueba con reactivo de Nessler... ..	47
Figura 19: Imagen del gel electroforesis realizado para los productos de PCR del gen <i>nifH</i> donde se observa el control positivo identificado como CP.....	48
Figura 20: Imagen del gel electroforesis realizado para los productos de PCR del gen <i>nifH</i> .....	49
Figura 21: Abundancia relativa por filo en cada una de las dos regiones analizadas. ....	51
Figura 22: Abundancia relativa de los géneros en cada una de las dos regiones analizadas.....	53
Figura 23: Mapa de calor de los filios más abundantes presentes en la región V1-V2. ....	54
Figura 24: Mapa de calor de los 10 filios más abundantes de la región V3-V4.....	55
Figura 25: Diferentes métricas por tipo de muestra para diversidad alfa de las regiones V1-V2 y V3-V4 analizada. ....	56
Figura 26: Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de las distancias de Bray-Curtis entre las muestras analizadas para la regiones V1-V2 y V3-V4.....	58
Figura 27: Gel de electroforesis con 17 pozos para PCR del gen <i>nifH</i> con sus respectivas muestras detalladas. Del lado izquierdo se observa la escalera utilizada, seguida del control negativo y el control positivo. ....	86
Figura 28: Gel de electroforesis con 50 pozos para PCR del gen <i>nifH</i> con sus respectivas muestras detalladas. Del lado izquierdo se observan la escaleras utilizadas. Del lado derecho se detalla a que muestra corresponde cada pazo. ....	87
Figura 29: Gel de electroforesis con 17 pozos para PCR del gen <i>nifH</i> con sus respectivas muestras detalladas. Del lado izquierdo se observa la escalera utilizada. Los pozos con una “X” no fueron utilizados. ....	88

Figura 30: Gel de electroforesis con 50 pozos para PCR del gen <i>nifH</i> con sus respectivas muestras detalladas. En esta imagen solo se detalla la mitad de los pozos, del pozo 0 al 23. Del lado izquierdo se observa la escalera utilizada. Del lado derecho se detalla a que muestra corresponde cada pozo.....	89
Figura 31: : Gel de electroforesis con 50 pozos para PCR del gen <i>nifH</i> con sus respectivas muestras detalladas. En esta imagen solo se detalla la mitad de los pozos, del pozo 25 al 48. Del lado izquierdo se observa la escalera utilizada. Del lado derecho se detalla a que muestra corresponde cada pozo.....	90
Figura 32: Representación gráfica de la calidad de las secuencias reverse de las región V3-V4.....	164
Figura 33: Representación gráfica de la calidad de las secuencias forward de las región V3-V4.....	165
Figura 34: Representación gráfica de la calidad de las secuencias reverse de las región V1-V2.....	166
Figura 35: Representación gráfica de la calidad de las secuencias forward de las región V1-V2.....	167

## RESUMEN

La extracción directa y la caracterización del ADN de la comunidad microbiana mediante metagenómica ha revolucionado el estudio de la microbiología ambiental y la ecología microbiana. La biología molecular, en particular, ha proporcionado acceso a los genomas de bacterias “difíciles” o “imposibles” de cultivar en el laboratorio donde las técnicas de metagenómica son una herramienta para lograr identificar estos microorganismos. Esto ha permitido descubrir más filos, clases, géneros y genes de interés. En los últimos años esta técnica se ha utilizado en diversas disciplinas como la genética, la medicina, la biotecnología y la agricultura. Específicamente en la agricultura, es de importancia el estudio del microbioma del suelo ya que este es uno de los factores que define la salud del suelo. El estado del microbioma del suelo puede determinar el éxito de la producción de cultivos. Sin embargo, el cultivo continuo de plantas puede provocar una alteración de la comunidad microbiana del suelo y provocar una disminución en los rendimientos agrarios. Esto se ha comprobado con estudios a nivel mundial, pero son pocos los informes para el territorio guatemalteco. El cultivo de caña de azúcar es de gran interés para el país ya que es uno de los principales productos de exportación del país por lo que la eficiencia y salud de sus suelos de cultivo es vital para su producción. Este trabajo de graduación busca estudiar la comunidad bacteriana del suelo de caña de azúcar por medio de metagenómica e identificar por medio de microbiología clásica los microorganismos benéficos para el cultivo de caña de azúcar. Identificar bacterias con capacidades promotoras del crecimiento de las plantas también es vital para poder llegar a una agricultura sostenible. Estas bacterias pueden representar un menor uso de fertilizantes. Para esto se utilizaron herramientas de secuenciación, bioinformáticas y agares selectivos. Se utilizó dos regiones variables del gen rARN 16S, las cuales fueron V1-V2 y V3-V4. Al realizar el análisis del microbioma bacteriano de distintos tipos de tierra en suelos cultivados con caña de azúcar se encontró que los filos más comunes son Actinobacteriota, Proteobacteria, Firmicutes, Acidobacteriota, Chloroflexi, Gemmatimonadota y Nitrospirota para ambas regiones. Para los géneros se encontró tres más comunes entre las dos regiones *Pseudarthrobacter*, *Nitrospira* y *Streptomyces*. Se logró aislar e identificar bacterias con características promotoras del crecimiento mediante cultivos selectivos y diferenciales. Se tamizaron 10 características promotoras del crecimiento en las que se incluye solubilización de fosfatos, solubilización de potasio, producción de ACC desaminasa, producción de proteasas, posible solubilización de silicatos, producción de lipasas, producción de IAA, producción de las enzimas gluconasas y quitinasas, producción de amonio y crecimiento en medio libre de nitrógeno. Se encontraron 222 cepas con distintas características de las cuales seis poseen ocho características entre las principales se incluyen solubilización de fósforo y de potasio, así como fijación de nitrógeno. En la siguiente fase se espera formular bioproductos a partir de las cepas encontradas para implementarlas en las cosechas azucareras.

# I. INTRODUCCIÓN

Se ha estimado que en un gramo de suelo contiene hasta  $10^{10}$ -  $10^{11}$  bacterias y de 6000 - 50 000 especies bacterianas (van der Heijden et al., 2008). Los microorganismos que habitan en el suelo son esenciales ya que desempeñan un papel fundamental en la descomposición de la materia orgánica, la disponibilidad de nutrientes y los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno, fósforo, carbono etc.(L. F. Santos & Olivares, 2021). En los últimos años, ha crecido el interés por el papel que juega el microbioma del suelo en la producción agrícola y las enfermedades que afectan a las plantas ya que el ecosistema suelo-planta alberga una inmensa diversidad microbiana. (Trivedi et al., 2021). Existen varios estudios que han comprobado que el uso de bacterias promotoras del crecimiento (PGPB (Plant growth- promoting bacteria, por sus siglas en inglés)) en la agricultura, producen efectos positivos en cultivos como el maíz y la caña de azúcar (R. M. dos Santos et al., 2020). Esto se debe a que los PGPB de vida libre activamente colonizan las raíces de las plantas y promueven un efecto positivo en el desarrollo de estas al usar su propio metabolismo para solubilizar fosfatos, producir hormonas o enzimas esenciales para el crecimiento de la planta (Ramakrishna et al., 2019). Se ha observado que estos microorganismos con habilidades benéficas para las plantas son esenciales para la buena salud del suelo y la producción agropecuaria (A. Kumar et al., 2020). Los PGPB también pueden ayudar a mejorar la tolerancia al estrés abiótico y biótico o suprimir patógenos que atacan a las plantas; han sido usadas como biopesticidas, agentes de control biológico y biofertilizantes ya que reducen el uso de fertilizantes artificiales y pesticidas, disminuyendo así su impacto ambiental (R. M. dos Santos et al., 2020; J. Zhang et al., 2021). Por lo anterior el estudio de PGPB se ha visto como una oportunidad para mejorar la producción agrícola de diversos cultivos, incluidos los monocultivos.

La salud del suelo se define como la capacidad de este para ejercer su rol de sistema viviente dentro del ecosistema y sostener el crecimiento de plantas y animales (Tahat et al., 2020; Union of Concerned Scientists, 2017). Los suelos cuentan con una gran riqueza, pero existen factores que pueden provocar la pérdida de diversidad en ellos como es el caso del monocultivo por periodos prolongados, lo que puede ocasionar una reducción de la productividad en los campos de siembra (Magarey, 1999; Xiong et al., 2015) .

La caña de azúcar se cultiva ampliamente en todo el mundo y posee muchas aplicaciones en diferentes industrias como la alimenticia y la producción de energía, etc. (Yuan et al., 2022). La caña de azúcar es un cultivo de gran importancia económica para Guatemala ya que representa el 6.2% de las exportaciones totales del país(Villagrán, 2022). El sector de la agroindustria guatemalteca ha crecido permanentemente desde 1960 hasta llegar a ser uno de los principales exportadores a nivel mundial de este producto. Las plantaciones de caña ocupan alrededor de 266 mil hectáreas de suelo en Guatemala, el cual equivale al redor del 2.97% del total del territorio (Espinoza et al., 2013; *Fundazúcar - Azúcar de Guatemala*, s. f.-a; INE, 2020). Sin embargo, su cultivo y manejo enfrentan desafíos como enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus. Tradicionalmente el manejo de estas enfermedades se realiza a través de mejorar la resistencia del cultivo hacia el patógeno. A pesar de esto, en los últimos años se ha visto un aumentado de la susceptibilidad de las plantas, por lo que ha sido necesario encontrar otros métodos de manejo de enfermedades. Una alternativa es el uso de bacterias antagonistas y promotoras del crecimiento. Estas nuevas prácticas han incentivado el estudio del suelo tanto para analizar la composición del

microbioma presente como para encontrar bacterias promotoras del crecimiento (PGPB). El uso de estas bacterias no solo mejora el crecimiento de las plantas sino también reducen considerable el uso de agroquímicos(Asazgua, 2018). Por lo que existen estudios científicos que buscan encontrar microorganismos que brinden una alternativa para mejorar la salud del suelo (Ovalle & Viswanathan, 2020). Se ha observado que un número sustancial de cepas bacterianas de *Bacillus* aisladas de muestras de suelo rizosférico de las plantas de caña de azúcar poseen función de fijación de nitrógeno y propiedades de biocontrol contra patógenos de la caña de azúcar (Di et al., 2022).

Existen distintos métodos para estudiar la composición del suelo y organismos presentes en el mismo. Una de las metodologías que ha surgido recientemente es la secuenciación de nueva generación, NGS, por sus siglas en inglés (Di et al., 2022). Solo 1% de las bacterias que se encuentran en el suelo crecen mediante el uso de técnicas tradicionales de cultivo(Pham & Kim, 2012). Por lo que su análisis por medio de la metagenómica permite estudiar todos los microorganismos presentes en las muestras ambientales al combinar las disciplinas de biología molecular, genómica, bioinformática y biología. Determinar la diversidad del microbioma del suelo es vital para el manejo, sostenibilidad y regeneración de este (Sabale et al., 2019). Otra técnica utilizada para el estudio microbiológico del suelo es la microbiología tradicional que incluyen la siembra de bacterias en medios de cultivos no selectivos para luego contar el número de bacterias viables y caracterizarlas según su morfología. Es posible realizar una serie de pruebas para determinar la presencia o ausencia de características promotoras del crecimiento, utilizando medios selectivos y diferenciales (Dubey et al., 2020). Sin embargo, el estudio de los microorganismos del suelo y sus interacciones con plantas y otros organismos del suelo es difícil, debido a la gran diversidad de especies y sus complejas interacciones con el ambiente que las rodea. Otra dificultad añadida se debe a que solo una pequeña proporción de especies pueden aislarse en condiciones de laboratorio (Daniel, 2005).

Así pues, el estudio de los microorganismos del suelo con habilidades promotoras del crecimiento tiene un gran potencial para proporcionar nuevos conocimientos sobre el impacto de la diversidad microbiana en el crecimiento de las plantas. Así como también proporcionar alternativas sostenibles al uso de fertilizantes industriales. Los suelos guatemaltecos muestran un gran potencial para encontrar organismos promotores del crecimiento por lo que se propone realizar un estudio metagenómico por medio de la secuenciación del gen 16S ARN ribosomal para determinar la taxonomía de las bacterias en distintos suelos utilizados para la siembra de caña de azúcar. Así como también, caracterizar las bacterias encontradas en estas muestras de suelo por medio de microbiología clásica para determinar su potencial como bacterias promotoras del crecimiento.

## II. JUSTIFICACIÓN

Una de las principales causas de la degradación de los suelos se debe a la agricultura intensiva de monocultivos y la utilización de grandes cantidades de fertilizantes químicos ricos en nitrógenos y fosfatos (FAO, s. f.-a). Guatemala no es la excepción, sus suelos se han visto afectados por todos estos factores en las últimas décadas (Solano Divas, s. f.). La siembra de monocultivo en grandes extensiones reduce la diversidad microbioma del suelo en gran medida y deja a los cultivos más vulnerables a enfermedades (Salaheen & Biswas, 2019). Uno de los monocultivos de mayor importancia en el país es la caña de azúcar ya que cubre alrededor de 200 mil hectáreas que equivale alrededor del 2.1% del territorio nacional (Asazgua, 2018; CENGICAÑA, 2014). La determinación del microbioma del suelo de estas plantaciones puede generar información importante para su buen manejo. Así como el potencial de las bacterias como promotoras del crecimiento que se encuentran en ellos (Kalayu, 2019).

Los fertilizantes son compuestos que contienen elementos químicos como nitrógeno, fósforo y potasio etc., que se busca mejores el crecimiento y productividad de las plantas (eurostat, s. f.). Los fertilizantes son una parte integral de la producción agrícola actual, ya que proporcionan elementos minerales esenciales para el crecimiento positivo de los cultivos y las cosechas florecientes. Las variedades de plantas de cultivo de alto rendimiento posiblemente no alcancen todo su potencial sin obtener una dosis equilibrada de fertilizantes (Khan et al., 2018). La dependencia de pesticidas y fertilizantes comunes en los monocultivos de tierras de cultivo convencionales es un factor importante que contribuye a la pérdida de biodiversidad y su uso indiscriminado y prolongado se ha convertido en una fuente importante de contaminación del suelo y el agua (Schmidt et al., 2021).

La biodisponibilidad de nutrientes esenciales en el suelo para el crecimiento de los cultivos es una de las mayores preocupaciones para los agricultores y la agroindustria. Entre los nutrientes más importantes para las plantas se encuentran el fósforo y el nitrógeno. Sin embargo, la forma biodisponible, es decir la forma inorgánica de los compuestos, es escasa en los suelos por lo que es necesario suplementarlos por medio de fertilizantes (Abisaí Pazos-Rojas et al., 2016). La cantidad adecuada de fertilizantes a suministrar es compleja, ya que depende de muchos factores como el tipo de suelo, el cultivo, la época del año etc. por lo que muchos agricultores suelen colocar una cantidad recomendada por el fabricante que no necesariamente es la adecuada para todos los suelos. Este exceso puede dañar tanto el crecimiento del cultivo como el suelo y el ecosistema (Bisht et al., 2020). El excedente de fertilizante se puede filtrar a cuerpos de agua o acuíferos lo que en grandes cantidades puede causar eutrofización (Aktar et al., 2009).

En los últimos años se ha observado que los microorganismos presentes en el suelo son responsables de hacer biodisponibles nutrientes como el fósforo, el nitrógeno, potasio etc. También producción de enzimas que les permiten solubilizar, fijar y degradar compuestos de manera que las plantas puedan utilizarlos para desarrollarse. A estos microorganismos se les conoce como organismos promotores del crecimiento (PGPB) (Kalayu, 2019). En Guatemala el uso de estos microorganismos aún no es una práctica común, ya que solo pocos agricultores tienen conocimiento o hacen uso de él. Debido a esto es importante generar investigaciones que permitan obtener datos sobre el estado del suelo en las plantaciones guatemaltecas y aislar los

microorganismos nativos con características promotoras del crecimiento para en un futuro poder utilizarlos en la agricultura del país.

### III. OBJETIVOS

#### 1. **Objetivo general**

Analizar la diversidad del microbioma bacteriano de suelos de uso para el cultivo de caña de azúcar en Guatemala y caracterización de las bacterias promotoras del crecimiento presentes en ellos.

#### 2. **Objetivos específicos**

- Optimizar la extracción de ADN genómico bacteriano a partir de muestras de suelo.
- Determinar la composición cualitativa y cuantitativa del microbioma bacteriano en diferentes tipos de suelo utilizados para la siembra de caña de azúcar en Guatemala mediante metagenómica del gen 16S ribosomal usando regiones variables.
- Aislar e identificar bacterias con características promotoras del crecimiento mediante el uso de medios de cultivo selectivos y diferenciales.
- Preservar de las bacterias identificadas y caracterizadas que sean de interés agrícola.

## IV. MARCO CONTEXTUAL

Guatemala es un país que se encuentra Centro América y se ha dedicado principalmente a la producción de productos agrícolas. Los productos de mayor exportación del país incluyen el café, el cardamomo y la azúcar (Banco de Guatemala, 2022). Por lo que la agricultura es esencial en la economía del país. Los suelos son parte vital para que la agricultura de un país puede prosperar. En ellos se pueden encontrar millones de micro- y macro- organismos que interactúan entre sí. Cada uno juega un papel importante para mantener la salud del suelo. Entre los beneficios que traen los suelos se encuentran que son fuente de enzimas, metabolitos secundarios, control biológico de plagas y patógenos, etc. (Lombard et al., 2011).

La caña de azúcar es uno de los cultivos de mayor importancia económica a nivel mundial ya que es fuente de producción de azúcar y bioetanol. El 80% de la azúcar producida a nivel mundial proviene de la caña de azúcar, lo que equivale a alrededor de 1.889.268.880 toneladas de caña de azúcar anuales (Atlas Big, (s.f)). Se cultiva en países tropicales y subtropicales (Yara, 2022).

Actualmente Guatemala es el quinto exportador de azúcar a nivel mundial y el tercero con mayor productividad en el mundo. A nivel latinoamericano es el segundo exportador de azúcar. Esta industria genera en el país 56 mil empleos directos y 270 mil indirectos. La caña de azúcar es el segundo producto más exportado del país y genera divisas que han superado los mil millones de dólares anuales. Cubre alrededor de 253 mil hectáreas que equivale alrededor del 2.1% del territorio nacional (ASAZGUA, s. f.; CENGICANA, 2014).

La caña de azúcar se empezó a cultivar en el país en 1536 como un producto consumo local fácil de cultivar y no fue hasta mediados del siglo XIX que se empezó a exportar (Sugar for Good, 2017). Para los años 2000 el cultivo ya estaba bien establecido en el país como uno de los principales de exportación y contaba con múltiples asociaciones a nivel nacional que promovían su cultivo e innovaban (Melgar, Meneses, Orozco, Pérez, Espinosa, 2012).

Las principales plantaciones, en su mayoría ingenios azucareros, se encuentran en la costa sur del país. La Asociación de Azucareros de Guatemala –Asazgua– reporta 11 ingenios azucareros agremiados. Los cuales son Trinidad, Magdalena, La Sonrisa, Palo Gordo, La Unión, El Pilar, Santa Ana, Madre Tierra, Santa Teresa, Pantaleón y Concepción (*Fundazúcar - Azúcar de Guatemala*, s. f.-b). Entre estos ingenios se encuentra el Ingenio Magdalena, fundado alrededor de los años 1950, produce azúcar y otros derivados en distintas fincas de la costa sur guatemalteca.

El Ingenio Magdalena tiene como visión que “Al 2026 seremos una empresa líder en costos y productividad a través de la innovación, crecimiento y la creación de valor sostenible, diversificando nuestros productos en distintos mercados.” (*Estrategia - Ingenio Magdalena*, s. f.). Debido a esto tiene distintos programas, alianzas y objetivos para mejorar su productividad de manera sostenible haciendo uso de las nuevas tecnologías.

El Centro de Estudios en Biotecnología -CEB- de la Universidad del Valle de Guatemala busca “catalizar el desarrollo de la biotecnología en el país, vinculando la investigación y educación, para su aplicación en beneficio de la sociedad y el medio ambiente.” (*Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) - UVG*, s. f.). Una de sus líneas de investigación es la microbiología aplicada.

Debido a las necesidades del ingenio en temática de la aplicación de la microbiología para mejorar la sostenibilidad y producción nace el proyecto “Manejo de Microbiología de Suelo” en cual se busca utilizar PGPB para disminuir la aplicación de fertilizantes inorgánicos. Uno de los

principales objetivos del proyecto es de detectar y aislar especies de hongos y bacterias beneficiosas específicas involucradas en la movilización y disponibilidad de nutrientes. Dentro de este proyecto se encuentra el presente trabajo de graduación, en dónde se buscó realizar el análisis bioinformático del microbioma bacteriano de suelos sembrados con caña de azúcar. Así como también caracterizar bacterias con habilidades promotoras del crecimiento.

## V. MARCO TEÓRICO

### 1. Agricultura

La agricultura comenzó hace unos 12.000 años y provocó un cambio radical en la sociedad y en la forma en que vivían las personas. Ha este cambio se le llama la “Revolución Neolítica”. En esta época los estilos de vida tradicionales de cazadores-recolectores quedaron en el olvido y los seres humanos empezaron a vivir en asentamientos permanentes con un suministro estable de alimentos. Por lo que, a partir de la agricultura, crecieron ciudades y civilizaciones. El planeta tierra paso de aproximadamente 5 millones de habitantes hace 10 mil años a más de 7 mil millones en la actualidad. Este crecimiento exponencial se debe en gran medida a que ahora se pueden cultivar alimentos y domesticar animales para satisfacer la demanda, así como también a un mayor acceso a servicios de salud y el desarrollo de la medicina moderna (National Geographic, s. f.). Se cree que la domesticación de plantas y animales comenzó en las áreas tropicales y subtropicales a principios de la mitad del Holoceno. Los trópicos proporcionaban suficiente humedad para el crecimiento de la vegetación que proporciona alimento tanto a humanos como a animales. Algunas de las primeras evidencias de la domesticación de plantas provienen del suroeste Asia. Por esta época una variedad de plantas alimenticias, incluyendo trigo, centeno, cebada, lentejas, garbanzos y guisantes fueron domesticado en el Cercano Oriente y el sur de Asia (A. K. Gupta, 2004; Ross-Ibarra et al., 2007).

Desde esos primeros pasos la agricultura ha evolucionado a lo largo de los siglos. Después de la segunda guerra mundial ocurrió un gran cambio debido a las nuevas tecnologías, la mecanización, el mayor uso de químicos, la especialización y las políticas gubernamentales que favorecieron la maximización de la producción y la reducción de los precios de los alimentos. Estos cambios permitieron que una menor cantidad de agricultores produjera más alimentos a precios más bajos (Brodt et al., 2011).

Aunque estos desarrollos han tenido muchos efectos positivos y han reducido muchos riesgos en la agricultura, también causaron efectos negativos. Entre ellos destacan el agotamiento de la capa superior del suelo, la contaminación de las aguas subterráneas, la contaminación del aire, las emisiones de gases de efecto invernadero, el declive de las granjas agrícolas familiares, el abandono de los ambientes rurales y pocos trabajadores agrícolas. También surgieron nuevas amenazas para la salud y la seguridad humanas debido a la propagación de nuevos patógenos (Brodt et al., 2011; FAO, s. f.-b).

Debido a lo anterior, durante las últimas décadas ha surgido un movimiento que cuestiona los efectos negativos causados por las prácticas agrícolas hoy en día y busca alternativas innovadoras y sostenibles. Por lo anterior surge la agricultura sostenible integra tres objetivos principales: salud ambiental, rentabilidad económica y equidad social (Velten et al., 2015). Entre sus prácticas se encuentran la aplicación de biofertilizantes, plaguicidas naturales, rotación de cultivos, cultivos intercalados, cultivos intercalados de relevo, agrosilvicultura con árboles maderables, frutales o de nueces, fertilización orgánica, fertilización dividida, labranza reducida, riego por goteo y control biológico de plagas (Wezel et al., 2014).

## **1.1. Agricultura en Guatemala**

La agricultura en Guatemala representa el 12% del Producto Interno Bruto (PIB), aproximadamente el 33% del empleo y 25% de las exportaciones. Guatemala se ubica entre los principales productores a nivel mundial de café, banano y azúcar (Castellanos, 2015). Esto debido a la fertilidad del suelo y clima adecuado para el cultivo de una gran variedad de productos (Martínez et al., 2020). La agricultura se puede clasificar en dos: la de gran extensión y la de pequeña escala medidas en hectáreas cultivadas. La de gran escala se define como aquella que se desarrolla en unidades productivas de gran tamaño, mayor a 10 hectáreas. En general está vinculada con productos tradicionales de exportación como los son el azúcar, el banano y el café. La agricultura a gran escala se ha convertido en un modelo de negocio para las grandes empresas (Castellanos, 2015). La agricultura de pequeña escala se define como la realizada en una unidad productiva de reducido tamaño, en general menor a 10 hectáreas. Su producción está orientada al mercado interno o externo. Se basa en la pequeña empresa y en propiedades familiares que abarcan cultivos como el maíz, frijol y hortalizas (Castellanos, 2015; Martínez et al., 2020).

La eficiencia y producción de la agricultura se ha visto afectado por efectos del cambio climática y degradación de los suelos por lo que ha habido iniciativas internacionales como nacionales que buscan mitigar los efectos y proporcionar herramientas para combatirlos. Sin embargo, la implementación de las nuevas tecnologías es lenta en el país debido a su alto costo y el conocimiento limitado de los agricultores de estas (Fernández-Roca Baquero, 2018; Mercado et al., 2019).

### **1.1.1. Agricultura de la caña de azúcar**

La caña de azúcar es un cultivo perenne que crece principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Esta tiene un alto contenido de agua, alrededor del 75% de su peso. El contenido de azúcar solo equivale alrededor del 10% al 15% del peso total (Quiroz et al., 2021). Los principales productos de la caña son el azúcar de caña y el alcohol. Alrededor del 75% de la caña de azúcar es para el azúcar y el 22% para el etanol y el resto para otros productos como energía eléctrica a partir del bagazo de la caña (MARIN et al., 2018). Los principales mercados del producto se encuentran en la India, la Unión Europea China, Brasil, Estados Unidos, Indonesia, Rusia, Pakistán, México y Egipto. Entre 2001 y 2018, el consumo mundial de azúcar aumentó alrededor del 40%. Bajo este contexto Guatemala representó una cuota del 1% de la producción mundial de caña de azúcar en 2019 (MARIN et al., 2018). Mientras que en América Latina, fue el cuarto productor de caña de azúcar. Se cultivó en unas 270.000 hectáreas en Guatemala en 2019 y se produjo alrededor de 107 toneladas por hectárea (Castro et al., 2019). La producción se concentra en la Costa Sur del país, en los departamentos de Escuintla, Suchitepéquez, Retalhuleu y Santa Rosa. Los ingenios guatemaltecos también producen energía, principalmente a partir del bagazo. La energía producida representa el 21% la producción nacional de energía, solo superada por la hidroeléctrica (37%) (Castro et al., 2019; Quiroz et al., 2021).

### **1.1.2. Uso de fertilizantes**

Las plantas requieren 16 elementos esenciales para crecer de manera saludable y brindar frutos. De estos 13 son proporcionados por el suelo. El nitrógeno, el fósforo y el potasio son conocidos como micronutrientes primarios ya que los cultivos los requieren en mayores cantidades (Bevan et al., 2021). El cultivo continuo de la tierra va desgastando las reservas de nutrientes por

lo que es necesario suplementarlo regularmente para que posea el nivel óptimo de producción. El método más común usado por los agricultores para suplementar el cultivo de los nutrientes que necesita es el uso de fertilizantes químicos, especialmente de fertilizantes que contienen nitrógeno, fósforo y potasio (Prashar & Shah, 2016).

Los fertilizantes son compuestos que se aplican en la agricultura ya sea al suelo o directamente a los cultivos para incrementar su productividad y/o calidad. Estos se pueden clasificar en: naturales, sintéticos/industriales, orgánicos e inorgánicos. Basados en su aplicación también se pueden clasificar como directos o indirectos. Los directos proveen al cultivo de nutrientes esenciales como el nitrógeno, fósforo y potasio, así como micronutrientes de forma directa a los cultivos. Mientras que los segundos como el yeso, cal y fertilizantes bacterianos se usan para mejorar la calidad del suelo (B. Singh et al., 2020). Los fertilizantes orgánicos son naturales y están compuestos por estiércol y residuos de productos animales o vegetales. Tienen un alto contenido de carbono, ácidos orgánicos y nutrientes. Un ejemplo de este tipo de fertilizantes es la composta. En el caso de los inorgánicos están hechos a partir de químicos industriales y pueden estar su forma primaria como sodio, potasio y fósforo o ser complejos mezclar 2 o 3 elementos primarios como el nitrofosfato y el fosfato de amonio. Se pueden subclasificar basado en composición (puro, complejo mezclado), forma física (sólidos, líquidos) o aplicación (directa o indirecta) (Baweja et al., 2020).

El reporte “El estado mundial de la agricultura y la alimentación” presentado por la FAO (2015) indica que solo en Guatemala se utiliza en promedio 97 kg/he de fertilizante a pesar de que los precios de estos han aumentado en las últimas décadas. Una situación que solo ha empeorado debido a la guerra en Ucrania ya que era uno de los mayores exportadores junto con Rusia(OEC, s. f.). Lo que ha empujado a los países Latino Americanos a buscar alternativas como los biofertilizantes (FAO, 2022).

Los biofertilizantes son cualquier sustancia que contengan microorganismos y materia orgánica que se aplique a los suelos, semillas, y superficie de las plantas con el fin de incrementar la disponibilidad de los nutrientes para el cultivo (Varmaa & Giri, 2020). Estos son una alternativa sostenible y más económica muchas veces. En todo suelo se encuentran microorganismos benéficos, sin embargo, muchas veces en cantidades insuficientes para mejorar el rendimiento o aquellos que se encuentran en el suelo no son los de mayor beneficio para la planta. Los microorganismos que se pueden suplementar son bacterias, algas y hongos. (Baweja et al., 2020). En este trabajo se hará más énfasis en los biofertilizantes bacterianos ya que se busca encontrar bacterias con características que puedan convertirlas en estos. Generalmente el nitrógeno, el fósforo y el potasio se encuentran en abundancia en el ambiente, sin embargo, no están disponibles para los microorganismos. Por lo que suplementar el suelo con bacterias que pueden hacer estos elementos disponibles para las plantas es una alternativa a los fertilizantes tradicionales.

### **1.1.3. Uso de pesticidas**

Las enfermedades que aquejan a las plantas son una de las principales razones de las pérdidas de cultivos alrededor del mundo. Por lo que son una gran amenaza a la seguridad alimenticia global. Para reducir o eliminar la presencia de estos fitopatógenos se utiliza con frecuencia pesticidas químicos. La aplicación de estos pesticidas ha aumentado en las últimas décadas siendo el mayor consumidor Asia, seguido de Europa. Mientras que los mayores productores de pesticidas son China seguido de Estados Unidos ((Prashar & Shah, 2016). Los

cuatro grupos de plagas de importancia económica para la caña de azúcar en Guatemala son: la chinche salivosa, barrenadores de tallo, plagas de raíz y ratas de campo (CENGICAÑA ,2017)

Los pesticidas son sustancias tóxicas bioactivas que pueden influenciar de forma directa o indirecta la producción agrícola, la calidad de los agroecosistemas y la salud del suelo. Entre los pesticidas se incluyen los insecticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas, nematocidas, etc. Estos se pueden clasificar según la peste a eliminar, su composición química, persistencia en suelo (vida media), espectro de actividad, modo de aplicación, formulación, toxicidad y volatilidad (Baweja et al., 2020). Idealmente el pesticida no debe afectar a otros organismos, deben poseer una baja vida media, ser económicos y biodegradables. Sin embargo, muchos pesticidas son tóxicos para todo tipo de vida por lo que pueden llegar a contaminar tanto el suelo como el agua y entrar en la cadena trófica. Por todo lo descrito anteriormente, los pesticidas son considerados una gran amenaza para la diversidad del suelo y para hábitats naturales en el suelo (Baweja et al., 2020; Prashar & Shah, 2016).

Los pesticidas tienden a permanecer por periodos prolongados en el suelo ya que tardan un mayor tiempo en degradarse que las plantas o los animales. Los residuos químicos no son metabolizados de forma rápida. Los factores que afectan la persistencia de los pesticidas en el suelo son: el tipo de suelo, el contenido de materia orgánica, la concentración de iones de hidrógeno, diversidad del microbiota del suelo, la presencia de invertebrados, la temperatura, la precipitación y la radiación de rayos ultravioletas provenientes del sol. Entre las clasificaciones químicas principales de los pesticidas se encuentran los organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. Estos tienen diversos efectos en el microbiota del suelo como la pérdida de diversidad de microorganismos, la pérdida de biomasa y toxicidad. Los componentes de los pesticidas cambian las dinámicas poblacionales del suelo debido a que el microbioma del suelo se ve afectado por tales compuestos. Se ha demostrado que afecta el balance nutricional y disponibilidad de estos en el suelo (Mehjin A M et al., 2019; Prashar & Shah, 2016).

## **2. Salud del suelo**

El suelo es considerado uno de los tipos de ecosistemas más diversos. Se estima que cada gramo de tierra contiene entre 1000 y 1 000 000 de especies de bacterias diferentes (Alteio et al., 2020). Esta gran cantidad de bacterias y microorganismos presentes hacen del suelo un reservorio de diversidad genética y metabólica. Sin embargo, la caracterización de su diversidad microbiana aún es pobre. Los microorganismos en estos sistemas tienen roles importantes en los ciclos biogeoquímicos como el ciclo del nitrógeno y del carbono. Están directamente relacionados con la salud del suelo, la cuál es vital para la seguridad alimentaria del planeta (Díaz-Rodríguez et al., 2021). Los factores más importantes que influyen la composición del ecosistema del suelo son sus propiedades fisicoquímicas, el pH, la humedad y la temperatura (Kaushik et al., 2020).

Se ha visto que el uso intensivo del suelo para la agricultura daña su calidad. En las últimas décadas se han observado cambios sin precedente en la diversidad del suelo. Lo anterior causado por las alteraciones antropocéntricas como son: el aumento del uso de fertilizantes sintéticos, pesticidas y el cambio de uso en el suelo para incrementar la producción de alimentos (Bollmann-Giolai et al., 2020). Esto ha llevado a preocupaciones sobre la sostenibilidad de sistemas de agricultura intensivos. Es importante obtener información sobre los ecosistemas microbianos del

suelo para generar alternativas sostenibles de un mejor manejo y monitorea el estado de este. De manera que se pueda mantener y mejorar la salud del suelo (Q. L. Chen et al., 2020).

## **2.1. Degradación de los suelos**

La degradación del suelo consiste en la declinación en las condiciones como el pH, la salinidad, la erosión, etc. Este declive es causado por diferentes factores como: uso inapropiado, mal manejo, prácticas agrícolas inadecuadas etc. La degradación de los suelos baja la productividad de la agricultura por lo que es un problema ambiental serio ya que los suelos son un recurso natural fundamental para la vida. La degradación de los suelos se puede dividir en tres categorías física, química o biológica (Karlen & Rice, 2015; Lehman et al., 2015).

### **2.1.1. Química**

#### **2.1.1.1. Salinidad**

La habilidad de las plantas para crecer se ve afectada por distintos factores químicos del suelo entre los que se incluyen altas concentraciones de sal. Las altas concentraciones de salinidad en el suelo afectan a las plantas por medio de dos mecanismos. El estrés osmótico y la toxicidad iónica (Haj-Amor et al., 2022). El primero tiene un efecto a corto plazo ya que ocurre cuando el cultivo absorbe iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  lo cual reduce el potencial osmótico entre la raíz, el suelo y la disponibilidad del agua. El segundo induce toxicidad que afecta la habilidad de las plantas para absorber nutrientes debido a las altas concentraciones de estos iones dentro de la planta (Ullah et al., 2021).

#### **2.1.1.2. Acidificación del suelo**

La acidificación del suelo es causada por la precipitación de iones de hidrógeno ( $\text{H}^+$ ), la deposición de gases acidificantes atmosféricos o partículas como el dióxido de sulfuro, el amoníaco, el ácido hidroclorehídrico y ácido nítrico. Otra causa es la aplicación de fertilizantes con contenido de sales de sulfuro, urea o amonio. La mineralización de la materia orgánica es otro factor que afecta el pH del suelo (Goulding, 2016). La precipitación de iones de hidrógeno provoca la disminución del pH. El pH del influye en la disponibilidad de nutrientes del suelo para las plantas como y en cómo reaccionan los nutrientes entre sí (Agriculture Victoria, 2020).

#### **2.1.1.3. Residuos químicos**

Los residuos químicos en el suelo pueden ser desde metales pesados hasta pesticidas. En ambos casos pueden ser dañinos para todo el ecosistema, desde las plantas, hasta los microorganismos del suelo e incluso para el consumidor al alimentarse con los productos de suelos contaminados. Las bacterias pueden proliferarse pobremente en ambiente tóxicos. Estos residuos químicos afectan negativamente a los PGPB ya que pueden llegar a inactivan sus características promotoras del crecimiento, especialmente de los fijadores de nitrógeno y solubilizados de fósforo (Riyaz et al., 2021). Los metales pesados como el cadmio (Cd), cromo (Cr), plomo (Pb), aluminio (Al), mercurio (Hg) etc., son tóxicos tanto para los microorganismos como para las plantas, siendo tóxicos incluso en bajas concentraciones. Algunos de los efectos comunes en plantas son inhibición del crecimiento, fotosíntesis, clorosis, alteraciones en el balance de agua y asimilación de nutrientes y senescencia. Estos efectos pueden llegar a matar a la planta (Kumari et al., 2020).

## **2.1.2. Física**

### **2.1.2.1. Erosión**

Este tipo de degradación consiste en el movimiento de partículas del suelo de un lugar a otro. Esto puede darse por el viento o por el agua. La erosión es un fenómeno natural que ha sucedido a lo largo de los siglos creando valles, ríos y formando las montañas. Esta erosión generalmente ocurre de forma lenta. Sin embargo, las acciones humanas como malas prácticas de agricultura, tala de bosques, alteración del flujo de las fuentes de agua etc. han acelerado el ritmo de la erosión (Qiu et al., 2021). El agua causa erosión debido a que las partículas del suelo son desplazadas por gotas de lluvia o el agua que corre. Este puede causar la remoción de una capa uniforme del suelo formando canales y surcos. El viento causa erosión debido a la remoción de partículas del suelo (Acosta-Martínez et al., 2015).

### **2.1.2.2. Compactación**

Este fenómeno sucede cuando las partículas del suelo son presionadas, reduciendo el tamaño de poro entre ellas. Esto a su vez causa que la infiltración y el drenaje de agua sea menor ya que poros más grandes tienden a mover de manera más efectiva el agua hacia la profundidad del suelo que poros más pequeños. Por otro lado, el intercambio de gases es más requiere de mayor tiempo por lo que causa problemas relacionadas a la aireación. En un suelo con mayor compactación las raíces del cultivo necesitan una mayor fuerza para penetrar en este provocando un menor crecimiento o que requiere más tiempo (University of Minnesota Extension, 2018).

## **2.1.3. Biológica**

La degradación biológica se define como la pérdida de materia orgánica resistente (humificada) por acción de la mineralización acelerada. El término, también es equiparado con el agotamiento o pérdida de la cobertura vegetal, a la par de la materia orgánica, y para indicar la disminución de los organismos beneficiosos del suelo (ODEPA, 2013). La degradación biológica del suelo ocurre principalmente por el uso intensivo de este y la aplicación de tecnología inadecuada. Entre los factores que influyen se encuentran la adición de fertilizantes químicos. Lo anterior ocasiona una pérdida de biodiversidad y de la materia orgánica. Estas pérdidas repercuten en funciones del suelo como la transformación, reciclado y posterior asimilación de los por las plantas (Piscitelli, 2015).

### **2.1.3.1. Materia orgánica**

La materia orgánica es el principal sumidero y fuente de fitonutrientes en los ecosistemas. En ella se encuentran alrededor del 95% del nitrógeno (N) y el sulfuro (S) y entre 20% al 25% del fósforo (P) presente en el suelo. Tiene efectos importantes en el intercambio iónico, el almacenamiento de humedad y la capacidad de infiltración del suelo, promueve la incorporación de nutrientes y es el principal sustrato proveedor de fuentes de carbono para la producción de energía (ODEPA, 2013). Por lo que su degradación está directamente relacionada con el declive de la diversidad microbioma (Orgiazzi & Panagos, 2018).

### **2.1.3.2. Diversidad de microorganismos del suelo**

Los microorganismos del suelo juegan papeles claves en los ciclos de los nutrientes, descomposición de desechos y residuos de diferente naturaleza, así como en la desnaturalización de sustancias contaminantes. Estos microorganismos son vitales para ciclos de vida en el suelo

(ODEPA, 2013). El deterioro o eliminación de una o más poblaciones significativas de microorganismos del suelo tiene como resultado cambios en los ciclos biogeoquímicos lo que termina afectando los cultivos (Orgiazzi & Panagos, 2018).

### **3. Microorganismos del suelo**

Tradicionalmente se ha pensado que el suelo es simplemente una fuente de nutrientes para las plantas, cuando en realidad es un ecosistema complejo que alberga bacterias, hongos, protistas y animales (Jacoby et al., 2017). Las plantas exhiben una diversa gama de interacciones con estos organismos que habitan en el suelo. Estas interacciones ecológicas van desde competitivas, explotadoras, neutrales, comensales y mutualistas (Furtak et al., 2018). Los microorganismos realizan una variedad de funciones vitales del suelo al regular el ciclo de nutrientes, descomponer la materia orgánica, definir la estructura del suelo, suprimir enfermedades de las plantas y apoyar la productividad de las plantas. La presencia de microorganismos y su actividad puede afectar la estructura del suelo (Coban et al., 2022). Desde la década de los 2000, las investigaciones se han enfocado en documentar la abundancia y diversidad del microbioma de la raíz de las plantas a través de la metagenómica y ha disminuido el estudio cepas microbianas individuales. Los resultados de los estudios de secuenciación han demostrado que la rizosfera de la planta es un punto de riqueza ecológica, que albergan una enorme variedad de taxones microbianos (Jacoby et al., 2017).

Los suelos contienen una variedad de formas de vida fáciles de ver al ojo humano, las cuales incluyen las raíces, los insectos y los gusanos. Sin embargo, al quitar todo esto queda una increíble diversidad de comunidades complejas de organismos que no pueden verse a simple vista los cuales incluyen bacterias, arqueas, hongos y virus. Estos tienen un gran impacto en las propiedades del suelo y en sus procesos (Orgiazzi & Panagos, 2018). La integridad del ecosistema depende de la estabilidad, residencia y funcionamiento de estas comunidades microscópicas. Estas afectan una variedad de procesos como la solubilidad de los componentes minerales, reducen químicamente compuestos orgánicos, modifican la estructura de los suelos. La estructura del suelo se ve afectada de manera positiva por la producción de polisacáridos. La producción de ácidos orgánicos está directamente relacionada con la disponibilidad de los minerales del suelo. Todo esto contribuye a que los organismos que viven por encima del suelo puedan alimentarse ya que muchos dependen de la descomposición de la materia para poder alimentarse (Tate, 2020).

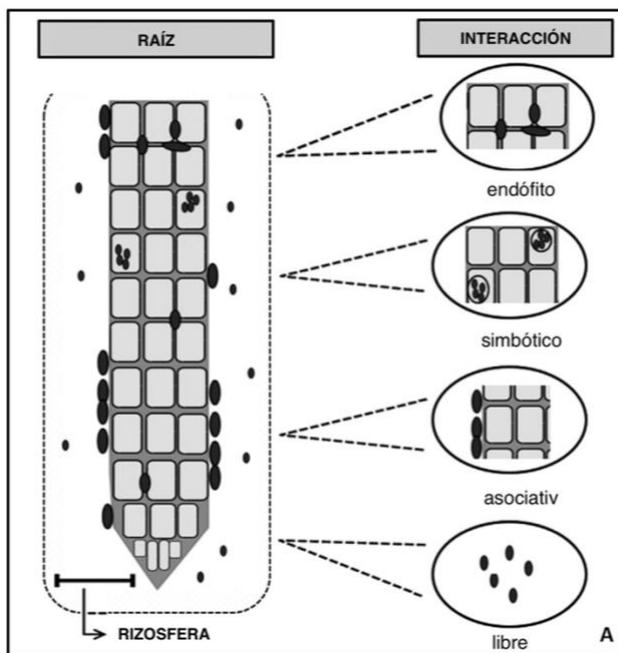
#### **3.1. Bacterias promotoras del crecimiento en plantas**

El papel que juegan las bacterias en la salud del suelo es indiscutible por lo que hay múltiples estudios que se han dedicado a estudiar las características de estas, especialmente aquellas que están involucradas en el crecimiento de las plantas para aprovechar sus beneficios en la agricultura. Esto se debe a que pueden ahorrar costos en fertilizantes y mejorar la calidad de los cultivos (de Souza et al., 2015).

Las bacterias promotoras del crecimiento, -PGPB- por sus siglas en inglés (Plant growth-promoting bacteria). Son bacterias que pueden mejorar el crecimiento de las plantas y protegerlas de enfermedades y estrés abiótico por medio de una gran variedad de mecanismos. Estas bacterias establecen una asociación con las plantas, la cual en ocasiones puede ser endofítica, es decir, que las bacterias se encuentran dentro de la raíz de las plantas. Por otro lado, si las bacterias colonizan las raíces de las plantas y promueven el crecimiento de esta se les llama rizobacterias promotoras

del crecimiento, -PGRR- por sus siglas en inglés (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Backer et al., 2018). Muchas veces ambos términos se usan de manera intercambiable. En este trabajo nos referiremos a ambas como bacterias promotoras del crecimiento (PGPB) para utilizar un término que abarque más interacciones entre la planta y ellas (de Souza et al., 2015; Timmusk et al., 2017).

Figura 1: Posibles interacciones entre la raíz de las plantas y las PGPB.



Fuente: (R. de Souza et al., 2015a)

Leyenda de la figura: Ilustración de las interacciones de las bacterias con la raíz y el suelo de la planta. Las interacciones pueden ser endofíticas, simbióticas, asociativas o libres.

La interacción entre las plantas y las bacterias (Figura 1) ocurre de manera simbiótica, endofítica o asociativa con diferentes grados de proximidad con relación a la raíz y el suelo aledaño. Estas bacterias ayudan a las plantas a través de mecanismos variados entre lo que se incluyen la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato, la actividad de la ACC desaminasa y la producción de fitohormonas entre otros (ver Cuadro 1) (de Souza et al., 2015).

Cuadro 1: Bacterias registradas con habilidades promotoras del crecimiento.

Especie/Género	Habilidad	Referencias
<i>Aeromonas punctata</i>	Producción de IAA	Iqbal y Hasnain, 2013
<i>Azospirillum brasilense</i>	Producción de IAA	Camilios-Neto, et al., 2014
<i>Bacillus subtilis</i>	Producción de IAA	Tahier, et al., 2017
<i>Burkholderia phytofirmas</i>	Producción de IAA	Poupin et al., 2016
<i>Azotobacter sp.</i>	Fijación de nitrógeno	Huang et al., 2012;
<i>Paenibacillus sp.</i>	Fijación de nitrógeno, solubilización de potasio	Anand et al., 2013; Goswami et al., 2016.

Especie/Género	Habilidad	Referencias
<i>Burkholderia sp.</i>	Fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, potasio, ACC desaminasa, producción de pirrolnitrina	Onofre-Lemus et al., 2009; Nazia, et al., 2021,
<i>Azospirillum sp.</i>	Fijación de nitrógeno	Angus et al., 2013;
<i>Herbaspirillum sp.</i>	Fijación de nitrógeno	Habibi et al., 2014; Geddes et al., 2015;
<i>Arthrobacter sp.</i>	Solubilización de fósforo	Oteino et al., 2015
<i>Bacillus sp.</i>	Solubilización de fósforo, ACC desaminasa, fijación de nitrógeno, solubilización de silicatos, lipasas, proteasas, quitinasas	Oteino et al., 2015, Cruz et al., 2022, Rabbani, et al., 2015, (Veliz et al., 2017)
<i>Beijerinckia</i>	Solubilización de fósforo	Oteino et al., 2015
<i>Enterobacter sp.</i>	Solubilización de fósforo, solubilización de silicatos	Oteino et al., 2015., Cruz et al., 2022
<i>Microbacterium sp.</i>	Solubilización de fósforo, quitinasas, gluconasas	Oteino et al., 2015, Ngalimat et al., 2021
<i>Pseudomonas fluorescens.</i>	Solubilización de fósforo,	Oteino et al., 2015
<i>Erwinia sp.</i>	Solubilización de fósforo	Oteino et al., 2015
<i>Rhizobium sp.</i>	Solubilización de fósforo	Oteino et al., 2015
<i>Mesorhizobium sp.</i>	Solubilización de fósforo	Oteino et al., 2015
<i>Flavobacterium sp.</i>	Solubilización de fósforo	Oteino et al., 2015
<i>Rhodococcus sp.</i>	Solubilización de fósforo	Oteino et al., 2015
<i>Serratia sp.</i>	Solubilización de fósforo	Oteino et al., 2015
<i>Pseudomonas spp.</i>	Solubilización de fósforo, Solubilización de potasio, ACC desaminasa, fijación de nitrógeno, solubilización de silicatos, Producción de pirrolnitrina, lipasas, proteasas	Liu et al., 2012; Onofre Lemus 2009, Sighn et al., 2020, Cruz et al., 2022 Oteino et al., 2015, Rabbani, et al. 2015
<i>Bacillus edaphicus</i>	Solubilización de potasio	Liu et al., 2012
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	Solubilización de potasio	Liu et al., 2012
<i>Acidithiobacillus spp.</i>	Solubilización de potasio	Liu et al., 2012
<i>Aliccaligenes sp.</i>	Producción de ACC desaminasa	De Souza, et al., 2015
<i>Ochroactrum sp.</i>	Producción de ACC desaminasa	De Souza, et al., 2015
<i>Aeromonas sp.</i>	Solubilización de silicatos	Cruz, et al., 2022
<i>Serratia sp.</i>	Producción de pirrolnitrina, quitinasas	Pawar et al., 2019
<i>Serratia marescens</i>	Producciones de quitinasas	(Veliz et al., 2017)

(R. de Souza et al., 2015b; R. M. dos Santos et al., 2020; Oteino et al., 2015)

Las PGPB son también conocidas por aliviar factores de estrés tanto abióticos como bióticos. Al estrés abiótico se le atribuye hasta el 50% de pérdidas en producción, mientras que al biótico al 30%. Los abióticos incluyen la salinidad, inundaciones, contaminación con metales pesados, temperaturas extremas, pH (Poria et al., 2022).

