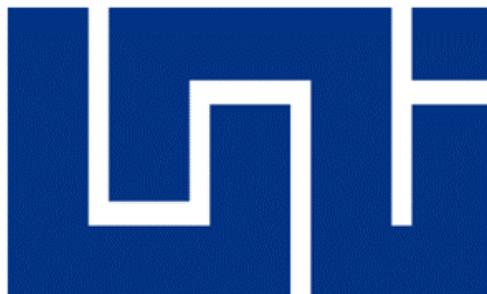


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
MAESTRIA INTERINSTITUCIONAL EN BIOTECNOLOGÍA**



TESIS

**DESCIFRANDO EL CONTENIDO MICROBIANO DE BIOINSUMOS
COMERCIALES PARA EL DISEÑO DE UN CONSORCIO CON
POTENCIAL BIOFERTILIZANTE**

Para optar al Título de Máster en Biotecnología

Elaborado por

Ing. Johana Lisseth O`Connor Mendoza

Tutor

PhD. Leandro Alberto Páramo Aguilera

Managua, Nicaragua

Octubre, 2019

DEDICATORIA

A Dios por ser luz en mi camino, refugio de mis alegrías y tristezas.

A mi madre, María Mendoza, quien hasta el día de hoy ha dado todo por mí. Ella, con su ejemplo, su sacrificio y entrega sentó las bases de responsabilidad y deseo de superación.

A mi esposo, Jeilyng Duarte, por ser mi apoyo en todo momento y a mi hijo, Johan Matías, que es mi motivación para seguir.

AGRADECIMIENTO

A Dios por las oportunidades que ha puesto en mí vida, por darme salud y fuerzas para seguir.

Al Doctor Leandro Alberto Páramo Aguilera, quien ha sido un instrumento que Dios ha puesto en mi camino para que pudiera apoyar en distintos momentos mi proceso de formación profesional. Por su motivación de hacer lo correcto, me ha impulsado para lograr esta meta.

A la Universidad Nacional de Ingeniería, a través de la Rectoría del Msc. Néstor Gallo Zeledón, por el financiamiento otorgado para el desarrollo de este trabajo.

A las diversas áreas, direcciones y facultades en las que me ha tocado desempeñarme a lo largo la Maestría, por brindarme el tiempo y apoyo, para finalizar esta etapa. Especialmente, al Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA) y a su Directora Ing. Larisa Korsak, por ser contraparte de este proyecto de investigación, poniendo a disposición su personal e instalaciones para el desarrollo del mismo. A la Dirección de Fuentes Alternas de Energía (DFAE), su Directora Ing. Suyén Córdoba y a la Facultad de Ingeniería Química y su decano Ing. Rafael Gamero, por ceder parte de mi tiempo a este proyecto.

A los estudiantes de Ing. Química: Griselda Martínez y Laura Guillén; de Ing. Agrícola: Nemrod Urroz y Rommel Álvarez, por su compromiso, entrega y aporte en el avance de esta investigación.

Al grupo de instituciones, CNU, CONICYT que hicieron posible la Maestría Interinstitucional en Biotecnología y a los docentes que con su entrega lograron sembrar la semilla del saber. Así como a mis compañeros, en especial al Master José Méndez, por su apoyo y ánimos en todo el proceso.

A toda mi familia por ser un respaldo y saber que puedo contar con ellos en todo momento.

RESUMEN

Los fertilizantes químicos, han sido reportados como causantes de diversos problemas, incluidos la contaminación atmosférica y subterránea, la acidificación del suelo, la eutrofización, la disminución de la fertilidad, la pérdida de biodiversidad y el alto consumo de energía en los procesos de síntesis. En este contexto, se han realizado grandes esfuerzos para reemplazar los fertilizantes químicos con biofertilizantes amigables con el medio ambiente. La presente investigación brinda una oportunidad de sustitución a la fertilización química, al desarrollar un consorcio microbiano con propiedades biofertilizantes.

El desarrollo del trabajo involucró la caracterización microbiológica y molecular de la microbiota cultivable de 4 bioinsumos comerciales provenientes del occidente y norte de Nicaragua. Como resultado de la caracterización morfológica se obtuvo: 22 bacterias de forma bacilar (15 Gram positivas y 7 Gram negativas) y 1 de forma cocal Gram positiva, 6 hongos filamentosos y 1 hongo levaduriforme. Para la identificación molecular, se obtuvieron los árboles filogenéticos a través de la bioinformática aplicada a los resultados de la extracción y secuenciación del ADN (gen ADNr 16S para bacterias y región ITS1-ITS4 para hongos filamentosos). Se logró la identificación molecular del 93% (28 de 30) microorganismos aislados (23 bacterias: 12 especies, 11 géneros; 5 hongos filamentosos: 4 especies y 1 género). Encontrándose en los Bioinsumos zona norte: **muestra TS**: 5 bacterias (*Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, 2 *Bacillus sp.* y *Stenotrophomonas sp.*) y 3 hongos filamentosos (*Monascus pupureus*, *Neosartorya glabra* y *Aspergillus flavus*-reportado como patógeno para cultivos); **muestra LS**: 6 bacterias (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, 2 *Stenotrophomonas sp.* y *Paenibacillus sp.*); **muestra LL**: 3 bacterias (*Bacillus Megaterium*, *Staphylococcus succinus* y *Bacillus sp.*) y 2 hongos filamentosos (*Byssochlamys nivea* – reportado como contaminante en fruta procesada y uno no secuenciado). Zona de occidente, **muestra DCL**: 9 bacterias (2 *Lysinibacillus macroides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus flexus*, *Bacillus cereus* – patógeno para ser humano, *Agrobacterium tumefaciens*, 2 *Bacillus sp.* y una *Stenotrophomonas sp.*) y 1 hongo levaduriforme - no secuenciado. Se observó que el 75% de los bioinsumos analizados contienen al menos una cepa contaminante y solo un 25% están libres de patógenos, esto muestra gran diversidad microbiana y falta de calidad evidenciada por la presencia de patógenos en los bioinsumos que son perjudiciales para la planta y el ser humano.

Las pruebas de antagonismo se realizaron entre 9 bacterias promisorias, seleccionadas de la revisión de aplicaciones biotecnológicas de las cepas en estudio. Como resultado 4 bacterias fueron seleccionadas para formar el consorcio entre ellas: *Bacillus megaterium* (promotor de crecimiento vegetal (PGPR),

solubilización de fosfato, fijador de nitrógeno y productor de ácido indolacético (AIA)) *Bacillus marisflavi* (fijador nitrógeno), *Exiguobacterium aurantiacum* (productor AIA) y *Pseudomonas mendocina* (como movilizador de nutrientes (solubiliza Fe y P) y estimulador de biomasa). Mediante las pruebas de estabilidad al consorcio, se demostró por un periodo de 2 meses (que se siguió su análisis en refrigeración), que mantiene un número de células viables en el orden de 10^4 a 10^8 UFC/mL.

La evaluación de la aplicación del consorcio biofertilizante en los cultivos de chiltoma, rábano y pepino al realizar el análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey a variables de desarrollo vegetativo y cosecha, a nivel estadístico los tres tratamientos (To, TB y TQ) no muestran diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$). En general, se pudo concluir que el consorcio biofertilizador propuesto, resulta prometedor como una alternativa al uso de los fertilizantes químicos, amigable con el ambiente y no perjudicial al ser humano que debe ser considerado para el desarrollo la agricultura sostenible en Nicaragua.

ABSTRACT

Chemical fertilizers have been reported as causing several problems, including atmospheric and underground pollution, soil acidification, eutrophication, reduced fertility, loss of biodiversity and high energy consumption in synthesis processes. In this context, great efforts to replace chemical fertilizers with environmentally friendly biofertilizers have been made. This research provides an opportunity for chemical fertilization substitution, by developing a microbial consortium with biofertilizing properties.

The development involved the microbiological and molecular characterization of the cultivable microbiota of 4 commercial inoculants from western and northern Nicaragua. As a result of the morphological characterization it was obtained: 22 bacteria of bacilar form (15 Gram positive and 7 Gram negative) and 1 of coccal Gram positive form, 6 filamentous fungi and 1 levaduriform fungus. For molecular identification, phylogenetic trees were obtained through bioinformatics applied to the results of DNA extraction and sequencing (16s rDNA gene for bacteria and ITS1-ITS4 region for filamentous fungi). The molecular identification of 93% (28 of 30) isolated microorganisms (23 bacteria: 12 species, 11 genera; 5 filamentous fungi: 4 species and 1 genus) was achieved. Found in the Northern zone Inoculant: **TS sample**: 5 bacteria (*Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, 2 *Bacillus sp.* and *Stenotrophomonas sp.*) and 3 filamentous fungi (*Monascus pupureus*, *Neosartorya glabra* and *Aspergillus flavus*- reported as pathogen for crops); **LS sample**: 6 bacteria (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, 2 *Stenotrophomonas sp.* and *Paenibacillus sp.*); **LL sample**: 3 bacteria (*Bacillus Megaterium*, *Staphylococcus succinus* and *Bacillus sp.*) and 2 filamentous fungi (*Byssochlamys nivea* - reported as contaminant in processed fruit and one fungi –not sequenced). West zone, **DCL sample**: 9 bacteria (2 *Lysinibacillus macroides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus flexus*, *Bacillus cereus* - pathogenic for humans, *Agrobacterium tumefaciens*, 2 *Bacillus sp.* and one *Stenotrophomonas sp.*) And 1 levaduriform fungus - not sequenced. It was observed that 75% of the analyzed inoculant contain at least one contaminating strain and only 25% are free of pathogens, this shows great microbial diversity and lack of quality evidenced by the presence of pathogens in the inoculant that are harmful to the plant and the human being.

Antagonism tests were performed among 9 promising bacteria, selected from the review of biotechnological applications of the strains under study. As a result, 4 bacteria were selected to form the consortium among them: *Bacillus megaterium* (plant growth promoter (PGPR), phosphate solubilization, nitrogen fixer and indolacetic acid producer (AIA)) *Bacillus marisflavi* (nitrogen fixer), *Exiguobacterium aurantiacum* (producer AIA) and *Pseudomona mendocina* (as nutrient mobilizer (solubilizes Fe and P) and biomass stimulator). Through the stability tests to the

consortium, it was demonstrated for a period of 2 months (which was followed by cooling analysis), which maintains a number of viable cells in the order of 10^4 to 10^8 CFU / mL.

The evaluation of the biofertilizing consortium in sweet paper, radish and cucumber crops when performing the analysis of variance (ANOVA) and comparison test of Tukey means to variables of vegetative development and harvest, at the statistical level the three treatments (To , TB and TQ) do not show significant differences between them ($p > 0.05$). In general, it could be concluded that the proposed biofertilizer consortium is promising as an alternative to the use of chemical fertilizers, friendly to the environment and not harmful to the human being that should be considered for development a sustainable agriculture in Nicaragua.

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTO	III
RESUMEN.....	4
ABSTRACT	6
INDICE DE FIGURAS.....	10
INDICE DE TABLAS.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. ANTECEDENTES.....	13
III. JUSTIFICACIÓN.....	15
IV. OBJETIVOS	17
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	17
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
V. MARCO TEÓRICO	18
5.1. CONTENIDO MICROBIANO	18
5.2. TECNOLOGÍA DE INOCULACIÓN (BIOINSUMOS).....	18
5.3. SIEMBRA Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS.....	18
5.4. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE MICROORGANISMOS	19
5.4.1. Identificación morfológica bacteriana.....	20
5.4.2. Identificación morfológica de los hongos	23
5.5. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS	24
5.6. MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS	28
5.7. CRECIMIENTO MICROBIANO.....	28
5.7.1. Crecimiento exponencial	29
5.7.2. Crecimiento microbiano en cultivo por lotes.....	30
5.7.3. Medición del crecimiento microbiano	31
5.8. BIOFERTILIZANTE	33
5.8.1. Tipos de biofertilizantes	33
5.8.2. Consorcios microbianos.....	34
5.8.3. Modo de aplicación del biofertilizante formulado.....	36
5.9. PRUEBAS DE MACROTÚNEL.....	36
5.9.1. Diseño de bloques al Azar	36
5.9.2. Cultivos:.....	37
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39

6.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO	39
6.2. CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO MICROBIANO DE BIOINSUMOS COMERCIALES FABRICADOS EN NICARAGUA	39
6.2.1. Conservación de los microorganismos aislados	39
6.2.2. Caracterización morfológica de los microorganismos aislados	41
6.2.3. Identificación molecular de los microorganismos	43
6.3. PRUEBAS DE ANTAGONISMO	47
6.4. FORMULACIÓN DEL CONSORCIO MICROBIANO.....	50
6.4.1. Construcción de curva cinética de crecimiento	50
6.4.2. Pruebas de estabilidad por viabilidad celular del biofertilizante.....	52
6.4.3. Efecto del consorcio biofertilizante sobre cultivos de interés agrícola en macrotúnel	53
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
7.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS MICROORGANISMOS.....	60
7.1.1. Caracterización morfológica de bacterias	61
7.1.2. Caracterización morfológica de hongos filamentosos	65
7.1.3. Identificación molecular de bacterias	67
7.1.4. Identificación molecular de hongos filamentosos	71
7.2. PRUEBAS DE ANTAGONISMO Y SELECCIÓN DEL CONSORCIO MICROBIANO	74
7.2.1. Propiedades y funciones de bacterias y hongos	74
7.2.2. Selección de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal	80
7.2.3. Pruebas de antagonismo por la técnica de difusión en pozos.....	82
7.3 FORMULACIÓN DEL CONSORCIO MICROBIANO PARA UN BIOFERTILIZANTE Y ESTABILIDAD DE LAS CEPAS INDIVIDUALES.....	87
7.3.1. Construcción de curva de crecimiento por método turbidimétrico	87
7.3.2. Pruebas de estabilidad por viabilidad celular del biofertilizante.....	92
7.4 PRUEBAS DEL CONSORCIO BIOFERTILIZANTE EN MACROTÚNEL.	95
7.4.1 Efecto del Consorcio Biofertilizante en Chiltoma (<i>Capsicum annuum L</i>).....	95
7.4.2 Efecto del Consorcio Biofertilizante en Rábano (<i>Raphanus sativus L.</i>).....	98
7.4.3 Efecto del Consorcio Biofertilizante en Pepino (<i>Cucumis sativus</i>).....	100
VIII. CONCLUSIONES	103
IX. RECOMENDACIONES.....	105
X. BIBLIOGRAFIA.....	106
XI. ANEXOS.....	122

Anexo 2. Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de bacterias.....	124
Anexo 3. Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de hongos	130
Anexo 4. Resultados de pruebas de antagonismo de las bacterias.....	131
Anexo 5. Resultados de las pruebas del consorcio biofertilizante en macrotúnel	135
PUBLICACIONES.....	138
GLOSARIO.....	139
ABREVIATURAS	142