Es posible utilizar estas bacterias como inoculantes para mejorar la calidad y cantidad de diferentes cultivos, así como reducir el uso de fertilizantes industriales. El éxito y eficiencia de las PGPB es influenciado por varios factores entre los que se incluyen la habilidad de colonizar las raíces, crear ambientes favorables para su desarrollo y función, la salud del suelo. En este último se encuentran factores como tipo de suelo, nutrientes contaminación con metales pesado, humedad, diversidad microbiana y estado del suelo según las prácticas agrícolas que han utilizado en él (de Souza et al., 2015; Shah et al., 2021).

### 3.1.1. PGPB en caña de azúcar

Existe una gran diversidad de PGPB asociadas a la rizosfera y brotes de la caña de azúcar. Por lo que su investigación es un pilar importante para la mejora de la productividad del cultivo. En los últimos años han aumentado el número de bacterias asociadas a la caña debido a la implementación de nuevas herramientas moleculares (Antunes et al., 2017). En el Cuadro 2 se detallan algunos de los géneros y especies reportados

Cuadro 2: Especies de bacterias asociadas a la caña de azúcar y sus habilidades.

Especie/Género	Habilidad	Referencia
<i>B. subtilis</i>	Solubilización de fosfato (P)	Rosa, <i>et al.</i> , 2020
<i>B. pumilus</i>	Producción de IAA y gluconasas	Santos <i>et al.</i> , 2018
<i>Bacillus megaterium</i>	Solubilización de fosfato, producción de IAA y fijación de nitrógeno	Chandra, <i>et al.</i> , 2018
<i>Escherichia sp.</i>	Antagonismo a fitopatógenos, producción de IAA, solubilización de P	Patel <i>et al.</i> , 2019
<i>Burkholderia gladioli</i>	Solubilización de P	Muthukumarasamy, <i>et al.</i> , 2017
<i>Bacillus xiomenensis</i>	Producción de IAA, quitinasas, proteasas, ACC desaminasas, solubilización de P	Xia <i>et al.</i> , 2020
<i>Azotobacter sp</i>	Producción de IAA, solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno	Ahmad <i>et al.</i> , 2016
<i>A. brasilense</i>	Fijación de nitrógeno	Lopes <i>et al.</i> , 2012
<i>Gluconacetobacter sp.</i>	Fijación de nitrógeno	Lopes <i>et al.</i> , 2019
<i>Herbaspirillum sp.</i>	Fijación de nitrógeno	Lopes <i>et al.</i> , 2019

Especie/Género	Habilidad	Referencia
<i>Azospirillum sp.</i>	Fijación de nitrógeno, solubilización de P	Lopes et al., 2019,
<i>Bulkholderia sp.</i>	Fijación de nitrógeno, solubilización de silicatos	Lopes et al., 2019; Raturi, et al., 2021
<i>Beijarinckia sp.</i>	Fijación de nitrógeno	Lopes et al., 2019
<i>Janthinobacterium</i>	Solubilización de silicatos	Raturi, et al., 2021

(R. M. dos Santos et al., 2020; Mehnaz, 2011; Ohyama et al., 2014; R. K. Singh et al., 2020)

Estudios como el de Rosa *et al.* (2020) han comprobado que la inoculación de PGPB en la caña pueden ser una manera efectiva de ahorrar costos en fertilizantes con respecto al fósforo. En el estudio comprobaron que la combinación de *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* y  $P_2O_5$  es una alternativa viable. Por otro lado, Li *et al.* (2017) aisló *Pseudomonas spp.* asociadas a la caña de azúcar y verificó que tenían habilidades como solubilización fosfato, producción de ACC desaminasa, producción de IAA y fijación de nitrógeno. Otro estudio realizado por Muthukumarasamy *et al.*, (2017) reportó que la asociación entre *Rosneathales terrae* y *Burkholderia gladioli* con la caña de azúcar mejoraban la solubilización de fosfato y potasio.

### 3.2. Mecanismos/Características de las PGPB

Existen diferentes mecanismos responsables de la interacción entre las plantas y las bacterias que son activados por diversas señales bioquímicas.

#### 3.2.1. Mecanismos directos

Los mecanismos directos de acción de la PGPB involucran la mejora y producción de sustancias necesarias para el crecimiento de las plantas. Estos aumentan la fertilidad del suelo por medio de la movilización de minerales esenciales como el potasio, fósforo y nitrógeno (R. M. dos Santos et al., 2020).

##### 3.2.1.1. Fijación de nitrógeno

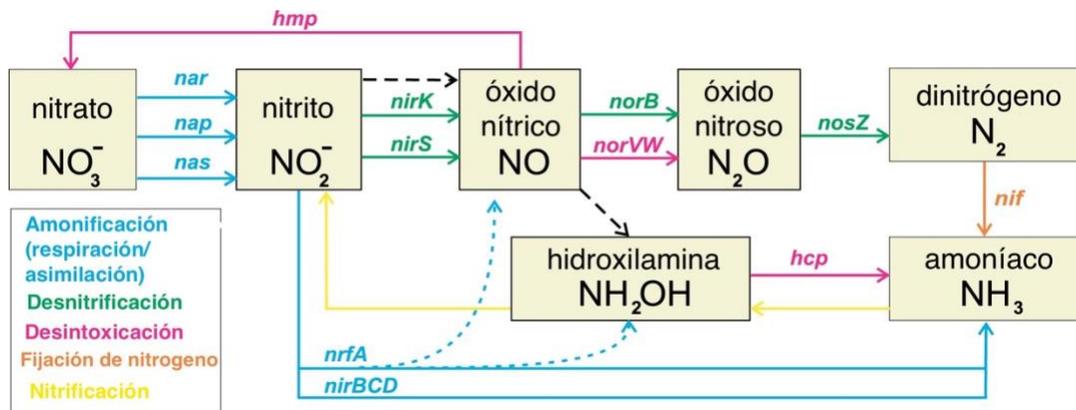
El nitrógeno es un elemento crítico para el crecimiento y la producción de las plantas. Es un componente importante de la clorofila, así como de los aminoácidos. También se encuentra en otras biomoléculas importantes, como ATP y ácidos nucleicos (Wagner, 2011). Aunque es uno de los elementos más abundantes en su forma gaseosa ( $N_2$ ) las plantas solo pueden utilizar formas reducidas de este elemento (Muangthong et al., 2015; Rilling et al., 2018a). La molécula de nitrógeno está compuesta por dos átomos de nitrógeno unidos por un triple enlace covalente, lo que hace que la molécula sea altamente inerte y no reactiva. La nitrogenasa cataliza la ruptura de este enlace y la adición de tres átomos de hidrógeno a cada átomo de nitrógeno. Para realizar este proceso las bacterias necesitan energía la cuál obtienen de compuestos de las rizosferas de sus plantas hospedantes (H. B. Li et al., 2017). Las plantas obtienen nitrógeno de distintas formas como la adición de amoníaco y/o fertilizante de nitrato, estiércol al suelo, la liberación de estos compuestos durante la descomposición de la materia orgánica y fijación biológica de nitrógeno (Rilling et al., 2018a; Wagner, 2011).

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) se lleva cabo por un grupo especializado de procariotas. Estos organismos utilizan la enzima nitrogenasa para catalizar la conversión de

nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) en amoníaco (NH<sub>3</sub>). Las plantas pueden asimilar fácilmente NH<sub>3</sub> para producir las biomoléculas nitrogenadas antes mencionadas. Estos procariotas incluyen organismos acuáticos, como cianobacterias, bacterias del suelo de vida libre, como *Azotobacter*, bacterias que forman relaciones asociativas con plantas, como *Azospirillum* y, lo que es más importante, bacterias, como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, que forman simbiosis con leguminosas y otras plantas. Otros ejemplos de bacterias fijadoras de nitrógeno incluyen especies de *Bacillus*, *Clostridium* y *Klebsiella*. (Rilling, et al., 2018). Algunas de las bacterias utilizadas en biofertilizantes reportadas en distintos estudios en cultivos de leguminosas, arroz y caña que suplen nitrógeno son *Rhizobium spp.*, *Actinorhizobium spp.*, *Azotobacter spp.*, y *Azospirillum spp.* Se usan en cultivos leguminosos, arroz y caña de azúcar (Timmusk et al., 2017).

Por otro lado, existen otras rutas metabólicas por las cuales las plantas pueden obtener nitrógeno y en las cuales las bacterias también se ven involucradas, como la amonificación, desnitrificación y nitrificación. Por ejemplo, cuando un organismo excreta desechos o muere, el nitrógeno de sus tejidos se encuentra en forma de nitrógeno orgánico (por ejemplo, aminoácidos, ADN). Esta materia es descompuesta por varios microorganismos, liberando nitrógeno inorgánico al ecosistema en forma de amoníaco. A este proceso se le conoce como amonificación. De esta manera queda disponible el amoníaco para que las plantas y otros microorganismos lo absorban para su crecimiento (de Chaves et al., 2021). La desnitrificación es el proceso que convierte el nitrato en gas nitrógeno, eliminando así el nitrógeno biodisponible y devolviéndolo a la atmósfera. El gas dinitrógeno (N<sub>2</sub>) es el producto final de la desnitrificación, pero existen otras formas gaseosas intermedias de nitrógeno (Bernhard, 2010). Por otro lado, la nitrificación es el proceso que convierte el amoníaco en nitrito y luego en nitrato. La mayor parte de la nitrificación se produce de forma aeróbica. Hay dos pasos distintos involucrados en la nitrificación. El primer paso es la oxidación del amoníaco a nitrito, que se lleva a cabo por microbios conocidos como oxidantes de amoníaco. Los oxidantes aeróbicos de amoníaco convierten el amoníaco en nitrito a través del intermediario hidroxilamina (Figura 2) (Ferretti et al., 2021). En la siguiente imagen se puede observar las diferentes rutas y los genes involucrados en estas reacciones. En esta las rutas de amonificación, desnitrificación, desintoxicación, fijación de nitrógeno y nitrificación se muestran mediante líneas continuas coloreadas con los nombres de los genes involucrados en cada una (Rodionov et al., 2005).

Figura 2: El ciclo del nitrógeno inorgánico bacteriano.



Fuente: (Rodionov et al., 2005)

Debido a estudios moleculares se sabe que las bacterias fijadoras de nitrógeno poseen genes que les permiten realizar este proceso. Análisis metagenómicos han identificado más de 742

secuencias como genes *nif*, incluidos los genes de la subunidad estructural *nifH*, *nifD*, *nifK* y varios genes adicionales. Se sabe que los genes *nif* bacterianos codifican los componentes del complejo enzimático nitrogenasa. La subunidad estructural de la dinitrogenasa reductasa y las 2 subunidades de la dinitrogenasa están codificadas por los genes *nifH*, *nifD* y *nifK*. Sin embargo, se sabe que hay muchos otros genes *nif* involucrados en la fijación del nitrógeno (Dai et al., 2014).

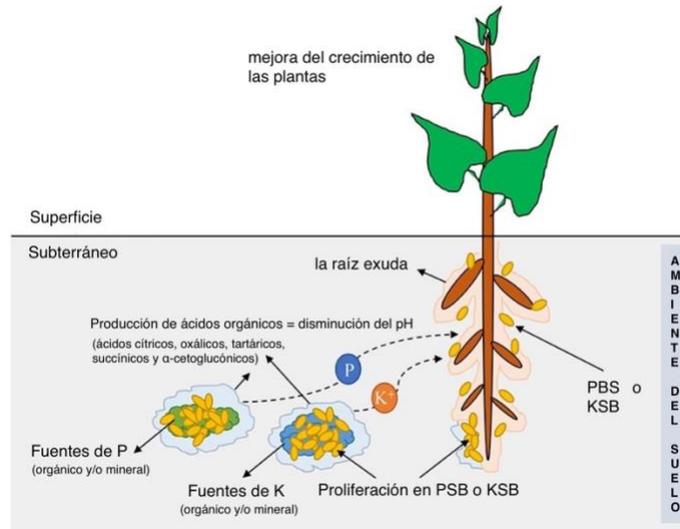
### 3.2.1.2. Solubilización de fosfatos

El fósforo (P) es uno de los principales macronutrientes limitantes que requieren las plantas para crecer, particularmente en regiones tropicales, debido a su baja disponibilidad en el suelo (Kalayu, 2019). Representa entre el 0,2 y el 0,8 % del peso seco de las plantas. La planta lo utiliza para la producción de ácidos nucleicos, enzimas, coenzimas, nucleótidos y fosfolípidos. Este elemento es esencial en todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas como en actividades fisiológicas y bioquímicas, incluida la fotosíntesis, el desarrollo de raíces, el fortalecimiento de tallos, la formación de flores y semillas, la madurez y la calidad del cultivo, producción de energía, reacciones de almacenamiento, crecimiento de raíces, división y agrandamiento celular, fijación de N, resistencia a enfermedades (Alori et al., 2017). La mayoría de los suelos poseen cantidades considerables de P, pero una gran proporción está ligada a los constituyentes del suelo por lo que no está disponible para las plantas. Aunque se complementen con fertilizantes del 75–90% de este químico de fósforo agregado es precipitado por complejos de cationes metálicos y rápidamente se fija en los suelos. Lo que puede impactar en el medio ambiente ya que puede llegar a provocar eutrofización y agotamiento de la fertilidad del suelo (Q. Chen & Liu, 2019; Yuan et al., 2022). Todo esto presenta un desafío para la agricultura por lo que se han buscado alternativas para hacer que el fósforo este en su forma biodisponible para las plantas.

En los últimos años se han estudiado como biofertilizantes los microorganismos que son parte integral del ciclo natural del fósforo a los cuáles se les conoce como solubilizadores de fosfato (PSM, Phosphate Solubilizing Microorganisms). Entre estos microorganismos están incluidos las bacterias, hongos, actinomicetos y algas. Los PSB se pueden dividir en dos clases: microorganismos solubilizadores de P que secretan ácido orgánico, como el ácido glucónico, para disolver los compuestos de P y microorganismos mineralizantes que secretan fosfatasa para mineralizar enzimáticamente los compuestos de P (Q. Chen & Liu, 2019). La aplicación de ambas clases de PSB en el suelo disminuye el pH del suelo y forma una micro área que ofrece P alrededor de la rizosfera de la planta, lo que mejora el suministro de P disponible para la planta y fortalece la actividad de otros microorganismos beneficiosos (S. K. Singh et al., 2022).

Entre las bacterias del suelo que se ha reportado que movilizan fósforo a través de la solubilización y la mineralización incluyen *Pseudomonas spp.*, *Agrobacterium spp.* y *Bacillus circulans*, *cepas de Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Kushneria*, *Paenibacillus*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Serratia*, etc. (Alori et al., 2017).

Figura 3: Interacción de las bacterias solubilizadoras de potasio (KSB) o las bacterias solubilizadoras de fósforo (PSB) con la raíz de la planta para liberar potasio (K) y/o fósforo (P) en formas que pueden ser absorbidas por la planta.



Fuente: (Bakhshandeh et al., 2017).

Leyende de la figura: Mecanismo de interacción de las bacterias solubilizadoras de potasio/fósforo con las raíces de las plantas.

### 3.2.1.3. Solubilización de potasio

El potasio (K) es uno de los macronutrientes esenciales, el tercero más importante después del nitrógeno y el fósforo, para las plantas. Juega un papel vital en el crecimiento y el metabolismo de las plantas. El K se utiliza en el metabolismo, la activación de enzimas, la osmorregulación, el equilibrio de carga y la prevención de la pérdida innecesaria de agua y la regulación del movimiento estomático en las plantas (Sattar et al., 2019). Las reservas de K del suelo oscilan entre el 0,04 y 3 %, pero una proporción considerable está disponible en forma de minerales insolubles, mientras que una pequeña fracción de potasio es accesible a las plantas (1 al 2% del elemento) y la absorbe directamente por las raíces de las plantas (Etesami et al., 2017). En los suelos, la fijación de K es comparativamente rápida; sin embargo, su liberación es un proceso lento. Muchos microorganismos solubilizadores de potasio (KSM), como hongos, bacterias y algunos hongos micorrízicos arbusculares (AM), ayudan en la movilización de K del suelo a las plantas. Estos convierten la forma no disponible de K (minerales arcillosos) a la forma disponible ( $K^+$ ). Por lo tanto, las bacterias solubilizadoras de potasio (KSB, potassium solubilizing bacteria) poseen potencial para mejorar la disponibilidad de potasio en los suelos y reducir el uso de fertilizantes químicos con potasio. KSB solubiliza diferentes tipos de K en el suelo al secretar ácidos orgánicos, como ácido tartárico, cítrico y oxálico. Esto impulsa el crecimiento de las plantas, el rendimiento y el estado de fertilidad del suelo. Los mecanismos utilizados por los microorganismos para la disolución de K son la producción de ácidos orgánicos, la reducción del pH del suelo, la acidólisis, la quelación, las reacciones de intercambio y la formación de complejos (Pandey et al., 2020; Sattar et al., 2019). Entre los géneros más comunes de bacterias solubilizadores de K se incluyen *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Leclercia* (Sun et al., 2020).

#### **3.2.1.4. Solubilización de silicatos**

Si (silicio) es el segundo elemento más abundante en la corteza terrestre con alrededor del 27%. En su mayoría se encuentra en su forma insoluble como silicato de magnesio, silicato de aluminio, silicato de hierro, silicato de calcio, sodio y silicato de potasio. También esta viene en forma de caolín, esmectita, vermiculita, cuarzo, sílice amorfa y formas cristalinas como feldespato, ortoclasa y plagioclasa (Raturi et al., 2021).

Está involucrado en la fertilidad del suelo y aumenta las defensas de las plantas. El Si no es considerado un nutriente vital para las plantas, pero se ha encontrado que tiene beneficios para las gramíneas como el arroz, el maíz y la caña de azúcar. El Si también influye en la salud de la planta durante condiciones desfavorables y la protege de angiospermas, insectos, nemátodos, así como estrés abiótico provocado por metales pesados y metaloides (J. A. Cruz et al., 2022)

Las bacterias solubilizadoras de silicatos (SSB, por sus siglas en inglés) están involucradas en la conversión de silicatos en sílica soluble. Estas bacterias producen silicasa, una enzima que solubiliza los silicatos en sílica soluble, haciendo que el Si esté disponible para el uso de las plantas. Este tipo de bacterias se encuentran en el suelo, agua, y sedimentos acuáticos. Sin embargo, se encuentran en proporciones pequeñas (J. A. Cruz et al., 2022; Lee et al., 2019).

El mecanismo de acción de la solubilización de silicatos, al igual que la de fosfatos, consiste en la producción de ácido orgánico por lo que dependiendo del medio utilizado es difícil distinguir entre ambos (Vinod Babu et al., 2020). Un estudio de 2020 encontró que mejores solubilizadores de Si también solubilizan P en el medio NBRIP que contiene TCP como fuente de fósforo. Según este estudio la producción de ácido maleico, succínico y fumárico junto con la actividad de la fosfatasa ácida son los mecanismos de solubilización usados por las bacterias que analizaron. (Bist et al., 2020). Sin embargo, el mecanismo completo de la solubilización de Si aún no está completamente elucidado (Raturi et al., 2021).

#### **3.2.1.5. Producción de IAA**

Las fitohormonas son las responsables del desarrollo de la planta y permiten que esta tolere diferentes condiciones de estrés abiótico. Algunas PGPB son capaces de producir estas fitohormonas las cuales incluyen citoquinas, auxinas y etileno. Estas juegan diferentes papeles en los procesos de crecimiento de la planta como la multiplicación de las células (R. M. dos Santos et al., 2020).

Las auxinas, por ejemplo, están involucradas en el desarrollo de la planta, la auxina más conocida es el ácido indol-3-acético (IAA, por sus siglas en inglés). El IAA juega un papel esencial en la división celular, desarrollo del fruto, la senescencia de las hojas estimula el desarrollo de las raíces, hojas y flores de plantas. También es responsable de los sistemas de comunicación entre plantas y bacterias. Se sabe que alrededor del 80% de las bacterias aisladas de la rizosfera producen esta hormona (R. M. dos Santos et al., 2020; Shah et al., 2021). El triptófano es el principal precursor de la síntesis de IAA por lo que agregarlo al medio de cultivo siempre resulta en el incremento de su producción. La biosíntesis sucede por medio de una reacción de cinco pasos que está codificada en los genes *trp* (R. M. dos Santos et al., 2020).

Factores ambientales que afectan la producción de IAA incluyen el pH, la temperatura. Estudios sugieren que la disponibilidad de vitaminas puede afectar la síntesis de IAA en bacterias. El carbono y nitrógeno son nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas (Fu et al., 2015).

Sin embargo, cabe resaltar que la correlación entre el crecimiento de la planta y la interacción de IAA no es lineal, ya que las plantas deben tener óptimos niveles endógenos de IAA para un buen desarrollo. El exceso de IAA también puede causar daños a la planta como la disminución en el crecimiento de la raíz; por lo que estimular la planta con esta fitohormona debe ser cuidadosamente monitoreado para evitar la sobredosis (R. M. dos Santos et al., 2020)

#### **3.2.1.6. Producción de pirrolnitrina**

La pirrolnitrina (PRN) es un halometabolito de pirrol con efectos antifúngicos. Tiene usos en la agricultura, farmacéutica y en la industria. La fórmula química de la pirrolnitrina es 3-cloro-4-(2-nitro-3-clorofenil) pirrol ya que es un derivado del fenilpirrol que contiene dos átomos de cloro, un benceno y dos anillos pirrólicos. Los fenilpirrol han sido probados como efectivos contra *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Penicillium*, *Candida* spp. y varias bacterias Grampositivas y fitopatógenos fúngicos del suelo como *Rhizoctonia solani* y *Fusarium sambucinum* (Pawar et al., 2019).

La pirrolnitrina exhibe efectos inhibitorios mediante la obstrucción de la síntesis de biomoléculas vitales como el ADN, ARN y proteínas. Así como también impidiendo la división mitótica y desacoplando la fosforilación oxidativa (Zaman et al., 2021). La producción de este compuesto está regulada por medio del *quorum-sensing*, lo que también indica que la colonización eficiente del ambiente es vital para puede producirse y funcionar como un control biológico (An et al., 2022). Los genes involucrados en la producción de pirrolnitrina son *PrnABCD*, que producen sus respectivas enzimas (PrnA, PrnB, PrnC, PrnD) (Pawar et al., 2019). Para su detección se utiliza el reactivo de Ehrlich ya esta forma un anillo de pirrol que se condensa con p-dimetilaminobenzaldehído para formar un complejo de color violeta (Pawar et al., 2019).

Bacterias del género *Burkholderia* spp. se han reportado como productoras de este compuesto (Zaman et al., 2021). Así como también *Serratia* y *Pseudomonas* spp. (Pawar et al., 2019).

#### **3.2.2. Mecanismos indirectos**

Los mecanismos indirectos de acción de las PGPB incluyen la producción de agentes de biocontrol que inactivan o matan patógenos lo que provee de un ambiente sano a las plantas. Esto incluye la antibiosis, competencia y enzimas líticas como las proteasas, quitinasas y gluconasas las cuales suprimen directamente el crecimiento de patógenos de plantas al dañar la integridad estructural de sus paredes celulares (Chandran et al., 2021; H. Wang et al., 2021). Las bacterias también pueden mejorar el crecimiento de las plantas al reprimir patógenos y promover el sistema inmune innato de la planta en contra de estos. A esto se le conoce como resistencia sistemática inducida (ISR, por sus siglas en inglés) (R. M. dos Santos et al., 2020). Las enzimas hidrolíticas degradan componentes de la pared celular de hongos y oomicetos, de manera que se pueden utilizar como biocontrol para plagas de este tipo como los son los hongos fitopatógenos. Entre los géneros más destacados que producen este tipo de enzimas se encuentran *Bacillus* y *Pseudomonas* las suprimen el crecimiento y desarrollo de hongos filamentosos en condiciones *in vitro* (Bhattacharyya et al., 2020; R. de Souza et al., 2015a; Kumari et al., 2020).

### 3.2.2.1. Producción de lipasas

Las lipasas se utilizan extensamente en la industria ya que hidrolizan enlaces de éster de acilo de acilgliceroles y actúan también en las reacciones de esterificación y transesterificación. Estas enzimas son hidrolasas que hidrolizan específicamente grasas en ácidos grasos y glicerol (Ilesanmi et al., 2020a). Son producidas por muchos microorganismos, lo cuales han sido encontrados en vertederos industriales, fabricadas de procesamiento de aceites y restos de alimentos, sin embargo, son ubicuas y se encuentran también en el suelo, agua, aire y plantas. Esta enzima junto con otras enzimas líticas pueden lisar la pared celular de hongos fitopatógenos. Se ha encontrado que bacterias del género *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp. pueden producirlas (Rabbani et al., 2015; Willerding et al., 2011).

### 3.2.2.2. Producción de proteasas

Las proteasas son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos (López-Otín & Bond, 2008). Son usadas en la industria alimenticia tanto para animales como para humanos, en dónde al hidrolizar las proteínas mejoran las propiedades organolépticas de la comida. Se usan también para el manejo de desechos y en la industria del cuero (Suberu et al., 2019). Las bacterias productoras de proteasas son reconocidas como actores clave en la degradación microbiana de materia orgánica. Al secretar proteasas extracelulares hidrolizan proteínas complejas en pequeños péptidos y aminoácidos aptos para la absorción celular de otros organismos. Debido a esto están involucrado en la mineralización del nitrógeno. Por lo que son de importancia biogeoquímica y ecológica (Das & Varma, 2010; X. Y. Zhang et al., 2015).

### 3.2.2.3. Producción de quitinasas

La quitina es uno de los biopolímeros más abundantes en la tierra, después de la celulosa. Se encuentra en muchos organismos como en los caparazones y exoesqueletos de los artrópodos (crustáceos e insectos). También está presente en la pared celular de muchos hongos (Banerjee & Mandal, 2019). Debido a esto muchas bacterias poseen genes que codifican para enzimas quitinolíticas. Las bacterias quitinolíticas descomponen la quitina tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y se encuentran en una amplia gama de hábitats. En el suelo y la rizosfera, las bacterias utilizan la quitina de insectos y hongos como fuente de carbono y nitrógeno. La hidrólisis de quitina consiste en dividir primero el polímero en oligómeros solubles en agua, seguido de la división de estos oligómeros en dímeros por otra enzima, que divide los dímeros en monómeros. Una gran parte de los cultivos se pierde debido a plagas por lo que la agroindustria depende de fungicidas y pesticidas. Por lo que microorganismos que produzcan estas enzimas pueden ser una alternativa para combatir estos problemas (M. Kumar et al., 2018; Veliz et al., 2017). Estas enzimas se han encontrado en bacterias como *Streptomyces*, *Bacillus thuringiensis*, *Serratia marescens*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas* (Veliz et al., 2017).

### 3.2.2.4. Producción de gluconasas

Las  $\beta$ -glucanasas producidas por las bacterias asociadas a las plantas también poseen un papel versátil en la fisiología del crecimiento de las plantas y ayudan a las plantas a superar diferentes tipos de estrés. Las  $\beta$ -glucanasas también protegen a la planta contra las infecciones causadas por hongos ya que degradan su pared celular (Jha, 2022). Estas enzimas degradan polisacáridos complejos (Edison & Pradeep, 2020). Por ejemplo, la endo- $\beta$ -1,3(4)-glucanasa (EC 3.2.1.6), puede cortar los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,4 en glucanos, como la laminarina (Liberato et al., 2021). Se han encontrado en bacterias como *Streptomyces*, *Arthrobacter* sp.,

*Cellulosimicrobium cellulans*, *Nocardiopsis* sp., *Paenibacillus* sp., *Thermotoga neapolitan*. Por lo tanto, las glucanasas bacterianas se consideran una solución ambientalmente segura para muchas complicaciones ambientalmente, aumentar el rendimiento de los cultivos de una manera ecológica. (Wu et al., 2018).

### **3.2.2.5. Producción de ACC desaminasas**

El etileno es una fitohormona endógena gaseosa que en pequeñas concentraciones participa en los procesos del crecimiento de la planta, desarrollo y senescencia. A pesar de esto también se le ha identificado como una fitohormona de estrés ya que, en casos de daños por patógenos, inundaciones, sequías, salinidad y contaminantes se acelera su producción. Esto tiene efectos adversos como la disminución en el crecimiento de las raíces y por lo tanto de la planta (R. de Souza et al., 2015a). Una forma en que se puede reducir los niveles de etileno de la planta es por medio la enzima bacteriana 1-aminociclopropano- 1-carboxilato (ACC) desaminasa. Esta enzima regula la producción de etileno metabolizando el ACC, el cual es el precursor del etileno, en ácido  $\alpha$ -cetobutírico y amoníaco. Cuando la planta excreta el ACC las bacterias lo hidrolizan por medio de la enzima ACC desaminasa (de Souza et al., 2015; Ngalimat et al., 2021). En la agricultura el etefón, es un compuesto liberador de etileno y fue el primer regulador de crecimiento (1960) utilizado para el manejo de cultivos. Los efectos de este regulador se le atribuyen al etileno. Hoy en día es utilizado en plantaciones de caña de azúcar ya que acelera la maduración, incrementa el rendimiento, inhibe la floración y extiende las temporadas de cosecha y molienda (Cunha et al., 2017). Se ha observado que ACC desaminasa está presente en especies del género *Burkholderia* (Onofre-Lemus et al., 2009).

### **3.2.2.6. Biocontrol de patógenos**

Un biocontrol o control biológico, se define como la explotación de agentes vivos, para combatir organismos que causan daño como los patógenos, plagas y malas hierbas. En estos también se incluyen virus (Stenberg et al., 2021). Los controles biológicos siempre deben constar de 3 elementos: el agente de biocontrol, la plaga o patógeno y una parte humana interesada que se beneficie de él (H. Wang et al., 2021).

El uso de PGPB como agentes de biocontrol como alternativa a los pesticidas se ha popularizado debido a las preocupaciones ambientales de hoy en día (Ngalimat et al., 2021). Algunas PGPB protegen a las plantas contra ataques de plagas y patógenos. Estas actividades de biocontrol se deben a su capacidad para biosintetizar metabolitos antimicrobianos como cianuro de hidrógeno (HNC), fenazinas, pioluteorina, 2,4-diacetilfloroglucinol, tensina, viscosinamida y pirrolnitrina. También pueden competir contra los patógenos por los nutrientes y estimular el sistema inmunológico de las plantas (Mahdi et al., 2022). Bacterias del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Streptomyces* han sido estudiadas como biocontroles (Ngalimat et al., 2021).

## **4. Caracterización del microbioma bacteriano del suelo.**

El microbioma se define como una comunidad característica de organismos que ocupan un hábitat definido con distintas propiedades fisicoquímicas. Pueden encontrarse ya sea en personas, plantas, suelo, océano. Sedimentos o atmósfera (Berg et al., 2020). Por lo tanto, el microbioma del suelo consiste en una comunidad dinámica de microorganismos asociados al suelo y las plantas. En este se incluyen bacterias, hongos, virus, artrópodos etc., (NY State University, s. f.). Sin embargo,

en este trabajo nos referiremos exclusivamente al microbioma bacteriano del suelo. El microbioma del suelo es difícil de generalizar porque depende de muchos factores bióticos y abióticos, como la humedad, el pH, el tipo de vegetación en el área, la estructura y aireación del suelo, así como también la competencia o cooperación con otros microbios cercanos. Por lo tanto, la salud del suelo puede variar según el ecosistema y su flora y fauna local (Clutter, 2021).

Durante décadas la microbiología utilizó métodos tradicionales de cultivo para identificar a las bacterias en distintos ambientes. Esto permite la clasificación de las bacterias en especies y cepas. Estos métodos permiten resultados cualitativos de las bacterias que son cultivables en ambiente de laboratorio. Nuevas técnicas moleculares están revolucionando como se estudia el microbioma (S. Gupta et al., 2019).

#### **4.1. Metagenómica de suelos**

La metagenómica es un conjunto de técnicas de investigación, que comprende muchos enfoques y métodos relacionados (Council, 2007). Los enfoques de metagenómica son cada vez más populares para estudiar la composición taxonómica y funcional de las comunidades microbianas en entornos ambientales, agrícolas y clínicos. A diferencia de los enfoques tradicionales de genómica única, la metagenómica no se basa en tener clones bacterianos individuales de conjuntos microbianos complejos, sino que cataloga mediante la secuenciación de todos los genes y genomas de una comunidad mixta a la vez (Xu et al., 2014). Dependiendo de métodos de cultivos muchas veces limita el análisis de los microorganismos presentes en el suelo ya que no todos pueden crecer en condiciones de laboratorio. Se sabe que alrededor de solo el 1% de las bacterias puede ser cultivado en el laboratorio, mientras que el otro 99% queda sin explorar (Nwachukwu & Babalola, 2022). Por lo que, solamente utilizar estos métodos puede llevar a subestimar la diversidad microbiana del suelo (N. Gupta et al., 2018; Nwachukwu & Babalola, 2022).

Esta metodología requiere de la generación de librerías, la cual a su vez depende de la extracción de ADN/ARN de alta calidad del ambiente. Las librerías permiten que el ADN se adhiera a la celda de flujo de secuenciación y permite la identificación de la muestra. Sin embargo, aspectos como la heterogeneidad del suelo, la diversidad microbiana y otras propiedades del suelo hacen de esto un reto. Por lo que es recomendable realizar purificaciones para quitar la mayor cantidad posible de contaminantes como metales ácidos provenientes del suelo (N. Gupta et al., 2018; Nwachukwu & Babalola, 2022).

Una de las técnicas más utilizadas hoy en día para estudiar bacterias es la secuenciación de ARN ribosomal 16s. El gen que codifica el ARNr, una parte de la subunidad del ribosoma pequeño constituye partes muy irregulares y conservadas que permiten estudiar, diferenciar y clasificar organismos (Chopra et al., 2020). La secuenciación de 16S rDNA es especialmente crucial para realizar perfiles fenotípicos específicos de bacterias inusuales, bacterias de división lenta, bacterias que son imposibles de cultivar e infecciones con cultivos negativos. Entre las regiones variables más usadas para identificar bacterias están las V1-V2 y las V3-V4 (Christensen, 2018).

Un manejo integral de los nutrientes del suelo y de la biodiversidad microbiana del suelo son una herramienta importante para el correcto crecimiento de las plantas (Goel, Suyal, Dash, & Soni, 2017). Por lo que microorganismos beneficiosos, son de importancia agrícola debido a que son cruciales para una agricultura sostenible (Nesme et al., 2016). La metagenómica ayuda a la predicción de la estructura de las comunidades microbianas. Es vital para estudiar y comprender las dinámicas de suelo y permitir un mejor manejo de este (N. Gupta et al., 2018; Nwachukwu & Babalola, 2022).

#### 4.1.1. Análisis bioinformáticos

La profundidad de secuenciación para un análisis metagenómico depende del propósito de cada proyecto. Usar secuenciación basada en amplicones de rARN 16S permite no solo una profundidad adecuada sino también, identificar la gran mayoría de lecturas y comparar con bases de datos metagenómicas públicas como NCBI (Park & Won, 2018). Un *contig* un conjunto de secuencias de ADN que se superponen de manera parcial para formar colectivamente una representación continua de una región genómica. (Vestergaard et al., 2017). Otro punto importante del proceso es el ensamblar los *contigs* ya que estos aumentan la calidad de las anotaciones especialmente cuando se trabaja con lecturas más pequeñas que se obtienen de plataformas como iSeq y MiSeq.

Algunos de los programas más utilizados para el análisis bioinformático son IDBA-UD, y MegaHit y R, lo cuales proveen de un “pipeline” aceptado en la literatura (Vestergaard et al., 2017). Para la clasificación de la bacteria se puede usar la base de datos Silva, una de las bases de datos más utilizadas para estos análisis ya que es de acceso libre y cuenta con las secuencias necesarias para la identificación de géneros bacterianos.

Una vez identificado los taxones presentes en la muestra se investiga los índices de diversidad presentes en ellas. Para entender las tendencias en la diversidad del microbiota bacteriano se debe analizar en diferentes hábitats y regiones geográficas. La diversidad Alpha es aquella que describe la riqueza, es decir el número de taxones y la relativa abundancia de los taxones, en una muestra de determinado tipo de hábitat (Walters & Martiny, 2020). La diversidad Alpha puede ser analizada con paquetes del programa R con el índice de Shannon. El índice de Shannon se utiliza para para estimar la diversidad genética. Se puede utilizar para describir la variación en múltiples niveles de organización genética, desde polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), especies enteras o unidades taxonómicas más grandes hasta ecosistemas (Konopiński, 2020). Mientras que para la diversidad Beta se usa la disimilitud de Bray-Curtis para el análisis estadístico (Bollmann-Giolai, Giolai, Heavens, et al, 2020; Lucaciu, Pelikan, Gerner, et al, 2019).

Mientras que la diversidad Beta se cuantifica como la variabilidad en la composición de una comunidad, es decir la identidad de los taxones observados, entre varias muestras dentro de un hábitat. El tipo de bioma del suelo impacta la diversidad Alpha de este, sin embargo, no la diversidad Beta. Esto se debe a que la heterogeneidad espacial y las limitaciones de expansión promueven la diversidad bacteriana (Walters & Martiny, 2020). En el caso del suelo este presenta una diversidad Alpha mayor que el microbiota intestinal o del a piel en animales (Prober et al., 2015).

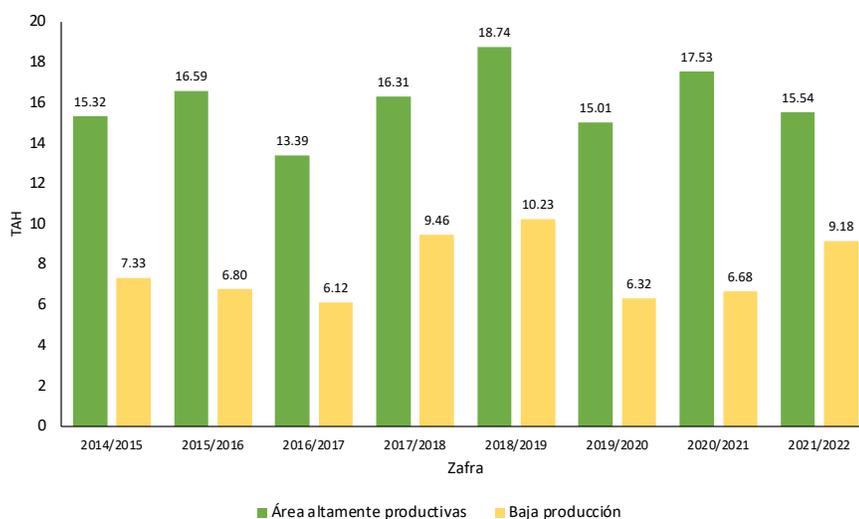
## VI. ANTECEDENTES

Esta investigación se basa en muestras de diferentes tipos en suelos de cultivo de caña de azúcar proporcionadas por el Ingenio Magdalena. Este proporcionó datos adicionales para la realización del trabajo.

### 1. Tipos de muestra

El Ingenio Magdalena categoriza sus fincas de acuerdo con la productividad que presentan, así como la cantidad de materia orgánica disponible en ellas. Para clasificarlas ellos realizaron un análisis histórico de los últimos 5 años por cuartiles. Siendo el promedio de azúcar como ingenio de 110 t/ha (toneladas por hectárea) de caña de azúcar. El promedio de la industria es de alrededor de 105 t/ha. Los lotes arriba del percentil 75 son consideradas como de alta producción. Mientras que la baja productividad se encuentran el percentil 25. El valor de la clasificación de alto contenido de materia orgánica se da en porcentaje (%). De las muestras obtenidas se encontraban entre 6.68% y 6.78%. También fue proporcionada las toneladas de caña producidas por hectárea (TCH) (ver anexos).

Figura 4: Toneladas de azúcar por hectárea (TAH) por zafra desde el 2014 hasta el 2022. Clasificadas según el ingenio acorde a los percentiles.



Fuente: Ingenio Magdalena

### 2. Tipo de fertilización

El Ingenio utiliza distintos tipos de fertilizante entre los que se encuentran el granulado y la Fertivinaza. La Fertivinaza tiene como fuente de nitrógeno los siguientes elementos vinaza, nitrato de amonio, sulfato de amonio. Esta es una composta realizada “manualmente” por ellos mismos (ver anexos Cuadro 8).

### 3. pH del suelo

Proporciono los datos del pH de la muestra según su base de datos. Estos datos de los últimos años (ver anexos cuadro).

#### **4. Ingredientes activos de herbicidas colocados en el suelo**

También proporcionó los datos de los ingredientes activos de los herbicidas utilizados en la tierra. Los cuales incluyen pendimetalina, diuron, ametrina, 2,4-D, asulam, trifloxysulfuron (ver anexos cuadro).

## VII. METODOLOGÍA

### 1. Sitio de estudio

El presente trabajo de graduación se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica y Microbiología y el Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) de la Universidad del Valle de Guatemala. Las muestras fueron recolectadas en diferentes fincas del Ingenio Magdalena a lo largo de la Costa Sur Guatemalteca. Entre las fincas muestreadas se incluyen San Patricio, Buganvilia, Polonia, Velasquez, San Isidro, El Horizonte Estrada, Santa Isabel La Faja II, Puyumate, La Cuchilla, Remanzo II, Kenya, Mandelville II, Luceros, El Mirador y California.

### 2. Sujeto de estudio

El sujeto de estudio fue el microbioma bacteriano de diferente tipo de muestra utilizados para la siembra de caña de azúcar. Así como también las bacterias aisladas de las muestras de tierra.

### 3. Diseño, enfoque y tipo de investigación

Se trata de una investigación experimental con un enfoque de investigación cualitativo.

### 4. Tipo y tamaño de muestra

Se muestrearon 20 diferentes sitios conforme lo acordado con el Ingenio Magdalena. Los tipos de muestra fueron descritos según la clasificación que tiene el ingenio de estas. Los cuales incluyen alta y baja productivas, alto contenido de materia orgánica, caña con áreas anegadas y área boscosa. En estas últimas no había caña sembrada.

### 5. Criterios de inclusión y exclusión

Se utilizaron las 20 muestras de diferentes tipos de tierra. De las bacterias aisladas se seleccionaron las que son morfológicamente distintas en las placas de aislamiento.

### 6. Variables

Las variables que están involucradas en este trabajo de investigación se describen en los Cuadros 3 y 4.

Cuadro 3: Variable de taxones bacterianos

<b>Variable</b>	<b>Taxones bacterianos</b>
Definición conceptual	Presencia de distintos taxones bacterianos en los dos diferentes suelos
Indicador	Secuencias distintas de 16S que determinen bacterias de taxones diferentes.
Dimensiones	Taxonomía bacteriana (Dominio, Filo, Familia, Género)
Instrumento de medición	Secuencias obtenidas de NGS

<b>Variable</b>	<b>Taxones bacterianos</b>
Definición operacional	Identificar a que taxones perteneces las distintas bacterias en base a las secuencias obtenidas.

Cuadro 4: Variable de bacterias promotoras del crecimiento (PGPB)

<b>Variable</b>	<b>Bacterias Promotoras del Crecimiento</b>
Definición conceptual	Presencia de distintas bacterias con características promotoras del crecimiento.
Indicador	Crecimiento en diferentes medios selectivos y diferenciales que indican la característica deseada.
Dimensiones	Positivo para la característica promotora del crecimiento.
Instrumento de medición	Medios de cultivo selectivos y diferencias (Cambio de color, uso del sustrato específico)
Definición operacional	Identificar qué características promotoras del crecimiento de las bacterias aisladas.

## 7. Hipótesis

### 7.1. Hipótesis principal:

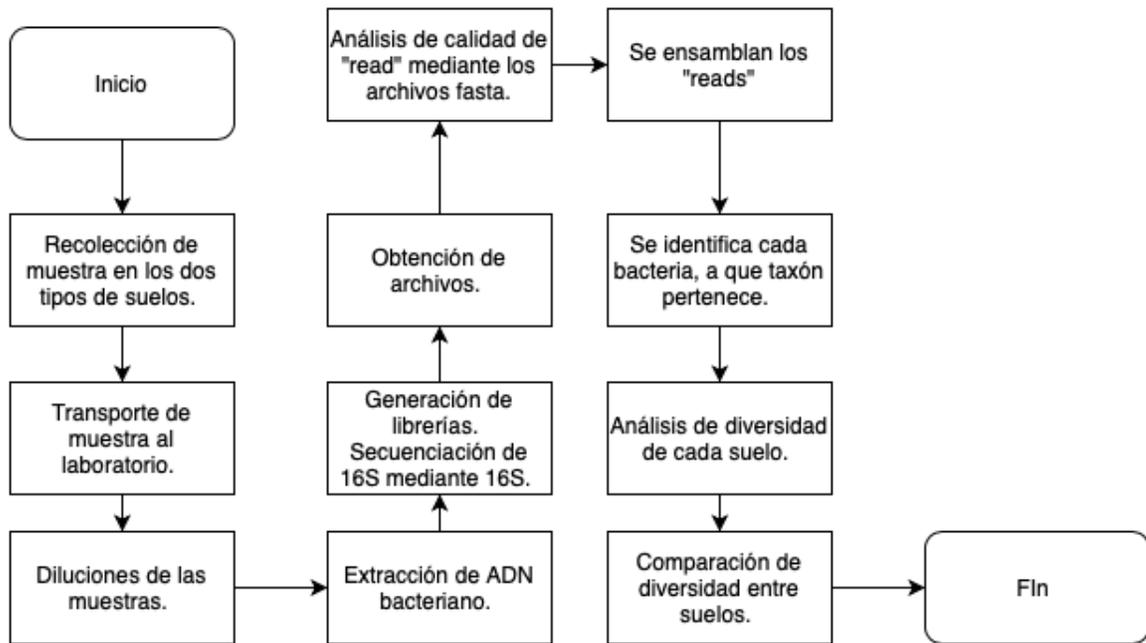
Habrà una diferencia en la cantidad, géneros y características promotoras del crecimiento de las bacterias encontrados en diferentes tipos de muestra utilizados para cultivo de caña de azúcar.

### 7.2. Hipótesis secundaria:

- En el análisis taxonómico mediante secuenciación se encontrará distintas proporciones de géneros bacterianos según el tipo de muestra.
- Se encontrarán bacterias con distintas características promotoras del crecimiento en las muestras de suelo analizadas.

## 8. Metodología

Figura 5: Diagrama de la metodología para el análisis bioinformático.



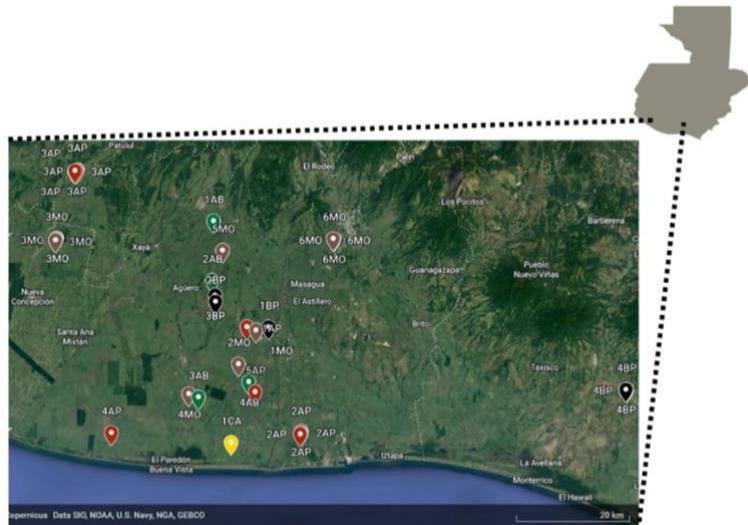
### 8.1. Recolección de muestras de suelo

La recolección de las muestras se llevó a cabo por personal de Magdalena e investigadores del Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) en dos fechas distintas. Las primeras 5 muestras se colectaron el 5 de mayo del 2022 y los 15 restantes el 20 de julio del 2022. Para esta recolectó las muestras de suelo a 10 - 15cm de distancia de base del tallo y de 10 - 15cm de profundidad de esta. Se tomó aproximadamente 10g de muestra y colocarla en bolsa de muestreo. Se muestrearon 6 puntos y unificar las muestras en la bolsa hermética. Cada bolsa fue etiquetada con el tipo de muestra y su respectivo ID. Se documentó la finca, el lote, la variedad, las coordenadas y el tipo de muestra. Luego fueron transportadas al laboratorio de las instalaciones de la UVG para ser analizadas. Estas muestras se colocarán en una hielera con hielo a 6°C. Se almacenaron en 4°C. Para mayor detalle revisar el procedimiento normado de operación (SOP por sus siglas en inglés "Standard Operating Procedure") 1.

Cuadro 5: Códigos asignados según el tipo de muestra de la muestra y número de muestras

Tipo de muestra	Código	Número de muestras
Alta productividad	AP	5
Baja productividad	BP	4
Mayor contenido de materia orgánica	MO	6
Área boscosa	AB	4
Caña con areas anegadas	CA	1

Figura 6: Puntos de muestreo ubicados en el mapa.



Fuente: Proyecto Magdalena

## 8.2. Procesamiento de muestras de suelo y aislamiento de bacterias del suelo.

En el laboratorio se realizarán los procedimientos de diluciones seriadas. Se incubó 2.5 gramos de suelo suspendido en 100 ml de agua peptonada. Se colocaron en un agitador durante 1 hora y se realizaron diluciones seriadas de hasta  $10^{-5}$ . Luego se sembraron en placas de agar nutritivo y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 hrs. Luego se seleccionaron las colonias morfológicamente distintas y se realizaron cultivos puros de ellas. Se les asignó un ID de acuerdo con el tipo de muestra y el número de muestra. El procedimiento a detalle se describe en el POE 1.

## 8.3. Caracterización de las bacterias

Para caracterizar a las bacterias aisladas de los distintos tipos de muestra se realizaron distintos procedimientos. Se realizó una tinción Gran para determinar la morfología de la bacteria (procedimiento en POE 1.1). Se seleccionaron las bacterias con morfología de colonia y morfología bacteria distintas. Luego se realizaron distintas pruebas para determinar las características promotoras del crecimiento de las bacterias seleccionadas.

### 8.3.1. Pruebas fijación de nitrógeno

#### 8.3.1.1. Prueba medio libre de nitrógeno

Se realizó un medio líquido libre de nitrógeno con azul de bromotimol. Se inocularon las cepas bacterias en este y se observó si había cambio de color y formación de colonias. El procedimiento a detalle se describe en el POE 2.

#### 8.3.1.2. Prueba con reactivo de Nessler (Producción de amonio)

Se realizó un cultivo en medio líquido Burke, el cual es un medio libre de nitrógeno, en una placa de 96 pocillos. Se dejó incubar durante 48 hrs. a temperatura ambiente. Luego se adicionó el reactivo de Nessler. Los pozos con coloración amarilla oscura, anaranjado y café fueron tomadas como positivas. Los pozos que conservaron el color del reactivo (amarillo) se tomaron

como negativas. Se documentó que cepas son positivas. El procedimiento detallado se puede encontrar el POE 2.