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Técnica de siembra por estrías	19
Figura 2. Morfología de Bacterias	20
Figura 3. Morfología de colonias bacterianas	21
Figura 4. Tinción de Gram	23
Figura 5. El método Sanger para la secuenciación de ADN.	25
Figura 6. Curva de crecimiento bacteriano	30
Figura 7. Ilustración simplificada del concepto de consorcios microbianos	35
Figura 8. Fruto de Chiltoma	37
Figura 9. Planta de Pepino	38
Figura 10. Preparación de los medios de cultivo	40
Figura 11. Tinción diferencial de Gram	43
Figura 12. Técnica de cinta adhesiva para la observación de esporas en hongos	43
Figura 13. Corrección de errores de secuenciación	45
Figura 14. Comparación de la secuencia en estudio según el % de identidad	46
Figura 15. Alineamiento de la secuencia en estudio	46
Figura 16. Muestra la combinación y distribución de las bacterias confrontadas	49
Figura 17. Muestra la preparación del pre-inóculo	50
Figura 18. Muestra la construcción de la curva cinética de crecimiento.	51
Figura 19. Técnica de recuento en placa y diluciones seriadas	52
Figura 20. Macrotúnel Individual instalado en predios de la UNI	53
Figura 21. Riego por goteo tipo espaguete	54
Figura 22. Preparación del sustrato	55
Figura 23. Preparación y llenado de maceteras	55
Figura 24. Plántulas de chiltomas con 25 días en bandejas de germinación	56
Figura 25. Siembra de rábano de forma directa	56
Figura 26. Arreglo y distribución de los cultivos y tratamientos en el macrotúnel	57
Figura 27. Morfología en placa y tinción de Gram de bacterias	64
Figura 28. Hongos filamentosos aislados d	66
Figura 29. Se muestra una sección del árbol filogenético de aislados bacterianos	68
Figura 30. Árbol filogenético de hongos aislados	72
Figura 31. Morfología en placa y Tinción de Gram de bacterias seleccionadas del banco de microorganismos del PIENSA	81

Figura 32. Tinciones de Gram realizadas en las pruebas de antagonismo	85
Figura 33. Comportamiento del efecto antagónico	86
Figura 34. Curva de crecimiento bacteriano (Absorbancia Vs Tiempo)	88
Figura 35. Curva de Concentración UFC/ mL vs Tiempo (h)	91
Figura 36. Curva de UFC para la prueba de estabilidad en el tiempo de cada bacteria	93
Figura 37. Variables de desarrollo y cosecha en cultivo de Chiltoma	96
Figura 38. Variables de desarrollo y cosecha en cultivo de Rábano	99
Figura 39. Variables de desarrollo y cosecha en cultivo de Pepino	101
Figura 40. Confrontación de la Cepas parte I	131
Figura 41. Confrontación de la Cepa parte II	131
Figura 42. Confrontación de la Cepa parte III	132
Figura 43. Tinciones de Gram en pruebas de antagonismo I	133
Figura 44. Tinciones de Gram en pruebas de antagonismo II	134
Figura 45. Fases del cultivo de chiltoma en macrotúnel	135
Figura 46. Fases del cultivo de Pepino en macrotúnel	136
Figura 47. Fases del cultivo del Rábano en macrotúnel	137

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos empleados para determinar el crecimiento microbiano	32
Tabla 2. Principales tipos de biofertilizantes	34
Tabla 3. Diseño de Bloques al azar para estudio de variables	36
Tabla 4. Asignación de nuevos códigos	47
Tabla 5. Valores de obtenidos en la preparación de la escala de McFarland.....	48
Tabla 6. Valores de absorbancia de los inóculos ajustados	48
Tabla 7. Concentración del consorcio biofertilizante aplicado	58
Tabla 8. Cantidad de microorganismos aislados a partir de bioinsumos	42
Tabla 9. Presenta la caracterización morfológica de bacterias.....	61
Tabla 10. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos filamentosos...	65
Tabla 11. Identificación de bacterias mediante secuenciación genética.....	69
Tabla 12. Identificación final de hongos	73
Tabla 13. Propiedades y funciones de bacterias	75
Tabla 14. Propiedades y funciones de hongos.....	79
Tabla 15. Aplicaciones biotecnológicas de las 4 cepas seleccionadas del PIENSA	81
Tabla 16. Resultados de pruebas de antagonismos de las cepas seleccionadas	83
Tabla 17. Concentración de biofertilizante mostrando la Absorbancia - UFC/mL.....	92

I. INTRODUCCIÓN

Nicaragua enfrenta el reto y la disyuntiva de producir suficientes alimentos para una población en crecimiento, pero al mismo tiempo implementar prácticas agrícolas sostenibles. En las últimas seis décadas, la aplicación de fertilizantes químicos ha desempeñado un papel crucial a nivel mundial para aumentar el rendimiento y el mantenimiento de los cultivos, así como el suministro adecuado de alimentos (Chaudhary *et al.*, 2017). Los fertilizantes químicos, han sido reportados como causantes de diversos problemas, incluidos la contaminación atmosférica y subterránea, la acidificación del suelo, la eutrofización, la disminución de la fertilidad, la pérdida de biodiversidad y el alto consumo de energía en los procesos de síntesis (Mahanty *et al.*, 2017). En este contexto, se han realizado grandes esfuerzos para reemplazar los fertilizantes químicos por biofertilizantes amigables con el medio ambiente (Mikhak *et al.*, 2017).

El mejorar la eficiencia de los fertilizantes minerales mediante el aprovechamiento de estrategias microbianas no se puede lograr a menos que diseñemos, probemos y desarrollemos formulaciones que demuestren su eficiencia de manera constante (Bargaz *et al.*, 2018). Uno de los mayores desafíos del campo de inoculantes microbianos es prosperar haciendo uso de un consorcio microbiano eficiente, que se basa en diversas cepas que exhiben propiedades de microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPM, por sus siglas en inglés) (Hashem *et al.*, 2016). Por lo tanto, la disponibilidad de biofertilizantes de alta calidad debe ser una prioridad, especialmente en países donde la producción agrícola juega un papel clave en la economía y la seguridad alimentaria (Lesueur *et al.*, 2016).

La presente investigación se enfocó en el desarrollo de un consorcio microbiano a partir de aislados autóctonos de microorganismos contenidos en bioinsumos comerciales (artesanales), caracterizados microbiológica y molecularmente (secuenciando el ADNr 16S para bacterias y la región ITS1-ITS4 para hongos filamentosos), para su respectiva identificación a nivel de especie. Posteriormente, se realizó una selección de aquellos microorganismos que exhibieron propiedades PGPM y que no presentaron antagonismo *in vitro* entre ellos. El proceso culminó con la evaluación del consorcio obtenido a nivel de su estabilidad como producto biológico y su aplicación en macrotúnel a cultivos de interés agrícola; con lo que se espera contribuir al impulso de la industria biotecnológica nacional, mejorar la calidad ambiental y la producción sustentable de alimentos.

II. ANTECEDENTES

Los biofertilizantes son una de las herramientas más importantes en la agricultura moderna y la agroalimentación, así como una fuerza económica impulsora en el futuro cercano. Además, los fertilizantes biológicos también desempeñan un papel importante como métodos prometedores para aumentar el uso eficiente de los recursos hídricos y terrestres, reduciendo la contaminación ambiental. Por lo tanto, los enfoques biotecnológicos amigables con el medio ambiente pueden ofrecer alternativas a los productos químicos fertilizantes (El-Ghamry *et al.*, 2018). Las bioformulaciones para la promoción del crecimiento de las plantas continúan inspirando la investigación y el desarrollo en muchos campos (Arora *et al.*, 2010). A nivel mundial se han realizado numerosas investigaciones que intentan caracterizar los bioinsumos, así como demostrar el potencial biofertilizante de muchos microorganismos solos o en consorcios, entre estas podemos citar:

- Herrmann *et al.*, (2015) caracterizaron el contenido microbiano de 65 biofertilizantes comerciales fabricados en los Estados Unidos, el Reino Unido, Australia, Sudáfrica, Tailandia, Kenia y Argentina. Los resultados mostraron que el 64% de los productos contenía una o varias cepas de contaminantes, mientras que solo el 36% de los productos podían considerarse puros. Los inoculantes rizobiales generalmente fueron de mejor calidad que los otros productos basados en PGPR, y el 40% de los biofertilizantes probados no contenían ninguna de las cepas declaradas, sino solo contaminantes, entre los cuales se encontraron patógenos para el humano como *Comamonas testosteroni* o *Serratia marcescens*. Estos resultados resaltan la necesidad de sistemas de control de calidad, para garantizar que los inoculantes eficaces lleguen a los usuarios finales.
- Gupta *et al.*, (2012) evaluaron el efecto de cuatro bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB) sobre el crecimiento y el contenido de aloína A de *Aloe barbadensis*, en el suelo que contiene fosfato tricálcico (TCP). Se identificaron PSB basándose en la secuenciación del gen 16S rRNA como *Pseudomonas synxantha*, *Burkholderia gladioli*, *Enterobacter hormaechei* y *Serratia marcescens*. Estos PSB solubilizaron 25–340 g mL⁻¹ de TCP en la fase líquida. El tratamiento de plantas con PSB individual o una mezcla de estos (en consorcio), incrementa la absorción de P, el P disponible en el suelo y el crecimiento de las plantas. El aumento en el contenido de aloína A debido a una mayor producción de biomasa vegetal y biomasa unitaria fue de 673%, 294%, 276%, 119% y 108% en plantas tratadas con un consorcio de PSB, *P. synxantha*, *S. marcescens*, *B. gladioli*, y *E. hormaechei* en el suelo modificado por TCP, respectivamente.