#### **8.3.1.3. PCR gen *nifH***

Las cepas que fueron seleccionadas como fijadoras de nitrógeno por medio de la prueba con el reactivo de Nessler se les realizó un PCR para identificar si poseían el gen *nifH* con Primers degenerados. Este gen aparece en muchas bacterias fijadoras de nitrógeno. Luego se realizó un gel de electroforesis del producto de PCR. Se tomó como positivo aquellos que presentaban una banda en 370bp. El procedimiento a detalle se encuentra en el POE 2.

#### **8.3.2. Solubilización de fosfato**

Se preparó medio NBRIP según lo indicado en Nautiyal (1999) en donde se inoculó cada bacteria morfológicamente distinta. Se incubó por 7 días a 28°C. La observación de un halo amarillo alrededor de la colonia indica una bacteria positiva para la solubilización de fosfatos. El procedimiento a detalle se encuentra en el POE 3.

#### **8.3.3. Solubilización de potasio**

Se preparó el medio de cultivo sólido Aleksandrov modificado de acuerdo con Rajawat et al. (2016). Se incubó por 3-4 días a 28°C. La formación de un halo amarillo se tomó como positivo para solubilizarían de potasio. El procedimiento a detalle se encuentra en el POE 4.

#### **8.3.4. Producción de ACC desaminasa**

Se prepararon placas de medio mínimo de DF (Dworkin y Foster) suplementado con 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (3mM). Se incubó durante 3 días a temperatura ambiente. El crecimiento de las bacterias se tomó como positivo. El procedimiento a detalle se encuentra en POE 5.

#### **8.3.5. Solubilización de silicatos**

Se realizó un medio modificado de medio Bunt y Rovira utilizando caolina coloidal al 0.25%. Se dejó incubar durante 14 días a temperatura ambiente. Se esperaba ver claro halo transparente alrededor de las colonias. Se tomó como positivo las colonias que tenían un contorno transparente. Se realizó el mismo medio de cultivo sólido, pero sin caoilina coloidal y con oxido de silicio. Un halo transparente alrededor de la colonia se considera positivo. El procedimiento a detalla se describe en el POE 7.

#### **8.3.6. Producción de lipasas**

Se realizó un medio de agar nutritivo suplementado con Tween 80. Se dejó en incubación 7 días. Se tomó como positivo la observación de pequeños cristales alrededor de las colonias. El procedimiento a detalle se encuentra en POE 9.

#### **8.3.7. Producción de proteasas**

Se preparó el medio de cultivo “skim milk agar” según Liu et al., (2021). Se incubaron por 24 horas a 30°C. La formación de un halo transparente se tomó como positiva para producción de proteasas. El procedimiento a detalle se encuentra en el POE 6.

#### **8.3.8. Producción de quitinasas**

Se realizó el tratamiento de la quitina para obtener quitina coloidal según lo indica Subramanian, et al, (2020). Sin embargo, debido a que el pH no subía al 7 como indicaba el procedimiento, realizar el procedimiento se realizaron lavados con una solución al 5% de bicarbonato de sodio y se realizó un filtrado al vacío. Para la preparación del medio también se utilizó la metodología de Subramanian, et al., (2020). Se dejó incubar durante 3 a 14 días. Un halo transparente alrededor de las bacterias se tomó como positivo. El procedimiento a detalle se encuentra en el POE 15.

#### **8.3.9. Producción de gluconasas**

Se realizó el medio según lo indicado en Jha, *et al*, 2022 suplementado con Congo Red. Se incubó durante 72 horas. La colación roja de la colonia se tomó como positivo. El procedimiento a detalle se encuentra en el POE 14.

#### **8.3.10. Producción de pirrolnitrina**

Se realizó la preparación de agar King B según lo indica el fabricante y se suplementó con antibióticos ciclohexamida, ampicilina y tetraciclina. Se dejó incubar durante 48 hrs. Las colonias que brillaron bajo la luz negra (UV) se tomaron como positivas para *Pseudomonas* spp.

Se llevó a cabo el medio de cultivo Tryptophan blue-teracycline medium (TB-T), ph 5.5, suplementado con tetraciclina y ciclohexamida. Las bacterias que crecieron el medio se tomaron como positivas para *Burkholderia* spp.

La comprobación de producción de pirrolnitrina por medio de TCL con el reactivo de Ehrlich y el Rf quedó pendiente debido a falta de un reactivo.

Todo el procedimiento a detalle se encuentra en el POE 11.

#### **8.3.11. Producción de IAA**

Se realizó una curva estándar con el ácido indol-3-acético (IAA) que iba de 5 ug/ml a 100 ug/ml. Se midió a 530 nm en el espectrofotómetro UV-VIS utilizado una cubeta de medición. Se realizó la curva de calibración y se calculó el R<sup>2</sup>.

Se realizó un medio de cultivo líquido de agua peptonada suplementado con L-Triptofano. Se inoculó cada sepa en un tubo de 1.5 ml con 500  $\mu$ L del medio. Se dejó incubando durante 5 días con agitación. Luego se suplementó el reactivo de Tang Bonner en una relación 1:2 con respecto al medio de cultivo. Se dejó incubar por 15 en oscuridad y luego se midió a 530 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. De forma colorimétrica se tomó como positivo las muestras que cambiaron a colores fucsia. Se calculó la concentración de IAA de las muestras. El procedimiento de detalle se encuentra en POE 10.

### **8.4. Metagenómica de amplicón rRNA 16S**

#### **8.4.1. Extracción de ADN**

Se realizó la extracción de ADN usando el kit DNeasy PoweSoil Pro-Kit (Qiagen, Hildem, Germany) de las 20 muestras siguiendo las instrucciones del fabricante con la modificación de agregar en el primer lavado cloroformo:alcohol isoamílico para mejorar el rendimiento de la extracción (Echevarría-Beirute, et al, 2021). Se midió las concentraciones y purezas del ADN mediante el uso del NanoDrop. Se repitió las muestras con bajas concentraciones de ADN y a petición de Macrogen para seguir con la secuenciación de 5 muestras. El procedimiento de detalle se puede observar en el POE 13.

#### **8.4.2. Secuenciación del amplicón rRNA16S (Regiones V1-V2, V3-V4)**

Una vez se realizó la extracción de las muestras se contrató el servicio de la empresa Macrogen en Korea para que realizara la secuenciación del amplicón rRNA16S de las regiones V1-V2 y V3-V4. Durante este proceso Macrogen solicitó que se enviaran más material para secuenciar de las muestras 1AP, 3AP, 5MO, 6MO, 1AB por lo que se extrajo de nuevo ADN de las muestras 1AP, 6MO y 1AB.

#### **8.4.3. Análisis bioinformático**

Mediante el programa R se realizó el control de calidad, la remoción de quimeras y la alineación de Forward y el Reverse de las muestras para cada región variable. Se utilizó la base de datos Silva (v.) para asignar taxonomías a las bacterias. Se determinó la diversidad beta y alpha usando el paquete de R (v.4.2.1) El procedimiento detallado se encuentra en el script (Anexos).

### **8.5. Cepario**

Se realizaron 3 ceparios para la conservación de las cepas encontradas. Para esto se inoculó una colonia en 1ml de medio nutritivo. Se dejó incubado durante la noche. Luego se tomó 500 *ul* del cultivo y colocó en un nuevo tubo. Se agregó 500 *uL* de glicerol al 40%. Inmediatamente se colocan en el congelador a -80°C. El primer cepario contiene todas bacterias aisladas. El segundo y tercer cepario contienen las bacterias tamizadas. Paralelo a la realización del cepario se sembraron en agar nutritivo para comprobar que se guardó cepas que estaban en crecimiento. Las que no crecieron se volvieron inocular y se realizó el proceso nuevamente para congelarlas. El procedimiento detallado se puede encontrar el POE 1.

## **9. Alcance y limitaciones**

Este proyecto fue un primer acercamiento para identificar la diversidad bacteriana en distintos tipos de muestras utilizados para el cultivo de caña de azúcar. Así como también es una primera caracterización de las habilidades promotoras de las bacterias aisladas. Debido a esto es un proyecto de exploración. Las limitaciones de estudio residen en que la diversidad del microbioma bacteriano puede verse afectado por factores como la época del año, la cantidad de precipitación, temperatura, fenómenos climáticos, la etapa de la caña etc. Cabe resaltar que esta investigación solo tomó muestras de la costa sur por lo que no se puede inferir información de suelos de otras regiones del país. Por último, en este trabajo se realizó una secuenciación de nueva generación con regiones variables del amplicón rRNS 16S por lo que no se tiene un genoma completo de las bacterias lo que no permite identificar cepas específicas.

## VIII. RESULTADOS

### 1. Caracterización de las habilidades promotoras del crecimiento

En el presente trabajo se recolectaron 20 muestras de distintos tipos de tierra en los cultivos de caña de la Costa Sur del país. Los tipos de tierra incluían alta productividad (AP), baja productividad (BP), alto porcentaje de materia orgánica (MO), área boscosa (AB) y caña con áreas anegadas (CA). Se tienen 5 muestras AP, 4 AB, 6 MO, 1 CA y 4BP. En el siguiente cuadro se describe las características de las muestras.

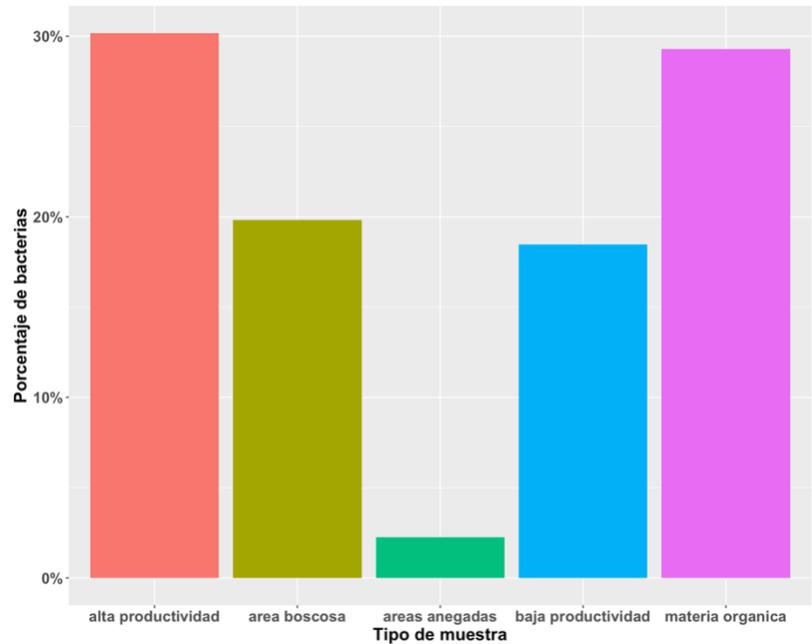
Cuadro 6: Descripción de los parámetros de las muestras.

Fecha de muestreo	Región	Finca	Lote	Tipo de suelo	Variedad	Código Asignado	Latitud	Longitud
5/05/22	Central Norte	San Patricio	351-002-012	Alta productividad	CP01-1341	1AP	14.11768	-90.950378
5/05/22	Central Norte	Buganvilla	011-002-018	Mayor contenido de M.O.	CG02-163	1MO	14.112333	-90.935379
5/05/22	Central Norte	Buganvilla	011-003-007	Baja productividad	SP83-2847	1BP	14.117368	-90.914801
5/05/22	Central Norte	Polonia	377-001-012	Mayor contenido de M.O.	Varias	2MO	14.05855	-90.964248
5/05/22	Central Norte	Casco Finca Velasquez	NA	Área de bosque	NA	1AB	14.2858705	-91.004991
20/07/22	Central Norte	San Isidro	072-002-006	Baja productividad	CG9878	2BP	14.157831	-91.001843
20/07/22	Central Norte	Velasquez	010-004-006	Baja productividad	CG9878	3BP	14.167859	-91.002658
20/07/22	Central Norte	El Horizonte Estrada	147-002-001	Alta productividad	Varias	2AP	13.947121	-90.862787
20/07/22	Central Norte	Santa Isabel La Faja II	754-001-001	Baja productividad	CP72-2086	4BP	14.017358	-90.327985
20/07/22	Central Norte	Puyumate	219-001-002	Mayor Conetenido de M.O	CG02-153	3MO	14.259052	-91.264174
20/07/22	Central Norte	Velasquez	Sector 3	Área de bosque	NA	2AB		
20/07/22	Central Norte	La Cuchilla	338-001-002	Alta productividad	Varias	3AP	14.367503	-91.22893
20/07/22	Central Norte	Remanzo II	555-001-002	Alta productividad	CP01-1564	4AP	13.9487251	-91.172815
20/07/22	Central Norte	Kenya	037-003-008	Mayor Conetenido de M.O	SP716161	4MO	14.0110216	-91.045786
20/07/22	Central Norte	Velasquez	010-001-035	Mayor Conetenido de M.O	CG02163	5MO	14.239282	-90.990299
20/07/22	Central Norte	Mandelville II	143-003-005	Mayor Conetenido de M.O	CP01-1341	6MO	14.257755	-90.807346
20/07/22	Central Norte	Ojo de agua	Bosque eucaliptos	Área de bosque	NA	3AB		
20/07/22	Central Norte	Luceros	Casco de la finca	Área de bosque	NA	4AB		
20/07/22	Central Norte	El Mirador	362-001-010	Alta productividad	CP72-2086	5AP	14.014202	-90.936838
20/07/22	Central Norte	California	376-001-002	Caña con areas anegadas	CG02-163	1CA	13.9336905	-90.976253

#### 1.1. Aislamiento y descripción de colonias

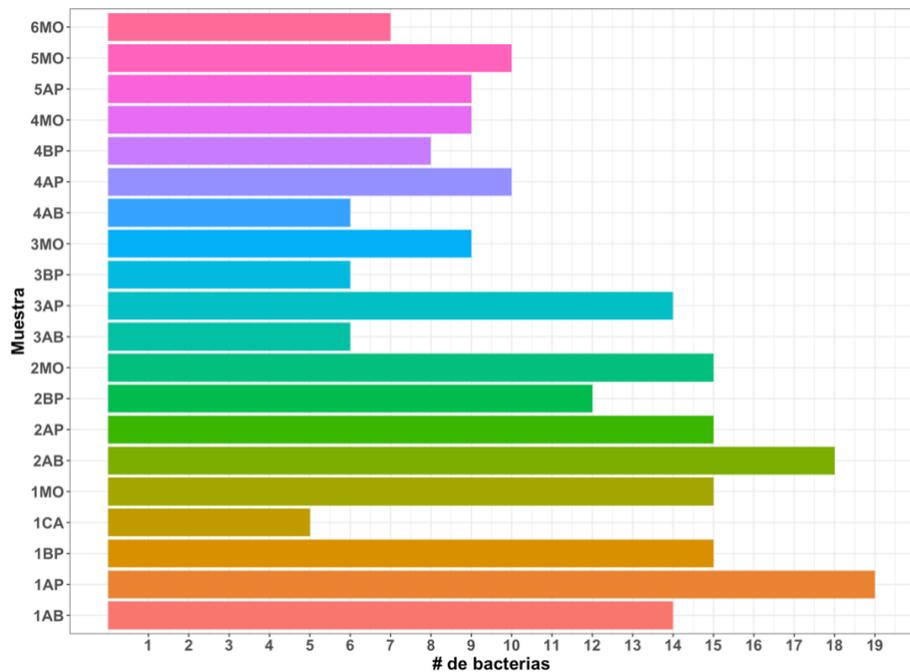
Se seleccionaron 315 bacterias con colonias de morfología diferentes. A estas se les realizó una tinción Gram para determinar su morfología. Se eliminaron las cepas que presentaban la misma morfología de colonia y tinción Gram. Después de este proceso se contó con 222 cepas las cuales se tamizaron. En el Cuadro 9 (Anexos) se pueden observar todas las características morfológicas de las colonias aisladas. Las descripciones más abundantes de las eran las ligosas, brillantes y la mayoría tenía un color blanco. Destacan algunas con colores en tonos naranjas.

Figura 7: Cantidad de bacterias aisladas por tipo de muestra.



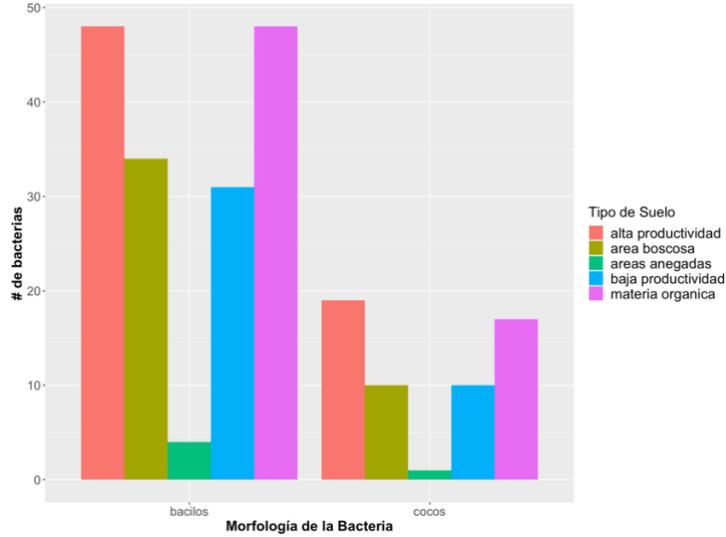
Se observa que las muestras de alta productividad equivalen a un 30% de las muestras analizadas. Seguidas de las muestras de alto contenido de materia orgánica con 29%. El 20% proviene de áreas boscosas, 18% baja productividad. Mientras que la muestra de áreas anegadas represente menos del 3% del total de bacterias.

Figura 8: Número de bacterias aisladas por muestra de suelo.



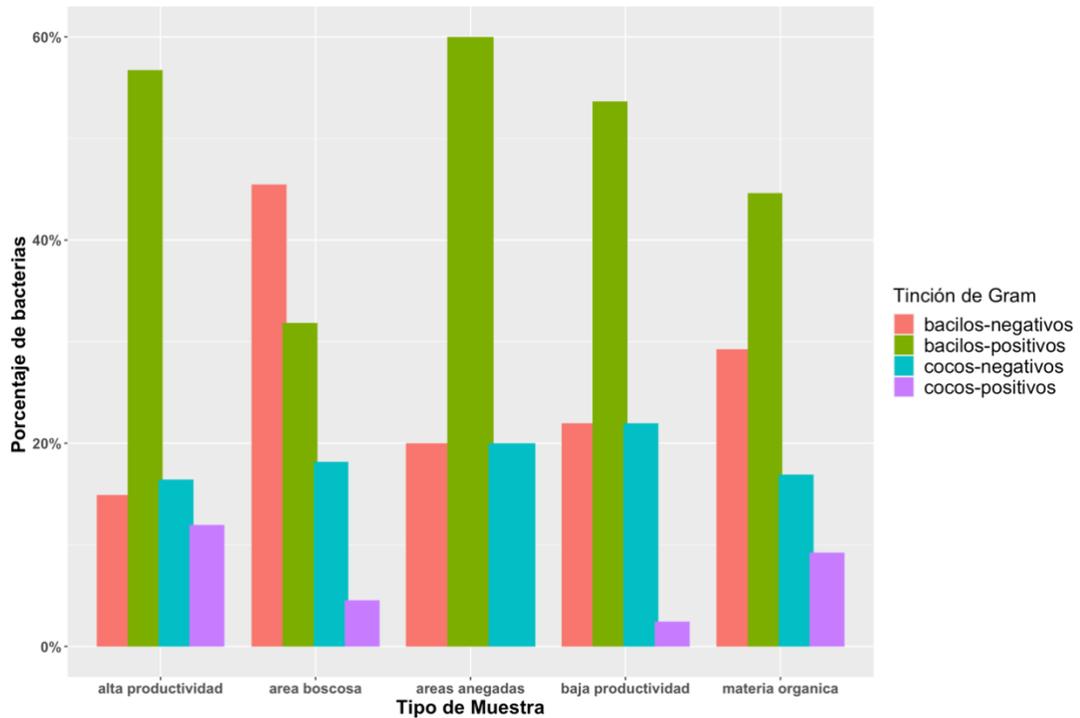
Se observa que las 1AP y 2AB tienen 19 y 18 cepas distintas aisladas respectivamente. Seguidas de 1MO, 2MO, 1BP y 2AP con 15 cepas aisladas. Las muestras con menos cantidad de cepas aisladas son la 1CA, la 3BP, 4AB, 3AB proviniendo estas 2 últimas de áreas boscosas.

Figura 9: Conteo de bacterias Gram positivo vrs Gram negativo según el tipo de muestra.



Al realizar la tinción de cada una de las cepas aisladas. Se determinó que las bacterias con forma de bacilo eran mayoritarias en las muestras de suelos. Se observan las mismas proporciones de distribución por tipo de muestra tanto para bacilos como para cocos. Ya que la mayor cantidad de bacterias se encuentran en suelos de alta productividad, seguidos de materia orgánica, área boscosa, baja productividad y áreas anegadas.

Figura 10: Porcentajes de morfología con tinción de Gram según tipo de muestra.



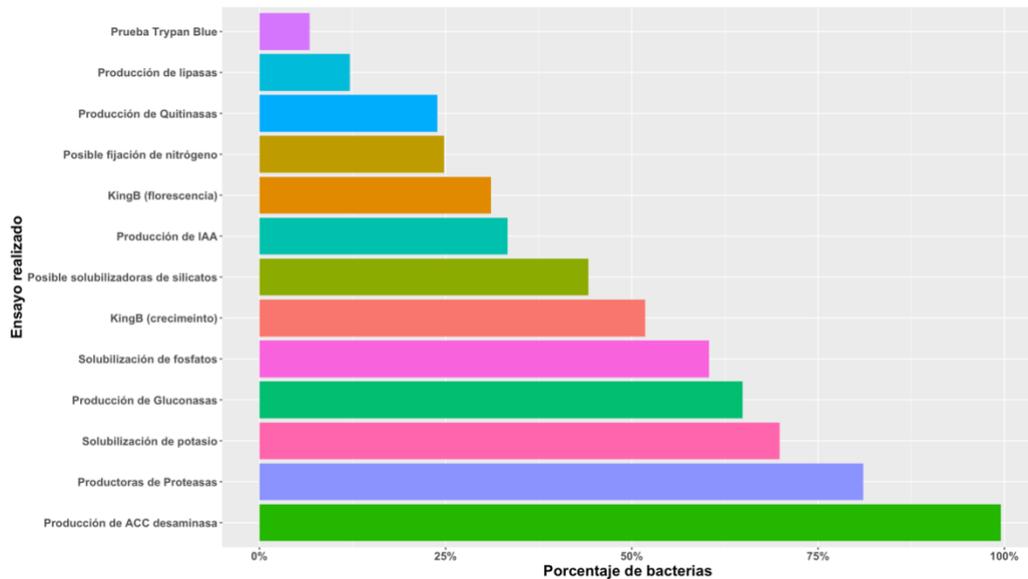
Legenda de la figura: Se indica el porcentaje de tinción de Gram de las bacterias por tipo de muestra.

Se observa que los bacilos Gram positivos son los más abundantes en todos los tipos de muestra excepto en el área boscosa donde los bacilos Gram negativos representan un mayor porcentaje (45%) de bacterias. También cabe destacar que en las áreas de caña anegadas no hay cocos Gram positivos y estos son los menos abundantes en todos los tipos de muestra.

## 1.2. Tamizaje de características promotoras del crecimiento

En total se tamizaron 222 cepas bacterias. La cantidad de bacterias que son positivas para cada uno de los análisis se detalla en Gráfica 10.

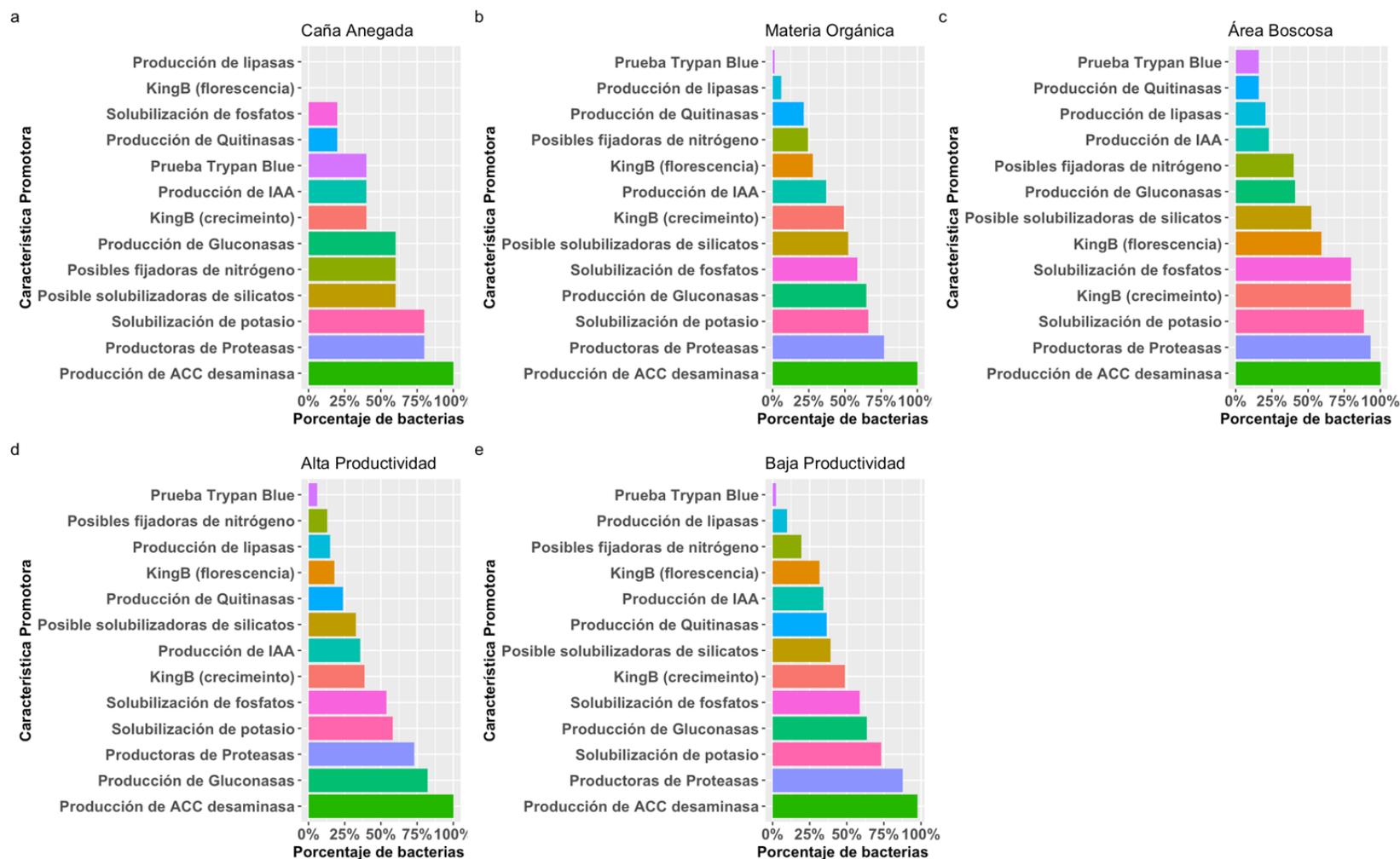
Figura 11: Cantidad de bacterias positivas según pruebas realizadas.



Legenda de la imagen: Se presentan el porcentaje de bacterias positivas para cada característica promotora del evaluada. Las pruebas realizadas fueron las siguientes: solubilización de fosfatos, solubilización de potasio, producción de ACC desaminasa, producción de proteasas, posible solubilización de silicatos, producción de lipasas, producción de IAA, producción de las enzimas gluconasas y quitinasas, posible fijación de nitrógeno por medio de las pruebas de reactivo de Nessler medio libre de nitrógeno, crecimiento en medio King B, fluorescencia en medio King B y crecimiento en medio suplementando con Trypan Blue. Se realizaron un total de 13 pruebas realizadas.

Se observa que todas las bacterias excepto 1 fueron positivas la producción de ACC desaminasa. Lo que quiere decir que el 99% de las bacterias son positivas para esta prueba. Seguido de producción de proteasas (81%) y potasio (69%). Un 60% son positivas para solubilización de fosfatos. 51% de las bacterias presentaron habilidades fijadoras de nitrógeno. Ese mismo porcentaje son posibles *Pseudomonas* según la prueba de crecimiento en agar King B suplementado. Un total del 31% de las bacterias presentan fluorescencia. Se observa que la habilidad productora de lipasas y quitinasas se encuentran en menor proporción en comparación que las gluconasas y proteasas que también son enzimas líticas. Se identificaron como posibles *Burkholderia* un 6% de las cepas aisladas.

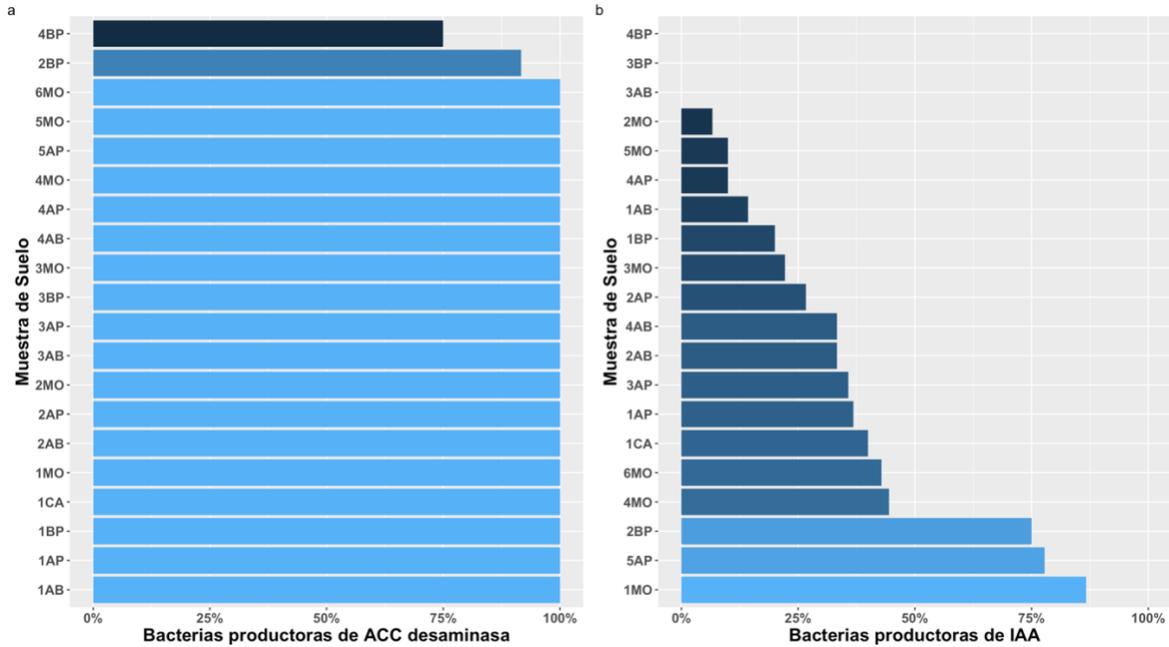
Figura 12: Número de bacterias que poseen características promotoras del crecimiento según el tipo de muestra.



Leyenda de la figura: (a) Alto Contenido de Materia Orgánica [MO], (b) Baja Productividad [BP], (c) Área Boscosa [AB], (d) Área de caña anegada [CA], (e) Alta Productividad [AP].

Se observa que las características de producción de ACC desaminasa, producción de proteasas se encuentran en proporciones similares en todos los tipos de muestra. Se observa que el porcentaje de producción de lipasas y quitinasas es similar en todos los tipos de muestra con excepción de la muestra de caña anegada dónde no hay bacterias productoras de lipasas.

Figura 13: Porcentaje de bacterias por muestra positivas para la producción de ACC y la de IAA.

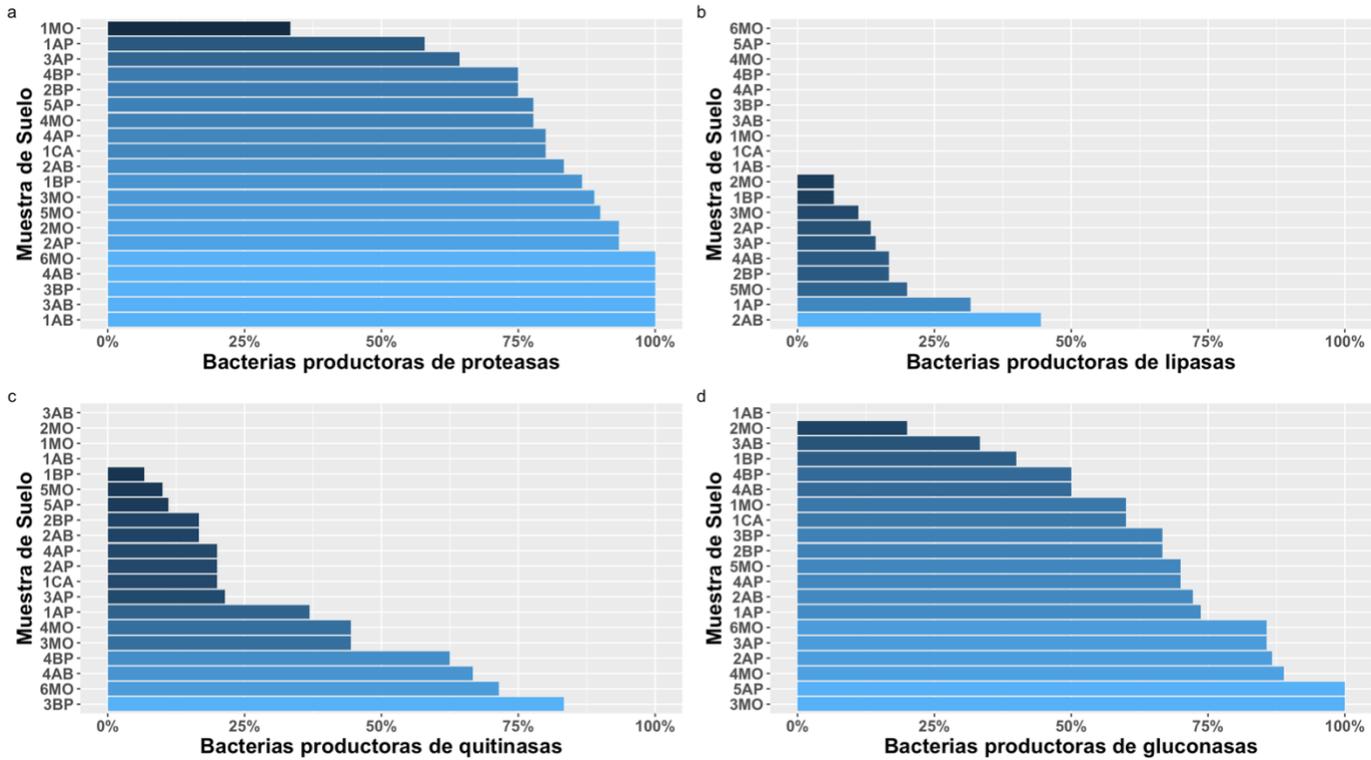


Leyenda de la figura: (a) Bacterias productoras de ACC desaminasa. (b) Bacterias productoras de IAA. (Alto Contenido de Materia Orgánica [MO], Baja Productividad [BP], Área Boscosa [AB], Área de caña anegada [CA], Alta Productividad [AP]).

La producción de ACC desaminasa está presente en todas las cepas de todas las muestras con excepción de las muestras 4BP y 2BP.

Se observa la producción de la fitohormona IAA. La muestra que presenta un mayor porcentaje de bacterias productoras son la 1MO, 5AP y 2BP. Las muestras 4BP, 3BP y 3AB no presentan producción de IAA.

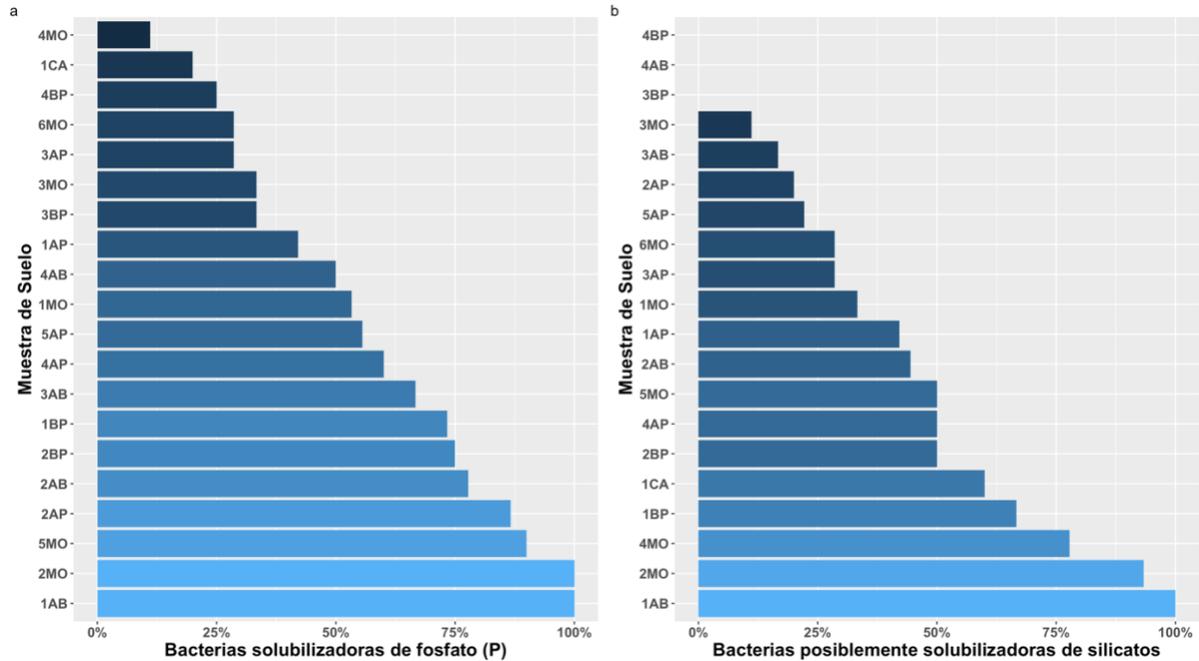
Figura 14: Porcentaje de bacterias por muestra positivas para la producción de enzimas hidrolíticas.



Leyenda de la figura: (a) Bacterias productoras de proteasas. (b) Bacterias productoras de lipasas. (c) Bacterias productoras de quitinasas. (d) Bacterias productoras de gluconasas. (Alto Contenido de Materia Orgánica [MO], Baja Productividad [BP], Área Boscosa [AB], Área de caña anegada [CA], Alta Productividad [AP]).

Se observa que las enzimas hidrolíticas más producidas por las bacterias son las proteasas y las gluconasas seguidas de quitinasas y lipasas respectivamente. Las gluconasas son producidas por todas las muestras excepto por la 1AB (área boscosa). Mientras que las muestras 6MO, 5AP, 4MO, 4BP, 4AP, 3BP, 3AB, 1MO, 1CA y 1AB no mostraron producción de lipasas. En el caso de producción de quitinasas las muestras 3AB, 2MO, 1MO y 1AB no presentaron producción.

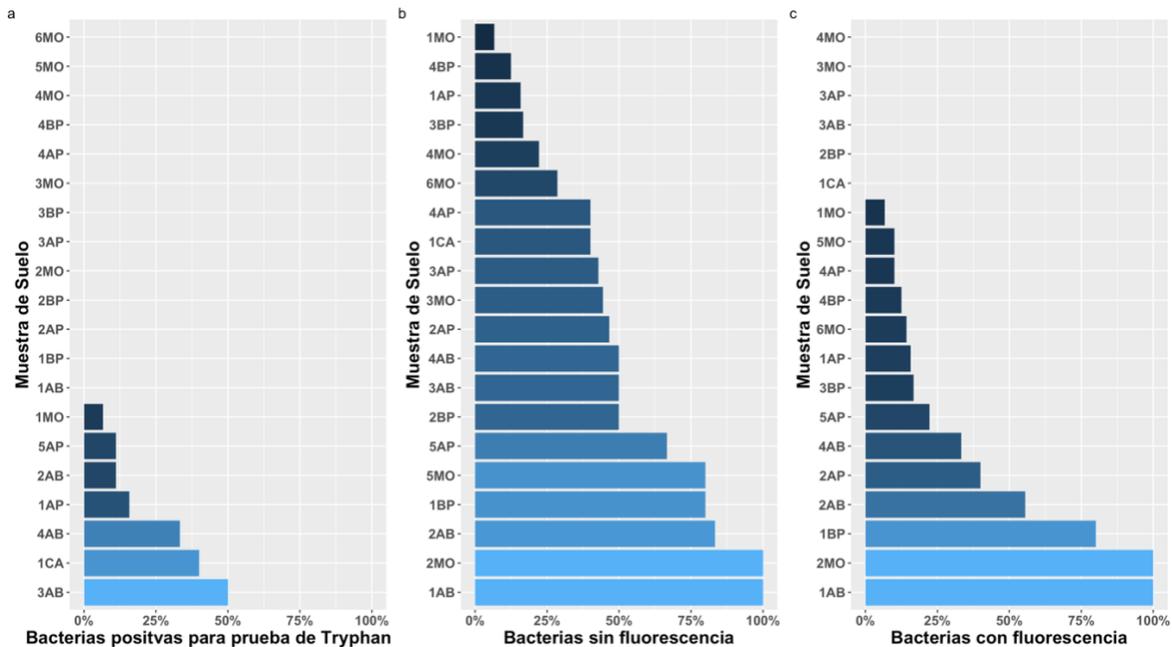
Figura 15: Porcentaje de bacterias por muestra positivas para solubilización de fosfato y posible solubilización de silicatos.



Legenda de la figura: (a) Bacterias positivas para solubilización de fosfatos. (b) Posibles bacterias positivas para solubilización de silicatos. (Alto Contenido de Materia Orgánica [MO], Baja Productividad [BP], Área Boscosa [AB], Área de caña anegada [CA], Alta Productividad [AP]).

Se observa que las muestras 1AB y 2MO presentan mayor porcentaje de bacterias solubilizadoras de fosfatos y silicatos. Se observa que las muestras 4BP, 4AB y 3BP no presentaron ningún indicio de posible solubilización de fosfatos. Mientras que todas las muestras presentaron al menos un 10% de bacterias solubilizadoras de fosfatos. Siendo las de menor cantidad las muestras 4MO y 1CA.

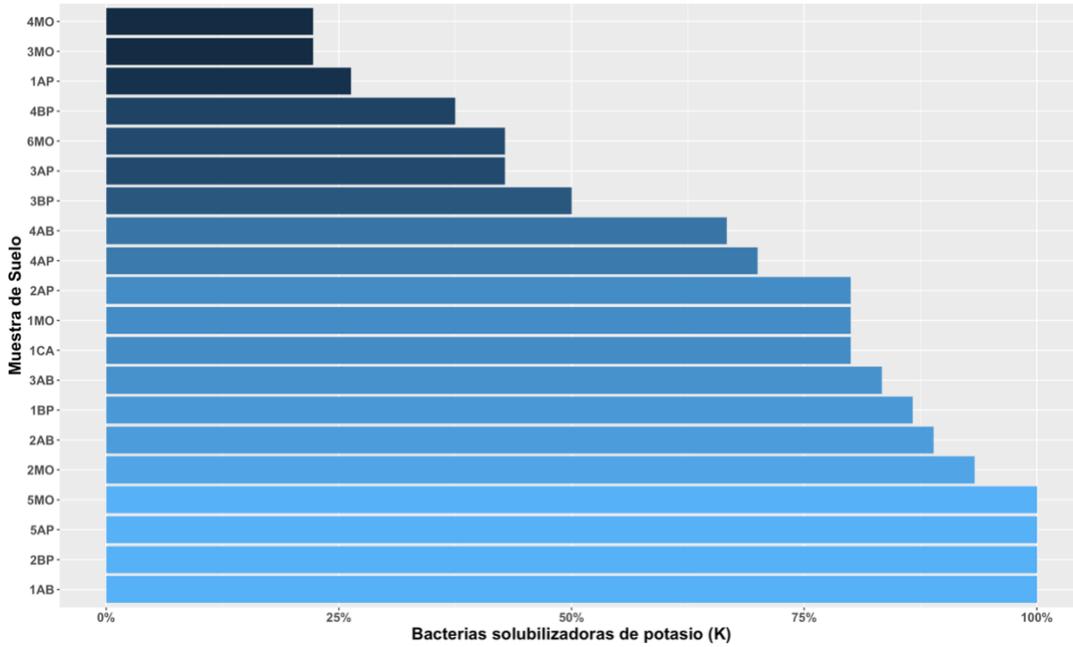
Figura 16: Porcentaje de bacterias por muestra positivas fluorescentes y no fluorescentes entre en agar King B y número de bacterias positivas para la prueba de TrypanBlue



Leyenda de la figura: (a) Bacterias positivas para prueba de TrypanBlue. (b) Bacterias sin fluorescente en agar King B. (c) Bacterias con fluorescencia en agar King B. (Alto Contenido de Materia Orgánica [MO], Baja Productividad [BP], Área Boscosa [AB], Área de caña anegada [CA], Alta Productividad [AP]).

El agar King B suplementado con antibióticos permite la diferenciación de bacterias del género *Pseudomonas* spp. Si presentan fluorescencia bajo una luz negra (UV) se toman como *Pseudomonas* fluorescentes. Se observa que este género está presente en todos los tipos de muestras y muestras recolectadas. La prueba de TrypanBlue se realiza para encontrar bacterias del género *Burkholderia*. Las bacterias de estos géneros son candidatas para la producción del antifúngico pirrolnitrina (Pawar et al., 2019). Se observa que la mayoría de las *Pseudomonas* se encuentran en las muestras 2MO y 1AB, siendo el 100% de estas fluorescentes. *Burkholderia* se encuentran en mayor porcentaje en las muestras 3AB y 1AP.

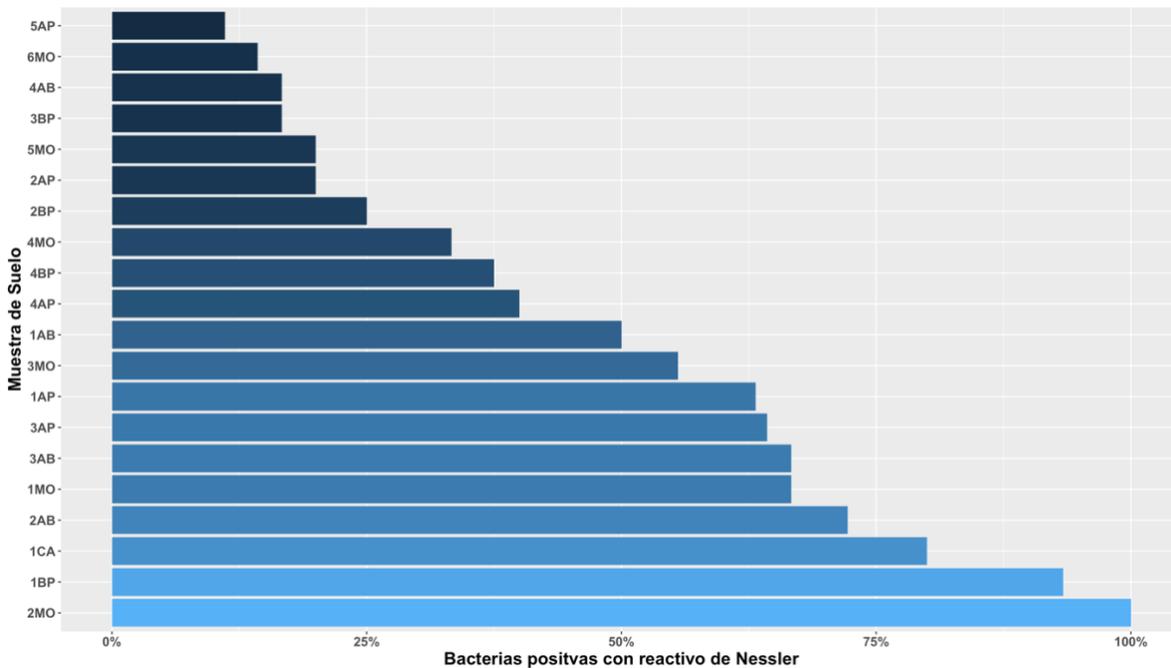
Figura 17: Porcentaje de bacterias positivas para solubilización de potasio (K).



Leyenda de la figura: (Alto Contenido de Materia Orgánica [MO], Baja Productividad [BP], Área Boscosa [AB], Área de caña anegada [CA], Alta Productividad [AP]).

Se observa que las muestras 1AB, 2MO y 2AB poseen un 100% de bacterias solubilizadoras de potasio. Todas las muestras al menos un 20% de solubilizadoras de potasio, siendo las 4MO y 3MO las que presentan un menor porcentaje.

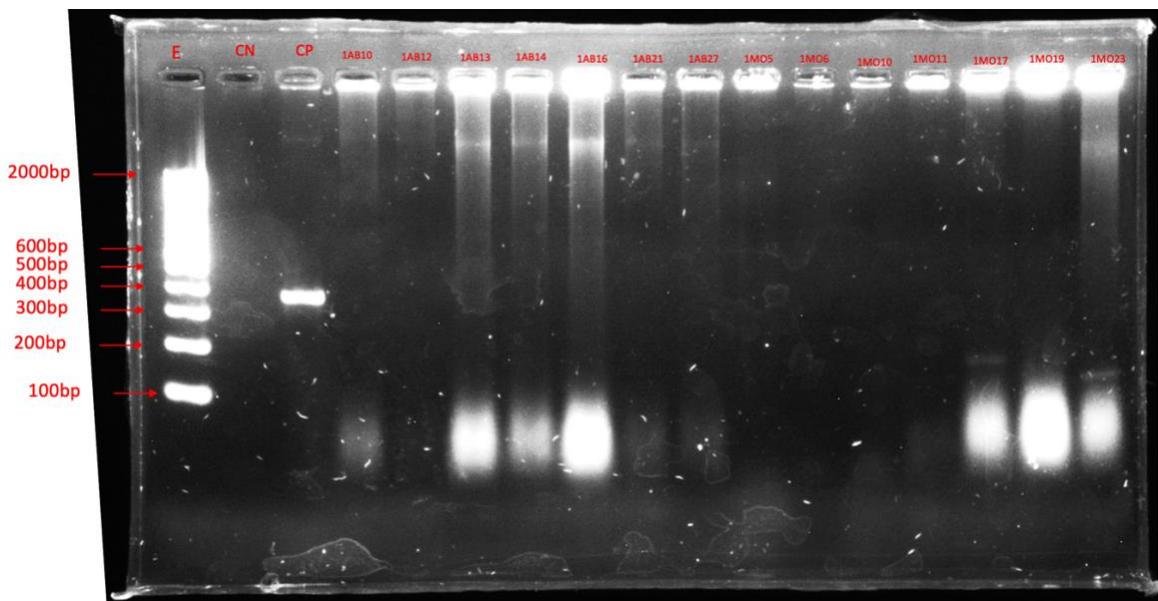
Figura 18: Porcentaje de bacterias positivas para prueba con reactivo de Nessler.



Leyenda de la figura: (Alto Contenido de Materia Orgánica [MO], Baja Productividad [BP], Área Boscosa [AB], Área de caña anegada [CA], Alta Productividad [AP]).

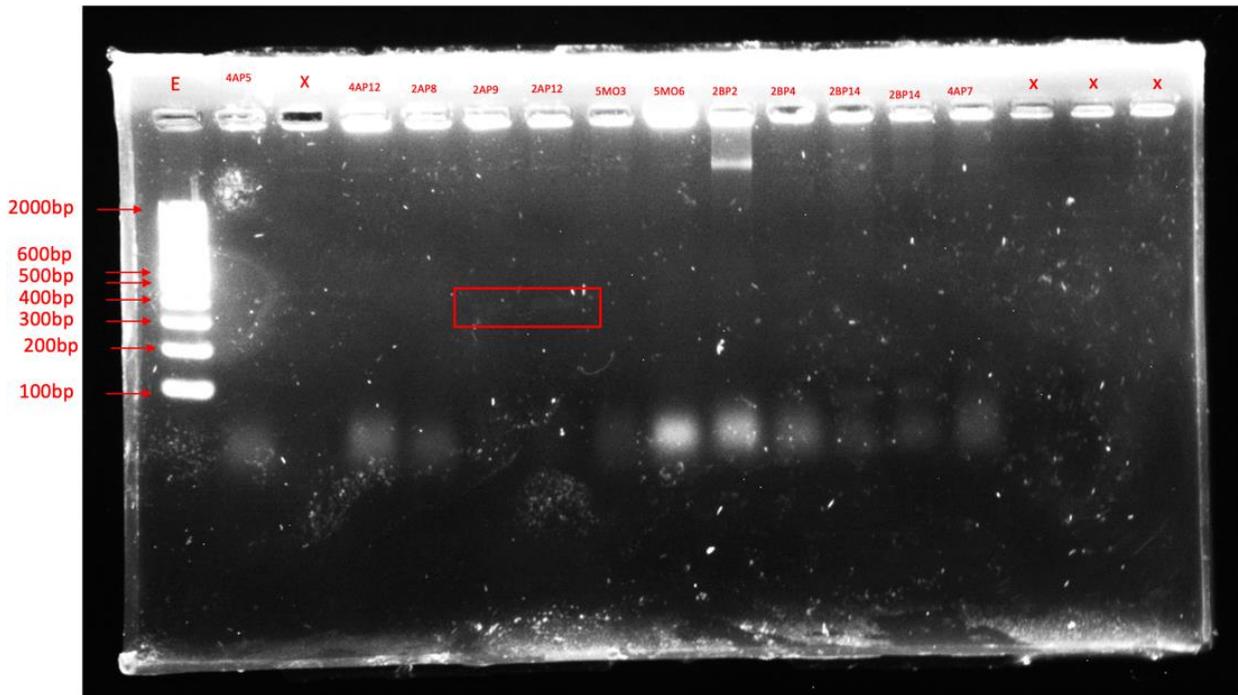
Se observa que las muestras con mayor cantidad de bacterias positivas para la reacción con el reactivo de Nessler son la 2MO con un 100%, la 1BP (94%) y las 2AB (78%). Todas las muestras presentaron bacterias fijadoras de nitrógeno, siendo las que tienen un menor porcentaje las 6MO, 5AP, 4AB y 3BP. Al comparar las positivas con el reactivo de Nessler con la prueba realizar con el medio libre de nitrógeno se encontraron 55 bacterias positivas para ambas pruebas. Se tamizaron estas bacterias más las que se encontraban con una coloración fuerte en la prueba de Nessler siendo un total de 115 bacterias tamizadas para el gen *nifH*.

Figura 19: Imagen del gel electroforesis realizado para los productos de PCR del gen *nifH* donde se observa el control positivo identificado como CP.



Leyenda figura: La amplificación del gen *nifH* se encuentra alrededor de ~370 bp. (Alto Contenido de Materia Orgánica [MO], Baja Productividad [BP], Área Boscosa [AB], Área de caña anegada [CA], Alta Productividad [AP]).

Figura 20: Imagen del gel electroforesis realizado para los productos de PCR del gen *nifH*.



Leyenda figura: Recuadro rojo marca las bandas tenues esperadas para la amplificación del gen *nifH* (~370 bp). (Alto Contenido de Materia Orgánica [MO], Baja Productividad [BP], Área Boscosa [AB], Área de caña anegada [CA], Alta Productividad [AP]).

Al analizar la presencia o ausencia de gen *nifH* en las cepas seleccionadas se observó una tenue banda en el peso esperado (370 bp) únicamente en 2 de las 115 muestras tamizadas. Las muestras donde se observaron fueron las 2AP9 y las 2AP12. En los anexos pueden observarse los geles que no presentaron amplificación del gen.

### 1.3. Cepario

Se realizaron 3 ceparios que se encuentran en refrigeración a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Uno con todas las bacterias aisladas y otros dos con las bacterias tamizadas.

## 2. Microbioma bacteriano de distintos tipos de muestra

Para analizar el microbioma bacteriano se usan el gen rARN 16S ribosomal. Este posee varias regiones que se pueden utilizar con tal fin. En este trabajo se secuenciaron dos regiones, la región V1-V2 y la región V3-V4. Cada una con largo de 300pb.

### 2.1. Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de las 20 diferentes muestras de suelo para enviarlas a la empresa especialista en servicios de secuenciación. Los datos obtenidos se detallan en el Cuadro 7.

Cuadro 7: Concentraciones y pureza del ADN extraído de las muestras por medio de NanoDrop.

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

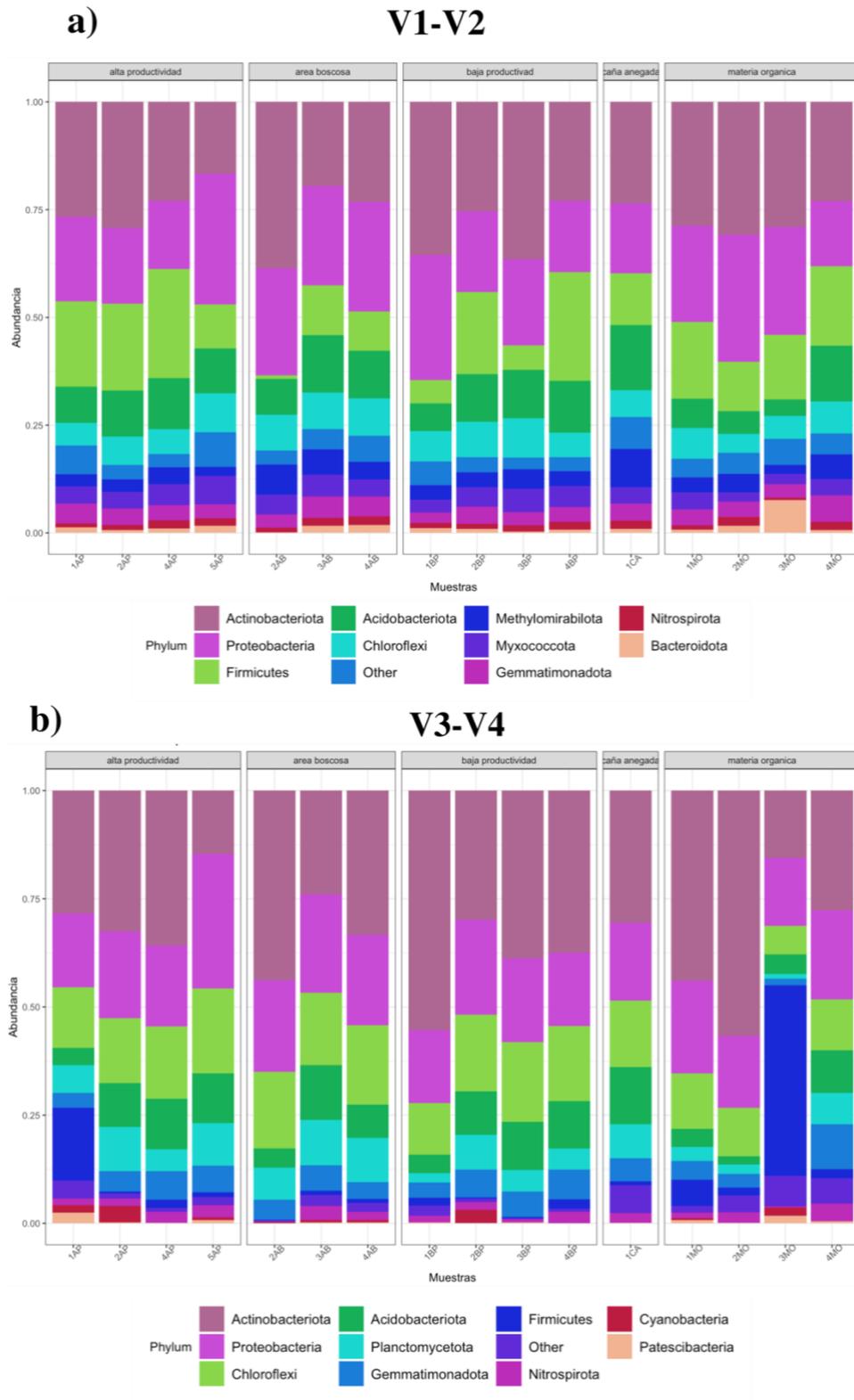
Leyenda del cuadro: (\*) indica las muestras de las cuales no se obtuvieron datos de secuenciación.

Se observa que de la muestra 1AP se obtuvo una baja concentración de ADN. Las muestras con concentraciones más altas son 4AB y 5AP. Los valores de A260/280 están en un rango de 1.35 a 1.90 mientras que los de A260/230 0.21 a 1.91.

De las muestras enviadas solo se recibió secuencias de las siguientes muestras 2AB, 3AB, 4AB, 1AP, 2AP, 4AP, 5AP, 1MO, 2MO, 3MO, 4MO, 1BP, 2BP, 3BP, 4BP y 1CA.

## 2.2. Análisis del microbioma bacteriano

Figura 21: Abundancia relativa por filo en cada una de las dos regiones analizadas.

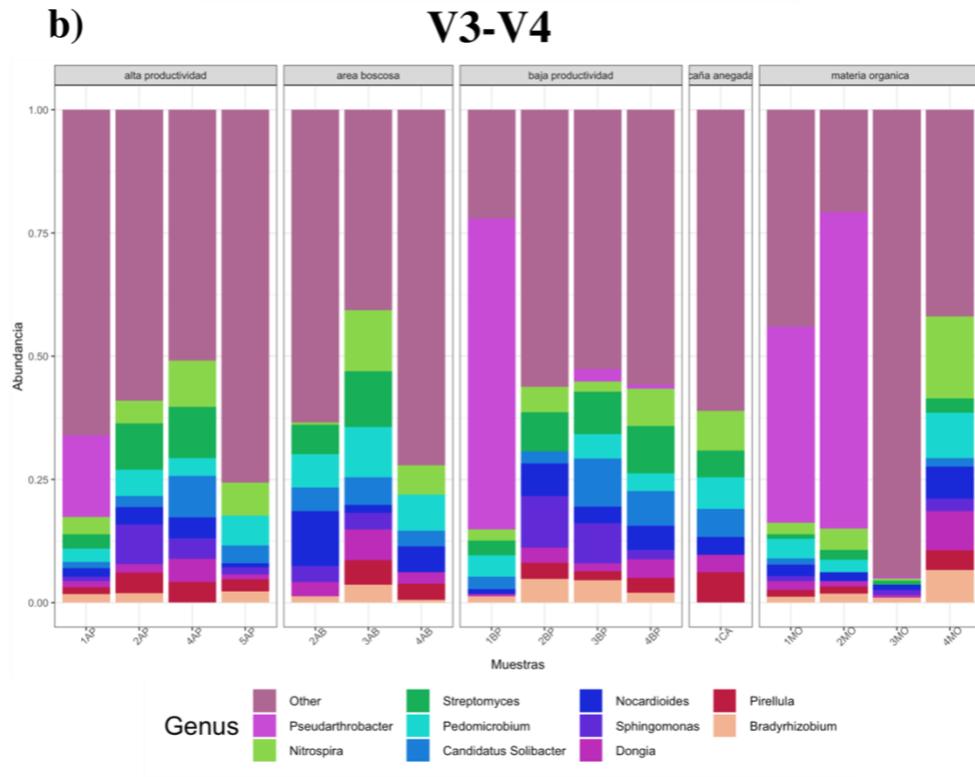
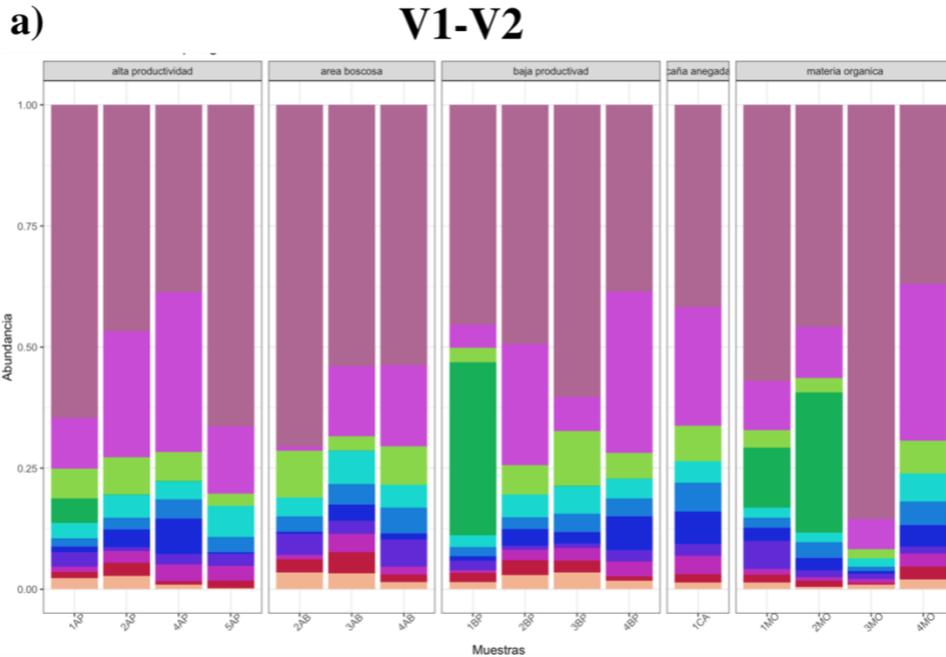


Leyenda de la imagen: (a) Región variable V1-V2, (b) Región variable V3-V4. Se muestran los 10 filos más abundantes. (Alto Contenido de Materia Orgánica [MO], Baja Productividad [BP], Área Boscosa [AB], Área de caña anegada [CA], Alta Productividad [AP]).

Se observa que los filos más abundantes para la región V1-V2 en todas las muestras son Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Acidobacteriota. En la muestra de caña en áreas anegadas se observa que el filo Methylophilum en una mayor proporción.

Se observa que los filos más abundantes para la región V3-V4 son el Actinobacteriota, Proteobacteria, Chloroflexi y Acidobacteriota. Se observa que la muestra 3MO tiene en mayor proporción la Firmicutes. El filo Patescibacteria solo están presentes en alta productividad y alto contenido de materia orgánica. Para ambas regiones los géneros más abundantes son *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteriota* y *Chloroflexi*.

Figura 22: Abundancia relativa de los géneros en cada una de las dos regiones analizadas.



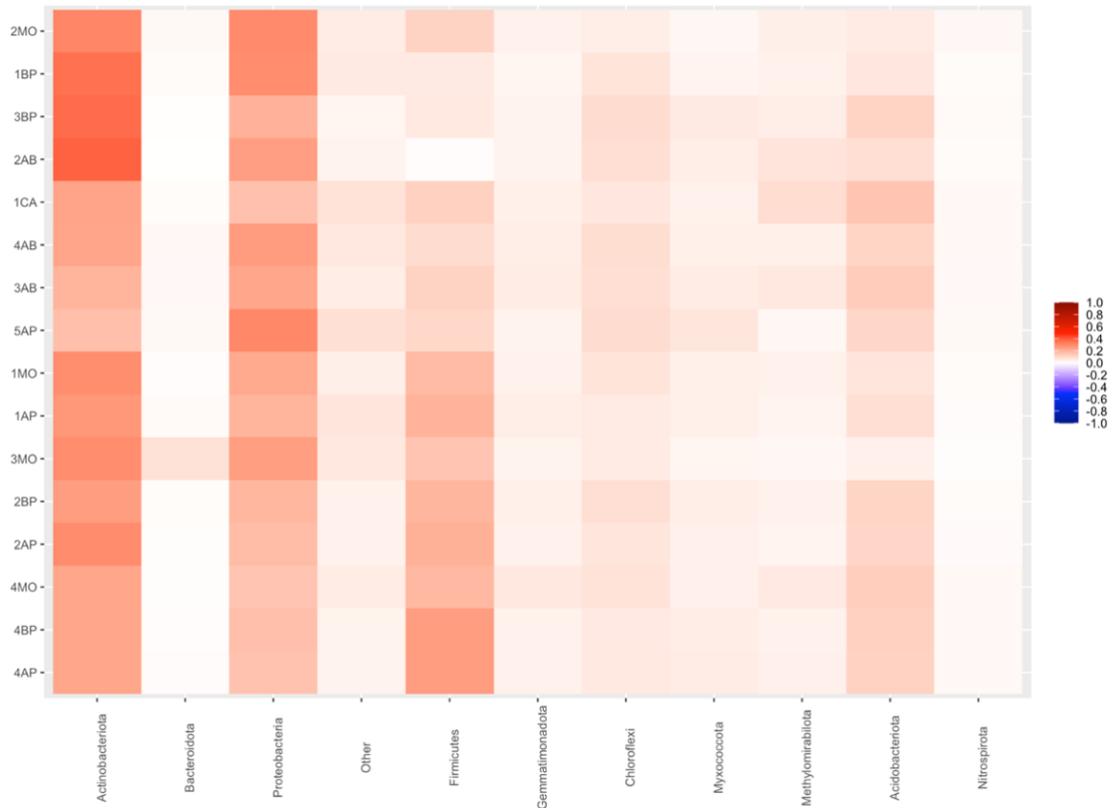
Leyenda de la imagen: (a) Región variable V1-V2, (b) Región variable V3-V4. Se muestran los 10 géneros más abundantes para cada una. (Alto Contenido de Materia Orgánica [MO], Baja Productividad [BP], Área Boscosa [AB], Área de caña anegada [CA], Alta Productividad [AP]).

Se observa que los géneros más abundantes para le región V1-V2 en todas las muestras son *Bacillus*, *Gaiella*, *Nitrospira*, *RB41* y *Afipia*. Se observa que la muestra 1BP tiene una mayor abundancia del género *Pseudarthrobacter*, el cual no está presente en las otras muestras de baja productividad. Este género solo está presente en las muestras 1AP, 1MO y 2MO. Se observa que la muestra 3MO tiene una baja abundancia relativa de bacterias.

Se observa que los géneros más abundantes en la región V3-V4 son *Pseudarthrobacter*, *Nitrospira*, *Streptomyces*, *Pedomicrobium*, *Nitrospira* y *Streptomyces*. Se observa que la muestra 3MO posee poca abundancia. Mientras que las 1MO, 2MO y 1BP poseen bacterias del filo Pseudarthrobacter en grandes proporciones.

Los géneros que comparte ambas regiones son *Pseudarthrobacter*, *Nitrospira*, y *Streptomyces*. Sin embargo, el color más marcado para ambas regiones es el de “other”. Es decir que en conjunto de otros géneros representan más de la mitad de la abundancia en cada tipo de muestra.

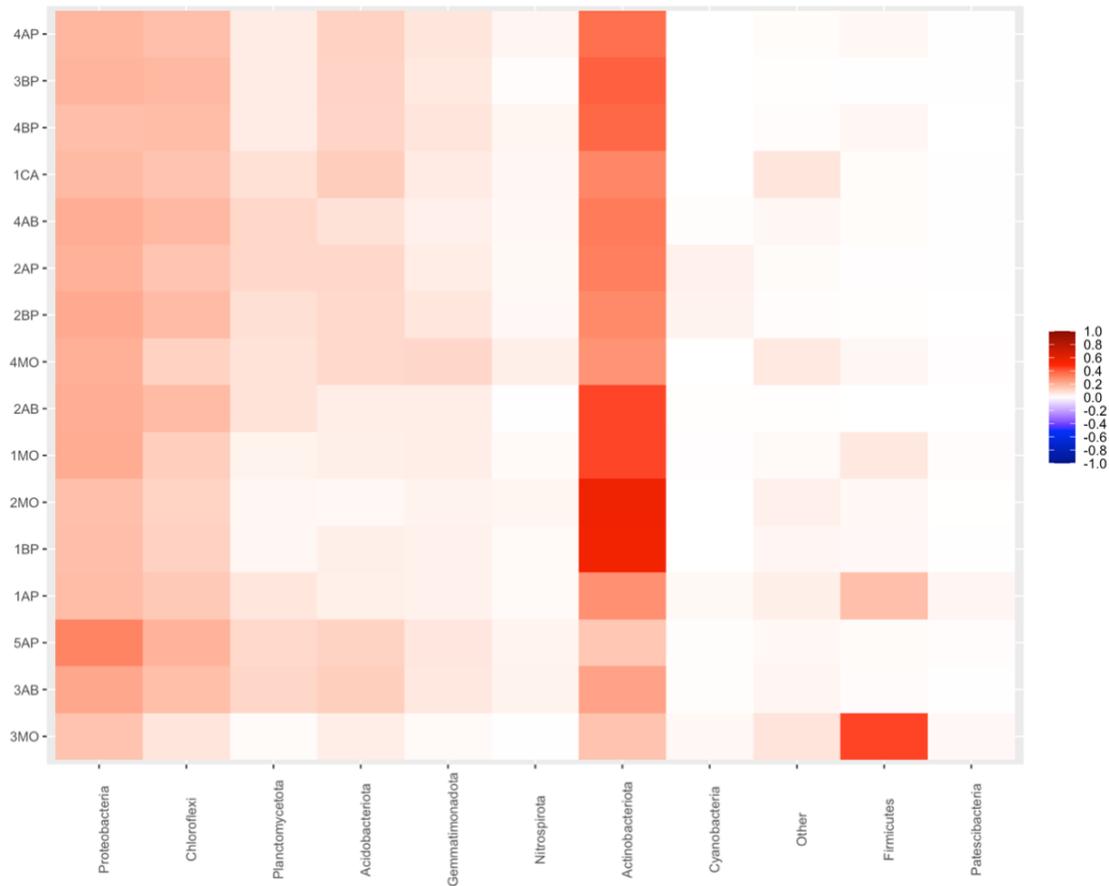
Figura 23: Mapa de calor de los filos más abundantes presentes en la región V1-V2.



Leyenda de la figura: Mapa de calor de abundancia relativa a nivel filos. (Alto Contenido de Materia Orgánica [MO], Baja Productividad [BP], Área Boscosa [AB], Área de caña anegada [CA], Alta Productividad [AP]).

Se observa que la mayoría de las bacterias de todas las muestras pertenecen al filo Actinobacteriota, seguido de Proteobacterira. Se observa que las muestra 3MO tiene una mayor proporción de Bacteroidata a comparación de las otras muestras.

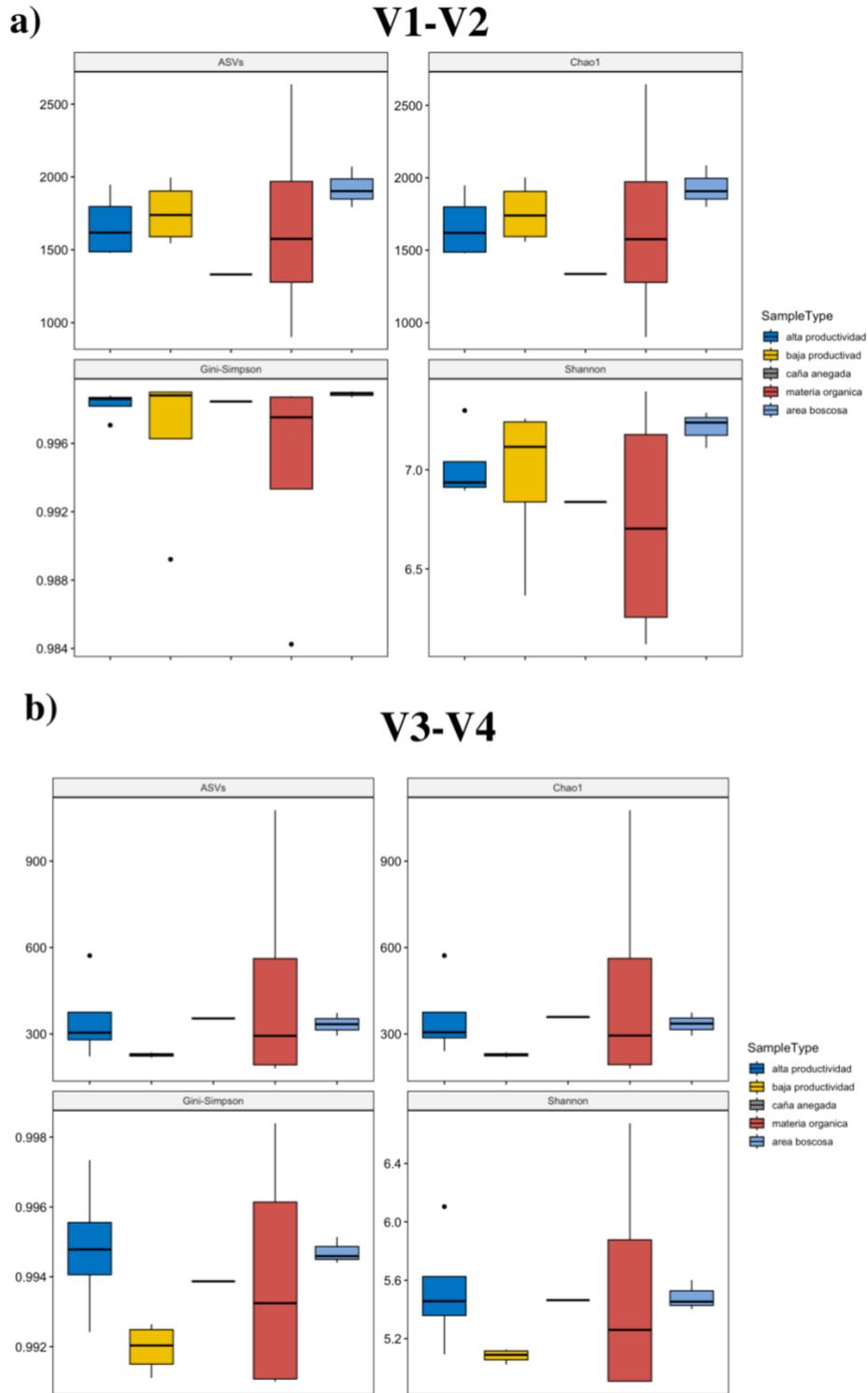
Figura 24: Mapa de calor de los 10 filios más abundantes de la región V3-V4.



Leyende de la figura: Mapa de calor de abundancia relativa a nivel filios. (Alto Contenido de Materia Orgánica [MO], Baja Productividad [BP], Área Boscosa [AB], Área de caña anegada [CA], Alta Productividad [AP]).

Se observa una mayor coloración en el filo Actinobacteriota para todas las muestras, especialmente para las 2AB, 1MO, 2MO, 1BP. Seguido de una coloración roja más leve para el filo Proteobacteria y Chloroflexi. Mientras que la muestra 3MO presente un mayor número de bacterias del filo Firmicutes.

Figura 25: Diferentes métricas por tipo de muestra para diversidad alfa de las regiones V1-V2 y V3-V4 analizada.

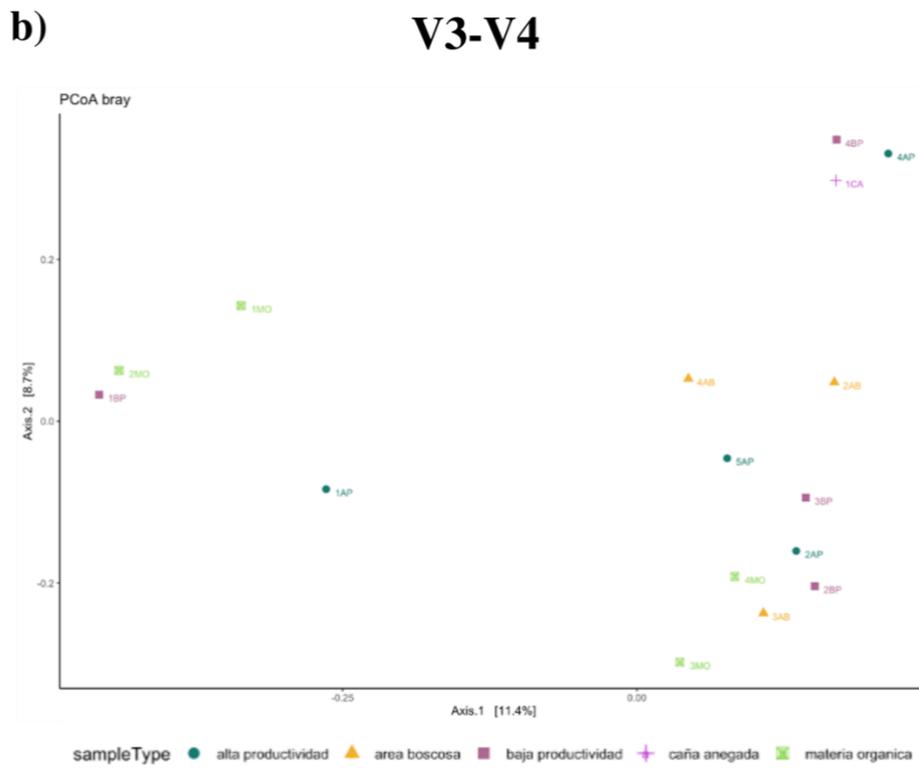
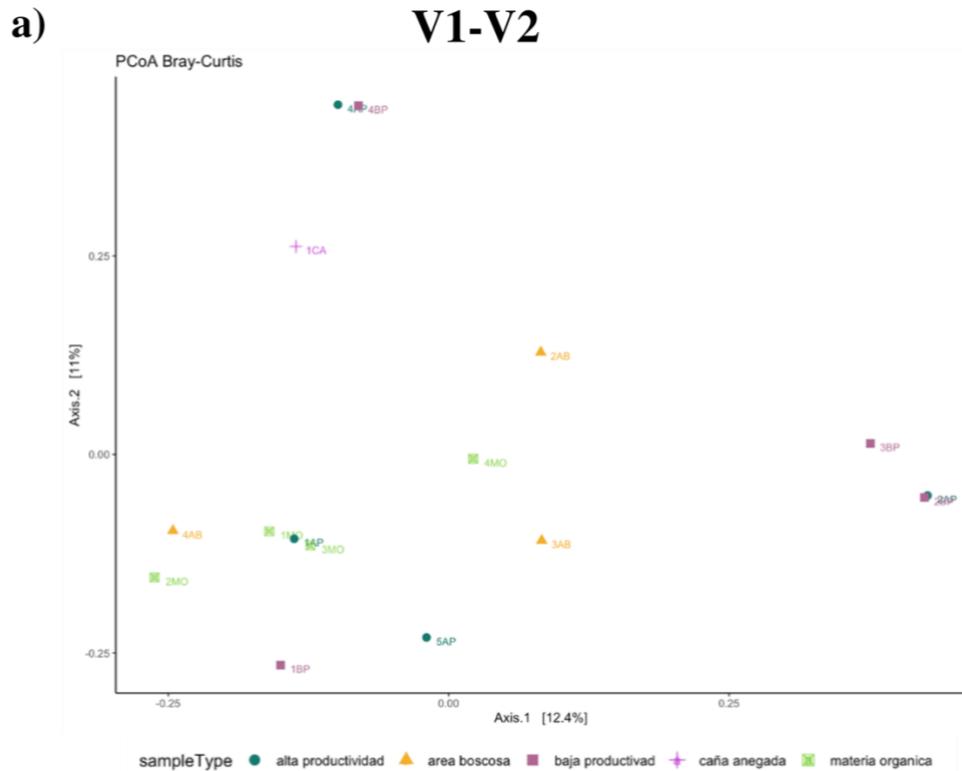


Leyenda de la figura: Métricas de diversidad alfa para ambas regiones las muestras evaluadas según pH. Número de ASVs, índice Chao1, índice de Gini-Simpson e índice de Shannon.

Se observa que el tipo de muestra con mayor diversidad alfa para la región V1-V2 (Figura 23a) es la de materia orgánica, seguida de baja productividad, alta productividad y área boscosa ya que tanto para la abundancia de ASVs, el índice de Chao1, índice de Shannon e índice de Gini-Simpson se observa el mismo comportamiento. En caña anegada no se observa diversidad debido a que solo se contaba con una muestra para el tipo de muestra.

Se observa que las muestras para la región V3-V4 de alto contenido de materia orgánica tienen una mayor diversidad. Seguidas de alta productividad en todas las métricas excepto en la de Gini-Simpson dónde le sigue la de baja productividad. Para la muestra de caña anegada no se observa diversidad alfa.

Figura 26: Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de las distancias de Bray-Curtis entre las muestras analizadas para la regiones V1-V2 y V3-V4.



Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) se realizó conforme a la metadata que contaba con el tipo de muestra, pH y la región de muestreo. Se observa que para le región V1-V2 la muestra 1CA está completamente separada de las demás muestras. Las muestras 3MO, 1AP 1MO se encuentran muy cercanas para la región V1-V2 pero para la región V3-V4 se encuentran separadas. Las muestras 4BP y 4AP se encuentran juntas en ambas regiones. Mientras que las 2BP y la 3AP también cercanas a la 3BP pero alejadas de las demás muestras para la región V1-V2, pero para la región V3-V4 se encuentran separadas.

## IX. DISCUSIÓN

El microbioma del suelo y las bacterias que en él habitan, son de suma importancia para la salud del suelo. Cada vez se denota más que su estudio es vital para la agricultura ya que brinda herramientas importantes a los agricultores que les permite entender el estado de su suelo. Esto ayuda al agricultor a tomar decisiones informadas. Por otro lado, las bacterias promotoras del crecimiento que habitan en los suelos tienen un gran potencial como bioproductos para una variedad de aplicaciones entre las que se incluyen biofertilizantes y biopesticidas.

En la Figura 6 se observan que el mayor porcentaje de las bacterias aisladas se encuentran en el tipo de muestra alto contenido de materia orgánica (MO) (30%) seguido de alta productividad (AP) (29%). Le siguen la de tipo de área boscosa (AB) y baja productividad (BP). Se esperaba aislar un mayor porcentaje de bacterias en las muestras de áreas boscosas debido a que según estudios los bosques presentan mayor diversidad de especies (Silva-Parra et al., 2017). Se observa únicamente un porcentaje ligeramente más alto que el de baja productividad. Tampoco se observa una diferencia en la abundancia relativa de estos dos tipos de muestra al ser analizadas con metagenómica (Figura 19 y 20). Un motivo por el cual en el área boscosa se aislaron menos bacterias que en las muestras MO y AP podría deberse a factores externos que estén afectando su microbioma bacteriano. Entre los factores externos puede estar el pH, la temperatura o filtración de compuestos tóxicos en el suelo, así como también que haya una mayor proporción de organismos no cultivables en ese tipo de muestras (Chaudhary et al., 2019; Lladó et al., 2017; Zeng et al., 2019). Por otro lado, estudios han revelado que el monocultivo de la azúcar tiene efectos negativos a largo plazo en la calidad del suelo y en su microbioma (Putra et al., 2020). Por lo que cabe resaltar que estas áreas boscosas se encuentran dentro de las plantaciones o aledaños a ellas por lo que podría ser un factor que afecte. Sin embargo, es necesario mayor investigación para determinarlo. No se puede confirmar tampoco si alguna vez fueron usadas para cultivar y abandonadas debido a la baja productividad. Eso explicaría porque su porcentaje de bacterias es el mismo que el de áreas de baja productividad. Al observar la abundancia relativa en las figuras 19 y 20 de filos y géneros respectivamente no se observan patrones diferentes a los de los demás tipos de muestra.

Se observa que de las muestras 2AB y 1AB se aislaron una mayor cantidad de bacterias que de las muestras 3AB y 4AB. Esto indica diferencias entre muestras de un mismo tipo. La muestra 3AB pertenece a un bosque de eucaliptos, estos árboles son conocidos por acidificar el suelo lo que puede ser un motivo para un menor aislamiento (Albert Kobina Mensah, 2016). Al compararlo con los datos de metagenómica se observa que en la muestra 3AB el filo Acidobacteriota es ligeramente más abundante que la muestra 2AB. En este filo se encuentran bacterias que presentan una mayor adaptación a ambientes con pH bajos (Conradie & Jacobs, 2021). En ninguna muestra de áreas boscosas se aislaron más bacterias que en la muestra 1AP la cual tiene un mayor porcentaje de bacterias. Esto refuerza la idea que el uso anterior o las plantaciones aledaños afectan el microbioma de estas áreas (Q. Zhao et al., 2018).

En la Figura 8 se observa que los bacilos se encuentran en mayor proporción en todos los tipos de muestra que los cocos. Se ha demostrado que los bacilos son beneficiosos para la salud de suelo, especialmente los Gram positivo (J. Liu et al., 2019). En la Figura 9 se observa que los bacilos Gram positivo están en mayor proporción en todos los tipos de muestra. Un estudio del 2020 encontró que las bacterias Gram positivo son los actores clave en la descomposición de los compuestos de nitrogenados como proteínas y aminoácidos por lo que, una mayor proporción de estos puede significar una mejor obtención de nitrógeno para la planta (Enggrob et al., 2020). El segundo grupo más abundante que se encontró en las cepas aisladas fueron bacilos Gram negativo.

Las bacterias Gram negativo de los géneros *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* and *Burkholderia mallei* pueden ser beneficiosas como bacterias promotoras del crecimiento. Sin embargo, bacterias de género *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* y *Shigella* pueden llegar a ser patógenas para el ser humano (D. Cruz et al., 2021). En las pruebas realizadas con el agar King B y la luz negra (figura 15) se presume que las bacterias que crecieron son del género *Pseudomonas* spp. A pesar de que este género está reportado como abundante en los suelos no se observa en los resultados obtenidos por medio de metagenómica (ver figura 21) (H. B. Li et al., 2017). Las bacterias que crecieron en el agar suplementado con Trypan Blue se espera sean del género *Burkholderia* spp.

La morfología y tinción de Gram de las bacterias son indicadores de la comunidad bacteriana presente en las distintas muestras. Las bacterias promotoras del crecimiento tienen distintas habilidades que le permiten mantener la salud del suelo y contribuir al desarrollo y salud de la planta (A. Kumar et al., 2020). Debido a esto es de suma importancia identificar las capacidades de cada bacteria. Por otro lado, las bacterias aisladas de los nichos nativos tienen una mayor posibilidad de éxito para ser transformadas en bioproductos para la agricultura ya que se encuentran adaptadas al ambiente (Emami et al., 2019). Los suelos nativos tienen un gran potencial para aislar bacterias con características promotoras del crecimiento como se observa en la figura 10 donde se comprobaron 10 habilidades. Las habilidades con mayor porcentaje en todos los tipos de muestra fueron la producción de ACC desaminasa, producción de proteasas, solubilización de potasio y producción de gluconasas. También se observa que las bacterias de las muestras de alta productividad y alto contenido de materia orgánica poseen un mayor porcentaje de bacterias positivas para las distintas habilidades (Figura 11).

La ACC desaminasa es una enzima que promueve el crecimiento de las plantas influenciadas por el estrés (Esquivel-Cote et al., 2013). Esta característica es diversa entre los organismos presentes en el suelo (Ma et al., 2015). Es una enzima que tiene la ventaja que disminuye las concentraciones de etileno, el cual es una fitohormona que en pequeñas cantidades tiene efectos positivos en la planta, pero en grandes cantidades puede causarle estrés (Onofre-Lemus et al., 2009). En 2021 CENGICANÁ presentó un informe sobre el manejo de la floración de la caña de azúcar utilizando etileno lo que confirma que es utilizado en la industria azucarera guatemalteca (Espinoza et al., 2021). Como resultado puede que las bacterias busquen mecanismos para regular la cantidad presente en el ambiente lo que provocando que se sintetice la ACC desaminasa o estén bajo otro tipo de estrés que hace que las plantas liberen el precursor del etileno al ambiente (Rauf et al., 2021). Por lo que se comprueba que es una habilidad extendida en las bacterias que habitan en el suelo y su producción puede estar influenciada por el uso de etileno en los cultivos (Ravanbakhsh et al., 2017).

El IAA, también es una fitohormona, una auxina, que juega un papel esencial en la división celular, desarrollo de la planta y la senescencia de las hojas (R. M. dos Santos et al., 2020). Es la hormona vegetal más común de la clase de las auxinas y regula varios aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Tiene un gran potencial para promover el crecimiento y la protección de las plantas para la agricultura sostenible (Fu et al., 2015). Se observa que no está presente en tres de las muestras, 4BP, 3BP, 3AB, (Figura 12), sin embargo, esto puede deberse a que se utilizó un método colorimétrico no cuantitativo, por lo que si la producción era menor al observado con el menor de los estándares (5µg/mL) no se pudo detectar (Gorndon & Weber, 1950).

En la Figura 13 se observa la producción de enzimas líticas gluconasas, proteasas, quitinasas y lipasas. Se observa que la proteasa es la enzima de mayor producción. Esto coincide

con lo esperado debido a que otros estudios han reportado que las proteasas son de las enzimas de mayor abundancia en el suelo. Se encuentran tanto en el suelo como en otros ambientes ya que son esenciales para el procesamiento de las proteínas del ambiente (X. Y. Zhang et al., 2015). Por otro lado, las gluconasas son vitales el procesamiento de polisacáridos complejos sobre todo porque se trata de plantaciones de caña de azúcar donde los polisacáridos son abundantes debido al tipo de cultivo. En el futuro estas bacterias productoras de gluconasas pueden utilizarse para acelerar el procesamiento del bagazo de la caña (Abdeshahian et al., 2020). Estas enzimas también son esenciales para el control de plagas ya que permiten la degradación de paredes celulares y también mejoran la resiliencia del cultivo ante factores de estrés abióticos. Por lo que en el futuro se pueden seleccionar cepas que presente estas cuatro enzimas juntas para estudiar su capacidad como control de plagas (Jha, 2022) Las cepas de la muestra 2AB produjeron estas cuatro enzimas.

Las quitinasas permiten la degradación de las paredes celulares de hongos y atropados que contienen quitina por lo que tienen potencial como biocontroles (Veliz et al., 2017). Cabe resaltar que se encontró una mayor cantidad de bacterias productoras de quitinasas en la muestra de alta productividad (1AP) y en dos de baja productividad (3BP y 4BP) por lo que recomendamos verificar con el ingenio el estado de los lotes de dónde provienen las muestras. Uno de los motivos para este aumento de producción de quitinasas puede deber la presencia de plagas con exoesqueleto de quitina como es el caso chinches y ronrones que aquejan a las plantaciones azucareras (Banerjee & Mandal, 2019; CENGICANA, s. f.).

La enzima lítica de menor producción observada en las muestras es la lipasa. Esto puede deberse a que, en las plantaciones de azúcar, abundan más los compuestos de carbono que los lípidos por lo que las bacterias producen en menor cantidad las lipasas (Ilesanmi et al., 2020b). Las lipasas también se han es suelos contaminado con plásticos ya que ayudan a su degradación por lo que se puede investigar la presencia de plásticos y microplásticos en los campos de cultivo (Guliyev et al., 2022; Ragoobur et al., 2021). Estos plásticos pueden ser introducidos por equipos utilizados para el cultivo de la caña o ser arrastrados en épocas de lluvia.

El silicio es uno de los elementos más abundante del planeta. Se ha demostrado que el mecanismo de solubilización de los silicatos está altamente relacionado con el de solubilización de fosfatos, dónde ambos involucran la producción de ácidos como mecanismo (Lee et al., 2019). En esta investigación no se observó el halo esperado para la detección de solubilización de silicatos por lo que se tomó como positivo una orilla ligeramente transparente alrededor de las colonias. Esto puede deberse a la elección de fuente de silicatos ya que se realizó con caolina coloidal la cual es soluble en agua y las bacterias solubilizan silicatos en sus formas insolubles (J. A. Cruz et al., 2022). También se realizó un medio con óxido de silicio, sin embargo, tampoco se observó un halo, por lo que la falla puede deberse a las fuentes de silicatos utilizadas. Las bacterias tomadas como posibles positivos para solubilizadoras de silicatos coinciden en su gran mayoría con las solubilizadoras de fosfato (Figura 14) lo que nos lleva a hipotetizar que efectivamente son solubilizadoras de silicatos, debido a que los mecanismos de solubilización de estos dos compuestos son similares y en varios estudios se ha demostrado que muchas bacterias tienen las habilidades juntas (Bist et al., 2020) . La mayoría de estos estudios que comparan fuente de silicatos concluyen que el tri-silicato de magnesio es la mejor opción por lo que sería una alternativa a analizar en el futuro para determinar si las bacterias aisladas son efectivamente solubilizadores de silicatos.(Kang et al., 2017). Las muestras 2MO y 1AB son para ambas pruebas las muestras con mayor cantidad de bacterias positivas para ambos casos. Por otro lado, también se observó un cambio de coloración de algunas de las cepas ya que se tornaron de color verde algunas y otras en tonos marrones y rojos. Esto puede deberse a que el silicato presente en el medio

haya causado una estimulación de producción de pigmentos. Existen pigmentos de esos colores producidos por bacterias, sin embargo, no reportan que las bacterias empiece a producirlos por una estimulación externa (Pishch et al., 2011; Venil et al., 2013).

Los géneros de *Pseudomonas* y *Burkholderia* (Figura 15) son abundantes en el suelo y se ha reportado en estudios anteriores que sus especies producen pirrolnitrinas. (J. T. de Souza & Raaijmakers, 2003; Tzawa et al., 2000). Este compuesto ayuda a las plantas a defenderse de patógenos ya que tiene un efecto antifúngico (Pawar et al., 2019; Zaman et al., 2021). Por lo que las cepas identificadas como positivas son posibles candidatos para su producción. Ambos géneros tienen reportados otras características promotoras del crecimiento en plantas, como la producción de proteasas, por lo que es importante su identificación (An et al., 2022; Onofre-Lemus et al., 2009).

En la Figura 17 se observa que, igual que con la solubilización de potasio (Figura 16) y la fijación de fosfatos, la muestra con mayor cantidad de bacterias fijadoras de nitrógeno es la 2MO lo que indica que esta muestra posee bacterias que proporcionan los tres nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. El nitrógeno es esencial para el desarrollo de las plantas y una buena cosecha por lo que las bacterias que lo fijan son de gran interés (Singh et al., 2020). La implementación de estas cepas a los cultivos tiene el potencial de economizar el uso de fertilizantes químicos en las plantaciones de Magdalena. Por lo que se deben realizar pruebas cuantitativas de la fijación de nitrógeno para poder determinar las cepas con mayor potencial de uso. Así como hacer experimentaciones en campo (Ohyama et al., 2014; Rilling et al., 2018b).

Existen varios métodos que nos dan indicios de que las bacterias aisladas son capaces de trabajar con nitrógeno, las cuales incluyen crecimiento en medios libres de nitrógeno, amplificación de genes involucrados y la detección de productos o subproductos generados por las bacterias. La prueba con el reactivo de Nessler detecta la producción de  $\text{NH}_3$  (Padilla et al., 2022). Los cambios en el pH o la presencia de interferencias (iones de impurezas, otras moléculas y especialmente moléculas que contienen N) pueden afectar negativamente su precisión (Y. Zhao et al., 2019). Debido a esto se realizó un primer tamizaje donde se identificó 115 cepas que presentaron mayor coloración en la prueba de Nessler. Se comparó esa información con el crecimiento en un medio libre de nitrógeno con lo cual se identificaron 55 cepas positivas para ambas pruebas. Luego se realizó un PCR para el gen *nifH*, el cual está involucrado en la fijación del nitrógeno. Se eligió este gen ya que estudios lo han reportado como uno de los más abundantes (Dai et al., 2014). A pesar de esto, de las 115 bacterias tamizadas solo se observaron bandas tenues en dos de las muestras. Esto puede deberse a que las bacterias estudiadas usan otros genes para fijar el nitrógeno. Entre otros genes fijadores de nitrógeno se encuentran *nifD* y *nifK* (Pi et al., 2022). Mise et al., 2021 sugieren que se encuentran muchas secuencias *Pseudo-nifH* que limitan la identificación de las bacterias fijadoras de nitrógeno por lo que identifica al *nifD* y *nifK* como marcadores más confiables (Mise et al., 2021). Por otro lado se pueden pasar las bacterias de un medio libre de nitrógeno a otro durante un periodo más largo de tiempo para disminuir el porcentaje de error del medio libre de N.

De las bacterias tamizadas las que tiene mayor potencial para crecimiento son las de las muestras de alto contenido de materia orgánica y alta productividad específicamente la 1AP24 con 9 características (ver Cuadro 11) promotoras del crecimiento y las 1AP18, 2AB8, 2AB9, 4AP5, 2BP2 y 2AP12 con 8 características. De estas todas excepto la cepa 1AP18 pueden proveer a la planta de los tres nutrientes esenciales fósforo, nitrógeno y potasio.

Debido a que los organismos cultivables anteriormente presentados solo representan una mínima parte del microbioma del suelo, en este trabajo también se realizó un análisis de secuenciación de metagenómica de gen rARN 16S. Para determinar la composición bacteriana del suelo y determinar los filos y géneros que son dominantes en cada tipo de suelo se amplificaron las regiones V1-V2 y V3-V4.

Primero se realizó una extracción de ADN, las concentraciones y purzas se pueden ver en el Cuadro 7. La mayoría de las extracciones obtuvieron valores altos de concentraciones. Los datos medidos de pureza con el NanoDrop denotaban impurezas ya que en la razón 260/280 se observan valores menores al esperado 1.80 lo que podría significar contaminación con proteínas o fenol (Thermo Fischer Scientific, 2009). Sin embargo, el NanoDrop no marca contaminación con fenol por lo que se descarta esta posibilidad, por lo que pueden ser ácidos húmicos. Las muestras 1AB, 3AP, 4MO y 5MO, de las cuales no se obtuvieron datos para el análisis metagenómico, presentan valores bajos para ambas mediciones. A pesar de eso otras muestras también poseen valores bajos y se obtuvieron secuencias por lo que puede que haya algún contaminante en la tierra. Uno de los principales problemas reportado en la extracción de ADN de suelo es que este contiene ácidos húmicos que pueden co-precipitar e inhibir el procedimiento de aislamiento de ADN y, pasos posteriores, conducir al fracaso de la reacción de PCR (Wydro, 2022). Los ácidos húmicos se encuentran en el carbón, lignito, suelos y materiales orgánicos. Dos de las muestras (5MO y 6MO) de las que no se tienen datos coinciden en que provienen de suelos con alto contenido de materia orgánica por lo que puede haber presencia de ácidos húmicos (Ampong et al., 2022). Por otro lado, productos a base de ácido húmico se han utilizado en la producción de caña de azúcar en los últimos años para garantizar la sostenibilidad de la producción agrícola (Li et al., 2019). Estudios realizados por CENGICANA confirman que también es un compuesto presente en productos agrícolas utilizados en el país por lo que es posible que sean estos los que inhibieron la secuenciación de las muestras (Gerardo Espinoza Véliz et al., 2021; Morales & Espinoza, 2008). Debido a esto se puede agregar para muestra de cultivos de caña un paso adicional que precipite los ácidos húmicos y así evitar su interferencia (Ampong et al., 2022).