- Por otro lado, Borda *et al.*, (2009) realizaron un estudio para producir un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter Nigricans*. El aislamiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno se realizó en medio Ashby-benzoato a partir del suelo de un cultivo de *Stevia rebaudiana Bert*. Los aislamientos identificados como *Azotobacter nigricans* fueron evaluados mediante una cinética de crecimiento y la cepa con mayor velocidad se utilizó para la elaboración por fermentación discontinua de un biofertilizante. La evaluación preliminar del biofertilizante se realizó mediante su inoculación en 3 eras de un cultivo de *S. rebaudiana Bert* y el rendimiento se determinó con base en la producción de biomasa y concentración de glucósidos. La evaluación preliminar en campo mostro una relación positiva entre el aumento de la concentración de glucósidos en las hojas de *S. rebaudiana* y una mayor producción de biomasa en respuesta a la aplicación del biofertilizante.

- Farfan, (2017) realizó una investigación con el objetivo de identificar posibles microorganismos viables en la formulación de un bioinsumo fertilizante. Se aislaron bacterias nativas no patógenas de los suelos de cultivo con capacidad fijadora de nitrógeno N, movilizadora de fósforo P y potasio K; tres cepas seleccionadas se emplearon en experimentación *invitro* basada en el Diseño estadístico Completamente Aleatorizado DCA con seguimiento semanal durante dos meses, midiendo las concentraciones de N, P y K en los suelos inoculados. Para determinar estadísticamente la fijación / movilización de los nutrientes a los suelos por parte de las bacterias se implementó un Análisis de Varianza ANOVA empleando el paquete estadístico IBM SPS Statistics.

- Méndez-Úbeda *et al.*, (2018), efectuaron la investigación orientada al aislamiento e identificación morfológica y molecular de microorganismos nativos de Nicaragua partiendo de bioinsumos artesanales, en la búsqueda de bacterias (*Bacillus subtilis*) antagonistas de hongos fitopatógenos; para lo cual, se realizaron ensayos de antagonismo contra los hongos identificados como *Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium sp*, tanto *invitro* a través de la confrontación dual de las bacterias con potencial antagonístico de los hongos fitopatógenos evaluados, como en condiciones de invernadero en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum L*); siendo esta la primera fase en el desarrollo de un producto biológico nacional que tendrá como ingrediente activo *Bacillus subtilis*, reportada como antagonista de un amplio rango de hongos y que será usado para el control de enfermedades en cultivos de interés agrícola.

III. JUSTIFICACIÓN

La agricultura del mañana, desafiada por la creciente demanda mundial de alimentos, la escasez de tierras cultivables y los recursos junto con las múltiples presiones ambientales, debe gestionarse de manera inteligente a través de enfoques modernos sostenibles y ecoeficientes; ésta debe ser más productiva, sostenible y respetuosa con el medio ambiente (Bargaz *et al.*, 2018). La excesiva dependencia de los fertilizantes químicos para producir más cultivos inevitablemente daña la ecología ambiental y la salud humana con gran severidad (Mahanty *et al.*, 2017). Un uso intensivo de la tierra y de agroquímicos, provoca agotamiento de los suelos debido a la explotación de grandes cantidades de elementos nutritivos, produciendo una disminución progresiva de la fracción orgánica del suelo (Trujillo, 2012). Un ambiente infértil dificulta la producción de nuevos cultivos, debido a que las plantas se vuelven más vulnerables a enfermedades y como consecuencia la producción agrícola disminuye en cantidad y calidad (Portero, 2014).

La explotación de microorganismos como biofertilizantes se considera en cierta medida una alternativa a los fertilizantes químicos en el sector agrícola debido a su gran potencial para mejorar la producción de cultivos y la seguridad alimentaria (Mahanty *et al.*, 2017). Los biofertilizantes, pueden estar formados por cepas individuales o en consorcios microbianos. Los microorganismos que lo conforman son beneficiosos tanto para la planta como para el suelo, se pueden aplicar en la semilla, la raíz o el suelo. Su principal objetivo es movilizar la disponibilidad de nutrientes con base a su actividad biológica, como: la fijación de nitrógeno y la solubilización del fósforo; también ayudan a recuperar la microbiota perdida y a su vez, mejorar la salud del suelo en general (Afanador, 2017). Desde el punto de vista ecológico, se hace necesario conocer los integrantes de la comunidad microbiana donde se localiza el cultivo, con el fin de potenciar su acción y favorecer su posterior aplicación como inoculantes (Otero, 2011).

El mercado de biofertilizantes se valoró en USD 946.6 millones en 2015; se proyecta que crezca a una tasa compuesta anual de 14.08% de 2016 a 2022 (Micro Market Monitor, 2015). En el documento de estrategia nacional para el fomento de la producción orgánica en Nicaragua, 2005. Se expone que en el país, existen serias limitaciones en la oferta y desarrollo de bienes y servicios orientados a la producción orgánica, uno de los casos particulares son los bioinsumos (biofertilizantes y biocontroladores de plagas) producidos a nivel local, la mayoría de estos productos poseen un bajo nivel tecnológico, por lo que se desconoce las alternativas de biocontrol (parasitoides, presencia del tipo de microorganismos, otros), no se tiene estudios del espectro de funcionamiento de los mismos. Sumado a esto, las instituciones públicas que deberían de regular este tipo de productos, desconocen

el tema, por lo que estos bioinsumos no cuentan con certificación, ni están registrados según lo indican las regulaciones para la certificación orgánica.

El poder generar una alternativa de fertilización amigable con el medioambiente, que permita la intensificación sostenible de la agricultura a través de ampliar las opciones de la producción orgánica o como complemento al uso de fertilizantes sintéticos, que apunten a aumentar la rentabilidad llegando a mercados internacionales con altos estándares y mayor poder adquisitivo, es un reto y en este contexto, la investigación estuvo orientada al aislamiento e identificación morfológica y molecular de microorganismos nativos de Nicaragua partiendo de bioinsumos artesanales; definiendo sus aplicaciones y seleccionando las más promisorias como PGPM, se realizaron ensayos de antagonismo *invitro* a través de inhibición simultánea de bacterias y se desarrolló un consorcio microbiano con propiedades biofertilizantes, compuesto de: *Bacillus megaterium*, *Bacillus marisflavi*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Pseudomonas mendocina*, el cual fue evaluado en condiciones de macrotúnel en los cultivos de chiltoma (*Capsicum annuum* L.), rábano (*Raphanus sativus*) y pepino (*Cucumis sativus*); siendo ésta la primera fase de la certificación del contenido microbiológico de bioinsumos, así como para la estandarización e impulso de agro productos innovadores. Sentando las bases para la configuración de acciones que permiten el desarrollo de la industria biotecnológica nacional.

IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar un consorcio de microorganismos autóctonos aislados de bioinsumos comerciales (artesanales), para aplicarlo como biofertilizante en cultivos de interés agrícola.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el contenido microbiano de bioinsumos comerciales fabricados en Nicaragua, por sus características morfológicas e identificación molecular de acuerdo a su filogenia.
- Realizar pruebas de antagonismos entre cepas seleccionadas por sus usos y aplicaciones de interés de la revisión de bases de datos, que serán usadas en consorcio para un producto biofertilizante.
- Evaluar el consorcio microbiano con propiedades biofertilizante a nivel de laboratorio, considerando pruebas de estabilidad del bioproducto y su efecto en macrotúnel sobre cultivos de interés agrícola.

V. MARCO TEÓRICO

5.1. CONTENIDO MICROBIANO

Actualmente se han desarrollado herramientas y técnicas bioquímicas, microbianas y moleculares muy avanzadas que proporcionan métodos precisos y rápidos para determinar la diversidad microbiana en cualquier ecosistema. Alrededor del 99% de los microbios en el medio ambiente no son cultivables; por lo tanto, se requieren muchos más esfuerzos para hacerlos cultivables y luego identificables (Pathak and Kumar, 2016).

5.2. TECNOLOGÍA DE INOCULACIÓN (BIOINSUMOS)

Los inoculantes de PGPM pueden definirse como formulaciones que contienen una o más cepas (o especies) de microorganismos benéficos preparados con un material portador económico y fácil de usar. El desarrollo de técnicas para la producción de grandes cantidades de inóculos puros, con alto potencial de infectividad, es el principal problema que debe abordarse para permitir un amplio uso de los biofertilizantes. Los aspectos claves de la tecnología de inoculación con PGPM son el uso de una formulación adecuada de preparaciones de inóculos, la selección de un portador adecuado y el diseño de métodos de administración correctos (Malusá 2012).

La Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense de Insumos Agrícolas - Bioinsumos y Sustancias Afines NTON 11 048 - 16. Define **bioinsumo** como: “Productos elaborados a partir de organismos benéficos tales como bacterias, hongos, virus, nematodos e insectos, extractos naturales obtenidos de plantas y compuestos bioactivos microbianos que pueden ser utilizados en la producción agrícola para el manejo de las plagas o promover el crecimiento y desarrollo de las plantas”.

5.3. SIEMBRA Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS

La siembra o inoculación consiste en introducir artificialmente una porción de muestra o inóculo en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento (Santambrosio y Ortega, 2009). El cultivo de los microorganismos se realiza con el fin de proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada, esto se debe efectuar asépticamente, con medios de cultivos e instrumentos esterilizados y trabajar fuera de toda corriente de aire, utilizando un mechero o bien flujo laminar para crear un ambiente estéril (Méndez-Úbeda *et al.*, 2018).

Existen diversos tipos de siembra de microorganismos de acuerdo al medio utilizado y los requerimientos del microorganismo a estudiar, según Santambrosio y Ortega, (2009) se destacan:

- a) **Siembra por inmersión:** consiste en colocar el inóculo en una placa Petri y sobre el mismo verter el medio de cultivo fundido, este método se utiliza para microorganismos aerobios;
- b) **Siembra en superficie:** en esta el medio de cultivo fundido se vierte sobre una placa Petri y se deja gelificar, luego el inóculo se coloca sobre la superficie con ayuda de una espátula de Drigalsky y se extiende hasta su absorción total por el medio de cultivo, este tipo de siembra es recomendado para microorganismos aerobios estrictos.
- c) **Siembra por estrías:** la cual consiste en verter el medio de cultivo sobre una placa Petri y dejarlo gelificar, como lo muestra la **Figura 1**, posteriormente en los cuatro puntos cardinales de la placa se trazan estrías perpendiculares lo más separadas posibles para identificar diferentes morfologías en el crecimiento de los microorganismos

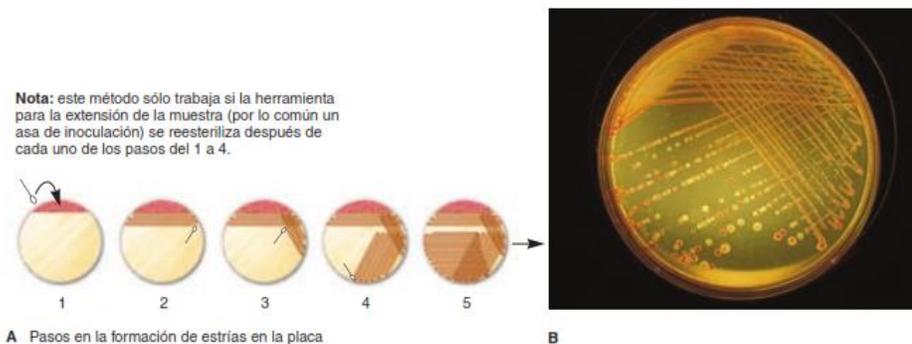


Figura 1. Técnica de siembra por estrías. (a) Se muestra un patrón de rayas típico, (b) así como un ejemplo de una placa rayada (Prescott *et al.*, 2008).

5.4. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE MICROORGANISMOS

Todos los organismos vivos se pueden dividir en dos tipos celulares: eucariotas y procariotas. Tienen estructuras en común como la membrana celular, los ribosomas encargados de la síntesis proteica y el ácido desoxirribonucleico (ADN) portador de la información genética (Pírez y Mota, 2006). Dentro de este esquema, las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas, en este reino, según criterios evolutivos, se diferencian el grupo de las eubacterias y el de las arqueobacterias. Mientras que los protistas, los hongos y las algas que se organizan de forma unicelular, multicelular o en colonias, poseen células eucariotas (Pírez y Mota, 2006).

La identificación de estos grupos de microorganismos comprende un conjunto de técnicas y procedimientos necesarios para establecer su identidad con el fin de comprobar si este se trata de un microorganismo ya conocido o de uno nuevo y así poder realizar una correcta clasificación. Pueden ser identificados por métodos fenotípicos, es decir, según las características observables, tales como, la morfología, desarrollo y propiedades bioquímicas y metabolismo; y también mediante métodos moleculares (Bou *et al.*, 2011).

5.4.1. Identificación morfológica bacteriana

La forma de las bacterias depende de la pared celular, que les proporciona elasticidad y al mismo tiempo rigidez. Estos microorganismos se presentan habitualmente como elementos esféricos, conocidos como cocos, alargados, denominados bacilos, e incurvados. Esta forma puede variar debido a distintas circunstancias exógenas, como la antigüedad del cultivo, factores nutricionales, tratamiento con antibióticos, etc. (Liébana, 2002). En la **Figura 2** se muestra la morfología bacteriana.

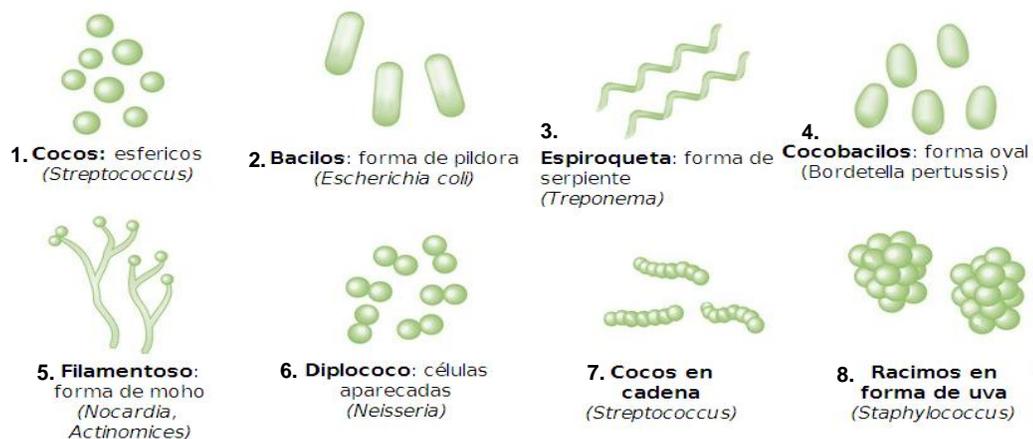


Figura 2. Morfología de Bacterias: 1-cocos; 2-bacilos; 3-espiroquetas; 4-cocobacilos; 5-filamentoso; 6-diplococo; 7-cocos en cadena; 8-Racimos en forma de uva, Adaptado de (Rosenthal and Tan, 2011).