A las 16 secuencias obtenidas se realizó el análisis de microbioma bacteriano. Las puntuaciones Q son métricas comunes para evaluar la calidad de los datos de secuenciación. Q30 equivale a la probabilidad de una llamada de base incorrecta de 1 en 1000 veces. Mientras que Q20 de 1 en 100 veces. Si se observan puntuaciones Q bajas pueden dar lugar a un aumento de las llamadas de variantes de falsos positivos, lo que da lugar a conclusiones inexactas (Illumina, 2011). En el caso de las secuencias obtenidas todos los valores Q30 estaba sobre el 70% mientras que las Q20 se encuentran por encima del 80% (ver anexos) por lo que ninguno se encuentra por debajo de lo aceptado (Sathyanarayanan et al., 2019). Sin embargo, cabe resaltar que estos valores son el promedio de dos lecturas por lo una de ellas puede estar por debajo de Q20 y aun así tener un valor por encima (Illumina, 2011). Esto es evidente al revisar las puntuaciones Q para las secuencias forward y reverse, donde el reverse a la mitad de los ciclos tiene puntuaciones más bajas de Q10 (ver anexos). Las secuencias reversen siempre tienen una menor calidad debido a que las enzimas utilizadas tienen menos eficiencia para incorporar nucleótidos en la dirección inversa 3'→5' (Sousa, 2020). Para las regiones V1-V2 los valores tanto del forward como el reverse se mantuvieron por arriba de Q10 a lo largo de todos los ciclos. Sin embargo, para las regiones V3-V4 los reverse empezaban a bajar drásticamente alrededor de los 150 ciclos por lo que este se tuvo que tomar en cuenta para hacer los cortes (“trimming”) de manera adecuada y no obtener falso positivos.

Al comparar la abundancia relativa de las regiones V12 (V1-V2) y V34 (V3-V4) por filo se observa que 7 de los 10 fillos más comunes coinciden. Los que difieren en V12 son Methylomirabilota, Myxococcota, Bacteroidota. Mientras que en V34 son Planctomycetota, Cvanobacteria, Patescibacteria.

De los fillos más abundantes observados el Actinobacteriota también conocido como Actinomycetota antiguamente, son un grupo de bacterias Gram positivo presentes en el suelo (ASM, n.d.). Esto coincide con lo observado en las tinciones Gram (Figura 9) las más abundantes en todos los tipos de suelo. Esto también se observa en los fillos de la Figura 19. Así como también en los mapas de calor (figuras 21 y 22) dónde se observan los fillos más abundantes por muestra. Uno de los géneros más comunes en los suelos muestreados de este filo son los *Streptomyces* lo cual se puede observar en la Figura 20 de abundancia relativa por género para ambas regiones. Este filo desempeña un papel importante en el ciclo de la materia orgánica ya que inhibe el crecimiento de varios patógenos de plantas en la rizosfera y descompone mezclas complejas de polímeros en plantas muertas, animales y material fúngico por medio de la producción de enzimas extracelulares (Abdelgawad et al., 2020; Bhatti et al., 2017). Esto coincide con que todos los tipos de muestra producen enzimas como lipasas, gluconasas, quitinasas y proteasas.

El segundo filo más abundante es el Proteobacteria son un tipo de bacterias Gram negativo que se encuentran en el suelo y según análisis de secuenciación se encuentran entre los más abundantes de todos los suelos (Mhete et al., 2020). También esta reportado como común en suelos de cosecha de caña. Las proteobacterias se asociaron significativamente con la rizosfera de las plantas, y varias proteobacterias no simbióticas han sido reconocidas como de vida libre, incluidas *Azohydromonas*, *Azospirillum*, *Azospira*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pelomonas*, *Pseudacidovorax* y *Sphingomonas* (Solanki et al., 2020).

Firmicutes es de los fillos más común en las muestras analizadas. En la región V12 sin embargo, se encuentra con mayor abundancia que en la región V34 con excepción de la muestra 3MO dónde su proporción varía entre una región y otra. Se encuentra con mayor abundancia en la región V34 el más abundante. Esta reportado como uno de los fillos más comunes asociados a la caña de azúcar (Yuan et al., 2022). Los Firmicutes son bacterias que en su mayoría son Gram positivo lo que coincide con la observación de las tinciones Gram realizadas. A este filo pertenece el género *Bacillus* el cual se encuentra entre los géneros más abundantes encontrados con la región V12.

El filo Acidobacteriota es ubicuo en diversos ambientes terrestres que van desde suelos de sedimentos hasta pastizales, bosques y tierras agrícolas. Poseen genes que codifican para la degradación de polímeros de carbohidratos complejos como quitina y aminoácidos, lo que se comprueba al encontrar bacterias productoras de quitinasas y proteasas (Cho et al., 2020; Flieder et al., 2021). En las muestras analizadas es uno de los fillos más abundantes para ambas regiones.

Chloroflexi aparece como uno de los más abundantes en el análisis con ambas regiones y esta reportado como de los fillos más abundantes en los suelos de caña de azúcar (Tayyab et al., 2022). La mayor abundancia de proteobacterias, actinobacterias están asociadas a suelos no cultivados. Mientras que Firmicutes, Chloroflexi y Verrucomicrobia a tierras de cultivo (Wolińska, 2019). Sin embargo, no se observa esta diferencia en las muestras analizadas ya que Firmicutes, Chloroflexi se encuentran en la misma proporción en todas las muestras del mismo tipo para ambas regiones analizadas.

Gemmatimonadota es un filo común encontrado en muestras de suelo. Fue establecido como filo por métodos moleculares de muestras de suelo y sedimento marino y hasta el momento solo hay seis bacterias cultivadas. Se les atribuye del 1 al 2% de las bacterias de suelo lo que

también se observa en los resultados para ambas regiones analizadas (Mujakić et al., 2022). No se observan proporciones distintas entre tipos de muestra ni regiones.

El último filo en común para ambas regiones es Nitrospirota. Se sabe que es una bacteria que se encuentra en los suelos, pero es poco cultivable. Está involucrada en la nitrificación y hay estudios que demuestran una positiva correlación entre esta bacteria y metales pesados como el zinc y el cadmio (Y. Liu et al., 2022; Umezawa et al., 2020). Para ambas regiones analizadas se encuentran en baja abundancia del suelo.

Entre los géneros en común de las dos regiones se encuentran *Pseudarthrobacter*, *Nitrospira* y *Streptomyces*. Los demás géneros presentes son *Gaiella*, *MND1*, *Ammoniphilus*, *Pedomicrobium*, *RB41*, *Afipia* para las regiones V12 y *Pedomicrobium*, *Candidatus Solibacter*, *Nocardioides*, *Dongia*, *Pirellula*, *Bradyrhizobium* para la región V34. Se sabe que entre los géneros más abundantes del suelo de caña de azúcar se encuentran *Burkholderia* y *Pseudomonas*, sin embargo, ninguna de estas dos aparecen en los 10 géneros más comunes encontrados (Gao et al., 2019). Esto también sorprende debido a que mediante las caracterizaciones con medios selectivos como el King B y Trypan Blue se seleccionó bacterias que se pueden identificar como *Pseudomonas* y *Burkholderia* respectivamente.

En ambos análisis de regiones se observa que las muestras 1BP y 2MO indican una proporción diferente de géneros a las demás muestras. Ambos coinciden en el género más abundante siendo este *Pseudarthrobacter*. Este cambio en composición puede deberse a que estas dos muestras presentan, según los datos proporcionados por el ingenio (Cuadro 8), un pH neutro (~7). Estudios han demostrado que el pH puede cambiar la composición bacteriana del suelo (Ren et al., 2018; Tan et al., 2020). Al analizar el PCoA de Bray-Curtis (Figura 24) la región V3-V4 muestra una cercanía clara. Lo que muestra una relación entre la diversidad y el pH de estas dos muestras. La única otra muestra que presenta un pH de 7 es la muestra 1CA. Sin embargo, esta no se encuentra cerca por lo que puede deberse a otros factores como que la muestra proviene de áreas anegadas por lo que las bacterias están expuestas a un estrés abiótico diferente.

En la diversidad alfa (Figura 23) se observa que la mayor diversidad según los índices utilizados se encuentra en las muestras clasificadas como mayor contenido de materia orgánica, seguido de alta productividad, baja productividad y por último área boscosa. El índice de Chao1 también es una medida cualitativa de la diversidad alfa, que además de la riqueza de especies, tiene en cuenta la proporción de singletons ( $n = 1$ ) a doubletons ( $n = 2$ ) dando más peso a las especies raras (Prehn-Kristensen et al., 2018). No se observa un comportamiento distinto en las demás métricas. En la diversidad alfa calculado con la región V34 (figura 24b) se observa el mismo comportamiento que con la región V12 (figura 24a) para las muestras de materia orgánica y alta productividad, pero no para baja productividad donde en el índice de Chao1 no se observa el boxplot lo que indica que al dar peso a las especies más raras no hay especies diferentes en las muestras. En las muestras de tipo área boscosa se esperaban una mayor riqueza ya que en los bosques esta reportado un número mayor ((Dyderski & Jagodziński, 2021)). Sin embargo, se observa que tienen incluso una diversidad más baja que las muestras provenientes de áreas de baja productividad. Esta poca diversidad puede deberse a que, como se discutió antes, es probable que en las áreas boscosas fueron utilizadas con anterioridad como parte de la plantación y/o debido a su cercanía al cultivo se ven afectadas por los fertilizantes y pesticidas.

Por último, se calculó la diversidad beta del microbioma. La diversidad beta describe la diversidad de especies entre dos comunidades o ecosistemas. La disimilitud de Bray-Curtis es una forma de medir la disimilitud entre dos sitios diferentes (Fontana et al., 2020). En la Figura 24 se observa que para ambas regiones (Figura 24 a y b) las muestras 1CA, 4BP y 4AP son más cercanas

entre sí. También se observa que las muestras 1BP y 2MO están relacionadas lo que también se observaba con la composición taxonómica por especies y puede atribuirse a que ambas tienen un pH neutro. Se esperaba que las muestras del mismo tipo tuvieran una diversidad beta similar, sin embargo, este no es el caso lo que significa que la diversidad de especies entre los ecosistemas de un mismo tipo de muestra son diferentes (Fontana et al., 2020). Esto indica que la diversidad beta está dada por otros factores como el pH ya que 1BP y 2MO están cercanas (Wang et al., 2021). Sin embargo, los datos de pH son datos históricos dados por el ingenio por lo que se necesita verificar el estado actual de los suelos muestreados.

La información recolectada en este estudio es un primer paso para seleccionar a las bacterias con mayor potencial para utilizarse en futuros productos como biofertilizantes. Las cepas que mostraron mayor potencial, debido a que pueden proveer a la planta de los tres nutrientes esenciales (fósforo, nitrógeno y potasio) y poseen una gran cantidad de características promotoras del crecimiento son 1AP24, 2AB8, 2AB9, 4AP5, 2BP2 y 2AP12. Sin embargo, no se debe descartar cepas ya que presentaron habilidades útiles como la producción de enzimas líticas que puede llevar a la creación de productos de biocontrol para patógenos como hongos y artrópodos.

## X. CONCLUSIONES

- Se logró optimizar la técnica de extracción de ADN genómico de suelo para extraerlo exitosamente de las 20 muestras de tierra obtenidas.
- Se determinó la composición cualitativa y cuantitativa del microbioma bacteriano de diferentes tipos de muestra utilizados para la siembra de caña de azúcar de Guatemala mediante metagenómica del gen 16S ribosomal usando dos regiones variables (V1-V2 y V3-V4).
- Se identificó que los filos presentes más comunes son Actinobacteriota, Proteobacteria, Firmicutes, Acidobacteriota, Chloroflexi, Gemmatimonadota y Nitrospirota.
- Se identificó que los géneros más comunes para ambas regiones son *Pseudarthrobacter*, *Nitrospira* y *Streptomyces*.
- Se encontró que la diversidad alfa es mayor en las muestras de materia orgánica.
- Se logró aislar e identificar bacterias con características promotoras del crecimiento mediante cultivos selectivos y diferenciales.
- Se tamizaron las siguientes características promotoras del crecimiento: solubilización de fosfatos, solubilización de potasio, producción de ACC desaminasa, producción de proteasas, posible solubilización de silicatos, producción de lipasas, producción de IAA, producción de las enzimas gluconasas y quitinasas, prueba con el reactivo de Nessler y prueba de crecimiento en medio libre de nitrógeno.
- Las cepas con mayor potencial como bioproductos son 1AP24, 2AB8, 2AB9, 4AP5, 2BP2 y 2AP12.
- Se realizó un cepario con todas las bacterias aisladas (315 cepas) y otro con las tamizadas (222 cepas) que se encuentra en las instalaciones de la universidad.

## XI. RECOMENDACIONES

- Para mejorar la pureza de las extracciones y evitar que haya muestras sin secuenciar se recomienda realizar un paso extra en la extracción de ADN para eliminar los ácidos húmicos y mejorar la pureza de las extracciones.
- Realizar el análisis de TCL (cromatografía de capa fina) para determinar la producción de pirrolnitrina en las cepas aisladas que sean positivas en agar King B y TrypanBlue.
- Realizar de manera cuantitativa la detección de IAA con todas las cepas para tener datos cuantitativos completos.
- Utilizar los genes *nifD* y *nifK* para detectar posibles bacterias fijadoras de nitrógeno.
- Evaluar de forma cuantitativa las cepas más prometedoras para determinar si existen diferencias entre ellas para las habilidades presentadas.
- De las cepas evaluadas cuantitativamente seleccionar las de mejor rendimiento y realizar pruebas de campo.
- Formular un bioproducto a partir de las cepas con mejores rendimientos y combinación de características promotoras del crecimiento.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelgawad, H., Abuelsoud, W., Madany, M. M. Y., Selim, S., Zinta, G., Mousa, A. S. M., & Hozzein, W. N. (2020). Actinomycetes Enrich Soil Rhizosphere and Improve Seed Quality as well as Productivity of Legumes by Boosting Nitrogen Availability and Metabolism. *Biomolecules*, *10*(12), 1-19. <https://doi.org/10.3390/BIOM10121675>
- Abdeshahian, P., Ascencio, J. J., Philippini, R. R., Antunes, F. A. F., dos Santos, J. C., & da Silva, S. S. (2020). Utilization of sugarcane straw for production of  $\beta$ -glucan biopolymer by *Lasiodiplodia theobromae* CCT 3966 in batch fermentation process. *Bioresource Technology*, *314*, 123716. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.123716>
- Abisaí Pazos-Rojas, L., Marín-Cevada, V., Elizabeth Morales García, Y., Baez, A., Angel Villalobos-López, M., Pérez-Santos, M., Muñoz-Rojas, J., Puebla, de, Politécnico Nacional, I., & yellowtweety, M. (2016). Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. [www.reibci.org](http://www.reibci.org)
- Acosta-Martínez, V., van Pelt, S., Moore-Kucera, J., Baddock, M. C., & Zobeck, T. M. (2015). Microbiology of wind-eroded sediments: Current knowledge and future research directions. *Aeolian Research*, *18*, 99-113. <https://doi.org/10.1016/J.AEOLIA.2015.06.001>
- Agriculture Victoria. (2020). *Soil acidity | Soil | Farm management | Agriculture Victoria*. <https://agriculture.vic.gov.au/farm-management/soil/soil-acidity>
- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, *2*(1), 1. <https://doi.org/10.2478/V10102-009-0001-7>
- Albert Kobina Mensah, B. (2016). *Effects of Eucalyptus Plantation on Soil Physico-Chemical Properties in Thiririka Sub-Catchment, Kiambu County, Kenya*. <https://ir-library.ku.ac.ke/handle/123456789/14993>
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, *8*(JUN), 971. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00971/BIBTEX>
- Alteio, L. v., Schulz, F., Seshadri, R., Varghese, N., Rodriguez-Reillo, W., Ryan, E., Goudeau, D., Eichorst, S. A., Malmstrom, R. R., Bowers, R. M., Katz, L. A., Blanchard, J. L., & Woyke, T. (2020). Complementary Metagenomic Approaches Improve Reconstruction of Microbial Diversity in a Forest Soil. *mSystems*, *5*(2). <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00768-19>
- Ampong, K., Thilakaranthna, M. S., & Gorim, L. Y. (2022). Understanding the Role of Humic Acids on Crop Performance and Soil Health. *Frontiers in Agronomy*, *4*, 10. <https://doi.org/10.3389/FAGRO.2022.848621/BIBTEX>
- An, C., Ma, S., Liu, C., Ding, H., & Xue, W. (2022). Burkholderia ambifaria XN08: A plant growth-promoting endophytic bacterium with biocontrol potential against sharp eyespot in wheat. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 2783. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.906724/BIBTEX>
- Antunes, J. E. L., Lyra, M. C. C. P., Ollero, F. J., Freitas, A. D. S., Oliveira, L. M. S., Araújo, A. S. F., Figueiredo, M. V. B., & Mol, G. (2017). Diversity of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. *Genetics and Molecular Research*, *16*(2), 16029662. <https://doi.org/10.4238/gmr16029662>
- ASAZGUA. (s. f.). *Azúcar de Guatemala - Historia*. Recuperado 20 de enero de 2023, de <https://www.azucar.com.gt/azucar-de-guatemala-historia/>
- Asazgua. (2018). «*Guía Ambiental del Sector de la Caña de Azúcar*».

- ASM. (s. f.). *Soil Actinomycetes*. Recuperado 18 de enero de 2023, de <https://asm.org/Image-Gallery/Soil-Actinomycetes>
- 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*, *871*, 1473. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01473/BIBTEX>
- Bakhshandeh, E., Pirdashti, H., & Lendeh, K. S. (2017). Phosphate and potassium-solubilizing bacteria effect on the growth of rice. *Ecological Engineering*, *103*, 164-169. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2017.03.008>
- Banco de Guatemala. (2022). *Ingreso Mensual de Divisas por Exportaciones, 2016 - 2022 | Banco de Guatemala*. <https://banguat.gob.gt/es/page/ingreso-mensual-de-divisas-por-exportaciones-2016-2022>
- Banerjee, S., & Mandal, N. C. (2019). Diversity of chitinase-producing bacteria and their possible role in plant pest control. *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications: Volume 2. Soil & Agroecosystems*, 457-491. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8487-5\\_18/COVER](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8487-5_18/COVER)
- Baweja, P., Kumar, S., & Kumar, G. (2020). *Fertilizers and Pesticides: Their Impact on Soil Health and Environment*. 265-285. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-44364-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-44364-1_15)
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, *8*(1), 1-22. <https://doi.org/10.1186/S40168-020-00875-0/FIGURES/7>
- Bernhard, A. (2010). *The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact | Learn Science at Scitable*. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-nitrogen-cycle-processes-players-and-human-15644632/>
- Bevan, L., Jones, M., & Zheng, Y. (2021). Optimisation of Nitrogen, Phosphorus, and Potassium for Soilless Production of Cannabis sativa in the Flowering Stage Using Response Surface Analysis. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 2587. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.764103/BIBTEX>
- 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 2020 10:1*, *10*(1), 1-19. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72439-z>
- Bhatti, A. A., Haq, S., & Bhat, R. A. (2017). Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis*, *111*, 458-467. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2017.09.036>
- Bisht, N., Chauhan, P. S., Bisht, N., & Chauhan, P. S. (2020). Excessive and Disproportionate Use of Chemicals Cause Soil Contamination and Nutritional Stress. *Soil Contamination - Threats and Sustainable Solutions*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.94593>
- Bist, V., Niranjana, A., Ranjan, M., Lehri, A., Seem, K., & Srivastava, S. (2020). Silicon-Solubilizing Media and Its Implication for Characterization of Bacteria to Mitigate Biotic Stress. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 28. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00028/BIBTEX>

- Bollmann-Giolai, A., Giolai, M., Heavens, D., Macaulay, I., Malone, J., & Clark, M. D. (2020). A low-cost pipeline for soil microbiome profiling. *MicrobiologyOpen*, 9(12), e1133. <https://doi.org/10.1002/MBO3.1133>
- Brodthorn, S., Feenstra, G., Ingels, C., & Campbell, D. (2011). *Sustainable Agriculture | Learn Science at Scitable*. Nature Education Knowledge. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/sustainable-agriculture-23562787/>
- Castellanos, G. D. (2015). Agricultura y desarrollo local en Guatemala. *Revista Rupturas*, 5(1), 49-69. <https://doi.org/10.22458/RR.V5I1.714>
- Castro, N., Moreno Alcojor, A., Villadiego, L., & Svampa, M. (2019). *Los monocultivos que conquistaron el mundo : impactos socioambientales de la caña de azúcar, la palma aceitera y la soja*. [https://www.akal.com/libro/los-monocultivos-que-conquistaron-el-mundo\\_50902/](https://www.akal.com/libro/los-monocultivos-que-conquistaron-el-mundo_50902/)
- CENGICAÑA. (s. f.). *Boletines CAÑAMIP CENGICAÑA Boletines CAÑAMIP Boletines Manejo Integrado de Plagas CENGICAÑA CONTENIDO*.
- CENGICAÑA. (2014). *El Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala* (M. Melgar, A. Meneses, H. Orozco, O. Pérez, & R. Espinosa, Eds.). Artemis Edinter. <https://cengicana.org/files/20170103101309141.pdf>
- CENGICAÑA (Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar). (2017). *Guía de Buenas Prácticas Agrícolas en Caña de Azúcar*. <https://cengicana.org/files/20170425171748989.pdf>
- Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) - UVG. (s. f.). Recuperado 10 de enero de 2023, de <https://www.uvg.edu.gt/investigacion/ceb/>
- Chandran, H., Meena, M., & Swapnil, P. (2021). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as a Green Alternative for Sustainable Agriculture. *Sustainability 2021*, Vol. 13, Page 10986, 13(19), 10986. <https://doi.org/10.3390/SU131910986>
- Chaudhary, D. K., Khulan, A., & Kim, J. (2019). Development of a novel cultivation technique for uncultured soil bacteria. *Scientific Reports 2019* 9:1, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43182-x>
- Chen, Q. L., Ding, J., Zhu, Y. G., He, J. Z., & Hu, H. W. (2020). Soil bacterial taxonomic diversity is critical to maintaining the plant productivity. *Environment International*, 140, 105766. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.105766>
- Chen, Q., & Liu, S. (2019). Identification and Characterization of the Phosphate-Solubilizing Bacterium *Pantoea* sp. S32 in Reclamation Soil in Shanxi, China. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2171. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02171/BIBTEX>
- Cho, B.-K., Chaudhry, V., Finley, S. J., Lee, N., Basu, A., Kalam, S., Ahmad, I., Sayyed, R. Z., Ali El-Enshasy, H., Joe Dailin, D., & Luh Suriani, N. (2020). *Recent Understanding of Soil Acidobacteria and Their Ecological Significance: A Critical Review*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580024>
- Chopra, R. S., Chopra, C., & Sharma, N. R. (2020). Metagenomics: Techniques, Applications, Challenges and Opportunities. En *Metagenomics: Techniques, Applications, Challenges and Opportunities*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-6529-8>
- Christensen, H. (2018). *Introduction to Bioinformatics in Microbiology* (H. Christensen, Ed.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-99280-8>
- Clutter, C. (2021, mayo 13). *Unearthing the Soil Microbiome, Climate Change, Carbon Storage Nexus*. <https://asm.org/Articles/2021/May/Unearthing-the-Soil-Microbiome,-Climate-Change,-Ca>

- Coban, O., de Deyn, G. B., & van der Ploeg, M. (2022). Soil microbiota as game-changers in restoration of degraded lands. *Science (New York, N.Y.)*, 375(6584). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABE0725>
- Conradie, T. A., & Jacobs, K. (2021). Distribution patterns of Acidobacteriota in different fynbos soils. *PLOS ONE*, 16(3), e0248913. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0248913>
- Council, N. R. (2007). The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet. *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet*, 1-158. <https://doi.org/10.17226/11902>
- Cruz, D., Cisneros, R., Benítez, Á., Zúñiga-Sarango, W., Peña, J., Fernández, H., & Jaramillo, A. (2021). Gram-Negative Bacteria from Organic and Conventional Agriculture in the Hydrographic Basin of Loja: Quality or Pathogen Reservoir? *Agronomy 2021, Vol. 11, Page 2362*, 11(11), 2362. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY11112362>
- Cruz, J. A., Tubana, B. S., Fultz, L. M., Dalen, M. S., & Ham, J. H. (2022). Identification and profiling of silicate-solubilizing bacteria for plant growth-promoting traits and rhizosphere competence. *Rhizosphere*, 23, 100566. <https://doi.org/10.1016/J.RHISPH.2022.100566>
- Cunha, C. P., Roberto, G. G., Vicentini, R., Lembke, C. G., Souza, G. M., Ribeiro, R. v., Machado, E. C., Lagôa, A. M. M. A., & Menossi, M. (2017). Ethylene-induced transcriptional and hormonal responses at the onset of sugarcane ripening. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1-18. <https://doi.org/10.1038/srep43364>
- Dai, Z., Guo, X., Yin, H., Liang, Y., Cong, J., & Liu, X. (2014). Identification of Nitrogen-Fixing Genes and Gene Clusters from Metagenomic Library of Acid Mine Drainage. *PLoS ONE*, 9(2), 87976. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0087976>
- Das, S. K., & Varma, A. (2010). *Role of Enzymes in Maintaining Soil Health*. 25-42. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-14225-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-14225-3_2)
- de Chaves, M. G., Venturini, A. M., Merloti, L. F., Barros, D. J., Rossetto, R., Kuramae, E. E., Tsai, S. M., & Navarrete, A. A. (2021). Combined Use of Vinasse and Nitrogen as Fertilizers Affects Nitrification, Ammonification, and Denitrification by Prokaryotes. *Frontiers in Soil Science*, 1, 746745. <https://doi.org/10.3389/FSOIL.2021.746745/BIBTEX>
- De Souza, J. T., & Raaijmakers, J. M. (2003). Polymorphisms within the prnD and pltC genes from pyrrolnitrin and pyoluteorin-producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(1), 21-34. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00414-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00414-2)
- de Souza, R., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2015a). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- de Souza, R., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2015b). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Di, Y. ning, Kui, L., Singh, P., Liu, L. feng, Xie, L. yan, He, L. lian, & Li, F. sheng. (2022). Identification and Characterization of *Bacillus subtilis* B9: A Diazotrophic Plant Growth-Promoting Endophytic Bacterium Isolated from Sugarcane Root. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-18. <https://doi.org/10.1007/S00344-022-10653-X/FIGURES/5>
- Díaz-Rodríguez, A. M., Salcedo Gastelum, L. A., Félix Pablos, C. M., Parra-Cota, F. I., Santoyo, G., Puente, M. L., Bhattacharya, D., Mukherjee, J., & de los Santos-Villalobos, S. (2021). The Current and Future Role of Microbial Culture Collections in Food Security Worldwide. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 291. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2020.614739/BIBTEX>

- dos Santos, R. M., Diaz, P. A. E., Lobo, L. L. B., & Rigobelo, E. C. (2020). Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Maize and Sugarcane: Characteristics and Applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 136. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2020.00136/BIBTEX>
- Dubey, R. K., Tripathi, V., Prabha, R., Chaurasia, R., Singh, D. P., Rao, Ch. S., El-Keblawy, A., & Abhilash, P. C. (2020). *Methods for Exploring Soil Microbial Diversity*. 23-32. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-15516-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-15516-2_3)
- Dyderski, M. K., & Jagodziński, A. M. (2021). Impacts of invasive trees on alpha and beta diversity of temperate forest understories. *Biological Invasions*, 23(1), 235-252. <https://doi.org/10.1007/S10530-020-02367-6/TABLES/5>
- Edison, L. K., & Pradeep, N. S. (2020). Functional screening of  $\beta$ -Glucanase Producing Actinomycetes Strains from Western Ghats ecosystems of Kerala, India. *bioRxiv*, 2020.04.11.036731. <https://doi.org/10.1101/2020.04.11.036731>
- Emami, T., Mirzaei Heydari, M., Maleki, A., & Bazgir, M. (2019). Effect of native growth promoting bacteria and commercial biofertilizers on growth and yield of wheat (*Triticum aestivum*) and barley (*Hordeum vulgare*) under salinity stress conditions. *Cellular and Molecular Biology*, 65(6), 22-27. <https://doi.org/10.14715/CMB/2019.65.6.5>
- Enggrob, K. L., Larsen, T., Peixoto, L., & Rasmussen, J. (2020). Gram-positive bacteria control the rapid anabolism of protein-sized soil organic nitrogen compounds questioning the present paradigm. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72696-y>
- Espinoza, G., Hernández, C., & Morales, J. (2013). *Manual de Malezas y Catálogo de Herbicidas Para el Cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala*.
- Espinoza, G., Ramos, F., Arévalo, M., Santon, R., Velásquez, A., & de León Flores, L. M. (2021). *Manejo de la floración de caña de azúcar con etileno y bioestimulantes en la variedad CGO2-163*. <https://cengicana.org/files/20210730120045473.pdf>
- Esquivel-Cote, R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-Ortega, R., & Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(3), 251-258. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802013000300010&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000300010&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Estrategia - Ingenio Magdalena*. (s. f.). Recuperado 10 de enero de 2023, de <https://www.imsa.com.gt/estrategia/>
- Etesami, H., Emami, S., & Alikhani, H. A. (2017). Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects-a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(4), 897-911.
- eurostat. (s. f.). *Glossary:Fertiliser - Statistics Explained*. Recuperado 19 de enero de 2023, de <https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Glossary:Fertiliser>
- FAO. (s. f.-a). *Conservación de suelos y aguas en América Latina y el Caribe | Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Recuperado 14 de enero de 2023, de <https://www.fao.org/americas/prioridades/suelo-agua/es/>
- FAO. (s. f.-b). *Conservación de suelos y aguas en América Latina y el Caribe | Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Recuperado 20 de enero de 2023, de <https://www.fao.org/americas/prioridades/suelo-agua/es/>

- FAO. (2022). *Latin American and Caribbean countries shared methods and practices to address fertilizer shortages resulting from the war in Ukraine* | FAO. <https://www.fao.org/americas/noticias/ver/en/c/1538915/>
- Fernández-Roca Baquero, M. P. (2018). *Implantación de un modelo de agricultura familiar en el Centro Kulbaalib Xe Chulub, Nebaj, Guatemala*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/109101>
- Ferretti, G., Galamini, G., Deltedesco, E., Gorfer, M., Fritz, J., Faccini, B., Mentler, A., Zechmeister-Boltenstern, S., Coltorti, M., & Keiblinger, K. M. (2021). Gross Ammonification and Nitrification Rates in Soil Amended with Natural and NH<sub>4</sub>-Enriched Chabazite Zeolite and Nitrification Inhibitor DMPP. *Applied Sciences* 2021, Vol. 11, Page 2605, 11(6), 2605. <https://doi.org/10.3390/APP11062605>
- Flieder, M., Buongiorno, J., Herbold, C. W., Hausmann, B., Rattei, T., Lloyd, K. G., Loy, A., & Wasmund, K. (2021). Novel taxa of Acidobacteriota implicated in seafloor sulfur cycling. *The ISME Journal* 2021 15:11, 15(11), 3159-3180. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00992-0>
- Fontana, V., Guariento, E., Hilpold, A., Niedrist, G., Steinwandter, M., Spitale, D., Nascimbene, J., Tappeiner, U., & Seeber, J. (2020). Species richness and beta diversity patterns of multiple taxa along an elevational gradient in pastured grasslands in the European Alps. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69569-9>
- Fu, S. F., Wei, J. Y., Chen, H. W., Liu, Y. Y., Lu, H. Y., & Chou, J. Y. (2015). Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signaling & Behavior*, 10(8). <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1048052>
- Fundazúcar - Azúcar de Guatemala. (s. f.-a). Recuperado 14 de mayo de 2023, de <https://www.fundazucar.org/azucar-de-guatemala>
- Fundazúcar - Azúcar de Guatemala. (s. f.-b). Recuperado 10 de enero de 2023, de <https://fundazucar.org/azucar-de-guatemala>
- Furtak, K., Gajda, A. M., Furtak, K., & Gajda, A. M. (2018). Activity and Variety of Soil Microorganisms Depending on the Diversity of the Soil Tillage System. *Sustainability of Agroecosystems*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.72966>
- Gao, X., Wu, Z., Liu, R., Wu, J., Zeng, Q., & Qi, Y. (2019). Rhizosphere Bacterial Community Characteristics over Different Years of Sugarcane Ratooning in Consecutive Monoculture. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4943150>
- Gerardo Espinoza Véliz, J., Ramos, F., Corado, M., Ortiz, A., Sarceño, F., Santos, R., Arévalo, M., Montepeque, R., Javier, A., Sánchez, L., Carbajal, W., & Fajardo, P. (2021). *INCREMENTO DE LA PRODUCTIVIDAD DE AZÚCAR CON EL USO DE PRE-MADURANTE + MADURACIÓN DEL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR EN EL*.
- Gorndon, S., & Weber, R. (1950). Colorimetric estimation of indole-3-acetic acid. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 192-195. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90514-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90514-5)
- Goulding, K. W. T. (2016). Soil acidification and the importance of liming agricultural soils with particular reference to the United Kingdom. *Soil Use and Management*, 32(3), 390-399. <https://doi.org/10.1111/SUM.12270>
- Guliyev, V., Tanunchai, B., Noll, M., Buscot, F., Purahong, W., & Blagodatskaya, E. (2022). Links among Microbial Communities, Soil Properties and Functions: Are Fungi the Sole Players in Decomposition of Bio-Based and Biodegradable Plastic? *Polymers*, 14(14). <https://doi.org/10.3390/POLYM14142801/S1>
- Gupta, A. K. (2004). Origin of agriculture and domestication of plants and animals linked to early Holocene climate amelioration. *REVIEW ARTICLES CURRENT SCIENCE*, 87(1).

- Gupta, N., Vats, S., & Bhargava, P. (2018). Sustainable agriculture: Role of metagenomics and metabolomics in exploring the soil microbiota. *In Silico Approach for Sustainable Agriculture*, 183-199. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0347-0\\_11/COVER](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0347-0_11/COVER)
- Gupta, S., Mortensen, M. S., Schjørring, S., Trivedi, U., Vestergaard, G., Stokholm, J., Bisgaard, H., Krogfelt, K. A., & Sørensen, S. J. (2019). Amplicon sequencing provides more accurate microbiome information in healthy children compared to culturing. *Communications Biology* 2019 2:1, 2(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0540-1>
- Haj-Amor, Z., Araya, T., Kim, D. G., Bouri, S., Lee, J., Ghiloufi, W., Yang, Y., Kang, H., Jhariya, M. K., Banerjee, A., & Lal, R. (2022). Soil salinity and its associated effects on soil microorganisms, greenhouse gas emissions, crop yield, biodiversity and desertification: A review. *Science of The Total Environment*, 843, 156946. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.156946>
- Ilesanmi, O. I., Adekunle, A. E., Omolaiye, J. A., Olorode, E. M., & Ogunkanmi, A. L. (2020a). Isolation, optimization and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil. *Scientific African*, 8, e00279. <https://doi.org/10.1016/J.SCIAF.2020.E00279>
- Ilesanmi, O. I., Adekunle, A. E., Omolaiye, J. A., Olorode, E. M., & Ogunkanmi, A. L. (2020b). Isolation, optimization and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil. *Scientific African*, 8, e00279. <https://doi.org/10.1016/J.SCIAF.2020.E00279>
- Illumina. (2011). *Quality Scores for Next-Generation Sequencing*. [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/)
- INE. (2020). *ENCUESTA NACIONAL AGROPECUARIA*.
- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1617. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.01617/BIBTEX>
- Jha, Y. (2022). *Applications of Microbial Beta-Glucanase in Crop Improvement Under Biotic and Abiotic Stress*. 99-116. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-6466-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-19-6466-4_7)
- Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>
- Kang, S. M., Waqas, M., Shahzad, R., You, Y. H., Asaf, S., Khan, M. A., Lee, K. E., Joo, G. J., Kim, S. J., & Lee, I. J. (2017). Isolation and characterization of a novel silicate-solubilizing bacterial strain Burkholderia eburnea CS4-2 that promotes growth of japonica rice (*Oryza sativa* L. cv. Dongjin). <http://dx.doi.org/10.1080/00380768.2017.1314829>, 63(3), 233-241. <https://doi.org/10.1080/00380768.2017.1314829>
- Karlen, D. L., & Rice, C. W. (2015). Soil Degradation: Will Humankind Ever Learn? *Sustainability* 2015, Vol. 7, Pages 12490-12501, 7(9), 12490-12501. <https://doi.org/10.3390/SU70912490>
- Kaushik, P., Sandhu, O. S., Brar, N. S., Kumar, V., Malhi, G. S., Kesh, H., Saini, I., Kaushik, P., Sandhu, O. S., Brar, N. S., Kumar, V., Malhi, G. S., Kesh, H., & Saini, I. (2020). Soil Metagenomics: Prospects and Challenges. *Mycorrhizal Fungi - Utilization in Agriculture and Industry*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.93306>
- Khan, M. N., Mobin, M., Abbas, Z. K., & Alamri, S. A. (2018). Fertilizers and Their Contaminants in Soils, Surface and Groundwater. *Encyclopedia of the Anthropocene*, 1-5, 225-240. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809665-9.09888-8>

- Konopiński, M. K. (2020). Shannon diversity index: A call to replace the original Shannon's formula with unbiased estimator in the population genetics studies. *PeerJ*, 2020(6). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.9391/SUPP-7>
- Kumar, A., Singh, S., Gaurav, A. K., Srivastava, S., & Verma, J. P. (2020). Plant Growth-Promoting Bacteria: Biological Tools for the Mitigation of Salinity Stress in Plants. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1216. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01216/BIBTEX>
- Kumar, M., Brar, A., Yadav, M., Chawade, A., Vivekanand, V., & Pareek, N. (2018). Chitinases—Potential Candidates for Enhanced Plant Resistance towards Fungal Pathogens. *Agriculture* 2018, Vol. 8, Page 88, 8(7), 88. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE8070088>
- Kumari, P., Pathak, B., & Singh, J. K. (2020). Potential contribution of multifunctional mangrove resources and its conservation. *Biotechnological Utilization of Mangrove Resources*, 1-26. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819532-1.00001-9>
- Lee, K. E., Adhikari, A., Kang, S. M., You, Y. H., Joo, G. J., Kim, J. H., Kim, S. J., & Lee, I. J. (2019). Isolation and Characterization of the High Silicate and Phosphate Solubilizing Novel Strain *Enterobacter ludwigii* GAK2 that Promotes Growth in Rice Plants. *Agronomy* 2019, Vol. 9, Page 144, 9(3), 144. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY9030144>
- Lehman, R. M., Cambardella, C. A., Stott, D. E., Acosta-Martinez, V., Manter, D. K., Buyer, J. S., Maul, J. E., Smith, J. L., Collins, H. P., Halvorson, J. J., Kremer, R. J., Lundgren, J. G., Ducey, T. F., Jin, V. L., & Karlen, D. L. (2015). Understanding and Enhancing Soil Biological Health: The Solution for Reversing Soil Degradation. *Sustainability* 2015, Vol. 7, Pages 988-1027, 7(1), 988-1027. <https://doi.org/10.3390/SU7010988>
- Li, H. B., Singh, R. K., Singh, P., Song, Q. Q., Xing, Y. X., Yang, L. T., & Li, Y. R. (2017). Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL), 1268. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01268/BIBTEX>
- Li, Y., Fang, F., Wei, J., Wu, X., Cui, R., Li, G., Zheng, F., & Tan, D. (2019). Humic Acid Fertilizer Improved Soil Properties and Soil Microbial Diversity of Continuous Cropping Peanut: A Three-Year Experiment. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48620-4>
- Liberato, M. V., Prates, E. T., Gonçalves, T. A., Bernardes, A., Vilela, N., Fattori, J., Ematsu, G. C., Chinaglia, M., Gomes, E. R. M., Figueira, A. C. M., Damasio, A., Polikarpov, I., Skaf, M. S., & Squina, F. M. (2021). Insights into the dual cleavage activity of the GH16 laminarinase enzyme class on  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,4 glycosidic bonds. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100385. <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.100385>
- Liu, J., Cui, X., Liu, Z., Guo, Z., Yu, Z., Yao, Q., Sui, Y., Jin, J., Liu, X., & Wang, G. (2019). The diversity and geographic distribution of cultivable bacillus-like bacteria across black soils of northeast China. *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN), 1424. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01424/BIBTEX>
- Liu, Y., Gao, T., Wang, X., Fu, J., Zuo, M., Yang, Y., Yin, Z., Wang, Z., Tai, X., & Chang, G. (2022). Effects of heavy metals on bacterial community surrounding Bijishan mining area located in northwest China. *Open Life Sciences*, 17(1), 40-54. <https://doi.org/10.1515/biol-2022-0008>
- Lladó, S., López-Mondéjar, R., & Baldrian, P. (2017). Forest Soil Bacteria: Diversity, Involvement in Ecosystem Processes, and Response to Global Change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 81(2). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00063-16>

- Lombard, N., Prestat, E., van Elsas, J. D., & Simonet, P. (2011). Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics. *FEMS Microbiology Ecology*, 78(1), 31-49. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2011.01140.X>
- López-Otín, C., & Bond, J. S. (2008). Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30433. <https://doi.org/10.1074/JBC.R800035200>
- Ma, Y., Jakab, G., Glick, B. R., Jha, P. N., Singh, R. P., Shelke, G. M., & Kumar, A. (2015). Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to «stress ethylene» produced in plants Biochemistry and genetics of ACC deaminase enzyme. *Frontiers in Microbiology / www.frontiersin.org*, 6, 937. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00937>
- Magarey, R. C. (1999). Reduced productivity in long term monoculture: Where are we placed? *Australasian Plant Pathology*, 28(1), 11-20. <https://doi.org/10.1071/AP99002/METRICS>
- Mahdi, I., Fahsi, N., Hijri, M., & Sobeh, M. (2022). Antibiotic resistance in plant growth promoting bacteria: A comprehensive review and future perspectives to mitigate potential gene invasion risks. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.999988/FULL>
- MARIN, F., MORENO, M. A., FARIÁS, A., VILLEGAS, F., RODRIGUEZ, B. J., & VAN, D. B. M. (2018). *Modelación de la caña de azúcar en Latinoamérica: Estado del arte y base de datos para parametrización*. <https://doi.org/10.2760/247719>
- Martínez, J. D., Martínez Barón, D., Leal, M., & Castellanos, A. (2020). *Actualización del Estado del Arte en Cambio Climático, Agricultura y Seguridad Alimentaria en Guatemala 2020*. <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/111450>
- Mehjin A M, A.-A., Rawaa M, H., Ibtiha A, K., & Abdullah, T. (2019). Effect of pesticides on soil microorganisms. *Journal of Physics: Conference Series*. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1294/7/072007>
- Mehnaz, S. (2011). Plant Growth-Promoting Bacteria Associated with Sugarcane. *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*, 165-187. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_7)
- Mercado, L., Ospina, A., & Suchini, J. G. (2019). *Reporte Anual Monitoreo 2018: Territorio Sostenible Adaptado al Clima de Olopa, Guatemala*. <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/107350>
- Mhete, M., Eze, P. N., Rahube, T. O., & Akinyemi, F. O. (2020). Soil properties influence bacterial abundance and diversity under different land-use regimes in semi-arid environments. *Scientific African*, 7, e00246. <https://doi.org/10.1016/J.SCIAF.2019.E00246>
- Mise, K., Masuda, Y., Senoo, K., & Itoh, H. (2021). *Undervalued Pseudo-nifH Sequences in Public Databases Distort Metagenomic Insights into Biological Nitrogen Fixers*. <https://journals.asm.org/journal/msphere>
- Morales, J., & Espinoza, G. (2008). *CHEMICAL INDUCTION OF RIPENING IN SUGARCANE (Saccharum spp) IN GUATEMALA*.
- Muangthong, A., Youpensuk, S., & Rerkasem, B. (2015). Isolation and Characterisation of Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria in Sugarcane. *Tropical Life Sciences Research*, 26(1), 41-51.
- Mujakić, I., Piwosz, K., & Koblížek, M. (2022). Phylum Gemmatimonadota and Its Role in the Environment. *Microorganisms*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10010151/S1>

- National Geographic. (s. f.). *The Development of Agriculture* | National Geographic Society. Recuperado 14 de enero de 2023, de <https://education.nationalgeographic.org/resource/development-agriculture/12th-grade/>
- Nesme, J., Achouak, W., Agathos, S. N., Bailey, M., Baldrian, P., Brunel, D., Frostegård, Å., Heulin, T., Jansson, J. K., Jurkevitch, E., Kruus, K. L., Kowalchuk, G. A., Lagares, A., Lappin-Scott, H. M., Lemanceau, P., le Paslier, D., Mandic-Mulec, I., Murrell, J. C., Myrold, D. D., ... Simonet, P. (2016). Back to the future of soil metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 73. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00073/BIBTEX>
- Ngalimat, M. S., Hata, E. M., Zulperi, D., Ismail, S. I., Ismail, M. R., Zainudin, N. A. I. M., Saidi, N. B., & Yusof, M. T. (2021). Plant Growth-Promoting Bacteria as an Emerging Tool to Manage Bacterial Rice Pathogens. *Microorganisms 2021*, Vol. 9, Page 682, 9(4), 682. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9040682>
- Nwachukwu, B. C., & Babalola, O. O. (2022). Metagenomics: A Tool for Exploring Key Microbiome With the Potentials for Improving Sustainable Agriculture. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 206. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2022.886987/BIBTEX>
- NY State University. (s. f.). *Learn More About the Plant Soil Microbiome :: Plant Soil Microbial Community Consortium*. Recuperado 14 de enero de 2023, de <https://cifn.ncsu.edu/plant-soil-microbial-community-consortium/about/background/>
- ODEPA. (2013). *Entre los factores que influyen se encuentran esta la adición de fertilizantes químicos y materiales orgánicos que mejoran los procesos biológicos de la descomposición y la mineralización de la materia orgánica del suelo*.
- OEC. (s. f.). *Fertilizers in Russia* | OEC - The Observatory of Economic Complexity. Recuperado 20 de enero de 2023, de <https://oec.world/en/profile/bilateral-product/fertilizers/reporter/rus>
- Ohyama, T., Momose, A., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Sato, T., Nakanishi, Y., Jr., C. A. A., Soraya Ruamsungsri, Ando, S., Ohyama, T., Momose, A., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Sato, T., Nakanishi, Y., Jr., C. A. A., Soraya Ruamsungsri, & Ando, S. (2014). Nitrogen Fixation in Sugarcane. *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*. <https://doi.org/10.5772/56993>
- Onofre-Lemus, J., Hernández-Lucas, I., Girard, L., & Caballero-Mellado, J. (2009). ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) Deaminase Activity, a Widespread Trait in Burkholderia Species, and Its Growth-Promoting Effect on Tomato Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), 6581. <https://doi.org/10.1128/AEM.01240-09>
- Orgiazzi, A., & Panagos, P. (2018). Soil biodiversity and soil erosion: It is time to get married. *Global Ecology and Biogeography*, 27(10), 1155-1167. <https://doi.org/10.1111/GEB.12782>
- Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., & Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic Pseudomonas isolates. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUL), 148361. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00745/BIBTEX>
- Ovalle, W., & Viswanathan, R. (2020). Sustaining Sugarcane Production in Guatemala and Nicaragua Through Efficient Disease Management Approaches. *Sugar Tech*, 22(3), 361-366. <https://doi.org/10.1007/S12355-020-00801-6/METRICS>
- Padilla, F. M., Yousuf, F., & Mahmud, S. (2022). Review on Detection Methods of Nitrogen Species in Air, Soil and Water. *Nitrogen 2022*, Vol. 3, Pages 101-117, 3(1), 101-117. <https://doi.org/10.3390/NITROGEN3010008>

- Pandey, D., Kehri, H. K., Zoomi, I., Singh, U., Chaudhri, K. L., & Akhtar, O. (2020). *Potassium Solubilizing Microbes: Diversity, Ecological Significances and Biotechnological Applications*. 263-286. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-38453-1\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38453-1_9)
- Park, S.-C., & Won, S. (2018). Evaluation of 16S rRNA Databases for Taxonomic Assignments Using Mock Community. *Genomics & informatics*, 16(4), e24. <https://doi.org/10.5808/GI.2018.16.4.E24>
- Pawar, S., Chaudhari, A., Prabha, R., Shukla, R., & Singh, D. P. (2019). Microbial Pyrrolnitrin: Natural Metabolite with Immense Practical Utility. *Biomolecules* 2019, Vol. 9, Page 443, 9(9), 443. <https://doi.org/10.3390/BIOM9090443>
- Pham, V. H. T., & Kim, J. (2012). Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in Biotechnology*, 30(9), 475-484. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.05.007>
- Pi, H. W., Lin, J. J., Chen, C. A., Wang, P. H., Chiang, Y. R., Huang, C. C., Young, C. C., & Li, W. H. (2022). Origin and Evolution of Nitrogen Fixation in Prokaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 39(9). <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAC181>
- Piscitelli, M. (2015). *Degradación de suelos / UNICEN*. <https://www.unicen.edu.ar/content/degradaci%C3%B3n-de-suelos>
- Pishch, I. v., Maslennikova, G. N., Podbolotov, K. B., Karizna, Y. A., & Belyakovich, I. v. (2011). Silica based pigments. *Glass and Ceramics (English translation of Steklo i Keramika)*, 68(3-4), 71-75. <https://doi.org/10.1007/S10717-011-9324-X/METRICS>
- Poria, V., Dębiec-Andrzejewska, K., Fiodor, A., Lyzohub, M., Ajjjah, 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. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.999866>
- Prashar, P., & Shah, S. (2016). *Impact of Fertilizers and Pesticides on Soil Microflora in Agriculture*. 331-361. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-26777-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-26777-7_8)
- Prehn-Kristensen, A., Zimmermann, A., Tittmann, L., Lieb, W., Schreiber, S., Baving, L., & Fischer, A. (2018). Reduced microbiome alpha diversity in young patients with ADHD. *PLOS ONE*, 13(7), e0200728. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0200728>
- Prober, S. M., Leff, J. W., Bates, S. T., Borer, E. T., Firn, J., Harpole, W. S., Lind, E. M., Seabloom, E. W., Adler, P. B., Bakker, J. D., Cleland, E. E., Decrappeo, N. M., Delorenze, E., Hagenah, N., Hautier, Y., Hofmockel, K. S., Kirkman, K. P., Knops, J. M. H., la Pierre, K. J., ... Fierer, N. (2015). Plant diversity predicts beta but not alpha diversity of soil microbes across grasslands worldwide. *Ecology Letters*, 18(1), 85-95. <https://doi.org/10.1111/ELE.12381>
- Putra, R. P., Ranomahera, M. R. R., Rizaludin, M. S., Supriyanto, R., & Dewi, V. A. K. (2020). Short communication: Investigating environmental impacts of long-term monoculture of sugarcane farming in Indonesia through dpsir framework. *Biodiversitas*, 21(10), 4945-4958. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d211061>
- Qiu, L., Zhang, Q., Zhu, H., Reich, P. B., Banerjee, S., van der Heijden, M. G. A., Sadowsky, M. J., Ishii, S., Jia, X., Shao, M., Liu, B., Jiao, H., Li, H., & Wei, X. (2021). Erosion reduces soil microbial diversity, network complexity and multifunctionality. *The ISME Journal* 2021 15:8, 15(8), 2474-2489. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00913-1>
- Quiroz, D., Kuepper, B., Rijk, G., & Achterberg, E. (2021). *Principales actores, mecanismos de mercado, cuestiones laborales y oportunidades*. [www.profundo.nl](http://www.profundo.nl)
- Ragoobur, D., Huerta-Lwanga, E., & Somaroo, G. D. (2021). Microplastics in agricultural soils, wastewater effluents and sewage sludge in Mauritius. *Science of The Total Environment*, 798, 149326. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.149326>