Las bacterias pueden mantenerse unidas unas con otras después de la división celular, pero conservando siempre la independencia celular. Si el plano de división es único, podemos encontrar diplococos o cocos en cadena (microorganismos del género *Streptococcus*). Si los planos de división son muchos, los cocos pueden agruparse en tétradas o en racimos (*Staphylococcus*). Los bacilos pueden ser muy cortos (cocobacilos) o muy largos. Sus extremos pueden ser redondeados o rectos; pueden estar aislados, en cadenas, en filamentos o formando letras chinas (*Corynebacterium*). Los bacilos curvos pueden tener forma de coma (*Vibrio cholerae*) (Pírez y Mota, 2006).

a. Identificación macroscópica

La morfología de las colonias es fundamental en la identificación preliminar y para la diferenciación de los microorganismos. Para la observación morfológica es preferible examinar colonias de cultivos frescos crecidas en medios no selectivos. En este paso de la identificación es muy importante el aislamiento de las bacterias en cultivo puro ya que ésta debería estar compuesta por un solo tipo de microorganismos y procedería de una única célula. Las colonias de una única especie, cuando crecen en medios específicos y bajo condiciones idóneas se describen por sus características de tamaño, forma, consistencia, y a veces por su color (Fernández *et al.*, 2010).

El tamaño de las colonias bacterianas es generalmente uniforme entre una misma especie. Por ejemplo, las colonias de estreptococos tienen un tamaño más pequeño que las de los estafilococos y las enterobacterias. La forma está determinada por los bordes y el grosor de la colonia. El borde puede ser liso o rugoso e irregular; la colonia, abultada o plana. La textura de la colonia es también importante (**Figura 3**). Puede variar desde seca a viscosa, con superficie lisa o granular. Algunos microorganismos producen una colonia pigmentada, lo que puede ser de ayuda en el proceso de identificación (ejemplo: *Pseudomonas aeruginosa* (pigmento verde), *Serratia marcescens* (pigmento rojo) aunque en una misma especie puede haber cepas no pigmentadas (Fernández *et al.*, 2010).

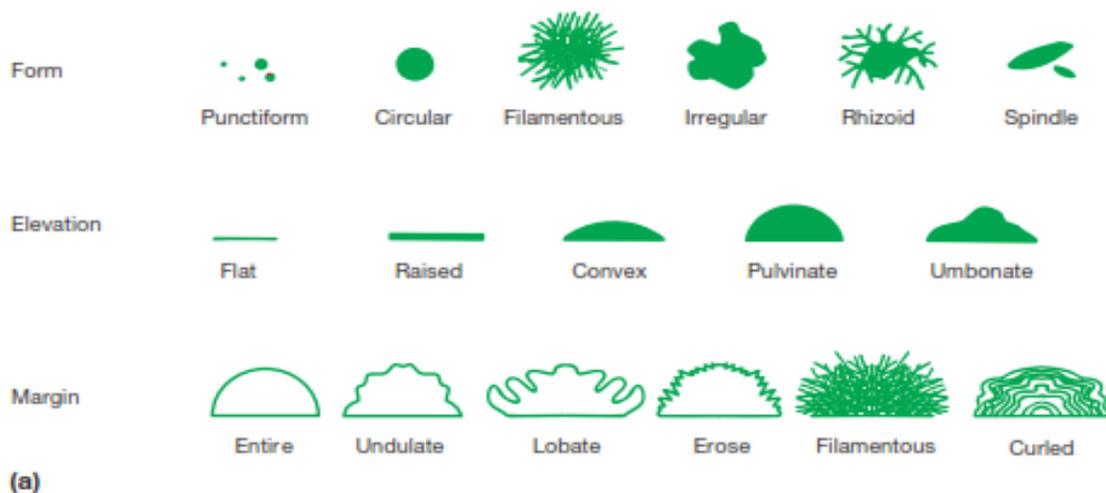


Figura 3. Morfología de colonias bacterianas. (a) Variaciones en la morfología de colonias bacterianas observadas a simple vista. La forma general de la colonia y la forma del borde o margen pueden determinarse mirando hacia abajo en la parte superior de la colonia. La naturaleza de la elevación de la colonia es evidente cuando se ve desde el lado cuando la placa se mantiene al nivel de los ojos (Prescott *et al.*, 2008)

b. Identificación microscópica

La morfología bacteriana debe ser observada con el microscopio óptico o el microscopio electrónico, dado el tamaño pequeño de estos microorganismos (Pérez y Mota, 2006). Según las características de las bacterias, de la muestra e incluso de lo que se quiera observar en ella, puede recurrirse a distintas formas de visualizarlas. En general, la observación se realiza en fresco, mediante tinciones o por técnicas especiales (Liébana, 2002). El examen en fresco permite visualizar las bacterias vivas e incluso observar sus movimientos. Si los microorganismos provienen de un medio líquido, se utilizará una gota del mismo, pero si proceden de un medio sólido se incorporarán a un líquido isotónico que conserve la forma bacteriana (p. ej., solución salina con un 0,9% de NaCl) (Liébana, 2002).

La tinción de Gram es una coloración diferencial, dado que las bacterias pueden clasificarse según su respuesta en Gram positivas o Gram negativas. Las primeras se tiñen de color azul violeta y las segundas adquieren un color rosado o rojo (Pérez y Mota, 2006). Esta técnica se inicia fijando la muestra por calor y se añade un colorante, el cristal violeta, que tiñe todas las bacterias del medio. Tras ello se fuerza la coloración con un mordiente de yodo. Si se parase la tinción en ese momento, todas las bacterias aparecerían de color violeta. A continuación, se usa un decolorante, alcohol acetona, que hará perder el cristal violeta a los Gram negativos. En ese instante, las Gram positivas siguen de color violeta, pero los Gram negativos no se ven al no estar coloreadas. Para visualizar éstas se usa el colorante de contraste, generalmente safranina o fucsina, que las tiñe de rojo (Liébana, 2002). Las diferencias de tinción de las bacterias se deben por cambios en la composición química y estructura de las paredes celulares, que facilitan la retención o eliminación del colorante primario después del proceso de decoloración (Aquiahuatl y Pérez, 2004). En la **Figura 4** se muestra dicho proceso de diferenciación entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