- Ramakrishna, W., Yadav, R., & Li, K. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. *Applied Soil Ecology*, *138*, 10-18. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2019.02.019>
- Raturi, G., Sharma, Y., Rana, V., Thakral, V., Myaka, B., Salvi, P., Singh, M., Dhar, H., & Deshmukh, R. (2021). Exploration of silicate solubilizing bacteria for sustainable agriculture and silicon biogeochemical cycle. *Plant Physiology and Biochemistry*, *166*, 827-838. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2021.06.039>
- Rauf, M., Awais, M., Ud-Din, A., Ali, K., Gul, H., Rahman, M. M., Hamayun, M., & Arif, M. (2021). Molecular Mechanisms of the 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid (ACC) Deaminase Producing *Trichoderma asperellum* MAP1 in Enhancing Wheat Tolerance to Waterlogging Stress. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 2213. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.614971/BIBTEX>
- Ravanbakhsh, M., Sasidharan, R., Voesenek, L. A. C. J., Kowalchuk, G. A., & Jousset, A. (2017). ACC deaminase-producing rhizosphere bacteria modulate plant responses to flooding. *Journal of Ecology*, *105*(4), 979-986. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12721>
- Ren, B., Hu, Y., Chen, B., Zhang, Y., Thiele, J., Shi, R., Liu, M., & Bu, R. (2018). Soil pH and plant diversity shape soil bacterial community structure in the active layer across the latitudinal gradients in continuous permafrost region of Northeastern China. *Scientific Reports 2018 8:1*, *8*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24040-8>
- Rilling, J. I., Acuña, J. J., Sadowsky, M. J., & Jorquera, M. A. (2018a). Putative nitrogen-fixing bacteria associated with the rhizosphere and root endosphere of wheat plants grown in an andisol from southern Chile. *Frontiers in Microbiology*, *9*(NOV), 2710. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02710/BIBTEX>
- Rilling, J. I., Acuña, J. J., Sadowsky, M. J., & Jorquera, M. A. (2018b). Putative nitrogen-fixing bacteria associated with the rhizosphere and root endosphere of wheat plants grown in an andisol from southern Chile. *Frontiers in Microbiology*, *9*(NOV), 2710. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02710/BIBTEX>
- Riyaz, M., Shah, R. A., Sivasankaran, K., Riyaz, M., Shah, R. A., & Sivasankaran, K. (2021). Pesticide Residues: Impacts on Fauna and the Environment. *Biodegradation Technology of Organic and Inorganic Pollutants*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.98379>
- Rodionov, D. A., Dubchak, I. L., Arkin, A. P., Alm, E. J., & Gelfand, M. S. (2005). Dissimilatory Metabolism of Nitrogen Oxides in Bacteria: Comparative Reconstruction of Transcriptional Networks. *PLOS Computational Biology*, *1*(5), e55. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.0010055>
- Ross-Ibarra, J., Morrell, P. L., & Gaut, B. S. (2007). Plant domestication, a unique opportunity to identify the genetic basis of adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(SUPPL. 1), 8641-8648. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0700643104/ASSET/3D9F628F-886A-4A93-96DB-30316A4E0AAA/ASSETS/GRAPHIC/ZPQ0110756770003.JPEG>
- Sabale, S. N., Suryawanshi, P. P., P.U., K., Sabale, S. N., Suryawanshi, P. P., & P.U., K. (2019). Soil Metagenomics: Concepts and Applications. *Metagenomics - Basics, Methods and Applications*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.88958>
- Salaheen, S., & Biswas, D. (2019). Organic Farming Practices: Integrated Culture Versus Monoculture. *Safety and Practice for Organic Food*, 23-32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812060-6.00002-7>

- Santos, L. F., & Olivares, F. L. (2021). Plant microbiome structure and benefits for sustainable agriculture. *Current Plant Biology*, 26. <https://doi.org/10.1016/J.CPB.2021.100198>
- Sathyanarayanan, A., Manda, S., Poojary, M., & Nagaraj, S. H. (2019). Exome Sequencing Data Analysis. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*, 1-3, 164-175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20094-0>
- Sattar, A., Naveed, M., Ali, M., Zahir, Z. A., Nadeem, S. M., Yaseen, M., Meena, V. S., Farooq, M., Singh, R., Rahman, M., & Meena, H. N. (2019). Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review. *Applied Soil Ecology*, 133, 146-159. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2018.09.012>
- Schmidt, M., Corre, M. D., Kim, B., Morley, J., Göbel, L., Sharma, A. S. I., Setriuc, S., & Veldkamp, E. (2021). Nutrient saturation of crop monocultures and agroforestry indicated by nutrient response efficiency. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 119(1), 69-82. <https://doi.org/10.1007/S10705-020-10113-6/TABLES/4>
- Shah, A., Nazari, M., Antar, M., Msimbira, L. A., Naamala, J., Lyu, D., Rabileh, M., Zajonc, J., & Smith, D. L. (2021). PGPR in Agriculture: A Sustainable Approach to Increasing Climate Change Resilience. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 211. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2021.667546/BIBTEX>
- Silva-Parra, A., Mogollón-Ortiz, Á. M., & Delgado-Huertas, H. (2017). Soil microbiota: Influence of different land use patterns and soil management factors at Villavicencio Oxisol, East Colombia. *Biota Colombiana*, 18(2). <http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/33660>
- Singh, B., Upadhyay, A. K., Al-Tawaha, T. W., Al-Tawaha, A. R., & Sirajuddin, S. N. (2020). Biofertilizer as a tool for soil fertility management in changing climate. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 492(1), 012158. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/492/1/012158>
- Singh, R. K., Singh, P., Li, H. B., Song, Q. Q., Guo, D. J., Solanki, M. K., Verma, K. K., Malviya, M. K., Song, X. P., Lakshmanan, P., Yang, L. T., & Li, Y. R. (2020). Diversity of nitrogen-fixing rhizobacteria associated with sugarcane: A comprehensive study of plant-microbe interactions for growth enhancement in *Saccharum* spp. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1-21. <https://doi.org/10.1186/S12870-020-02400-9/FIGURES/5>
- Singh, S. K., Wu, X., Shao, C., & Zhang, H. (2022). Microbial enhancement of plant nutrient acquisition. *Stress Biology* 2022 2:1, 2(1), 1-14. <https://doi.org/10.1007/S44154-021-00027-W>
- Solanki, M. K., Wang, Z., Wang, F. Y., Li, C. N., Gupta, C. L., Singh, R. K., Malviya, M. K., Singh, P., Yang, L. T., & Li, Y. R. (2020). Assessment of Diazotrophic Proteobacteria in Sugarcane Rhizosphere When Intercropped With Legumes (Peanut and Soybean) in the Field. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1814. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01814/BIBTEX>
- Solano Divas, E. E. (s. f.). *Resumen - Monitoreo de la contaminación por pesticidas en hortalizas para consumo en fresco en la ciudad capital*. Recuperado 14 de enero de 2023, de <https://digi.usac.edu.gt/bvirtual/resumenes2010/inf1042.html>
- Sousa, A. (2020). *16S rRNA gene amplicon - upstream data analysis*. [https://igcbioinformatics.github.io/biomesinycourse/pages/dada2/Biodata.ptCrashCourses.html#\(4\)\\_merge\\_denoised\\_forward\\_and\\_reverse\\_reads](https://igcbioinformatics.github.io/biomesinycourse/pages/dada2/Biodata.ptCrashCourses.html#(4)_merge_denoised_forward_and_reverse_reads)
- Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., Friberg, H., Gil, J. F., Jensen, D. F., Jonsson, M., Karlsson, M., Khalil, S., Ninkovic, V., Rehmann, G., Vetukuri, R. R., & Viketoft, M. (2021). When is it biological control? A framework of

- definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, 94(3), 665-676. <https://doi.org/10.1007/S10340-021-01354-7/FIGURES/2>
- Suberu, Y., Akande, I., Samuel, T., Lawal, A., & Olaniran, A. (2019). Optimization of protease production in indigenous *Bacillus* species isolated from soil samples in Lagos, Nigeria using response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101011. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2019.01.049>
- Sun, F., Ou, Q., Wang, N., Guo, Z. xuan, Ou, Y., Li, N., & Peng, C. (2020). Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from *Mikania micrantha* rhizospheric soil and their effect on *M. micrantha* plants. *Global Ecology and Conservation*, 23, e01141. <https://doi.org/10.1016/J.GECCO.2020.E01141>
- Tahat, M. M., Alananbeh, K. M., Othman, Y. A., & Leskovar, D. I. (2020). Soil Health and Sustainable Agriculture. *Sustainability 2020, Vol. 12, Page 4859, 12(12)*, 4859. <https://doi.org/10.3390/SU12124859>
- Tan, W., Wang, J., Bai, W., Qi, J., & Chen, W. (2020). Soil bacterial diversity correlates with precipitation and soil pH in long-term maize cropping systems. *Scientific Reports 2020 10:1, 10(1)*, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62919-7>
- Tate, R. L. (2020). *Soil Microbiology*. John Wiley & Sons, Incorporated.
- Tayyab, M., Islam, W., Noman, A., Pang, Z., Li, S., Lin, S., Lin Wenxiong, ., Zhang Hua, ., Wenxiong, L., & Hua, Z. (2022). *Sugarcane cultivars manipulate rhizosphere bacterial communities' structure and composition of agriculturally important keystone taxa. 1, 32*. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03091-1>
- Thermo Fischer Scientific. (2009). *T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers*. [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., & Aronsson, A. C. (2017). Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 8, 49. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.00049/BIBTEX>
- Trivedi, P., Mattupalli, C., Eversole, K., & Leach, J. E. (2021). Enabling sustainable agriculture through understanding and enhancement of microbiomes. *New Phytologist*, 230(6), 2129-2147. <https://doi.org/10.1111/NPH.17319>
- Tzawa, J., Watanabe, K., Yoshida, H., Sato, M., & Homma, Y. (2000). Simple method of detection of the strains of fluorescent *Pseudomonas* spp. producing antibiotics, pyrrolnitrin and phloroglucinol. *Soil Microorganisms*, 54(1).
- Ullah, A., Bano, A., & Khan, N. (2021). Climate Change and Salinity Effects on Crops and Chemical Communication Between Plants and Plant Growth-Promoting Microorganisms Under Stress. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 161. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2021.618092>
- Umezawa, K., Kojima, H., Kato, Y., & Fukui, M. (2020). Disproportionation of inorganic sulfur compounds by a novel autotrophic bacterium belonging to Nitrospirota. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(5), 126110. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2020.126110>
- Union of Concerned Scientists. (2017). *What is Sustainable Agriculture? | Union of Concerned Scientists*. <https://www.ucsusa.org/resources/what-sustainable-agriculture>
- University of Minnesota Extension. (2018). *Soil compaction | UMN Extension*. <https://extension.umn.edu/soil-management-and-health/soil-compaction>
- van der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D., & van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11(3), 296-310. <https://doi.org/10.1111/J.1461-0248.2007.01139.X>

- Varmaa, A., & Giri, B. (2020). *Soil Biology*. <http://www.springer.com/series/5138>
- Veliz, E. A., Martínez-Hidalgo, P., & Hirsch, A. M. (2017). Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiology*, 3(3), 689. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2017.3.689>
- Velten, S., Leventon, J., Jager, N., & Newig, J. (2015). What Is Sustainable Agriculture? A Systematic Review. *Sustainability 2015*, Vol. 7, Pages 7833-7865, 7(6), 7833-7865. <https://doi.org/10.3390/SU7067833>
- Venil, C. K., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2013.06.006>
- Vestergaard, G., Schulz, S., Schöler, A., & Schloter, M. (2017). Making big data smart—how to use metagenomics to understand soil quality. *Biology and Fertility of Soils*, 53(5), 479-484. <https://doi.org/10.1007/S00374-017-1191-3/FIGURES/1>
- Villagrán, W. (2022, enero 24). *El azúcar, motor en la economía del país – Diario de Centro América*. <https://dca.gob.gt/noticias-guatemala-diario-centro-america/el-azucar-motor-en-la-economia-del-pais/>
- Vinod Babu, S., Gopal, A. V., Trimurtulu, N., Kishore Babu, G., & Sree Lakshmi, B. (2020). Isolation, Screening and Characterization of Silica Solubilizing Bacteria from Direct Sown Paddy (*Oryza sativa* L.) Growing Areas of Andhra Pradesh. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 9(10), 4054-4066. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.910.465>
- Wagner, S. (2011). *Biological Nitrogen Fixation | Learn Science at Scitable*. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/biological-nitrogen-fixation-23570419/>
- Walters, K. E., & Martiny, J. B. H. (2020). Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. *PLOS ONE*, 15(9), e0233872. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0233872>
- 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 2021*, Vol. 9, Page 1988, 9(9), 1988. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9091988>
- Wang, J., He, N., Wang, Y., Li, J., & Li, M. (2021). Divergent drivers determine soil bacterial  $\beta$ -diversity of forest and grassland ecosystems in Northwest China. *Global Ecology and Conservation*, 28, e01622. <https://doi.org/10.1016/J.GECCO.2021.E01622>
- Wezel, A., Casagrande, M., Celette, F., Vian, J. F., Ferrer, A., & Peigné, J. (2014). Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(1), 1-20. <https://doi.org/10.1007/S13593-013-0180-7/METRICS>
- Willerding, A. L., Oliveira, L. A. de, Moreira, F. W., Germano, M. G., & Chagas, A. F. (2011). Lipase Activity among Bacteria Isolated from Amazonian Soils. *Enzyme Research*, 2011(1). <https://doi.org/10.4061/2011/720194>
- Wolińska, A. (2019). Metagenomic Achievements in Microbial Diversity Determination in Croplands: A Review. *Microbial Diversity in the Genomic Era*, 15-35. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00002-2>
- Wu, Q., Dou, X., Wang, Q., Guan, Z., Cai, Y., & Liao, X. (2018). Isolation of  $\beta$ -1,3-Glucanase-Producing Microorganisms from *Poria cocos* Cultivation Soil via Molecular Biology. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23071555>
- Wydro, U. (2022). Soil Microbiome Study Based on DNA Extraction: A Review. En *Water (Switzerland)* (Vol. 14, Número 24). MDPI. <https://doi.org/10.3390/w14243999>

- Xiong, W., Li, Z., Liu, H., Xue, C., Zhang, R., Wu, H., Li, R., & Shen, Q. (2015). The Effect of Long-Term Continuous Cropping of Black Pepper on Soil Bacterial Communities as Determined by 454 Pyrosequencing. *PLOS ONE*, *10*(8), e0136946. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0136946>
- Xu, Z., Hansen, M. A., Hansen, L. H., Jacquiod, S., & Sørensen, S. J. (2014). Bioinformatic Approaches Reveal Metagenomic Characterization of Soil Microbial Community. *PLOS ONE*, *9*(4), e93445. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0093445>
- Yuan, Z., Liu, Q., Pang, Z., Fallah, N., Liu, Y., Hu, C., & Lin, W. (2022). Sugarcane Rhizosphere Bacteria Community Migration Correlates with Growth Stages and Soil Nutrient. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(18), 10303. <https://doi.org/10.3390/IJMS231810303/S1>
- Zaman, N. R., Chowdhury, U. F., Reza, R. N., Chowdhury, F. T., Sarker, M., Hossain, M. M., Akbor, M. A., Amin, A., Islam, M. R., & Khan, H. (2021). Plant growth promoting endophyte *Burkholderia contaminans* NZ antagonizes phytopathogen *Macrophomina phaseolina* through melanin synthesis and pyrrolnitrin inhibition. *PLOS ONE*, *16*(9), e0257863. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0257863>
- Zeng, Q., An, S., Liu, Y., Wang, H., & Wang, Y. (2019). Biogeography and the driving factors affecting forest soil bacteria in an arid area. *Science of The Total Environment*, *680*, 124-131. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.04.184>
- Zhang, J., Liu, Y. X., Guo, X., Qin, Y., Garrido-Oter, R., Schulze-Lefert, P., & Bai, Y. (2021). High-throughput cultivation and identification of bacteria from the plant root microbiota. *Nature Protocols* *2021 16:2*, *16*(2), 988-1012. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00444-7>
- Zhang, X. Y., Han, X. X., Chen, X. L., Dang, H. Y., Xie, B. bin, Qin, Q. L., Shi, M., Zhou, B. C., & Zhang, Y. Z. (2015). Diversity of cultivable protease-producing bacteria in sediments of Jiaozhou Bay, China. *Frontiers in Microbiology*, *6*(SEP), 1021. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01021/BIBTEX>
- Zhao, Q., Xiong, W., Xing, Y., Sun, Y., Lin, X., & Dong, Y. (2018). Long-Term Coffee Monoculture Alters Soil Chemical Properties and Microbial Communities. *Scientific Reports* *2018 8:1*, *8*(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24537-2>
- Zhao, Y., Shi, R., Bian, X., Zhou, C., Zhao, Y., Zhang, S., Wu, F., Waterhouse, G. I. N., Wu, L. Z., Tung, C. H., & Zhang, T. (2019). Ammonia Detection Methods in Photocatalytic and Electrocatalytic Experiments: How to Improve the Reliability of NH<sub>3</sub> Production Rates? *Advanced Science*, *6*(8). <https://doi.org/10.1002/ADVS.201802109>

### XIII. ANEXOS

Figura 27: Gel de electroforesis con 17 pozos para PCR del gen *nifH* con sus respectivas muestras detalladas. Del lado izquierdo se observa la escalera utilizada, seguida del control negativo y el control positivo.

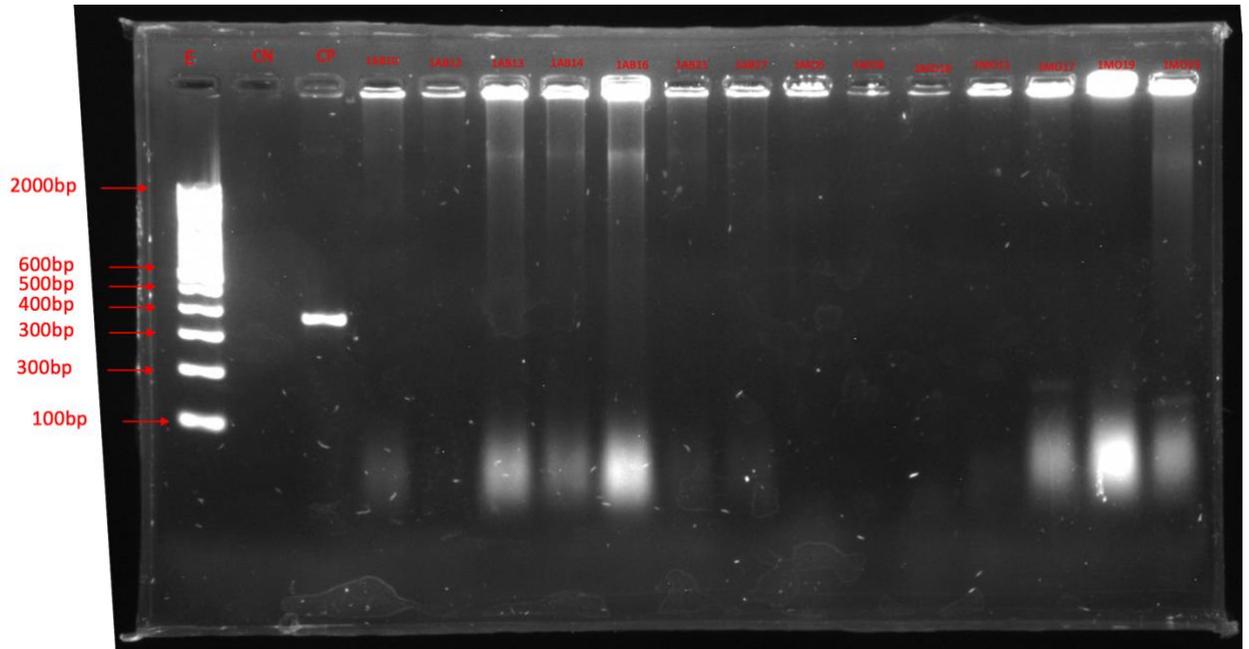


Figura 28: Gel de electroforesis con 50 pozos para PCR del gen *nifH* con sus respectivas muestras detalladas. Del lado izquierdo se observan la escaleras utilizadas. Del lado derecho se detalla a que muestra corresponde cada pazo.

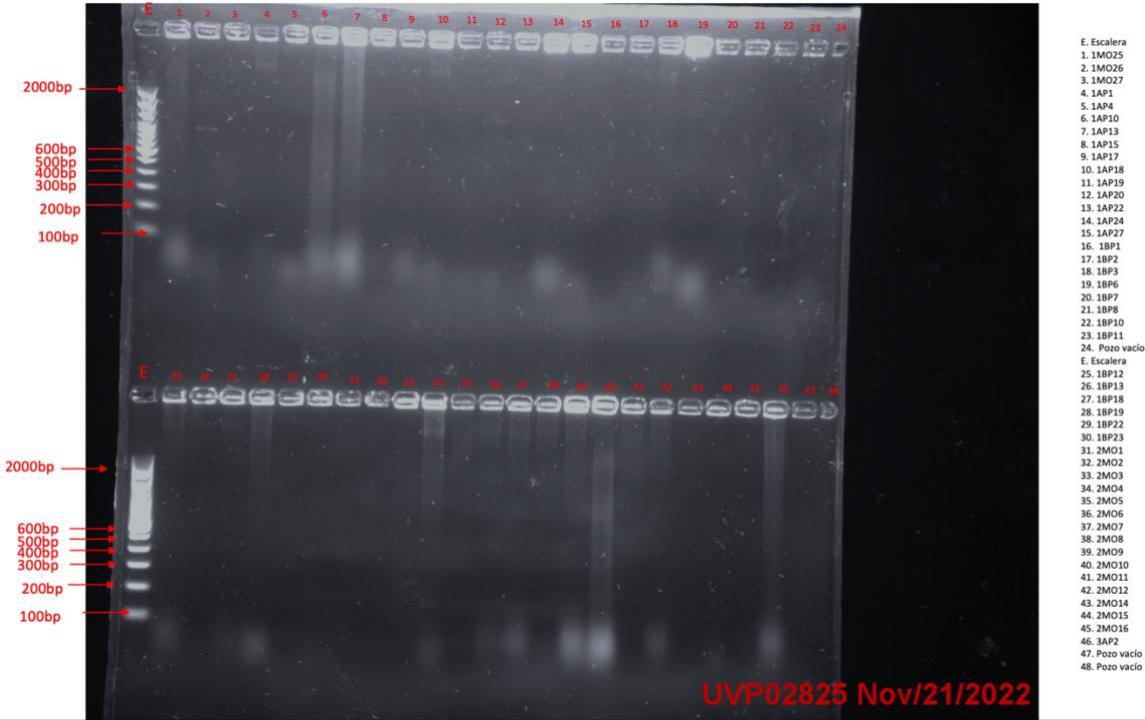


Figura 29: Gel de electroforesis con 17 pozos para PCR del gen *nifH* con sus respectivas muestras detalladas. Del lado izquierdo se observa la escalera utilizada. Los pozos con una "X" no fueron utilizados.

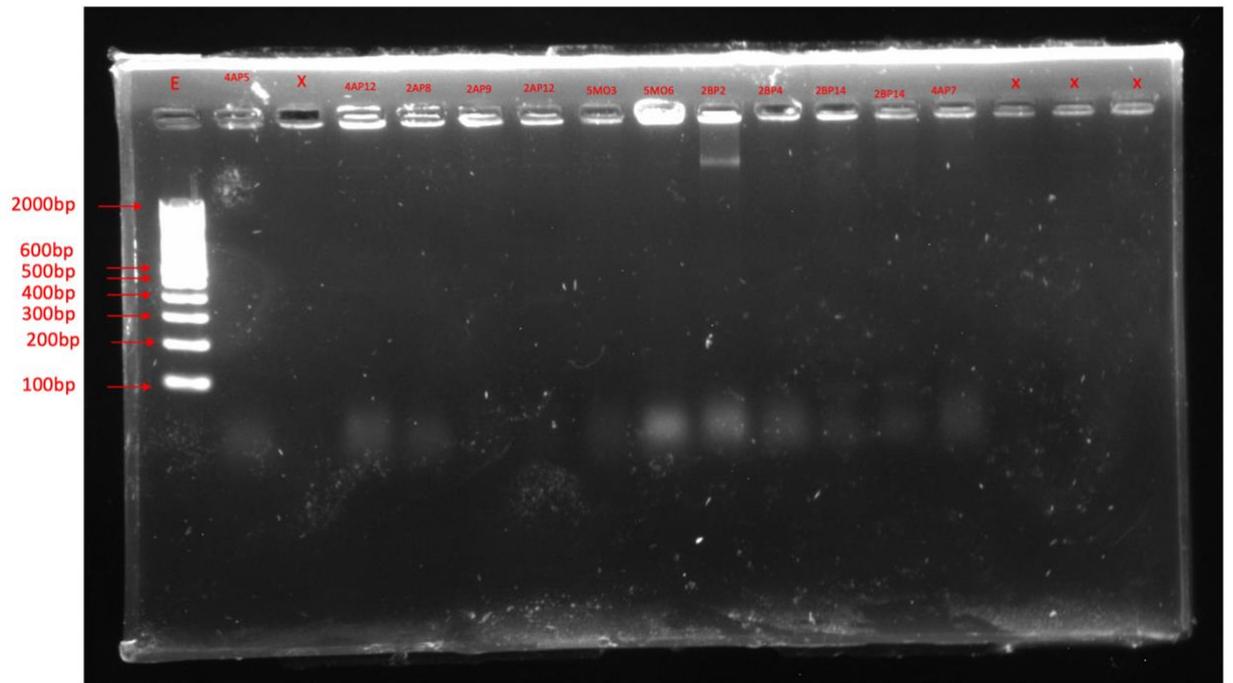


Figura 30: Gel de electroforesis con 50 pozos para PCR del gen *nifH* con sus respectivas muestras detalladas. En esta imagen solo se detalla la mitad de los pozos, del pozo 0 al 23. Del lado izquierdo se observa la escalera utilizada. Del lado derecho se detalla a que muestra corresponde cada pozo.

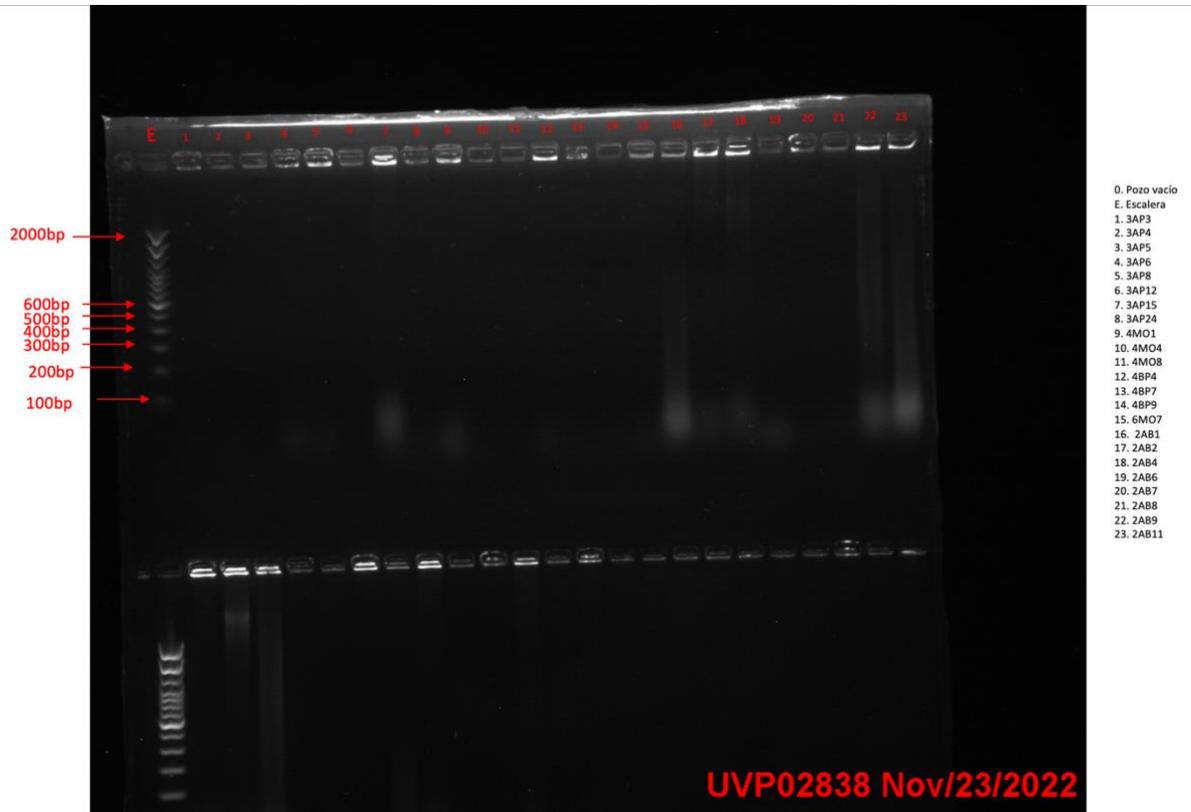
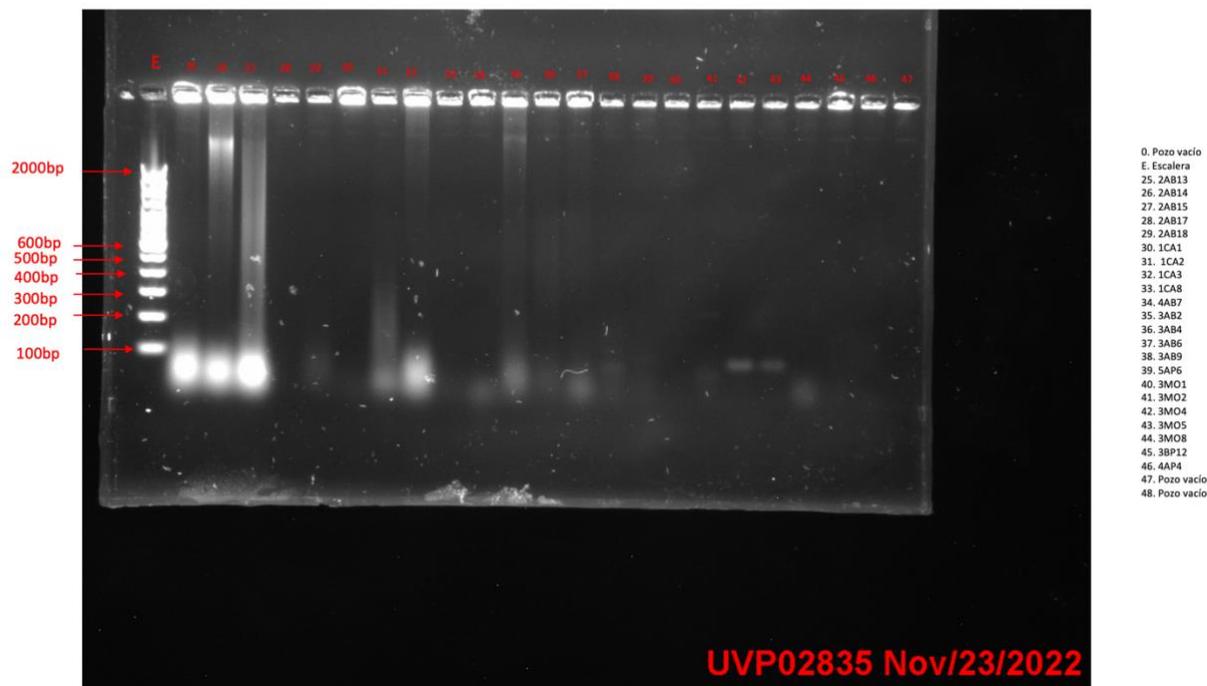


Figura 31: : Gel de electroforesis con 50 pozos para PCR del gen *nifH* con sus respectivas muestras detalladas. En esta imagen solo se detalla la mitad de los pozos, del pozo 25 al 48. Del lado izquierdo se observa la escalera utilizada. Del lado derecho se detalla a que muestra corresponde cada pazo.



## POE 1: Muestreo y diluciones

Procedimiento Normado de Operación	POE 1 <b>Proyecto Suelos Ingenio Magdalena</b>
	Páginas totales: 9
Muestreo de Suelos, diluciones seriadas y aislamiento de microorganismos en el suelo	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sanchez, Valeria Ochoa

### 1. Propósito

Muestreo de suelos destinados a la agricultura poco “maltratados”, poca aplicación de pesticidas, fungicidas y otros, con el objetivo de aislar microorganismos beneficiosos para el crecimiento de *Saccharum officinarum* (caña de azúcar).

### 2. Aplicación

Las diluciones seriadas en microbiología permiten obtener colonias aisladas a partir de una solución que originalmente se encontraba concentrada. Por lo general se prepara una serie de

soluciones al décimo (1:10) o al medio (1:2) de la concentración de la solución madre. Con este procedimiento se obtiene una serie de soluciones relacionadas entre sí. Por ejemplo si se realiza una solución con un factor de dilución 10 se obtendrán soluciones con las siguientes concentraciones 1/10; 1/100; 1/1000 y así sucesivamente. Si se realizan soluciones con un factor de dilución 2, las soluciones tendrán las siguientes concentraciones 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32 etc.

Estos ensayos requieren de una elución de la muestra en una solución tampón que consiste típicamente en agua estéril, PBS (solución salina tamponada con fosfato), solución salina, agua de peptona o algún otro tipo de medio de crecimiento o diluyente acuoso. Esto permite suspender la población microbiana del suelo al eliminar la fracción microbiana unida a la superficie del suelo, liberar la fracción microbiana unida a la micro-superficie. La elección de la solución tampón depende del uso final de la muestra. Por ejemplo, se utilizaría agua estéril, PBS o solución salina como diluyentes simples, mientras que se podría utilizar un medio de crecimiento para enriquecer una población o subpoblación bacteriana. El suelo se agrega normalmente a una razón 1:10 (Brooks, 2015).

### 3. Referencias

- 3.1. Brooks, J. 2015. <<Soil Sampling for Microbial Analyses>>. *Manual of Environmental Microbiology*,(5):2.6.3-1-2.6.3-11. <https://doi.org/10.1128/9781555818821.ch2.6.3>
- 3.2. Rodrigues, A. A., Forzani, M. V., Soares, R. de S., Sibov, S. T., & Vieira, J. D. G. 2016. <<Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane>>. *Pesquisa Agropecuária Tropical*,46(2):149–158. <https://doi.org/10.1590/1983-40632016v4639526>
- 3.3. RMB Environmental Laboratories. (s/f). <<Sample collection, storage and preservation>>. *Quality Assesment Manual*.

### 4. Terminología

- 4.1. Diluciones seriadas: Serie de sustancias en las que se va reduciendo la concentración de las mismas. Partiendo de la más concentrada (solución madre o stock) a la menor concentrada. Esto se logra utilizando un factor que permite bajar la cantidad de soluto por unidad de volumen en cada solución.
- 4.2. Solución tampón: Una mezcla de un ácido débil y su base conjugada o una base débil y su ácido conjugado. Estas soluciones ayudan a mantener un valor estable del pH de otra solución que se mezcla con la solución tampón (Skoog, 2015).

### 5. Documentos asociados

- 5.1. Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A. A., Araujo, W. L., & Raaijmakers, J. M. 2007. <<Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of Burkholderia cepacia complex isolates>>. *Applied and Environmental Microbiology*,73(22):7259–7267. <https://doi.org/10.1128/AEM.01222-07>
- 5.2. Kumar, A., & Meena, V. S. 2019. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability*. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability*. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-7553-8>
- 5.3. Vanegas Vanegas, C. L., & Gómez Rodríguez, J. A. 2018. <<Aislamiento e identificación molecular de microorganismos asociados a la caña de azúcar (Saccharum officinarum) variedad CP 722086>>. *Nexo Revista Científica*,31(01):64–73. <https://doi.org/10.5377/nexo.v31i01.6455>

- 5.4. Gómez, B., Ramírez, J., Veloz, R., & Gasca, J. 2014. <<Aislamiento y caracterización de bacterias de la rizósfera de guayaba con capacidad promotora de crecimiento de las plantas>>,42–50.
- 5.5. De Boer, W., Hundscheid, M. P. J., Gunnewiek, P. J. A. K., De Ridder-Duine, A. S., Thion, C., Van Veen, J. A., & Van Der Wal, A. 2015. <<Antifungal rhizosphere bacteria can increase as response to the presence of saprotrophic fungi>>. *PLoS ONE*,10(9):1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137988>
- 5.6. Tsegaye, Z. 2019. <<Characterization and Identification of Native Plant Growth-Promoting Bacteria Colonizing Tef (Eragrostis Tef) Rhizosphere During the Flowering Stage for A Production of Bio Inoculants>>. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*,22(2). <https://doi.org/10.26717/bjstr.2019.22.003710>
- 5.7. Skoog, D. et al. (2015). Fundamentos de Química Analítica. 9na edición. Cengage Learning.

## 6. Seguridad

### 6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

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

### 6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

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

## 7. Equipo, materiales y reactivos

### 7.1. Equipo

- 7.1.1. Incubadora con agitación
- 7.1.2. Micropipetas 1000ul
- 7.1.3. Micropipetas 100ul
- 7.1.4. Micropipetas 10ul
- 7.1.5. Pala pequeña

- 7.1.6. Hielera
- 7.1.7. Icepack
- 7.1.8. Sharpie
- 7.1.9. Etiquetas
- 7.1.10. Autoclave
- 7.1.11. Esparcidores
- 7.1.12. Asa en punta
- 7.1.13. Mechero

## **7.2. Materiales/ Cristalería**

- 7.2.1. Bolsa de muestreo esteril con cierre hermético
- 7.2.2. Tubos ependorff 1.5ml
- 7.2.3. Tubos de 15 ml o erlenmeyer 125ml
- 7.2.4. Puntas de micropipeta 1000ul
- 7.2.5. Puntas de micropipeta 100ul
- 7.2.6. Puntas de micropipeta 10ul
- 7.2.7. Caja Petri

## **7.3. Reactivos**

- 7.3.1. Agua peptonada o PBS
- 7.3.2. Levadura
- 7.3.3. Peptona
- 7.3.4. Cloruro de sodio
- 7.3.5. Agar bacteriológico

## **7.4. Material biológico**

- 7.4.1. Muestra de suelo

## **8. Procedimiento**

### **8.1. Muestreo de suelos**

- 8.1.1. Con una pala pequeña coleccionar muestras de suelo a 10 - 15cm de distancia de base del tallo y a 10 - 15cm de profundidad de la misma.
- 8.1.2. Tomar aproximadamente 10g de muestra y colocarla en bolsa de muestreo
- 8.1.3. Muestrear aproximadamente 4 a 5 puntos y unificar las muestras en la bolsa hermética.
- 8.1.4. Sellar la bolsa herméticamente
- 8.1.5. Rotular la bolsa con la siguiente información
  - 8.1.5.1. **Muestreo suelo Magdalena**
  - 8.1.5.2. **Fecha de muestreo (dia/mes/año):**
  - 8.1.5.3. **Colecta realizada por:**
  - 8.1.5.4. **Lote/Finca:**
  - 8.1.5.5. **Coordenadas:**
  - 8.1.5.6. **pH de suelo:**
  - 8.1.5.7. **Tipo de localidad + código:**
    - 8.1.5.7.1. Campos de cultivo de caña con Alta productividad (AP)
    - 8.1.5.7.2. Campos de cultivo de caña con Baja productividad (BP)

8.1.5.7.3. Campos de cultivo de caña con Mayor contenido de Materia Orgánica (MO)

8.1.5.7.4. Área de Bosque (AB)

8.1.5.7.5. Caña en área anegada (CA)

8.1.5.8. **Variedad sembrada:**

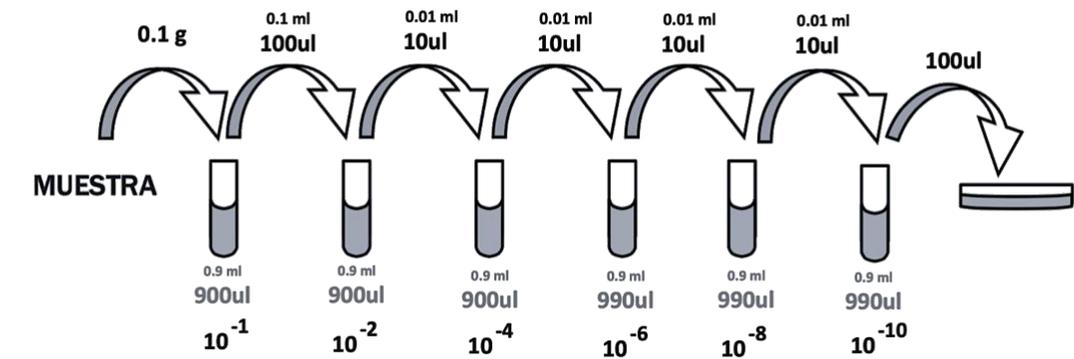
8.1.6. Colocar en una hielera y transportar con hielo o 6°C.

8.1.7. Realizar los procedimientos siguientes inmediatamente la muestra llegue al laboratorio. Si lo anterior no es posible almacenar la muestra a 4°C por máximo 48 horas. Para análisis de microbiología básica.

8.2. Agar nutritivo ( $V_f=1000\text{mL}$ )

8.2.1. Se agrega a 1 L de agua destilada los siguientes componentes, con agitación continua y calor.

- 2g Levadura
- 5 g Peptona
- 5 g Cloruro de sodio
- 15 g Agar bacteriológico



**Figura 1: Diluciones seriadas.**

8.3. Diluciones seriadas

8.3.1. Suspender 0.5 gramos de suelo en 50 mL de PBS a 20 mM con un pH de 7.4 o Agua peptonada en Elenmeyer de 125ml, esteril.

8.3.1.1. Suspender 0.1 gramos de suelo en 900 uL de PBS a 20 mM con un pH de 7.4 o Agua peptonada

8.3.2. Incubar por 1 hora a 130 rpm en incubadora con shaker.

8.3.3. Después de la agitación, realizar diluciones seriadas hasta  $10^{-10}$  (ver Figura 1)

8.3.4. Rotular la placa con la siguiente información:

8.3.4.1. **Número de Muestra (1, 2, 3...)**

8.3.4.2. **Código de tipo de localidad**

8.3.4.2.1. **Campos de cultivo de caña con Alta productividad (AP)**

8.3.4.2.2. **Campos de cultivo de caña con Baja productividad (BP)**

- 8.3.4.2.3. **Campos de cultivo de caña con Mayor contenido de Materia Orgánica (MO)**
- 8.3.4.2.4. **Área de Bosque (AB)**
- 8.3.4.2.5. **Caña en área anegada (CA)**
- 8.3.4.3. **Fecha de siembra**
- 8.3.5. Inocular 100 uL de cada dilución ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ) en agar nutritivo
- 8.3.6. Rotular e incubar a temperatura ambiente por 15 días.
- 8.3.7. Monitorear las placas diariamente.
- 8.4. Inoculación en agares selectivos y diferenciales
  - 8.4.1. Con las placas de agar nutritivo inoculadas
    - 8.4.1.1. Identifique los diferentes tipos de colonias en cada placa y enumérelas según el código
      - 8.4.1.1.1. **Número correlativo de Muestra (1, 2, 3...)**
      - 8.4.1.1.2. **Código de tipo de localidad**
        - 8.4.1.1.2.1. **Campos de cultivo de caña con Alta productividad (AP)**
        - 8.4.1.1.2.2. **Campos de cultivo de caña con Baja productividad (BP)**
        - 8.4.1.1.2.3. **Campos de cultivo de caña con Mayor contenido de Materia Orgánica (MO)**
        - 8.4.1.1.2.4. **Área de Bosque (AB)**
        - 8.4.1.1.2.5. **Caña en área anegada (CA)**
      - 8.4.1.1.3. **Número de colonia aislada**
    - 8.4.1.2. **Llene un cuadro con la siguiente información de cada colonia**
      - 8.4.1.2.1. **Código de colonia**
      - 8.4.1.2.2. **Color**
      - 8.4.1.2.3. **Textura**
      - 8.4.1.2.4. **Tinción de Gram**
      - 8.4.1.2.5. **Observaciones**
    - 8.4.1.3. Tome las placas de agar selectivo y diferencial asignado en los siguientes POEs y una nueva placa de agar nutritivo.
    - 8.4.1.4. Con un marcador permanente, dibuje una cuadrícula en la parte de atrás de cada placa de agar, de acuerdo a la figura 2.
    - 8.4.1.5. Numere cada cuadro cuidadosamente
    - 8.4.1.6. Utilizando la aguja bacteriológica inocule en cada una de las placas inocule en cada cuadro según el código de cada colonia de bacteria que haya identificado en las placas.
    - 8.4.1.7. **Luego de la incubación respectiva llene un cuadro con la siguiente información.**
      - 8.4.1.7.1.1. **Código de colonia**
      - 8.4.1.7.1.2. **Medio de cultivo selectivo y diferencial utilizado**
      - 8.4.1.7.1.3. **Reacción positiva o negativa**
      - 8.4.1.7.1.4. **Observaciones**
- 8.5. Identificación de colonias
  - 8.5.1. Luego de determinar las propiedades de las colonias obtenidas, seleccione algunas para realizar una identificación de 16S según el POE 11.

8.6. Stock de bacterias de interés

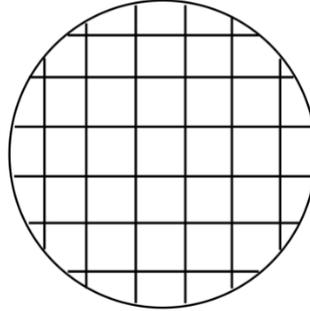
8.6.1. Inocular una colonia en 1ml de medio nutritivo

8.6.2. Incubar Overnight

8.6.3. Tomar 500ul de cultivo + 500ul de glicerol 40%

8.6.4. Fast freeze con etanol al 100% en congeladora -20%

8.6.5. Almacenar en -80°C (duración aproximada sin descongelar 6 meses)



**Figura 2. Placa Petri segmentada para aislamientos de colonias bacterianas**

**9. Esterilización de material**

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

**10. Anexos**

## POE 2: Fijación de nitrógeno

Procedimiento Normado de Operación	POE 2 <b>Proyecto Suelos Ingenio Magdalena</b>
	Páginas totales: 6
Identificación fenotípica de microorganismos fijadores de nitrógeno	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sanchez, Valeria Ochoa

### 1. Propósito

Entre los organismos del microbiota en una muestra de suelo degradado por la actividad agrícola y aplicación de agroquímicos, identificar e aislar aquellos capaces de fijar nitrógeno para aprovechamiento por otros organismos, es decir, de transformar el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en formas orgánicas accesibles, como amoníaco ( $NH_4^+$ ) o nitratos ( $NO_3^-$ ).

### 2. Aplicación

El ciclo del nitrógeno es uno de los ciclos bioquímicos esenciales para la supervivencia y desarrollo de un ecosistema, en el cual el nitrógeno atmosférico se hace biodisponible para otros, especialmente vegetales, que lo utilizan para fabricar aminoácidos y ácidos nucleicos (Audeserik, Audeserik, & Byers, 2012). Esta transformación es mayoritariamente realizada en la naturaleza por bacterias, mediante la fijación de nitrógeno (Mendes dos Santos, Escobar, Bentes, & Cid, 2020) estos organismos son denominados diazotrofos (Baldani, Reis, Videira, Boddey, & Divan, 2014). El cultivo y adición de organismos fijadores de nitrógeno a manera de biofertilizantes a los suelos agrícolas es una alternativa a la aplicación de fertilizantes químicos, previniendo así la erosión y disminución de diversidad y resiliencia del suelo (Vega, 2017).

### 3. Referencias

- 3.1. Angel, R., Nepel, M., Panhölzl, C., Schmidt, H., Herbold, C. W., Eichorst, S. A., & Wobken, D. 2018. <<Evaluation of primers targeting the diazotroph functional gene and development of NifMAP - A bioinformatics pipeline for analyzing nifH amplicon data>>. *Frontiers in Microbiology*,9(APR):1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00703>
- 3.2. Marusina, A. I., Boulygina, E. S., Kuznetsov, B. B., Tourova, T. P., Kravchenko, I. K., & Gal'chenko, V. F. 2001. <<A system of oligonucleotide primers for the amplification of nifH genes of different taxonomic groups of prokaryotes>>. *Microbiology*,70(1):73-78. <https://doi.org/10.1023/A:1004849022417>
- 3.3. Mendes dos Santos, R., Escobar, P., Bentes, L., & Cid, E.2020. << Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Maize and Sugarcane: Characteristics and Applications>>. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. doi:10.3389/fsufs.2020.00136 .

#### 4. Terminología

- 4.1. Diazotrófico: Nombre otorgado a las bacterias capaces de fijar nitrógeno, es decir, transformar mediante su metabolismo el nitrógeno atmosférico en formas biodisponibles (Baldani, Reis, Videira, Boddey, & Divan, 2014).
- 4.2. Medio selectivo: Medio nutritivo para el cultivo de microorganismos que inhiben el desarrollo de algunos organismos, dando lugar o promoviendo el de otros de interés (Rodríguez & Zhurnenko, 2018).