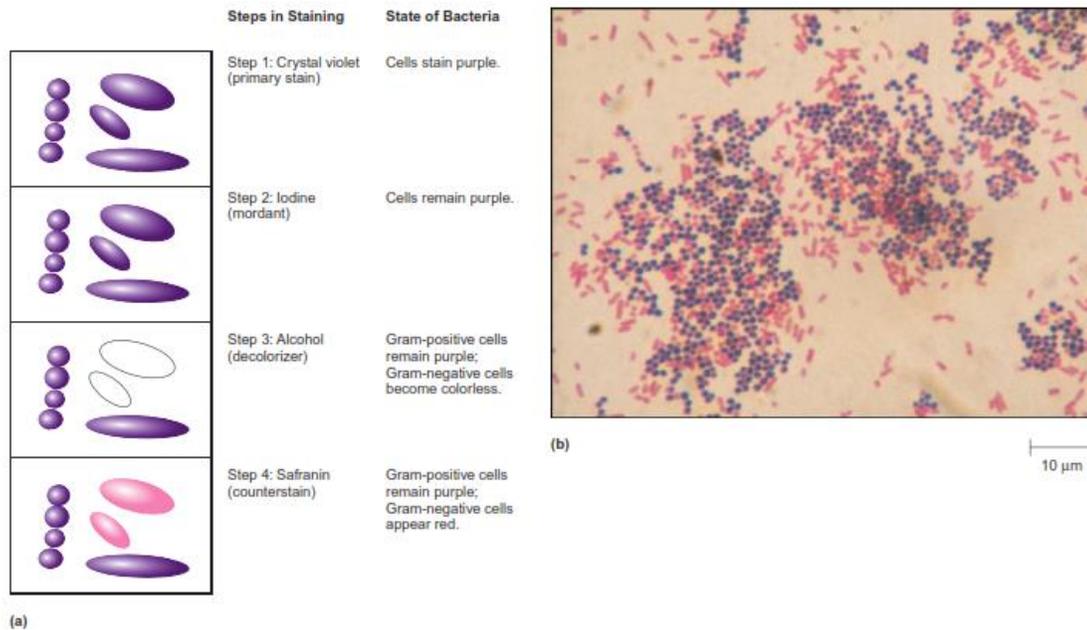


Figura 4. Tinción de Gram. (a) Procedimiento de la tinción Gram. (b) Resultados de una tinción Gram: Célula Gram-positiva (púrpura) es *Staphylococcus aureus*; Célula Gram-negativa (rosa-rojizo) es *Escherichia coli* (Adaptado de Prescott *et al.*, 2008).

5.4.2. Identificación morfológica de los hongos

Los hongos son organismos eucarióticos y de mayor tamaño que las bacterias, son de nutrición heterótrofa, es decir dependen de nutrientes orgánicos y son absorbidos a través de su pared celular y membrana plasmática (Aquihuatl y Pérez, 2004). Estos organismos, “vistos con el microscopio, presentan básicamente dos tipos de formas: una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular llamada levadura” (Liébana, 2002).

También existen hongos dimórficos principalmente patógenos que se presentan en las dos formas, dependiendo de condiciones ambientales, como la temperatura. Las levaduras se caracterizan por ser de forma esférica u oval, se reproducen asexualmente por gemación, mientras que los hongos filamentosos presentan un cuerpo o estructura vegetativa que se denomina como talo, generalmente están constituidos de hifas ramificadas que forman el micelio, algunos hongos presentan tabiques transversales o septos. El principal mecanismo de reproducción de los hongos es asexual, por fragmentación de hifas vegetativas o por la producción de esporas en conidióforos y esporangióforos formados en hifas aéreas las cuales son reproductivas. Sin embargo, la descripción de las estructuras de reproducción sexual, son el principal criterio de clasificación, por el que pueden ser ubicados en tres subdivisiones o phylum: Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Aquihuatl y Pérez, 2004). La identificación de los hongos está primariamente basada en las

diferencias morfológicas de las estructuras reproductivas y la forma en que las esporas o conidios se producen en células especializadas. La mejor ayuda la constituyen las Claves taxonómicas (Méndez-Úbeda *et al.*, 2018).

5.5. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS

Los métodos moleculares se han erigido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos. Las técnicas del DNA recombinante ayudan a subsanar estos problemas y a clasificar a los organismos de un modo más correcto, de acuerdo a su filogenia. Estos estudios se pueden realizar analizando la secuencia total de nucleótidos del genoma del microorganismo, pero actualmente se utilizan los estudios del ARNr 16S o 18S, porque son secuencias que se han mantenido bastante uniformes a lo largo de la evolución, y por eso se ven claramente las diferencias entre los distintos microorganismos y se pueden realizar árboles filogenéticos y esquemas evolutivos (Herrera, 2005).

El ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria caracterizada por la secuencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla. En eucariotas el ARNr18S es la macromolécula equivalente. Dado que los ARNr 16S y 18S proceden de las subunidades pequeñas de los ribosomas, el acrónimo ARNr SSU (del inglés, small subunit) se utiliza para ambos (Rodicio y Mendoza, 2004).

a. Identificación mediante secuenciación del ADNr 16S

Las técnicas de identificación molecular mediante el análisis del 16S ARNr u otros genes, se basan en la amplificación genómica y en la secuenciación de esos genes o sus fragmentos. El medio de cultivo o las condiciones de incubación no serán factores determinantes, pero sí serán factores críticos la extracción del ADN cromosómico y la amplificación, procesos técnicos que deberán tenerse en cuenta en toda metodología de identificación molecular.

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S incluye las siguientes etapas, extracción del ADN, amplificación del gen a partir de la muestra apropiada, determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón y análisis de la secuencia (Rodicio y Mendoza, 2004), finalmente con las secuencias analizadas se procede a la construcción del árbol filogenético, esta metodología se resume en la **Figura 5**. A continuación se describen cada de las etapas mencionadas anteriormente, según el proceso planteado por Bou *et al.* (2010).