#### 5. Documentos asociados

- 5.1. Audeserik, T., Audeserik, G., & Byers, B. 2012. << Biología: La vida en la Tierra con Fisiología>>. México : Pearson Educación de México.
- 5.2. Alves, A., Forzani, M., de Souza, R., Sibov, S. & Goncalves, J. 2016. <<Isolation and selection of plant promoting bacteria associated with sugarcane>>. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 46(2). pp. 149-158.
- 5.3. Boldani, J., Reis, V., Videira, S., Boddey, L. & Divan, V. 2014. <<The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists>>. *Plant Soil*. DOI: 10.1007/s11104-014-2186-6
- 5.4. Gómez, B., Ramírez, J., Veloz, R., Gasca, J. & Herrera, I. 2014. <<Aislamiento y caracterización de bacterias de la rizósfera de guayaba con capacidad promotora de crecimiento de las plantas>>. *Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Guanajuato*.
- 5.5. Rodríguez, C. & Zhurbenko, R. 2018. <<Manual BioCen de Medios de Cultivo>>. Cuarta Edición. Cuba: *Centro Nacional de Biopreparados*.
- 5.6. Tsegaya, Z., Yimam, M., Bekele, D., Chaniyalew, S. & Assefa, F. 2019. <<Characterization and Identification of Native Plant Growth-Promoting Bacteria Colonizing Tef (Eragrostis Tef) Rhizosphere During the Flowering Stage for A Production of Bio Inoculants. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*.
- 5.7. Vega, C. 2017. <<Trabajo de fin de grado: Problemas ambientales y de salud derivados del uso de fertilizantes nitrogenados>>. *Universidad Complutense*: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/CRISTINA%20VEGA%20OLIVA.pdf>

#### 6. Seguridad

##### 6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

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

##### 6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.

- 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles.
- 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

## **7. Equipo, materiales y reactivos**

### **7.1. Equipo**

- 7.1.1. Balanza semianalítica
- 7.1.2. Estufa con agitación magnética
- 7.1.3. Agitador magnético
- 7.1.4. Probeta de 1~L
- 7.1.5. Beaker de 80mL.
- 7.1.6. Autoclave

### **7.2. Materiales/ Cristalería**

- 7.2.1. Tubos de ensayo o viales de 10mL.
- 7.2.2. Asas microbiológicas en punta.
- 7.2.3. Erlenmeyer 1L
- 7.2.4. Papel encerado
- 7.2.5. Tubos Eppendorf 0.2ml
- 7.2.6. Puntas de micropipeta
- 7.2.7. Micropipetas

### **7.3. Reactivos**

- 7.3.1. Ácido málico
- 7.3.2.  $K_2HPO_4$
- 7.3.3.  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 7.3.4. NaCl
- 7.3.5.  $CaCl_2$
- 7.3.6. Azul de bromotimol
- 7.3.7. KOH
- 7.3.8. Agar microbiológico
- 7.3.9.  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
- 7.3.10.  $MnSO_4 \cdot H_2O$
- 7.3.11.  $H_3BO_3$
- 7.3.12.  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- 7.3.13.  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
- 7.3.14. Biotina
- 7.3.15. Piridoxina
- 7.3.16.  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
- 7.3.17. NaEDTA
- 7.3.18. Etanol
- 7.3.19. Agua destilada

- 7.3.20. ADN
- 7.3.21. Gotaq Mastermix
- 7.3.22. Hot start Colorless master mix
- 7.3.23. Oligo Forward (Marusina et al., 2001)
  - nifH\_F (5'- TGY GAY CCI AAI GCI GA -3')  
posición (115 - 131)
- 7.3.24. Oligo Reverse (Marusina et al., 2001)
  - nifH\_R (5'- GCC ATC ATY TCI CCI GA -3')  
posición (457 - 473)
- 7.3.25. Agua libre de nucleasas
- 7.3.26. Agarosa
- 7.3.27. Escalera 1000pb
- 7.3.28. Bromuro de Etidio 10mg/ml
- 7.3.29. Loading Dye
- 7.3.30. Buffer TBE

#### 7.4. Medicamentos

N/A

#### 7.5. Material biológico

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

### 8. Procedimiento

- 8.1. Preparación de soluciones necesarias para el medio semisólido libre de nitrógeno NFb

- 8.1.1. Preparación de solución de elementos traza ( $V_f=50\text{mL}$ )

- 0.004g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 0.0012g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.014g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$
- 0.01g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0.01175g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

- 8.1.2. Preparación de solución vitaminada ( $V_f=50\text{mL}$ )

Se disuelven en 50mL de agua destilada en calor 0.0005g de Biotina y 0.001g de piridoxina. Esta solución no se esteriliza en la autoclave, sino que por filtración a través de un filtro de 0.2 $\mu\text{m}$ .

- 8.1.3. Preparación de solución FeEDTA ( $V_f=100\text{mL}$ )

- Hervir agua destilada.
- Agregar 0.069g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0.093g de NaEDTA en 8 mL del agua en ebullición.
- Inmediatamente, aforar a 100mL con agua destilada fría

- 8.2. Preparación del medio de cultivo ( $V_f=1000\text{mL}$ )

- 8.2.1. Se agregaron a 1 L de agua destilada los siguientes componentes, con agitación continua y calor. (Exactamente con el mismo orden)

- 5g de ácido málico
- 0.5g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- 0.1g de NaCl
- 2mL de la mezcla de elementos traza
- 2mL de azul de bromotimol al 5% (disuelto en etanol)
- 4mL de la solución de FeEDTA al 1.64%

- 4g de KOH
  - 1.75g de agar bacteriológico.
- 8.2.2. Llevar a ebullición
- 8.2.3. Ajustar el pH a 6.5
- 8.2.4. Esterilizar el medio
- 8.2.5. Dejar enfriar la solución, cuando ésta haya alcanzado los ~40°C, agregar:
- 1 mL de la solución vitaminada.
  - Solución CaCl<sub>2</sub> filtrada (0.02g en 5ml agua)
  - Solución MgSo<sub>4</sub> \*7H<sub>2</sub>O filtrada (0.2g en 5ml agua)
- 8.2.6. Verter ~5 mL por tubo en tubos de ensayo. Agitar cada vez que se vierta para asegurar homogeneidad.
- 8.3. Inoculación e incubación
- 8.3.1. Inocular el medio con asa de aguja pinchando en el medio.
- 8.3.2. Seguir el procedimiento de POE 1 “Muestreo de Suelos, diluciones seriadas y aislamiento de microorganismos en el suelo” en el apartado de “Inoculación en agares selectivos y diferenciales”
- 8.3.3. **Incubar durante 7-10 días sin agitación a 30°C** y observar la formación de películas bacterianas. Las primeras podrán ser observadas tras 2-3 días de inoculación y el conteo se puede efectuar tras 5-7 días.
- Las bacterias capaces de fijar nitrógeno crecerán formando una película bajo la superficie del medio. Las bacterias incapaces de fijar nitrógeno no crecerán en el medio.
- 8.3.4. Re-aislar las colonias en un medio sólido utilizando un asa microbiológica en anillo.
- 8.3.5. Este procedimiento debe ser repetido 5 veces con las colonias “positivas” para asegurarse de que el crecimiento no se debe a restos de nitrógeno orgánico presente en la solución original.

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

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

8.4. PCR de confirmación del gen NifH

- 8.4.1. Colocar en un tubo Eppendorf libre de nucleasas:

Reactivo	Volumen final lrxn
Go Taq master mix	7.5 ul
oligo nifH_F (10uM)	0.75 ul
oligo nifH_R (10uM)	0.75 ul
ADN o Colonia	1 ul

Agua libre de nucleasas	5 ul
<b>TOTAL</b>	<b>15µl</b>

8.4.2. Realizar un control negativo sin ADN template

8.4.3. Utilizar el siguiente programa

Paso	Temperatura °C	Tiempo	# Ciclos
Iniciación de desnaturalización	94	3min.	1
Anillamiento	50	3 min	
Extensión	72	3 min	
Desnaturalización	94	30seg	5
Anillamiento	50	2 min	
Extensión	72	30seg	
Desnaturalización	94	30seg	30
Anillamiento	40	30seg	
Extensión	72	30seg	
Extensión final	72	7min.	1
	4	Indefinido	1

(Marusina et al., 2001)

Paso	Temperatura °C	Tiempo	# Ciclos
Iniciación de desnaturalización	94	5min.	1
Desnaturalización	94	30 seg	35
Anillamiento	52	45 seg	
Extensión	72	30 seg	
Extensión final	72	10 min	1
	4	Indefinido	1

(Angel et al., 2018)

### 8.2.1 Electroforesis

8.2.1.1 Preparar buffer TBE 1x

8.2.1.2 Para visualizar el resultado del PCR realice una electroforesis

8.2.1.3 Realizar un gel de agarosa de 1.5% con 0.45g de agarosa y 30ml de buffer TBE 1X, luego que se haya disuelto la agarosa en microondas (30 seg \* 30 seg y agitar)

8.2.1.3.1 Agregar bromuro de etidio 100X (15 ml de gel - 1ul de bromuro de etidio y 30ml de gel - 2ul de bromuro de etidio)

8.2.1.4 Dejar que el gel se solidifique

8.2.1.5 Cargar el gel (pozos más cerca del lago negativo)

8.2.1.6 Llenar la cámara de electroforesis con buffer TBE 1X

8.2.1.7 Cargar el gel (7ul de muestra con Loading Dye y escalera de 100bp)

8.2.1.7.1 Tamaño esperado de producto 370bp

8.2.1.8 Correr el gel por (30 min) a 100voltios.

8.2.1.9 Visualizar utilizando transiluminador

## 9. Esterilización de material

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

## 10. Cálculos

No aplica

### POE 3: Solubilización de fosfatos

Procedimiento Normado de Operación	POE 3 <b>Proyecto Suelos Ingenio Magdalena</b>
	Páginas totales: 3
Detección de microorganismos solubilizantes de fosfato	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sanchez, Valeria Ochoa

### 1. Propósito

Muestreo de suelos en busca de microorganismo solubilización de fosfatos con el objetivo de aislar microorganismos beneficiosos para el crecimiento de *Saccharum officinarum* (caña de azúcar).

### 2. Aplicación

El uso de medios selectivos para aislar microorganismos permite el aislamiento selectivo. El fósforo es uno de los nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. Sin embargo, este se encuentra en su mayoría insoluble en el suelo. Una gran parte del fósforo inorgánico aplicado en fertilizantes se inmoviliza después de su aplicación. Inocular el suelo con bacterias solubilización de fosfatos ha demostrado ayudar a poner e mayor disponibilidad el fósforo y obtener mejores cosechas. Por lo que un medio de cultivo selectivo para este tipo de microorganismo permite su rápida identificación para su posterior estudio y uso (Nautiyal, 1999).

### 3. Referencias

- 3.1. Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 170(1), 265-270.
- 3.2. Mehta, S., & Nautiyal, C. S. (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current microbiology*, 43(1), 51-56.

### 4. Terminología

- 4.1. Solubilización de fosfatos: Aquellos microorganismos que son capaces de solubilizar fósforo inorgánico a partir de compuestos insolubles.
- 4.2. NBRIP: Medio selectivo para la identificación de microorganismo solubilización de fosfatos. Por sus siglas en inglés: “National Botanical Research Institute 's phosphate growth medium (NBRIP)”.

## 5. Documentos asociados

- 5.1. UnitedStates: Patent Application Publication (2002). *COMPOSITION FOR QUALITATIVE SCREENING OF PHOSPHATE SOLUBILIZING MICROORGANISMS AND AQUALITATIVE METHOD FORSCREENING MICROORGANISMS*.<https://patentimages.storage.googleapis.com/3b/cf/5a/2df7839dbf60fb/US20020172993A1.pdf>

## 6. Seguridad

### 6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

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

### 6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

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

## 7. Equipo, materiales y reactivos

### 7.1. Equipo

- 7.1.1. Incubadora
- 7.1.2. Refrigeradora
- 7.1.3. Balanza analítica
- 7.1.4. Micropipetas
- 7.1.5. Espátula
- 7.1.6. Autoclave
- 7.1.7. Campana de flujo laminar

- 7.1.8. Sistema de gas
- 7.1.9. Estufa con agitador magnético
- 7.1.10. Medidor de pH.

## **7.2. Materiales/ Cristalería**

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

## **7.3. Reactivos**

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

## **7.4. Medicamentos**

- 7.4.1. NA

## **7.5. Material biológico**

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

## **8. Procedimiento**

### **8.1. Preparación de Medio NBRIP**

- 8.1.1 Pesar en balanza analítica
  - 10 g de glucosa
  - 5g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
  - 5 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
  - 0.25 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
  - 0.2 g KCl y 0.1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
  - 0.05g Azul de bromotimol
  - 15 g de agar.
- 8.1.2 Colocar en un Erlenmeyer de 1 litro.
- 8.1.3 Agregar 900 ml de agua destilada.
- 8.1.4 Agitar para disolver el componente.
- 8.1.5 Medir pH y llevarlo a pH 7.0
- 8.1.6 Agregar agua destilada para completar los 1000 ml.
- 8.1.7 Calentar en estufa con agitación constante hasta que llegue a punto de ebullición.

- 8.1.8 Autoclavear a 120°C por 20 min a 1 atm.
- 8.1.9 Dejar enfriar a una temperatura de aproximadamente 50-60°C
- 8.1.10 Etiquetar cajas Petri.
- 8.1.11 Plaquear en cajas Petri alrededor de 20 ml por caja.
- 8.1.12 Dejar solidificar.
- 8.2. Inoculación de bacterias
  - 8.2.1. Segmentar la placa Petri en 12 e inocular con 5ul de ON.
  - 8.2.2. Seguir el procedimiento de POE 1 “Muestreo de Suelos, diluciones seriadas y aislamiento de microorganismos en el suelo” en el apartado de “Inoculación en agares selectivos y diferenciales”
  - 8.2.3. **Incubar durante 14 días a 28°C.**
  - 8.2.4. Observar cada 2 días el halo de inhibición.  
Si se observan halos alrededor de las colonias es positivo. Los halos generalmente son de color amarillento.

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

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

## 9. Esterilización de material

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

## 10. Cálculos

No aplica

## 11. Anexos



Figura 1: Imagen de una colonia positiva (coloración amarilla) para solubilización de fosfatos.

POE 4: Solubilización de potasio

Procedimiento Normado de Operación	POE 4 <b>Proyecto Suelos Ingenio Magdalena</b>
	Páginas totales: 3
Aislamiento de microorganismos solubilizadores de potasio	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sánchez, Valeria Ochoa

### 1. Propósito

Aislar microorganismos solubilizadores de potasio a partir de muestras de suelo obtenidas de la rizósfera de plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).

### 2. Aplicación

Entre los múltiples nutrientes que las plantas necesitan para su desarrollo, está el potasio el cual en ocasiones es abundante en el suelo mas no en la forma que los organismos vegetales pueden consumir, ya que más del 90% del potasio se encuentra en forma de minerales insolubles. Este ion es necesario para múltiples procesos metabólicos, entre los que se encuentran la fotosíntesis, el crecimiento y la acumulación de azúcares (dos Santos et al., 2020). Si bien la aplicación de fertilizantes químicos de tanto potasio como otros nutrientes puede aumentar la producción agrícola a corto plazo, su uso causa un desbalance químico y ecológico que a largo plazo deteriora el suelo y disminuye la producción. Es por esto, que resulta de interés el aislamiento y eventual aplicación de microorganismos solubilizadores de potasio, generalmente rizobacterias, que tienen la capacidad de transformar los minerales de potasio de manera que este pueda ser absorbido por las raíces de las plantas (Kumar & Singh, 2019).

### 3. Referencias

- 3.1. dos Santos, R.M., Díaz, P.A., Lobo, L. & Rigobelo, E. 2020. <<Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Maize and Sugarcane: Characteristics and Applications>>. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4(September), 1-15. Extraído de: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00136>
- 3.2. Elsevier Inc. 2008. <<Advances in Applied Microbiology>>. Volume 65. San Diego, California: *Academic Press*.
- 3.3. Fatharani, R.& Rahayu, R. 2018. <<Isolation and Characterization of Potassium-Solubilizing Bacteria from Paddy Rhizosphere (*Oryza sativa* L.)>>. *Journal of Physics: Conf. Series. 1108*. doi: doi :10.1088/1742-6596/1108/1/012105
- 3.4. Kumar, A., & Singh, V. 2019. <<Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability. From Theory to Practices>>. Singapore: *Springer Nature*.

### 4. Terminología

- 4.1. Rizobacteria: Son bacterias originarias del suelo que viven en o alrededor de las raíces de una planta en el área llamada la rizósfera, una zona del suelo que se extiende algunos milímetros más allá de los límites de las raíces (Elsevier Inc. , 2008).
- 4.2. Solubilización de potasio: Es un proceso mediante el cual el potasio presente en

minerales insolubles del suelo reacciona con otros compuestos obteniendo iones solubles de potasio ( $K^+$ ). El principal mecanismo de solubilización del potasio es la acidólisis por la producción de ácidos orgánicos, como el ácido oxálico y el ácido succínico, ácidos inorgánicos y/o protones por parte de bacterias (Kumar & Singh, 2019) (dos Santos et al., 2020).

## 5. Documentos asociados

- 5.1. Etesami, H., Emami, S. & Alikhani, H. 2016. <<potassium solubilizing bacteria (KSB): Promotion of Plant Growth, and Future Prospects – A review>>. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 897-911.
- 5.2. Parmar, P. & Sindhu, S. 2013. <<Potassium Solubilization by Rhizosphere Bacteria: Influence of Nutritional and Environmental Conditions>>. *Journal of Microbiology Research*, 1, 25-31.
- 5.3. Singh, A., Singh, S. Tyagi, S. & Saxena, A. 2016. *Pedosphere*, 5, 768-773. doi: 10.1016/S1002-0160(15)60080-7

## 6. Seguridad

### 6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

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

### 6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

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

## 7. Equipo, materiales y reactivos

### 7.1. Equipo

- 7.1.1. Balanza seminanalítica
- 7.1.2. Potenciómetro
- 7.1.3. Filtro esterilizante de 0.2  $\mu$ m.
- 7.1.4. Estufa con agitación
- 7.1.5. Mechero

- 7.1.6. Esparcidor de vidrio
- 7.1.7. Autoclave
- 7.2. Materiales/ Cristalería**
  - 7.2.1. Agitador magnético
  - 7.2.2. Probeta de 1000mL
  - 7.2.3. Pipeta graduada 2.0mL
  - 7.2.4. Placas Petri
  - 7.2.5. Erlenmeyer 1000mL
  - 7.2.6. Papel encerado
  - 7.2.7. Micropipetas de 100uL
  - 7.2.8. Puntas 100uL
  - 7.2.9. Asa en punta
- 7.3. Reactivos**
  - 7.3.1. Glucosa
  - 7.3.2.  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
  - 7.3.3.  $CaCO_3$
  - 7.3.4.  $FeCl_3$
  - 7.3.5.  $Ca_3(PO_4)_2$
  - 7.3.6. Mica
  - 7.3.7. Agar microbiológico
  - 7.3.8. Azul bromotimol (solución  $5gL^{-1}$  en etanol al 70%).
  - 7.3.9. Agua destilada desionizada
- 7.4. Medicamentos**
  - N/A
- 7.5. Material biológico**
  - 7.5.1. Colonias aisladas de agar nutritivo de muestras de suelo
- 8. Procedimiento**
  - 8.1. Preparación de medio de cultivo (Medio de Aleksandrov modificado de acuerdo con las sugerencias de Rajawat *et al.*)
    - 8.1.1. Disolver en 1L de agua desionizada con agitación continua y calor:
      - 5.0g de glucosa
      - 0.5g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
      - 0.1g  $CaCO_3$
      - 0.006g de  $FeCl_3$
      - 2.0g de  $Ca_3(PO_4)_2$
      - 3.0g de Mica
      - 20.0g de agar
    - 8.1.2. Llevar a ebullición.
    - 8.1.3. Agregar 10mL de solución de azul bromotimol 5% en etanol al 70%.
    - 8.1.4. Ajustar pH a  $7.2 \pm 0.2$
    - 8.1.5. Autoclavear el medio preparado.
    - 8.1.6. Verter en placas Petri dentro del halo de esterilidad de un mechero y esperar a que se solidifiquen.
  - 8.2. Inoculación de placas con la muestra de suelo
    - 8.2.1. Segmentar la placa Petri en 12 e inocular con 5ul de ON.

- 8.2.2. Seguir el procedimiento de POE 1 “Muestreo de Suelos, diluciones seriadas y aislamiento de microorganismos en el suelo” en el apartado de “Inoculación en agares selectivos y diferenciales”
- 8.2.3. **Incubar durante 3-4 días a  $28.0 \pm 2.0$  °C.**
- 8.2.4. Observar el crecimiento. Las colonias solubilizadoras de potasio tendrán un halo amarillo sobre el medio azul.

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

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

## 9. Esterilización de material

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

## 10. Anexos

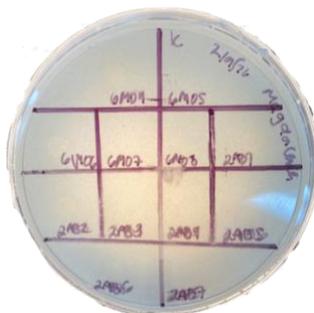


Figura 1: Se observa una coloración amarilla alrededor de las colonias identificadas como positivas.

POE 5: Solubilización de proteasas

Procedimiento Normado de Operación	POE 6 <b>Proyecto Suelos Ingenio Magdalena</b>
	Páginas totales: 3
Determinación de producción de proteasas	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sanchez, Valeria Ochoa

## 1. Propósito

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

## 2. Aplicación

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

## 3. Referencias

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

## 4. Terminología

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

## 5. Documentos asociados

- 5.1. De Oliveira, C. T., Pereira, J. Q., Brandelli, A., & Daroit, D. J. (2017). Prospecting soil bacteria from subtropical Brazil for hydrolases production. *Biologia*, 72(2), 130-139.
- 5.2. Himedia (2018). *SM Agar*. <https://himedialabs.com/td/m763.pdf>
- 5.3. Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 110.
- 5.4. Tsegaye, Z., Yimam, M., Bekele, D., Chaniyalew, S., & Assefa, F. (2019). Characterization and Identification of Native Plant Growth-Promoting Bacteria Colonizing Tef (*Eragrostis Tef*) Rhizosphere During the Flowering Stage for A Production of Bio Inoculants. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 21(5), 16444-16456.

## 6. Seguridad

### 6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

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

### 6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

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

## 7. Equipo, materiales y reactivos

### 7.1. Equipo

- 7.1.1. Incubadora
- 7.1.2. Refrigeradora
- 7.1.3. Balanza analítica
- 7.1.4. Micropipetas
- 7.1.5. Espátula
- 7.1.6. Autoclave
- 7.1.7. Campana de flujo laminar

- 7.1.8. Sistema de gas
- 7.1.9. Estufa con agitador magnético
- 7.1.10. Medidor de pH.

## **7.2. Materiales/ Cristalería**

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

## **7.3. Reactivos**

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

## **7.4. Medicamentos**

- 7.4.1. N/A

## **7.5. Material biológico**

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

## **8. Procedimiento**

### **8.1. Preparación del medio**

#### **8.1.1. Pesar**

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

8.1.2. Diluir los ingredientes en agua destilada.

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

8.1.4. Medir pH y asegurarse que este a 7.

8.1.5. Esterilizar

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

8.1.7. Dejar enfriar.

8.1.8. Guardar en refrigeradora hasta su uso.

### **8.2. Inoculación**

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

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

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

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

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

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

## 9. Esterilización de material

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

## 10. Cálculos

No aplica

## 11. Anexos



Figura 1: Las colonias positivas son aquellas que presentan un halo transparente alrededor.

POE 6: Solubilización de silicatos

Procedimiento Normado de Operación	POE 7 <b>Proyecto Suelos Ingenio Magdalena</b>
	Páginas totales: 3
Aislamiento de microorganismos solubilizadores de silicatos	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sanchez, Valeria Ochoa

### 1. Propósito

Detección y aislamiento de microorganismos capaces de solubilizar silicatos obtenidos de muestras de suelos utilizados para la agricultura, como potencial para ser utilizados como biofertilizantes.

### 2. Aplicación

Los suelos contienen generalmente un 5-40% de contenido de silicio, el cual se encuentran en formas inertes y no inertes. Desde hace más de un siglo, se han observado numerosos beneficios de la fertilización con silicatos para el crecimiento de *Oryza sativa* (arroz), *Hordeum vulgare* (cebada), *Zea mays* (maíz), *Saccharum officinarum* (caña de azúcar), entre otros, ya que tiene un impacto positivo en la producción, la fertilidad del suelo y la calidad ambiental (Matichenkov & Calvert, 2002). Fue hasta 2013 que el silicio en formas biodisponibles fue reconocido como un “elemento esencial por la Association of American Plant Food Control Officials. Además, potencia la resistencia a estreses bióticos y abióticos en algunos cultivos, así como la recepción de fósforo, magnesio, potasio, hierro, cobre y zinc. Sin embargo, solamente la fracción del silicio que se encuentra en moléculas de ácido monosilícico depolimerizado es consumido por las plantas (Chandrakala, Voleti, Bandeppa, Kumar, & Latha, 2019).

### 3. Referencias

- 3.1. Matichenkov, V. & Calvert, D. 2002. <<Silicon as a Beneficial Element for Sugarcane>>. *Journal of the American Society of Sugarcane Technologies*, 22, 21-30.
- 3.2. ASDN. 2021. <<Silicates>>. Extraído de ASDN: <https://asdn.net/asdn/chemistry/silicates.php>

### 4. Terminología

- 4.1. Silicato: Sales que contienen silicio y oxígeno en forma del anión  $\text{SiO}_4^{4-}$  u otras. Estas se encuentran en los minerales más comunes de la Tierra. Se pueden obtener de la reacción entre el ácido silícico y una base (ASDN, 2021).

### 5. Documentos asociados

- 5.1. Chandrakala, C., Voleti, S., Bandeppa, S., Kumar, N. & Latha, P. 2019. *Silicate Solubilization and Plant Growth Promoting Potential of Rhizobium sp. Isolated from Rice Rhizosphere. Silicon*. pp. 2895-2906.
- 5.2. Rubio, C., García, A. & Cardona, F. 2017. <<Técnicas básica de microbiología y bioquímica>>. *Técnicas básicas de microbiología y bioquímica*. España: Editorial Síntesis.

### 6. Seguridad

#### 6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

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

#### 6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
- 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles .

- 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

## **7. Equipo, materiales y reactivos**

### **7.1. Equipo**

- 7.1.1. Estufa con agitación
- 7.1.2. Autoclave
- 7.1.3. Balanza semianalítica
- 7.1.4. Mechero
- 7.1.5. Autoclave

### **7.2. Materiales/ Cristalería**

- 7.2.1. Placas Petri
- 7.2.2. Agitador magnético
- 7.2.3. Filtro de 0.2um
- 7.2.4. Jeringa
- 7.2.5. Erlenmeyer para la preparación del medio
- 7.2.6. Papel encerado
- 7.2.7. Espátula
- 7.2.8. Pipetas de 100uL

### **7.3. Reactivos**

- 7.3.1. Peptona
- 7.3.2. Glucosa
- 7.3.3. Cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ )
- 7.3.4. Cloruro férrico ( $FeCl_3$ )
- 7.3.5. Extracto de levadura
- 7.3.6. Sulfato de amonio ( $(NH_4)_2SO_4$ )
- 7.3.7. Fosfato de sodio dibásico ( $Na_2HPO_4$ )
- 7.3.8. Agar microbiológico
- 7.3.9. Caolina coloidal
- 7.3.10. Cicloheximida
- 7.3.11. Agua destilada desionizada
- 7.3.12. NaOH
- 7.3.13. HCl

### **7.4. Medicamentos**

N/A

### **7.5. Material biológico**

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

## **8. Procedimiento**

### **8.1. Preparación de medio modificado de Bunt y Rovira**

- 8.1.1. En un litro de agua destilada se disolvieron con agitación continua y con calor:

- 10g de peptona
  - 20g de glucosa
  - 0.1g de cloruro de magnesio
  - 0.01 de cloruro férrico
  - 1g de extracto de levadura
  - 0.5g de sulfato de amonio
  - 0.4g de fosfato de sodio dibásico
  - 20g de agar
  - 0.25% de Caolina coloidal
- 8.1.2. Llevar a ebullición
- 8.1.3. Ajustar pH a 7.0.
- 8.1.4. Esterilizar
- 8.1.5. Esperar a que el medio este a aprox. 50°C
- 8.1.6. Verter en placas Petri y dejar que se solidifique en el halo estéril de un mechero.
- 8.2. Inoculación del medio con las diluciones
- 8.2.1. Seguir el procedimiento de POE 1 “Muestreo de Suelos, diluciones seriadas y aislamiento de microorganismos en el suelo” en el apartado de “Inoculación en agares selectivos y diferenciales”
- 8.2.2. **Incubar durante 72 horas en la oscuridad a 28-30°C.**
- 8.2.3. Observar el crecimiento. Las colonias con un halo claro o de transparencia en el medio son tomadas como positivas.

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

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

## 9. Esterilización de material

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

## 10. Cálculos

No aplica

## 11. Anexos

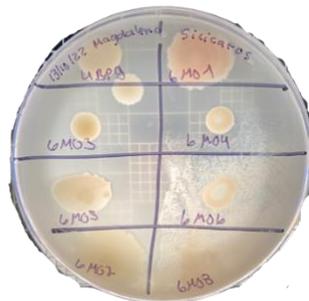


Figura 1: Se tomaron como positivas las colonias que presentaban un halo transparento alrededor de ellas.

POE 7: Producción de lipasas

Procedimiento Normado de Operación	POE 9 <b>Proyecto Suelos Ingenio Magdalena</b>
	Páginas totales: 3
Determinación de producción de lipasas	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sanchez, Valeria Ochoa

### 1. Propósito

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

### 2. Aplicación

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

### 3. Referencias

- 3.1. Bharathi, D., & Rajalakshmi, G. (2019). Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101368.
- 3.2. Geetha, K., Venkatesham, E., Hindumathi, A., & Bhadraiah, B. (2014). Isolation, screening and characterization of plant growth promoting bacteria and their effect on *Vigna Radita* (L.) R. Wilczek. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 3(6), 799-899.
- 3.3. Joshi, S., Jaggi, V., Tiwari, S., Sah, V. K., & Sahgal, M. (2019). Multitrate phosphate solubilizing bacteria from *Dalbergia sissoo* Roxb. *Rhizosphere in natural*

- forests of Indian Central Himalayas. *Environ Ecol*, 37(3A), 894-908.
- 3.4. Rabbani, M., Shafiee, F., Shayegh, Z., MirMohammadSadeghi, H., Samsam Shariat, Z., Etemadifar, Z., & Moazen, F. (2015). Isolation and Characterization of a New Thermoalkalophilic Lipase from Soil Bacteria. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 14(3), 901–906.
  - 3.5. Silva, C., Brito, T. L. D., Taniguchi, C. A., Lopes, L. A., Pinto, G. A., & de Carvalho, A. C. (2018). Growth-promoting potential of bacterial biomass in the banana micropropagated plants. *Embrapa Agroindústria Tropical-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.

#### **4. Terminología**

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

#### **5. Documentos asociados**

- 5.1. Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., ... & Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Progress in biophysics and molecular biology*, 132, 23-34.
- 5.2. Nielsen, C. K., Kjems, J., Mygind, T., Snabe, T., & Meyer, R. L. (2016). Effects of Tween 80 on growth and biofilm formation in laboratory media. *Frontiers in microbiology*, 7, 1878.

#### **6. Seguridad**

##### **6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:**

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

##### **6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio**

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

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

## 7. Equipo, materiales y reactivos

### 7.1. Equipo

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

### 7.2. Materiales/ Cristalería

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

### 7.3. Reactivos

- 7.3.1. Tween 80
- 7.3.2. Agar nutritivo

### 7.4. Medicamentos

- 7.4.1. NA

### 7.5. Material biológico

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

## 8. Procedimiento

### 8.1. Preparación de agar nutritivo suplementado

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

### 8.2. Inoculación y determinación de producción de lipasas.

- 8.2.1. Seguir el procedimiento de POE 1 “Muestreo de Suelos, diluciones seriadas y aislamiento de microorganismos en el suelo” en el apartado de “Inoculación en agares selectivos y diferenciales”
- 8.2.2. *Dejar incubar por 24hrs a 37°C.*
- 8.2.3. Si hay precipitado alrededor de la colina se toma como positivo.

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

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

- Observaciones
- Fotografía

## 9. Esterilización de material

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

## 10. Cálculos

No aplica.

## 11. Anexos

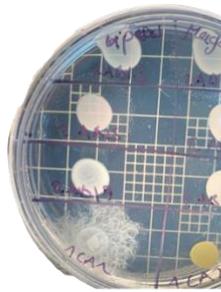


Figura 1: En la muestra 2AB se observa un precipitado alrededor de la colonia, lo que se toma como positivo para la producción de lipasas.

### POE 8: Producción de auxinas

Procedimiento Normado de Operación	POE 10 <b>Proyecto Suelos Ingenio Magdalena</b>
	Páginas totales: 4
Detección de microorganismos productores de ácido indol acético (IAA)	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sanchez, Valeria Ochoa

### 1. Propósito

Detección de microorganismos productores de auxinas aislados de suelos destinados a la agricultura poco “maltratados”, poca aplicación de pesticidas, fungicidas y otros, con el objetivo de identificarlos por medio de PCR 16S o ITS y secuenciación.

### 2. Aplicación

El Ácido indol-3-acético (IAA) es la fitohormona mejor caracterizada producida por microorganismos promotores del crecimiento vegetal. El IAA es una de las auxinas más fisiológicamente activas e interviene en la división, diferenciación y elongación de las células vegetales; también contribuye al crecimiento del xilema y las raíces (Rodríguez, *et al* 2016).

Existen diversos métodos para cuantificar el IAA producido, aquí utilizamos un método colorimétrico que permite detectar fácilmente la producción de esta fitohormona por medio de un viraje de color en tonos rojos o fúscas. Este viraje de color ocurre debido a una reacción oxidativa entre el ácido y una transaminación que lleva la sustitución del grupo amino por el cloro presente en el cloruro de hierro (III) (Gordon y Weber, 1950; Celis y Gallardo, 2008).

### 3. Referencias

- 3.1. Rodrigues, A. A., Forzani, M. V., Soares, R. de S., Sibov, S. T., & Vieira, J. D. G. 2016. <<Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane>>. *Pesquisa Agropecuária Tropical*,46(2):149–158. <https://doi.org/10.1590/1983-40632016v4639526>
- 3.2. Tsegaye, Z. 2019. <<Characterization and Identification of Native Plant Growth-Promoting Bacteria Colonizing Tef (Eragrostis Tef) Rhizosphere During the Flowering Stage for A Production of Bio Inoculants>>. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*,22(2). <https://doi.org/10.26717/bjstr.2019.22.003710>
- 3.3. Gupta, S., & Pandey, S. 2019. <<ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in French Bean (Phaseolus vulgaris) plants>>. *Frontiers in Microbiology*,10:1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01506>
- 3.4. Chrastil, J. 1976. <<Colorimetric estimation of indole-3-acetic acid>>. *Analytical Biochemistry*,72(1–2):134–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90514-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90514-5)

### 4. Terminología

- 4.1. Auxina: compuestos reguladores del desarrollo de plantas, los cuales influyen en el crecimiento, división celular y formación de raíces (Castillo et al., 2005).
- 4.2. Ácido indolacético (IAA): es la auxina natural más importante, induce la deformación y el aumento de pelos radiculares, logrando una mayor captación de nutrientes y promoviendo el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Lara et al., 2011).
- 4.3. Colorimetría: pruebas analíticas que pueden ser cualitativa o cuantitativa para corroborar la presencia o ausencia de un compuesto y la cantidad en algunos casos mediante la intensidad de color luego de inducir la formación de un complejo colorido con el analito (Skoog, et al, 2015).
- 4.4. Espectrofotometría: técnica analítica basada en la ley de Lambert-Beer, en la cual se hacen mediciones de la absorción de radiación por muestras en regiones ultravioleta, visible e infrarroja del espectro electromagnético. Se utiliza principalmente para medir concentraciones. Es una técnica de bajo costo y con gran número de aplicaciones (Rocha y Teixeira, 2004).
- 4.5. Curva de Calibración: consiste en una representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito. Esta se genera midiendo la absorbancia de varias disoluciones que contienen concentraciones conocidas del

analito. Luego de graficar estos puntos, se obtiene la función de la curva que representa el comportamiento de los datos (Skoog, et al., 2015).

## 5. Documentos asociados

- 5.1. Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez Bravo, J., & Acosta Echevarría, M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de biología*, vol. 27, 2005.
- 5.2. Lara, C. C., Oviedo, L., & Romero, A. A. (2011). Aislados nativos con potencial en la producción de ácido indol acético para mejorar la agricultura. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 9( 1), 17-23.
- 5.3. Rocha, F. R., & Teixeira, L. S. (2004). Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Química nova*, 27(5), 807-812.
- 5.4. Rocha, F. R., & Teixeira, L. S. (2004). Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Química nova*, 27(5), 807-812.
- 5.5. Gorndon, S., & Weber, R. 1950. <<Colorimetric estimation of indole-3-acetic acid>>. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):192-195. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90514-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90514-5)

## 6. Seguridad

### 6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

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

### 6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

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

## 7. Equipo, materiales y reactivos

### 7.1. Equipo

- 7.1.1. Espectrofotometro
- 7.1.2. Celdas del espectrofotómetro
- 7.1.3. Mechero

- 7.1.4. Balanza analítica
- 7.1.5. Autoclave
- 7.1.6. Micropipetas

**7.2. Materiales/ Cristalería**

- 7.2.1. Puntas de micropipeta
- 7.2.2. Tubos falcon 50ml

**7.3. Reactivos**

- 7.3.1. Agua peptonada
- 7.3.2. L-Triptofano
- 7.3.3. Reactivo de Tang Bonner
  - 7.3.3.1. Ácido sulfúrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  - 7.3.3.2. Solución FeCl<sub>3</sub>
- 7.3.4. Estándar de Ácido Indolacético (IAA)

**7.4. Medicamentos**

- 7.4.1. No aplica

**7.5. Material biológico**

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

**8. Procedimiento**

8.1. Preparación del reactivo de Tang Bonner

- 8.1.1. 1ml de FeCl<sub>3</sub> (0.5M)
- 8.1.2. 50ml H<sub>2</sub>O
- 8.1.3. 30ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

8.2. Preparar el stock de IAA 50ug/ml con 0.5g de IAA en 10ml de etanol.

8.3. Curva de calibración IAA

- 8.3.1. Preparar siete disoluciones de IAA con diferentes concentraciones de las soluciones patrón. Realizarlas en tubos de 1.5ml.

Concnetración (ug/ml)	Caldo Nutritivo (ul)	ml de stock de IAA comercial (50ug/ml)
0	1000	0
5	1000	0.1
10	1000	0.2
15	1000	0.3
20	1000	0.4
25	1000	0.5
30	1000	0.6
35	1000	0.7

40	1000	0.8
45	1000	0.9
50	1000	1.0
75	500	0.75
100	500	1.0

- 8.3.2. En tubos de 1.5ml, coloque 500ul de cada cultivo a evaluar
- 8.3.3. En campana de extracción, agregue a cada tubo 1ml del reactivo de Tang Bonner
- 8.3.4. Cierre los tubos y mezcle por inversión
- 8.3.5. Incube en oscuridad por 15 minutos
- 8.3.6. Leer la muestra a una longitud de onda de 530 nm.
- 8.3.7. Utilizar como blanco caldo nutritivo
- 8.3.8. Colocar la muestra en el espectrofotómetro y realizar la lectura.
- 8.3.9. Repetir este procedimiento para las siete soluciones patrón de IAA.
- 8.3.10. Realizar una grafica con la absorbancia (eje y) y la concentración de IAA (eje x)
- 8.3.11. Determinar la función que relaciona la absorbancia con la concentración de IAA por medio de regresión lineal mediante ajuste de mínimos cuadrados.
- 8.4. Cuantificación de IAA producida por microorganismo de interés
- 8.4.1. De un cada colonia aislada en el POE 1 “Muestreo de Suelos, diluciones seriadas y aislamiento de microorganismos en el suelo”
- 8.4.2. Cultivo puro previamente identificado como productor de algún compuesto de interés como enzimas, sideroforos, fijadores de fosfatos, fijadores de nitrógeno, entre otros.
- 8.4.3. Cultivar el microorganismo de interés en 500ul de agua peptonada suplementado con L-triptofano[5mM] a 30°C.
- 8.4.4. **Incubar con agitación de 2 días (48 horas), 3 días (72 horas), 4 días (96 horas) y 5 días (120 horas) a 30°C y 250 rpm.** Luego de estos tiempos centrifugar a 10,000 g durante 12 minutos
- 8.4.5. En tubos de 1.5ml, coloque 500ul de cada cultivo a evaluar
- 8.4.6. En campana de extracción, agregue a cada tubo 1ml del reactivo de Tang Bonner
- 8.4.7. Cierre los tubos y mezcle por inversión
- 8.4.8. Incube en oscuridad por 15 minutos
- 8.4.9. Leer la muestra a una longitud de onda de 530 nm utilizando como blanco el agua peptonada suplementada con triptofano.
- 8.4.10. Calcular la concentración de IAA realizado una curva de calibración con el estándar de Ácido Indolacético.

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

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

8.4.11. Almacenar las colonias positivas (-80°C) e identificar las colonias que posean una producción de IAA adecuada

## 9. Esterilización de material

No aplica

## 10. Cálculos

10.1. Stock estandar IAA( 50ug/ml)

$$10ml\left(\frac{50ug}{ml}\right)\left(\frac{1g}{1000mg}\right) = 0.5 g \text{ estandar IAA en etanol}$$

10.2. Volumen de stock IAA a agregar a 1ml de medio para alcanzar la concentración de 5ug/ml

$$C1*V1=C2*V2$$

$$5ug/ml*1ml = 50ug/ml*V$$

$$V=0.1ml \text{ de stock IAA}$$

10.3. Volumen de stock IAA a agregar a 1ml de medio para alcanzar la concentración de 10ug/ml

$$C1*V1=C2*V2$$

$$10ug/ml*1ml = 50ug/ml*V$$

$$V=0.2ml \text{ de stock IAA}$$

10.4. Volumen de stock IAA a agregar a 1ml de medio para alcanzar la concentración de 15ug/ml

$$C1*V1=C2*V2$$

$$15ug/ml*1ml = 50ug/ml*V$$

$$V=0.3ml \text{ de stock IAA}$$

10.5. Volumen de stock IAA a agregar a 1ml de medio para alcanzar la concentración de 20ug/ml

$$C1*V1=C2*V2$$

$$20ug/ml*1ml = 50ug/ml*V$$

$$V=0.4ml \text{ de stock IAA}$$

10.6. Volumen de stock IAA a agregar a 1ml de medio para alcanzar la concentración de 25ug/ml

$$C1 * V1 = C2 * V2$$
$$25\text{ug/ml} * 1\text{ml} = 50\text{ug/ml} * V$$
$$V = 0.5\text{ml de stock IAA}$$

- 10.7. Volumen de stock IAA a agregar a 1ml de medio para alcanzar la concentración de 30ug/ml

$$C1 * V1 = C2 * V2$$
$$30\text{ug/ml} * 1\text{ml} = 50\text{ug/ml} * V$$
$$V = 0.6\text{ml de stock IAA}$$

- 10.8. Volumen de stock IAA a agregar a 1ml de medio para alcanzar la concentración de 35ug/ml

$$C1 * V1 = C2 * V2$$
$$35\text{ug/ml} * 1\text{ml} = 50\text{ug/ml} * V$$
$$V = 0.7\text{ml de stock IAA}$$

- 10.9. Volumen de stock IAA a agregar a 1ml de medio para alcanzar la concentración de 40ug/ml

$$C1 * V1 = C2 * V2$$
$$40\text{ug/ml} * 1\text{ml} = 50\text{ug/ml} * V$$
$$V = 0.8\text{ml de stock IAA}$$

- 10.10. Volumen de stock IAA a agregar a 1ml de medio para alcanzar la concentración de 45ug/ml

$$C1 * V1 = C2 * V2$$
$$45\text{ug/ml} * 1\text{ml} = 50\text{ug/ml} * V$$
$$V = 0.9\text{ml de stock IAA}$$

- 10.11. Volumen de stock IAA a agregar a 1ml de medio para alcanzar la concentración de 50ug/ml

$$C1 * V1 = C2 * V2$$
$$50\text{ug/ml} * 1\text{ml} = 50\text{ug/ml} * V$$
$$V = 1\text{ml de stock IAA}$$

- 10.12. Volumen de stock IAA a agregar a 1ml de medio para alcanzar la concentración de 75ug/ml

$$C1 * V1 = C2 * V2$$
$$75\text{ug/ml} * 1\text{ml} = 50\text{ug/ml} * V$$
$$V = 1.5\text{ml de stock IAA}$$

- 10.13. Volumen de stock IAA a agregar a 1ml de medio para alcanzar la concentración de 100ug/ml

$$C1 * V1 = C2 * V2$$
$$100\text{ug/ml} * 1\text{ml} = 50\text{ug/ml} * V$$
$$V = 2\text{ml de stock IAA}$$

- 10.14. Solución FeCl<sub>3</sub> 0.5M

$$5ml\left(\frac{1l}{1000ml}\right)\left(\frac{0.5M}{l}\right)\left(\frac{162.2g}{1mol}\right) = 0.4055g \text{ FeCl}_3 \text{ en agua}$$

10.15. Stock L-triptofano (10mM)

$$10ml\left(\frac{1l}{1000ml}\right)\left(\frac{0.01M}{l}\right)\left(\frac{204.23g}{1mol}\right) = 0.0204g \text{ L - triptofano}$$

10.16. Volumen de stock a agregar a 500ul de medio para alcanzar la concentración de 5mM de L-triptofano

$$C1*V1=C2*V2$$

$$0.005M*0.5ml = 0.01M*V$$

$$V=0.25ml \text{ de solución L-triptofano stock 10mM}$$

$$V=250ul \text{ de solución L-triptofano stock 10mM}$$

## 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.
- 11.3. Asegurarse de que la concentración de la muestra a determinar, esté dentro del rango de la curva de calibración.
- 11.4. Homogeneizar la mezcla del reactivo y la muestra de IAA antes de la medición de absorbancia y verificar que la muestra no presente turbidez.
- 11.5. Limpiar las cubetas del espectrofotómetro con kimwipes antes de la medición de absorbancia.
- 11.6. Verificar la correcta orientación de la cubeta dentro del espectrofotómetro.
- 11.7. Medir las muestras empezando desde el color más tenue hasta el más intenso, para evitar alteraciones en la medida de absorbancia causada por manchas residuales tras vaciar la cubeta del espectrofotómetro.

## 12. Anexos



Figura 1: Imagen de la curva de calibración realizada para la prueba. Se toma como positivo la coloración rosada de la solución.

## POE 9: Producción de gluconasas

Procedimiento Normado de Operación	POE <b>Proyecto Suelos Ingenio Magdalena</b>
	Páginas totales: 4
Producción de Gluconasas	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sanchez, Valeria Ochoa

### 1. Propósito

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

### 2. Aplicación

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

### 3. Referencias

- 3.1. Behera, B. C., Parida, S., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2014). Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from mangrove soil of Mahanadi river delta and their cellulase production ability. *Am J Microbiol Res*, 2(1), 41-46.
- 3.2. Benjumeda Muñoz, D. (2017). Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal: Mecanismos y Aplicaciones. Extraído de: <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/65140/BENJUMEA%20MUÑOZ%2C%20DANIEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- 3.3. Jha, Y., Dehury, B., Kumar, S., Chaurasia, A., Singh, U. B., Yadav, M. K., Angadi, U. B., Ranjan, R., Tripathy, M., Subramanian, R. B., Kumar, S., & Simal-Gandara, J. (2022). Delineation of molecular interactions of plant growth promoting bacteria induced  $\beta$ -1,3-glucanases and guanosine triphosphate ligand for antifungal response

in rice: a molecular dynamics approach. *Molecular biology reports*, 49(4), 2579–2589. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-07059-5>

- 3.4. Zia, M. A., Yasmin, H., Shair, F., Jabeen, Z., Mumtaz, S., Hayat, Z., ... & Hassan, M. N. (2019). glucanolytic rhizobacteria produce antifungal metabolites and elicit ROS scavenging system in sugarcane. *Sugar Tech*, 21(2), 244-255.

#### **4. Terminología**

- 4.1. Gluconasas: Las glucanasas son enzimas líticas que hidrolizan los b-glucanos de la pared celular de fitopatógenos de suelo (González, Infante, et al, 2011).

#### **5. Documentos asociados**

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

#### **6. Seguridad**

##### **6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:**

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

##### **6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio**

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

#### **7. Equipo, materiales y reactivos**

##### **7.1. Equipo**

- 7.1.1. Incubadora  
7.1.2. Refrigeradora  
7.1.3. Balanza analítica

- 7.1.4. Micropipetas
- 7.1.5. Espatula
- 7.1.6. Autoclave
- 7.1.7. Campana de flujo laminar
- 7.1.8. Sistema de gas
- 7.1.9. Estufa con agitador magnético
- 7.1.10. Medidor de pH.

## **7.2. Materiales/ Cristalería**

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

## **7.3. Reactivos**

- 7.3.1. Agar microbiológico.
- 7.3.2. Laminarin
- 7.3.3. CMC (carboximetil celulosa)
- 7.3.4. Almidón
- 7.3.5. Congo Red (Rojo de Congo)
- 7.3.6. Laminarina

## **7.4. Medicamentos**

- 7.4.1. N/A

## **7.5. Material biológico**

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

## **8. Procedimiento**

- 8.1. Preparar una solución de NaCl a 1M.
- 8.2. Preparación del medio
  - 8.2.1. Pesar (Preparación para 1 litro)
    - 8.2.1.1. Congo Red del 0.02%-0.1%
    - 8.2.1.2. 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
    - 8.2.1.3. 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
    - 8.2.1.4. 0.2 MgSO<sub>4</sub>
    - 8.2.1.5. 1 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>
    - 8.2.1.6. 10g de CMC
    - 8.2.1.7. Laminarina 0.2% w/v (algunas recetas prescinden de esto)
    - 8.2.1.8. Almidón (algunas recetas prescinden de esto)
    - 8.2.1.9. 20 gr de agar.

- 8.2.2. Diluir los ingredientes en agua destilada.
  - 8.2.3. Calentar hasta que hierva con un agitador magnético hasta que se disuelvan todos los ingredientes.
  - 8.2.4. Medir pH y asegurarse que este a 7.
  - 8.2.5. Esterilizar
  - 8.2.6. Enfriar a 45-50°C y verter en placas Petri.
  - 8.2.7. Dejar enfriar.
  - 8.2.8. Guardar en refrigeradora hasta su uso.
- 8.3. Inoculación
- 8.3.1. Segmentar la placa Petri en 12 e inocular con 5ul de ON.
  - 8.3.2. Seguir el procedimiento de POE 1 "Muestreo de Suelos, diluciones seriadas y aislamiento de microorganismos en el suelo" en el apartado de " Inoculación en agares selectivos y diferenciales"
  - 8.3.3. Incubar a 30-37°C por 48 hrs (Pueden ser hasta 4 días).
  - 8.3.4. La producción de gluconasas es determinada midiendo el diametro del halo alrededor de las colonias después de desteñirlas.

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

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

**9. Esterilización de material**

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

**10. Cálculos**

N/A

**11. Control de calidad**

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

**12. Anexos**



Figura 1: Las colonias que presentaban un halo rojizo alrededor.

POE 9: Producción de quitinasas

Procedimiento Normado de Operación	POE <b>Proyecto Suelos Ingenio Magdalena</b>
	Páginas totales: 3
Producción de Quitinasas	Autores: Isabella García Caffaro, Aouda Sanchez, Valeria Ochoa

**1. Propósito**

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

**2. Aplicación**

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

**3. Referencias**

- 3.1. N Murthy, B Bleakley. (2012) Simplified Method of Preparing Colloidal Chitin Used For Screening of Chitinase- Producing Microorganisms. *The Internet Journal of Microbiology*. Volume 10 Number 2.
- 3.2. Sastoque Cala, E.L (2005). Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial bioconductor.

- 3.3. Viswanathan, R., & Samiyappan, R. (2001). Antifungal activity of chitinases produced by some fluorescent pseudomonads against *Colletotrichum falcatum* Went causing red rot disease in sugarcane. *Microbiological Research*, 155(4), 309-314.

#### **4. Terminología**

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

#### **5. Documentos asociados**

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

#### **6. Seguridad**

##### **6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:**

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

##### **6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio**

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

#### **7. Equipo, materiales y reactivos**

## **7.1. Equipo**

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

## **7.2. Materiales/ Cristalería**

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

## **7.3. Reactivos**

- 7.3.1. Agar microbiológico
- 7.3.2. Quitina de camarón
- 7.3.3.  $K_2HPO_4$
- 7.3.4.  $KH_2PO_4$
- 7.3.5.  $MgSO_4 \cdot 5H_2O$
- 7.3.6.  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
- 7.3.7.  $ZnSO_4$
- 7.3.8.  $MnCl_2$

## **7.4. Medicamentos**

- 7.4.1. N/A

## **7.5. Material biológico**

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

## **8. Procedimiento**

- 8.1. Preparación de quitina húmeda
  - 8.1.1. Pesar la quitina de camarón.
  - 8.1.2. Se trató con 150 ml de HCL (12M) en un beaker de 1000 ml. El HCL se debe agregar despacio y se revuelve cada 5 min por 60 min bajo campana a temperatura ambiente.
  - 8.1.3. Centrifugar y subir el pH. Si este no sube con agua, se puede utilizar una solución ligeramente alcalina.
  - 8.1.4. Filtrar por medio de filtrado al vacío con filtro Whatmann.
  - 8.1.5. Colectar el precipitado.

8.1.6. Esterilizar en autoclave a temperatura y presión estándar (STP) (15 psi, 20 minutos, 121°C).

8.1.7. Guardar a 4°C grados hasta su uso.

## 8.2. Pesar

8.2.1. 0.3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,

8.2.2. 4 g de NaCl

8.2.3. 0.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

8.2.4. 0.5 g MgSO<sub>4</sub> X 7H<sub>2</sub>O

8.2.5. Quitina coloidal húmeda (1%)

8.2.6. Agar al 1.5%

8.2.7. Diluir los ingredientes en agua destilada.

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

8.2.9. Medir pH y asegurarse que este a 7.

8.2.10. Esterilizar

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

8.2.12. Dejar enfriar.

8.2.13. Guardar en refrigeradora hasta su uso.

## 8.3. Inoculación

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

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

8.3.3. Incubar a 30°C por 3 días.

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

## 9. Esterilización de material

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

## 10. Cálculos

No aplica

## 11. Control de calidad

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

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

## 12. Anexos

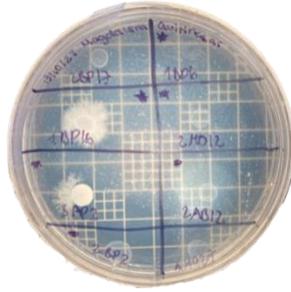


Figura 1: Se toma como positivo la aparición de un halo transparente alrededor de la colonia. Como se observa con la colonia de hasta abajo a la izquierda en la imagen.



<b>ID Muestra</b>	<b>VARIEDAD</b>	<b>TCH</b>	<b>MO %</b>	<b>pH</b>	<b>Orden Suelo</b>	<b>Tipo Fertilización</b>	<b>Fuente Nitrógeno</b>	<b>Ingredientes activos de Herbicidas (al Suelo)</b>
3AP	VARIAS	135	NA	6.31	Andisoles	Fertivinaza	Vinaza + Nitrato de Amonio + Sulfato de Amonio	S-metolachlor, Flumioxazin, Diuron, Ametrina, 2,4-D
4AP	CP 01-1564	131	NA	6.60	Mollisoles	Fertivinaza	Vinaza + Nitrato de Amonio + Sulfato de Amonio	No aplicado Preemergente
4MO	SP 716161	82	6.78	6.90	Mollisoles	Fertivinaza	Vinaza + Nitrato de Amonio + Sulfato de Amonio	Pendimentalina, Ametrina, Mesotrione
5MO	CG 02-163	95	6.78	5.87	Inceptisoles	Fertivinaza	Vinaza + Nitrato de Amonio + Sulfato de Amonio	Indaziflam, Asulam, Trifloxysulfuron
6MO	CP 01-1341	116	6.78	5.90	Andisoles	Fertivinaza	Vinaza + Nitrato de Amonio + Sulfato de Amonio	Pendimentalina, Ametrina, Atrazina, 2,4-D
3AB	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4AB	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5AP	CP 722086	163	NA	6.92	Mollisoles	Finca Entregada	Finca Entregada	NA
1CA	CG02-163	100	NA	7.19	Entisoles	Fertivinaza	Vinaza + Nitrato de Amonio + Sulfato de Amonio	Asulam, Trifloxysulfuron

Cuadro 9: Descripción de la morfología de las cepas aisladas de distintos tipos de muestra en cultivos de caña de azúcar.

<b>ID cepa</b>	<b>Morfología colonia</b>		<b>Tinción Gram</b>	
	<b>Color</b>	<b>Descripción colonia</b>	<b>Morfología</b>	<b>Tinción</b>
1AB1	Transparente	Forma irregular, no presenta elevación, es un poco brillante	cocos	positivos

ID cepa	Morfología colonia		Tinción Gram	
	Color	Descripción colonia	Morfología	Tinción
1AB2	Blanco	Forma circular, brillante, elevado	cocos	negativos
1AB5	Blanco/amarillo	Redonda, varias colonias juntas, pequeñas	bacilos	positivos
1AB10	Blanco	Redonda, blanca, brillante, con elevación	cocos	positivos
1AB11	Blanco	Redonda, súper brillante, elevada	bacilos	negativos
1AB12	Blanco/transparente	Borde irregular, como transparente alrededor y blanco en el centro	bacilos	negativos
1AB13	Blanco	Pequeña, redonda, con un poco de elevación	bacilos	negativos
1AB14	Blanco	Forma irregular, como filamentososa, sin elevación	bacilos	positivos
1AB16	Transparente	Redonda, brillante	cocos	negativos
1AB17	Blanca	Forma irregular, brillante, con borde medio transparente	cocos	negativos
1AB20	Blanco	Redonda, brillante con un pequeño borde irregular transparente	bacilos	negativos
1AB21	Blanco	Forma irregular, brillante	bacilos	negativos
1AB25	Blanco opaco	Redonda, brillante	cocos	negativos
1AB27	Blanca	Brillante, redonda con borde transparente	bacilos	negativos
1MO2	Blanco	Filamentososa. Borde irregular con bordes de “tentáculos”. “Nubecita”. Elevación	estreptobacilos	positivos
1MO5	Amarilla	Redonda. Borde liso. “Ligosa”. Plana	cocos	negativos
1MO6	Blanca	Ovalada, borde irregular. Umbilicada. Centro con elevación en “estrella”. Halo transparente. Textura rugosa y apariencia seca.	bacilos	positivos
1MO7	Blanca	Redonda de borde irregular, con “anillos”. Plana y de apariencia húmeda. Plana y de apariencia húmeda. No son evidentes los anillos que se habían observado antes.	bacilos	negativos
1MO10	Blanca	Redonda de borde regular, plana, ligosa. Blanca-transparente.	bacilos	positivos
1MO11	Blanca-transparente	Forma ovalada irregular. Plana. Blanca-transparente. Ligosa y con elevación.	cocos	positivos
1MO13	Amarilla	Borde irregular con “ramas”. Áreas transparentes por el patrón de la superficie (con “estrellas”). Apariencia seca, “plástica”, puntos amarillos separados.	estreptobacilos	positivos

ID cepa	Morfología colonia		Tinción Gram	
	Color	Descripción colonia	Morfología	Tinción
1MO14	Amarillo pálido a balnco en la orilla.	Redonda borde irregular. Elevación plana-convexa. Ligosa.	cocos	negativos
1MO17	Verde claro	Redonda de bordes irregulares. Con “anillos” blancos. Plana y ligosa.	cocos	negativos
1MO19	Blanca/ ligosa	Redonda de borde liso. Centro transparente, textura rugosa. Orilla delgada blanca y ligosa.	bacilos	positivos
1MO21	Blanco	Filamentosa. Textura de algodón de azúcar. Transparente. Filamentosa.	bacilos	negativos
1MO23	Transparente Blanca	Borde irregular.	estreptobacilos	negativos
1MO25	Blanca / crema	Redonda de borde liso. Convexa, brillante.	bacilos	positivos
1MO26	Transparente	Redonda de borde liso. Plana y lisa. Blanca-transparente. Ligosa.	bacilos	positivos
1MO27	Naraja “peach” / Beige	Forma irregular a ovalada. Borde irregular. Centro de color y alrededor blanco-transparente.	bacilococos	negativos
1AP1	Blanca translucida	Peludita con colochos.	estreptobacilos	positivos
1AP3	Rosadito/anaranjado pálido	Redonda lisa pequeña.	cocos	negativos
1AP4	Blanca opaca con un anillo en el centro	Redonda lisa pequeña.	bacilos	positivos
1AP6	Rosada fuerte	Redonda lisa pequeña.	bacilos	positivos
1AP10	blanca	Esponjosa, tiende a ser peluda	cocos	negativos
1AP11	blanca	Borde dentado, esponjosa con surcos.	bacilos	positivos
1AP13	transparente con centro blanco redondo	Borde dentado como que fuera estrella.	bacilos	negativos
1AP14	transparente con centro blanco redondo	Redonda pequeña.	bacilos	positivos
1AP15	blanca	Esponjosa.	cocos	negativos
1AP17	anaranjada	Pequeña redonda.	estretococos	positivos
1AP18	medio transparente blanca y amarilla	Redonda pequeña.	cocos	positivos
1AP19	blanca lechosa	Borde dentado y forma de pseudo corazón.	bacilos	positivos

ID cepa	Morfología colonia		Tinción Gram	
	Color	Descripción colonia	Morfología	Tinción
1AP20	medio transparente blanca	Borde liso con forma ovalada, ligosa	bacilos	negativos
1AP21	blanca	Redonda pequeña	bacilos	positivos
1AP22	blanca	“Peluda”	cocos	positivos
1AP23	anaranjada	Con bordes dentados, ligosa, abultadita	cocos	negativos
1AP24	amarilla	Bordes lisos, ligosa, abultadita	cocos	negativos
1AP26	blanca	Convexa, textura de línea como de nube. ligosa	estreptobacilos	positivos
1AP27	medio transparente blanca	Redonda pequeña	bacilos	positivos
1BP1	Color Mostaza	Borde definido	bacilos	positivos
1BP2	Amarillo	Borde definido, se ve una textura lista.	cocos	negativos
1BP3	Blanco fantasma	Borde irregular, textura granulosa	estreptobacilos	negativos
1BP6	Blanco/grisáceo transparente/ lechoso	Borde definido con forma de círculo. Textura aparente lisa.	bacilos	negativos
1BP7	Blanco transparente	Borde definido circular. Textura lisa y ligosa	bacilos	positivos
1BP8	Blanco transparente	Borde definido circular, con gránulos finos. textura lisa y ligosa	bacilos	negativos
1BP10	Blanco	Borde regular y definido. Forma circular.	cocos	negativos
1BP11	Amarillo transparente	Borde irregular con textura lisa. Tiene forma de flor.	cocos	negativos
1BP12	Rosado pálido	Borde definido circular con textura lisa.	bacilos	negativos
1BP13	Blanco	Borde regular y definido. Forma circular.	bacilos	negativos
1BP16	Blanco	Varios círculos sin límite definido.	bacilos	positivos
1BP18	Blanco/transparente	Es circular con borde irregular.	bacilos	negativos
1BP19	Blanco	Es circular con borde definido.	bacilos	negativos
1BP22	Blanco translúcido	Son círculos definidos pequeños.	cocos	negativos
1BP23	Rosada en el centro y borde blanco	Círculos con borde definido con dos colores rosado pálido en el centro y blanco en borde	bacilos	positivos
2MO1	Blanco	Forma irregular, sin elevación, textura áspera	estreptobacilos	negativos

ID cepa	Morfología colonia		Tinción Gram	
	Color	Descripción colonia	Morfología	Tinción
2MO2	Blanco, con borde transparente	Rugosa, forma irregular, borde transparente filamentoso, no presenta elevación.	bacilos	positivos
2MO3	Amarillo	Suave reluciente, forma circular, borde completo, elevado.	cocos	negativos
2MO4	naranja	suave reluciente, forma circular, borde completo, no está elevado, muy pequeña.	bacilos	negativos
2MO5	blanca	Brillante, redonda, sin borde, pequeña.	cocos	positivos
2MO6	amarillo pálido	Sin brillo, forma circular con borde completo transparente y color amarillo en el centro, ligera elevación.	bacilos	negativos
2MO7	blanco	Reluciente, forma circular con bordes ligeramente irregulares, se observa doble borde, sin elevación.	bacilos	positivos
2MO8	blanco	Opaca, suave, forma circular, con borde completo, sin elevación.	estafilicocos	positivos
2MO9	blanco	Forma circular, con borde doble completo, sin elevación,	bacilos	negativos
2MO10	blanco	Forma circular, con borde doble, el segundo es más marcado, sin elevación, ligosa.	bacilos	positivos
2MO11	naranja fuerte	Forma circular, con borde completo, con ligera elevación,	bacilos	negativos
2MO12	blanco	Forma circular con borde completo transparente y blanco dentro de, sin elevación, ligosa.	bacilos	negativos
2MO14	blanco	Rugosa, forma irregular, con bordes lobate transparentes, en el centro blanco, sin elevación.	bacilos	positivos
2MO15	blanco	Brillante, forma redonda, opaca, lisa, elevada.	bacilos	negativos
2MO16	blanco	Brillante, forma redonda, con bordes enteros, opaca, elevada y con varias colonias juntas.	cocos	positivos
3AP1	Blanco	Forma nubosa en los bordes con ramificaciones curvadas menos densas que en el centro.	cocos	negativos
3AP2	Blanco	Ramificaciones colochas densas con borde transparente y ramificaciones mas pequeñas alrededor como árbol.	bacilos	positivos
3AP3	Blanco	Circular con borde liso y color uniforme en toda la colonia.	bacilos	negativos
3AP4	Blanco amarilloso	Circular con borde liso y con color uniforme.	bacilos	positivos
3AP5	Blanco amarillo	Borde con forma de flor y color sólido.	cocos	negativos

ID cepa	Morfología colonia		Tinción Gram	
	Color	Descripción colonia	Morfología	Tinción
3AP6	Blanco	Circular con borde rugoso mas transparente que el centro.	bacilos	positivos
3AP8	Blanco	Circular con aros de distintas opacidades de blanco con el ultimo borde transparente ondulado y el centro sólido.	estreptococos	positivos
3AP9	Blanco transparente	Circular blanco transparente con el centro de punto transparente	cocos	positivos
3AP12	blanco	circular irregular con bordes rugosos y centro sólido, sin elevación y lisa.	bacilos	positivos
3AP15	transparente	forma irregular de flor completamente transparente.	cocos	negativos
3AP16	amarillo transparente	circular con borde liso delgado transparente y solidas.	cocos	negativos
3AP24	Blanca	Borde irregular. Centro opaco y halo transparente, crecimiento de "líneas".	bacilos	positivos
3AP25	Blanca-transparente.	Irregular. Halo opaco y líneas transparentes.	bacilos	positivos
3AP26	Blanca	Circular blanca solida con bordes ondulados y de color uniforma en toda la colonia.	bacilos	positivos
4MO1	Transparente -lechosa	Irregular "Desparramada".	bacilos	positivos
4MO3	Beige, brillante	Regular, redonda. Elevación convexa.	cocos	negativos
4MO4	Blanca	Irregular, ovalado. Textura seca. Sin elevación.	bacilos	positivos
4MO5	Blanca-lechosa	Borde liso. Forma de rayón.	bacilos	positivos
4MO6	Blanca. ligeramente transparente	Borde regular y liso, redonda. Elevación convexa.	cocos	negativos
4MO8	Blanca	Filamentosa, "colocha".	bacilos	negativos
4MO9	Blanca	Borde liso, redonda regular. Seca.	bacilos	negativos
4MO10	Amarilla-blanca	Borde regular, brillante, circular	bacilos	negativos
4MO11	Blanca-lechosa	Irregular, forma de "flor", centro tumultuoso.	bacilos	positivos
4BP1	Amarilla transparente con toques naranjas	Redonda, brillante.	cocos	negativos
4BP2	Blanca mate	Colocha, con filamento principal del que salen los colochos.	bacilos	positivos
4BP3	Blancas, opacas	Planas, sin brillo, bordes irregulares.	bacilos	positivos
4BP4	Blancas transparentes	Colochos pequeños sin filamento principal.	bacilos	positivos
4BP6	Transparentosa	Pequeñas y redondas.	bacilos	positivos

ID cepa	Morfología colonia		Tinción Gram	
	Color	Descripción colonia	Morfología	Tinción
4BP7	Amarilla Brillante	Redonda, brillante con relieve	bacilos	positivos
4BP8	Blanca opaca	Orilla irregular, plana y opaca	bacilos	positivos
4BP9	Transparente	Pequeños círculos planos	bacilos	positivos
6MO1	Color blanco	Aparente textura lisa, con borde no tan definido circular.	bacilos	positivos
6MO3	Color amarillento, huevo	Circular, de textura lechosa	cocos	negativos
6MO4	Color blanco	Tiene forma circular sin borde definido, hay una parte central con color más intenso pero la longitud de esta parte al borde es mínima.	bacilos	positivos
6MO5	Blanca	No existe figura aparente, ni bordes definidos, sin embargo, es de color uniforme.	bacilos	positivos
6MO6	Blanco transparente	Es colocha, tiene partes que son más transparentes que otras. CUIDADO AL AISLAR.	cocos	positivos
6MO7	Color blanco intenso	Es circular bien definida de color uniforme	cocos	positivos
6MO8	Blanco	Nube de colochos todos en la misma dirección con forma de curva	bacilos	positivos
2AB1	Amarillosa transparente (contraluz se ve de ese color)	Lisa babosa con bordes ondulados y centro difuminado	bacilos	negativos
2AB2	Amarillo oscura	Redonda pequeña brillante con bordes definidos, babosa	bacilos	negativos
2AB3	Transparente blanca	Redonda con centro definido, lisa	bacilos	negativos
2AB4	Blanca transparente	Forma irregular con bordes más oscuros que el resto de la colonia, lisa	bacilos	positivos
2AB5	Blanca transparente	Irregular con bordes ondulados sin centro definido. Lisa	bacilos	negativos
2AB6	Blanca	Redondo con aura mas transparente y textura aparenta rugosa	bacilos	positivos
2AB7	Blanca	Blanca solida redonda con bordes definidos y color uniforme. Lisa	bacilos	positivos
2AB8	Blanca transparente	Irregular con centro notable pero difuminado y colonia transparente con borde ondulado y textura lisa	bacilos	negativos
2AB9	Blanca	Ramificaciones entre la 5 (posible misma bacteria revisar en aislamiento)	bacilos	negativos
2AB10	Blanca	Nube de colochos densa tipo anzuelo con el borde menos denso de colochos	bacilos	positivos

ID cepa	Morfología colonia		Tinción Gram	
	Color	Descripción colonia	Morfología	Tinción
2AB11	Amarillo transparente (contra luz)	Nube con color uniforme y borde con gotas dispersando hacia afuera, textura rugosa.	bacilos	negativos
2AB12	Transparente	Círculos pequeños con borde textura babosa.	bacilos	negativos
2AB13	Amarillo transparente	Circular con borde de flor lisa babosa, con orilla de color mas fuerte.	bacilos	negativos
2AB14	Amarillo transparente	Circular con textura granulosa con centro definido y aura transparente (puede ser igual a la 15 revisar en aislamiento).	cocobacilos	negativos
2AB15	Amarillo transparente	Nube irregular con orilla en forma de gotitas y textura rugosas.	bacilos	negativos
2AB16	Blanco amarilloso	Redonda con color uniforme y centro notable.	cocos	negativos
2AB17	Blanca transparente	Irregular opaca lisa con aura transparente y borde de color mas fuerte.	bacilos	positivos
2AB18	Amarillo transparente	Circular poco babosa brillante con borde transparente.	bacilos	negativos
1CA1	Blanco transparente	No tiene borde definido, tiene forma de colochos con diferentes intensidades de color.	bacilos	positivos
1CA2	amarilla	Círculo definido amarillo con aparato textura lisa.	bacilos	negativos
1CA3	blanca	Circulo definido blanco con uniformidad de color.	cocos	negativos
1CA4	Transparente blanco	Parece ser de forma "circular" con bordes definidos y color regular.	bacilos	positivos
1CA8	Color huevo	Círculo grande de borde definido y textura lisa, color uniforme.	bacilos	positivos
4AB1	Blanca transparentosa	Filamentosa, los filamentos salen de un punto central.	bacilos	negativos
4AB2	Blanca transparentosa	Redonda transparente, brillante.	bacilos	positivos
4AB3	Blanca, mas oscura que las demás	Con relieve, lechosa, redonda.	cocos	negativos
4AB5	Blanca	Redonda, plana.	estreptobacilos	positivos
4AB6	Blanca lechosa	Blanca lechosa, creció en toda la placa, planas.	estreptobacilos	positivos
4AB7	Blancas	Planas, brillantes.	bacilos	positivos
3AB1	Blanca, transparente	Colocha, plana.	bacilos	positivos
3AB2	Blanca con tonos naranja	Irregular, relieve, pequeña.	cocos	negativos
3AB4	Blanca, bordes transparentes	Redonda y más oscura por dentro, halo transparente.	bacilos	negativos

ID cepa	Morfología colonia		Tinción Gram	
	Color	Descripción colonia	Morfología	Tinción
3AB6	Naranja/Amarillo	Redonda, brillante, relieve.	bacilos	positivos
3AB7	Naranja/Amarillo	Brillosa, redonda grande, plana.	cocos	negativos
3AB9	Blanco transparente	Nube de colochos con ramificaciones delgadas largas onduladas.	bacilos	positivos
5AP1	Blanca transparente	Centro y bordes más claros, con relieve.	bacilos	positivos
5AP2	Blanca amarillenta brillante	Redonda pequeña, brillante, con poco relieve.	bacilos	positivos
5AP3	Transparente	Transparente, con bordes irregulares y grande.	bacilos	positivos
5AP4	Blanca transparente	Colochas, plana.	bacilos	positivos
5AP5	Anaranjada	Redondas, pequeña, brillante.	bacilos	negativos
5AP6	Blanca	Apoca, redonda, céntrica.	bacilos	positivos
5AP7	Blanca transparente	Peludita, bordes irregulares.	estreptobacilos	positivos
5AP8	Blancuzca	Poco relieve, redonda, concéntrica.	bacilos	positivos
5AP9	Blanca	Bordes transparentos, ovalada.	bacilos	positivos
3MO1	Blanca transparente	Con filamentos “peludos”, transparente.	bacilos	positivos
3MO2	Blanca	Opaca, redonda, bordes lisos.	bacilos	positivos
3MO3	Transparente	Plana, sin relieve, bordes irregulares.	bacilos	positivos
3MO4	Transparente	Plana, se expande como mancha.	bacilos	positivos
3MO5	Opaca transparente	Crece como mancha.	bacilos	negativos
3MO6	Blanca	Pequeño, casi punto, con relieve.	cocos	negativos
3MO7	Blanca transparente	Crece como mancha, plana.	bacilos	positivos
3MO8	Transparente	Con forma de “estrella” con filamentos que salen de un mismo centro.	bacilos	negativos
3MO9	Blanca	En contraluz se observan diferentes halos.	bacilos	positivos
3BP1	Blanco	opaca, de forma irregular.	bacilos	positivos
3BP2	Blanco	Redonda, un poco más opaca, parecida a 3BP3.	bacilos	positivos
3BP5	Blanco/amarillo	redonda, creció sobre otra colonia.	cocos	negativos
3BP8	Blanco	forma irregular, brillante, sin elevación.	bacilos	positivos

ID cepa	Morfología colonia		Tinción Gram	
	Color	Descripción colonia	Morfología	Tinción
3BP9	Blanco	Forma irregular, textura aparentemente lisa.	bacilos	positivos
3BP12	Blanco	Redonda, pequeña, brillante, poca elevación.	bacilos	positivos
4AP1	Blanca	Colocha y en la punta de los filamentos más transparente.	cocos	negativos
4AP2	Blanca, amarillenta	Redonda, con bordes definidos, brillante.	bacilos	positivos
4AP3	Transparente opaca	Bordes irregulares, crece como mancha y parecen “tentáculos” gordos.	bacilos	positivos
4AP4	Transparente	Bordes irregulares, en el centro se observa que salen como “tentáculos” gordos.	bacilos	negativos
4AP5	Transparente	Forma de “estrella de mar”. El crecimiento es concéntrico.	bacilos	negativos
4AP7	Transparente blancuzca	Bordes irregulares, crece como mancha de agua.	bacilos	negativos
4AP9	Transparente	Crece como macha, bordes con “tentaculos” delgados.	bacilos	negativos
4AP10	Blanca	Colocha, crecimiento concéntrico.	bacilos	positivos
4AP12	Blanca	Redonda, como con puntitos. Plana.	bacilos	negativos
4AP13	Naranja	Viscosa	cocos	positivos
2AP1	Naranja con borde melocotón	Borde regular y lisa. Plana.	bacilos	positivos
2AP2	Amarillo pálido	Borde regular, circular. Lisa y plana.	bacilos	positivos
2AP3	Blanca-transparente	Filamentosa.	bacilos	positivos
2AP4	Lechosa	Borde irregular.	bacilos	positivos
2AP5	Blanca-transparente	Ovalada y borde irregular. Plana. Apariencia “seca”.	bacilos	positivos
2AP6	Blanca	Circular con borde irregular. Plana y muy seca.	estreptobacilos	positivos
2AP7	Transparente	Circular, pequeña. Borde regular.	bacilos	positivos
2AP8	Amarilla	Lineal (puede ser por estar al borde de la placa). Ligeramente brillante. Lisa.	cocos	positivos
2AP9	Blanca	Lineal (puede ser por estar al borde de la placa) y rizoide.	bacilos	positivos
2AP10	Blanca.	Borde irregular. Plana. De apariencia seca.	bacilos	positivos
2AP12	Transparente	Irregular. Extensa.	cocos	negativos

ID cepa	Morfología colonia		Tinción Gram	
	Color	Descripción colonia	Morfología	Tinción
2AP13	Blanco	Línea. Borde liso.	bacilos	positivos
2AP16	Blanca con tonos naranja	Pequeña, círculos.	bacilos	positivos
2AP17	Naranja	Viscosa.	cocos	positivos
2AP18	Blanca amarillenta	Viscosa, turbia.	bacilos	negativos
5MO1	Blanca	Lisa babosa con color uniforme y borde definido.	cocos	negativos
5MO2	Blanco amarilloso	Transparente con apariencia granulosa y bordes definidos.	bacilos	positivos
5MO3	Beige	Circular con un aro transparente en medio de la colonia y bordes difuminados.	bacilos	negativos
5MO4	Blanco transparente	Forma irregular con puntos negros en la colonia dispersos (revisar si es de la bacteria o algo extra) textura lisa y bordes definidos.	bacilos	positivos
5MO6	Beige	Circular con el centro de color solido con aura transparente definida.	bacilos	positivos
5MO7	Blanco oscuro	Circular con color uniforme y bordes definidos transparentes. Babosa brillante.	cocos	negativos
5MO11	Blanco verdoso	Forma irregular circular con bordes definidos transparente.	bacilos	positivos
5MO12	Amarillo transparente	Forma de esqueleto con tentáculos y en el centro una línea de color solido de donde crece. Bordes definidos y lisa.	bacilos	negativos
5MO13	Blanca amarillosa	Forma irregular con borde transparente y en el centro de la colonia formas como aros delgados de color mas fuerte.	bacilos	negativos
5MO14	Transparente	Figura irregular se extiende por la mitad de la placa (revisar en aislamiento).	cocos	negativos
2BP1	Amarillo pálido	Borde irregular. Colonias pequeñas. Brillante. Elevada, convexa.	bacilos	negativos
2BP2	Transparente, ligeramente blanca	Irregular. Brillante.	cocos	negativos
2BP3	Blanca lechosa. Borde transparente.	Circular. Borde regular, pero color blanco del centro de borde irregular. Brilliosa. Plana.	cocos	positivos
2BP4	Lechosa (blanco-amarillo)	Circular, borde regular. Elevada. Brillante. Más transparencia en el borde.	bacilos	positivos
2BP8	Blanca lechosa	Irregular. Plana.	bacilos	positivos

ID cepa	Morfología colonia		Tinción Gram	
	Color	Descripción colonia	Morfología	Tinción
2BP10	Amarilla	Borde irregular. Centro con color más intenso. Elevado. Brillante.	bacilos	positivos
2BP12	Blanca	Rizoide. "Copo".	bacilos	negativos
2BP13	Transparente.	Circular, borde regular. Muy pequeña para observar elevación.	cocos	negativos
2BP14	Transparente	Irregular. Superficie rugosa, ligeramente blanca.	bacilos	positivos
2BP15	Blanca	En puntos. circular. Borde regular.	cocos	negativos
2BP16	Transparente-blanca	Irregular. Como manchón, pero podría ser rizoide.	bacilos	positivos
2BP17	Transparente-blanca	Irregular, pero de la impresión de ser rizoide. Muy extendida en la placa.	bacilos	positivos

Cuadro 10: Cantidad de cepas aisladas por muestra.

ID de la muestra	Cantidad de cepas aisladas
1AB	14
2AB	18
3AB	6
4AB	6
1MO	15
2MO	15
3MO	9
4MO	9
5MO	10
6MO	7
1AP	19
2AP	15
3AP	14

4AP	10
5AP	9
1BP	15
2BP	12
3BP	6
4BP	8
1CA	5
<hr/>	
Total de cepas aisladas:	222
<hr/>	

Cuadro 11: Tabla con características promotoras del crecimiento por cepa.

ID_cepaa	Solubilización de fosfatos	Solubilización de potasio	Producción de ACC desaminasa	Producción de Proteasas	Posible producción de silicatos	Producción de Lipasas	Producción de IAA	Producción de quitinasas	Producción de gluconasas	King B fluorescencia	King Be crecimiento	Trypan Blue	Prueba de Nessler	Características promotoras
1AB1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	7
1AB2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	7
1AB5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	7
1AB10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
1AB11	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	9
1AB12	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	7
1AB13	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
1AB14	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
1AB16	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
1AB17	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	7
1AB20	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	7
1AB21	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	9
1AB25	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	7
1AB27	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
1MO2	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	5
1MO5	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	6

ID_cepaa	Solubilización de fosfatos	Solubilización de potasio	Producción de ACC desaminasa	Producción de Proteasas	Posible producción de silicatos	Producción de Lipasas	Producción de IAA	Producción de quitinasas	Producción de gluconasas	King B fluorescencia	King Be crecimiento	Trypan Blue	Prueba de Nessler	Características promotoras
1MO6	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	6
1MO7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
1MO10	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	7
1MO11	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	6
1MO13	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	6
1MO14	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
1MO17	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	5
1MO19	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	5
1MO21	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	4
1MO23	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	5
1MO25	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	5
1MO26	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	5
1MO27	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	9
1AP1	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	6
1AP3	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	5
1AP4	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	5
1AP6	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	4
1AP10	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	5
1AP11	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	6

ID_cepaa	Solubilización de fosfatos	Solubilización de potasio	Producción de ACC desaminasa	Producción de Proteasas	Posible producción de silicatos	Producción de Lipasas	Producción de IAA	Producción de quitinasas	Producción de gluconasas	King B fluorescencia	King Be crecimiento	Trypan Blue	Prueba de Nessler	Características promotoras
1AP13	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	3
1AP14	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2
1AP15	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	4
1AP17	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	4
1AP18	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	9
1AP19	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	5
1AP20	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	7
1AP21	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	3
1AP22	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	6
1AP23	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	7
1AP24	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	++
1AP26	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	6
1AP27	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
1BP1	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	6
1BP2	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	8
1BP3	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	8
1BP6	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	7
1BP7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
1BP8	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	5

ID_cepaa	Solubilización de fosfatos	Solubilización de potasio	Producción de ACC desaminasa	Producción de Proteasas	Posible producción de silicatos	Producción de Lipasas	Producción de IAA	Producción de quitinasas	Producción de gluconasas	King B fluorescencia	King Be crecimiento	Trypan Blue	Prueba de Nessler	Características promotoras
1BP10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
1BP11	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
1BP12	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	9
1BP13	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	7
1BP16	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	3
1BP18	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
1BP19	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	9
1BP22	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	9
1BP23	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
2MO1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	9
2MO2	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	9
2MO3	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	8
2MO4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
2MO5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	9
2MO6	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
2MO7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
2MO8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
2MO9	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
2MO10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8

ID_cepaa	Solubilización de fosfatos	Solubilización de potasio	Producción de ACC desaminasa	Producción de Proteasas	Posible producción de silicatos	Producción de Lipasas	Producción de IAA	Producción de quitinasas	Producción de gluconasas	King B fluorescencia	King Be crecimiento	Trypan Blue	Prueba de Nessler	Características promotoras
2MO11	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
2MO12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	7
2MO14	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
2MO15	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
2MO16	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	8
3AP1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
3AP2	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	4
3AP3	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	5
3AP4	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	8
3AP5	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	5
3AP6	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	6
3AP8	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	4
3AP9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	6
3AP12	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	6
3AP15	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	7
3AP16	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	6
3AP24	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	5
3AP25	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	7
3AP26	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	3

ID_cepaa	Solubilización de fosfatos	Solubilización de potasio	Producción de ACC desaminasa	Producción de Proteasas	Posible producción de silicatos	Producción de Lipasas	Producción de IAA	Producción de quitinasas	Producción de gluconasas	King B fluorescencia	King Be crecimiento	Trypan Blue	Prueba de Nessler	Características promotoras
4MO1	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	6
4MO3	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	7
4MO4	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	6
4MO5	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	4
4MO6	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	4
4MO8	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	7
4MO9	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	6
4MO10	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	3
4MO11	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	4
4BP1	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	7
4BP2	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	4
4BP3	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	4
4BP4	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	5
4BP6	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	8
4BP7	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	6
4BP8	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	4
4BP9	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	5
6MO1	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	4
6MO3	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	8

ID_cepa	Solubilización de fosfatos	Solubilización de potasio	Producción de ACC desaminasa	Producción de Proteasas	Posible producción de silicatos	Producción de Lipasas	Producción de IAA	Producción de quitinasas	Producción de gluconasas	King B fluorescencia	King Be crecimiento	Trypan Blue	Prueba de Nessler	Características promotoras
6MO4	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	5
6MO5	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	5
6MO6	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	6
6MO7	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	9
6MO8	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
2AB1	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	9
2AB2	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	8
2AB3	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	9
2AB4	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	9
2AB5	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	8
2AB6	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	5
2AB7	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	8
2AB8	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	8
2AB9	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
2AB10	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	5
2AB11	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	9
2AB12	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	5
2AB13	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	7
2AB14	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	9

ID_cepaa	Solubilización de fosfatos	Solubilización de potasio	Producción de ACC desaminasa	Producción de Proteasas	Posible producción de silicatos	Producción de Lipasas	Producción de IAA	Producción de quitinasas	Producción de gluconasas	King B fluorescencia	King Be crecimiento	Trypan Blue	Prueba de Nessler	Características promotoras
2AB15	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	9
2AB16	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	9
2AB17	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	7
2AB18	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	7
1CA1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2
1CA2	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	7
1CA3	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	9
1CA4	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	6
1CA8	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	7
4AB1	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
4AB2	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	6
4AB3	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	8
4AB5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	6
4AB6	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	4
4AB7	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	3
3AB1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
3AB2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	8
3AB4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	7
3AB6	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	8

ID_cepa	Solubilización de fosfatos	Solubilización de potasio	Producción de ACC desaminasa	Producción de Proteasas	Posible producción de silicatos	Producción de Lipasas	Producción de IAA	Producción de quitinasas	Producción de gluconasas	King B fluorescencia	King Be crecimiento	Trypan Blue	Prueba de Nessler	Características promotoras
3AB7	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	4
3AB9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	5
5AP1	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	5
5AP2	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	5
5AP3	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	8
5AP4	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	8
5AP5	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	7
5AP6	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	7
5AP7	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	7
5AP8	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	4
5AP9	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	8
3MO1	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	5
3MO2	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	7
3MO3	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	6
3MO4	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	4
3MO5	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	4
3MO6	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	8
3MO7	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	4
3MO8	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	5

ID_cepaa	Solubilización de fosfatos	Solubilización de potasio	Producción de ACC desaminasa	Producción de Proteasas	Posible producción de silicatos	Producción de Lipasas	Producción de IAA	Producción de quitinasas	Producción de gluconasas	King B fluorescencia	King Be crecimiento	Trypan Blue	Prueba de Nessler	Características promotoras
3MO9	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	5
3BP1	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	6
3BP2	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	4
3BP5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	6
3BP8	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	4
3BP9	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	4
3BP12	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	5
4AP1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	4
4AP2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	7
4AP3	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	3
4AP4	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	8
4AP5	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	8
4AP7	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	4
4AP9	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	8
4AP10	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
4AP12	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	5
4AP13	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	5
2AP1	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	7
2AP2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	7

ID_cepa	Solubilización de fosfatos	Solubilización de potasio	Producción de ACC desaminasa	Producción de Proteasas	Posible producción de silicatos	Producción de Lipasas	Producción de IAA	Producción de quitinasas	Producción de gluconasas	King B fluorescencia	King Be crecimiento	Trypan Blue	Prueba de Nessler	Características promotoras
2AP3	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	5
2AP4	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	6
2AP5	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	6
2AP6	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	4
2AP7	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	6
2AP8	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	6
2AP9	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	5
2AP10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	6
2AP12	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	8
2AP13	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	8
2AP16	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	8
2AP17	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	7
2AP18	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	6
5MO1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	6
5MO2	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	7
5MO3	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	8
5MO4	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	6
5MO6	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	6
5MO7	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	7



Figura 32: Representación gráfica de la calidad de las secuencias reverse de la región V3-V4.

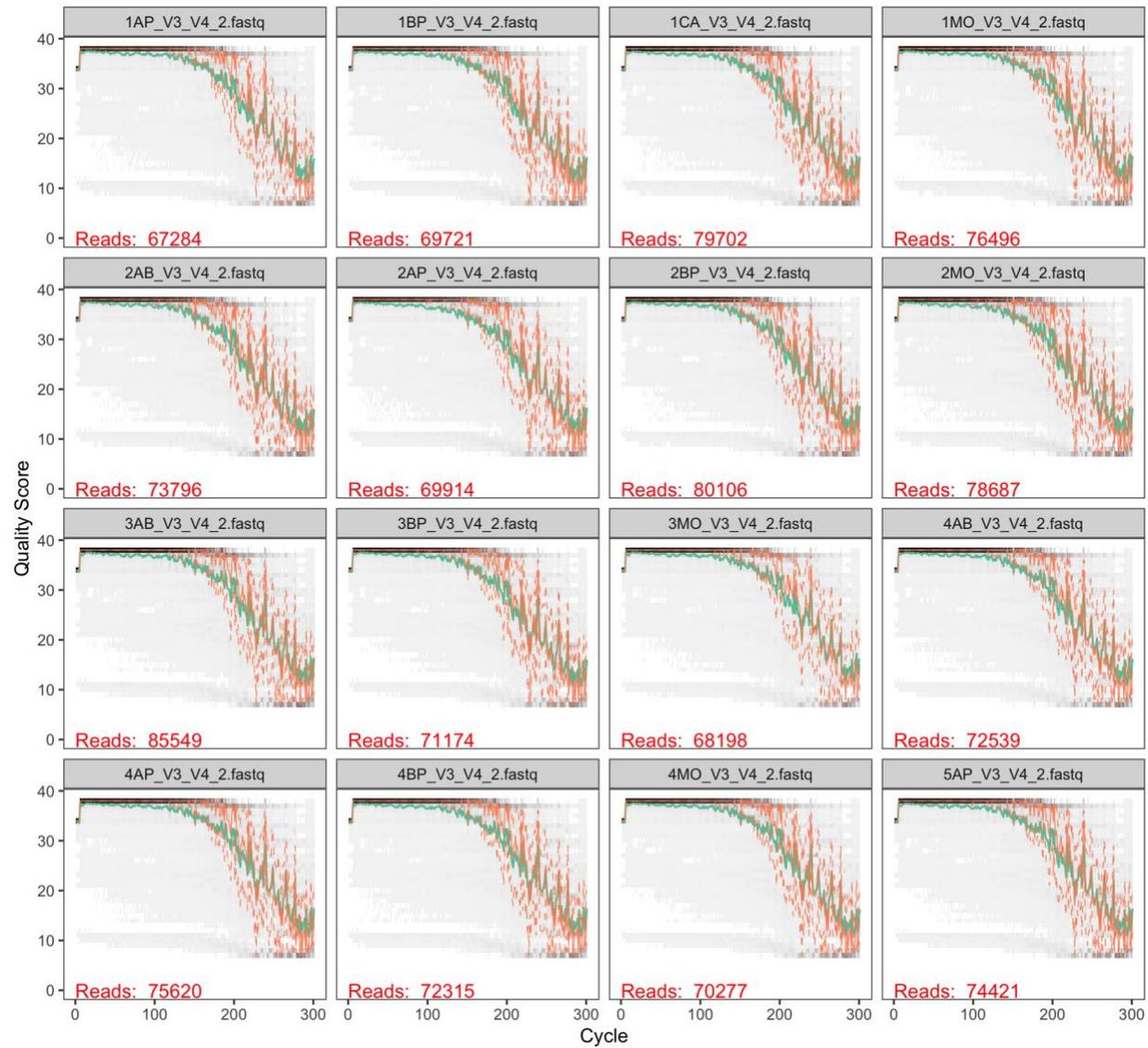


Figura 33: Representación gráfica de la calidad de las secuencias forward de la región V3-V4.

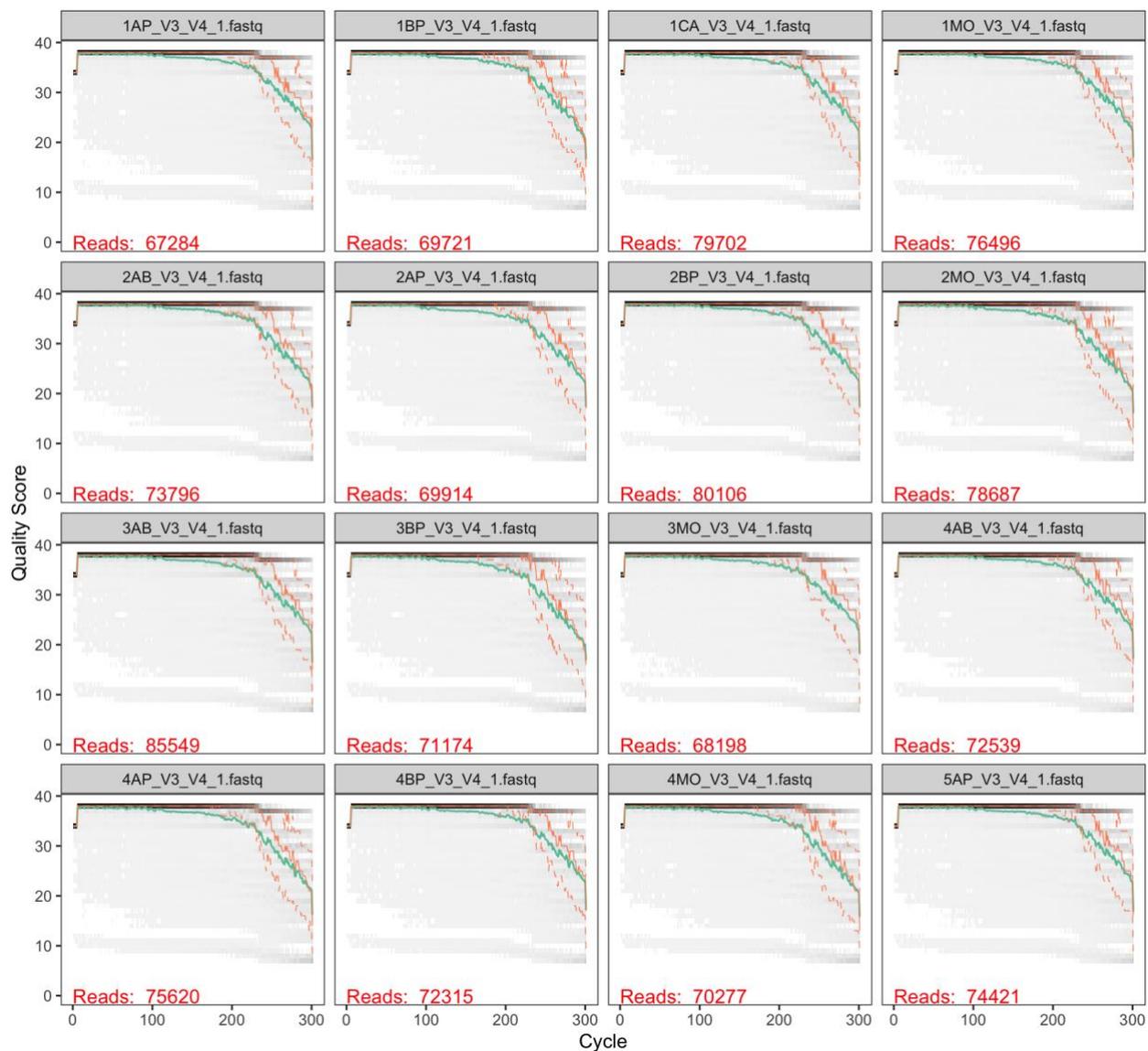


Figura 34: Representación gráfica de la calidad de las secuencias reverse de la región V1-V2.

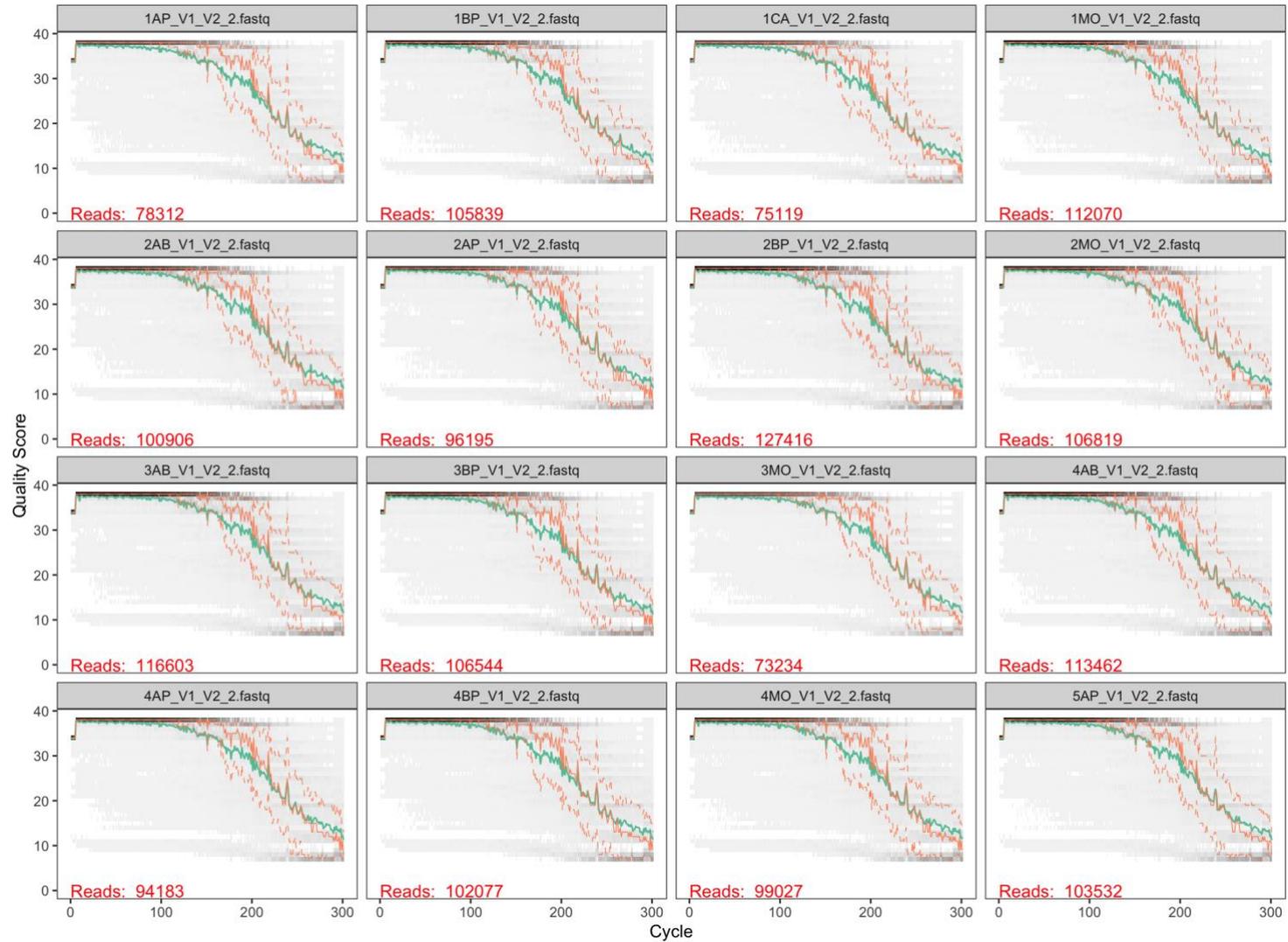


Figura 35: Representación gráfica de la calidad de las secuencias foward de la región V1-V2.