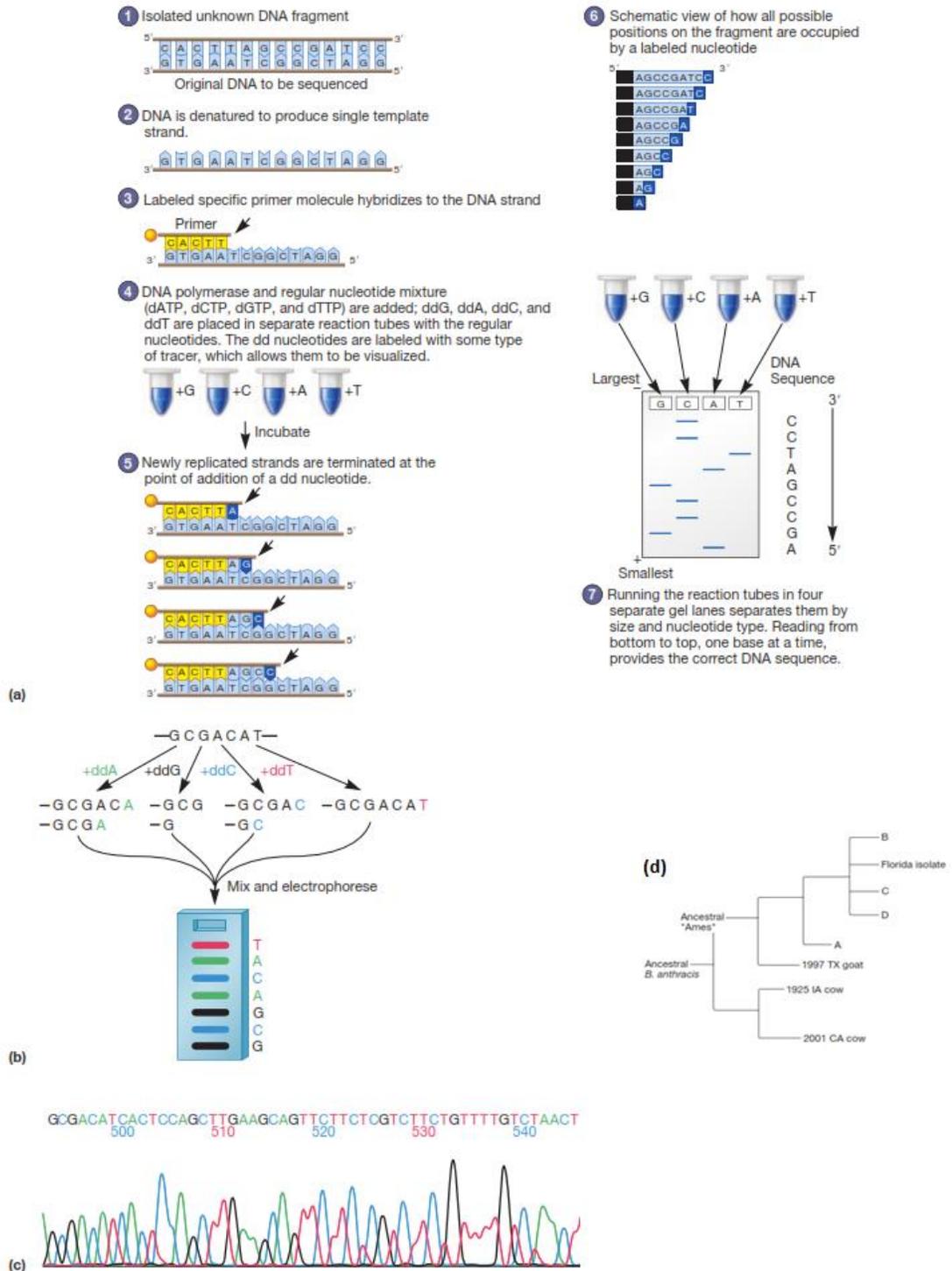


Figura 5. El método Sanger para la secuenciación de ADN. (a) Los pasos 1-6 se utilizan para la secuenciación manual y automática, el paso (7) muestra la preparación de un gel para la secuenciación manual en el que se utilizan los ddNTP radiomarcados. (b) Parte de una secuencia de ADN automatizada, Aquí los ddNTPs están marcados con tintes fluorescentes. (c) datos generados durante una secuencia de ADN automatizada (cromatograma). (d) Análisis de la secuencia (corrección de errores, comparación con otras secuencias, trazado del árbol filogenético) Prescott *et al.* (2008).

➤ **Extracción de ADN**

El ADN genómico se extrae a partir de células totales mediante diferentes métodos estándar o sistemas comerciales con versatilidad sobre el tipo de muestra clínica o de matrices, en el caso de tratarse de una muestra alimentaria o ambiental.

➤ **Amplificación de ADN**

La amplificación se lleva a cabo en un termociclador, gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desarrollada por Mullis en 1985. El ADN extraído se utiliza como un molde para dicha amplificación de una secuencia del ARNr 16S con un rango de tamaño entre 500-1500 (o de otro tamaño si se utilizan otros genes). Para confirmar una amplificación óptima, es imprescindible la electroforesis del producto de PCR en gel de agarosa. Debe observarse una sola banda (perteneciente a un único amplicón) con el tamaño adecuado. En el caso de amplificarse un amplicón con el tamaño deseado y otro con diferente tamaño, pueden utilizarse diferentes opciones: extracción del amplicón deseado del gel de agarosa, modificación de las condiciones de PCR o utilización de nuevos cebadores.

➤ **Secuenciación del amplicón**

La secuenciación es un proceso análogo a la PCR, que utiliza el ADN como molde pero que los cebadores directo y reverso actúan en reacciones independientes, los cuales pueden ser los mismos cebadores de amplificación u otros diseñados para esta etapa. A diferencia de la PCR, no se genera un nuevo molde, sino que se reutiliza en los ciclos programados (25-35). Se añaden bases marcadas con fluorocromos o terminadores y bases no marcadas, que se incorporan aleatoriamente a la síntesis. Los terminadores finalizan la síntesis de la secuencia, por lo que al final se obtiene una mezcla de productos de ADN de diferentes tamaños. Cada base (adenina, timina, guanina y citosina) se marca con un fluorocromo diferente que absorbe a diferente longitud de onda, detectándose posteriormente.

Los terminadores no incorporados se eliminan mediante la purificación del producto y el tamaño de cada uno se determina mediante electroforesis capilar. Según se va conociendo el tamaño y el terminador de cada fragmento (separados en gel o por elución) se determina la secuencia de bases representadas cada una por un color diferente y se editan de forma manual o automática. Las cadenas de ADN se secuencian independientemente, generándose la secuencia directa y la reversa (complementaria).

➤ **Análisis de secuencias**

La observación del electroferograma (secuencias de bases ofrecidas por los secuenciadores) constituye el primer paso del análisis de las secuencias. A veces se producen errores en el proceso de secuenciación, el equipo asigna una letra

incorrecta en lugar de una base nitrogenada o asigna una base que no corresponde según el pico correspondiente en el electroferograma; por ejemplo, asignación de dos T existiendo 3, o posiciones ambiguas (N). Para resolver estas situaciones se reedita visualmente el electroferograma y se corrige, y/o se alinean y ensamblan las secuencias directas y reversas en una secuencia consenso. Solamente aquellas secuencias que presentan <1% de indeterminaciones (~15 posiciones N, purinas R, pirimidinas Y) se consideran para el análisis. En ocasiones se hace necesaria la repetición del ensayo debido a que el microorganismo inicial no se encontraba en cultivo puro, por baja concentración del extracto cromosómico o del producto de PCR, etc.

➤ **Construcción de árboles filogenéticos**

La filogenia es el estudio de la evolución y desarrollo de las especies. La comparación de secuencias de algunas macromoléculas, es la forma más precisa y confiable para inferir en las relaciones filogenéticas. Estos datos, son preferibles sobre otros métodos moleculares por poseer cercanías evolutivas, debido a que permiten interpretaciones cuantitativas y directas, además que van conformando una creciente base de datos para subsecuentes referencias (Herrera, 2002). La comparación de las secuencias del gen ADNr 16S permite establecer relaciones filogenéticas entre organismos procariotas, de forma similar la región ITS permite hacer lo mismo en eucariotas, lo cual ha traído una gran repercusión en la taxonomía microbiana, ya que ha dado lugar al sistema de clasificación actual que ha permitido la identificación rápida y precisa tanto de procariotas como de eucariotas (Villota, 2013).

Los árboles filogenéticos permiten esquematizar las relaciones jerárquicas que surgen entre los microorganismos a través de la evolución. Estos árboles constan de nodos unidos entre sí por ramas, las longitudes de estas ramas pueden significar la distancia evolutiva que hay entre nodos. Los árboles agrupan los organismos, de manera que todo lo que hay alrededor de un nodo es considerado un grupo monofilético, es decir, que todo el grupo se origina de un único ancestro común y por tanto puede poseer rasgos comunes, cuando se presenta que un grupo excluye a algunos de sus descendientes se denomina parafilético (Baldauf, 2003).

Existen diversos métodos para construir árboles que puedan ser usados para datos moleculares. Según Sandria (2003), de acuerdo a los tipos de datos usados los métodos se dividen en dos categorías. La primera categoría comprende los métodos basados en distancia, en estos se calcula una distancia evolutiva para todos los pares de unidades taxonómicas operacionales (OTUs; especies o poblaciones) o secuencias de ADN (o aminoácidos), y el árbol filogenético se construye considerando las relaciones entre estas distancias. Una vez que se han obtenido los valores de distancia se pueden utilizar varios métodos para obtener el

árbol, los cuales son: método de distancia aritmética (encadenamiento), UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means), método de distancia transformada (TD), método de Fitch y Margoliash (FM), método de evolución mínima (ME), método de distancia de Wagner (DW), método Neighborliness (ST), método Neighbor-Joining (NJ).

La segunda categoría corresponde a los métodos basados en caracteres discretos: se utilizan datos con estados de caracteres discretos tales como estados de nucleótidos en secuencias de ADN, y el árbol se construye considerando las relaciones evolutivas de OTUs o secuencias de ADN en cada posición de carácter o nucleótido. Los principales métodos usados para la construcción de los árboles en esta categoría son, método de máxima parsimonia (MP), método de parsimonia evolutiva (EP), método de máxima probabilidad (ML).

5.6. MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS

El antagonismo es un proceso natural entre comunidades microbianas y se caracteriza por la inhibición, deterioro o muerte de alguna especie de microorganismos por la acción de otra; o una relación entre dos poblaciones en la cual una de ellas causa efectos deletéreos o negativos a la otra (Pérez *et al.*, 2014). Existen diversos mecanismos de acción empleados por los microorganismos antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos, entre ellos antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia (Larrea, 2001). A continuación, se describen dos de estos mecanismos:

El mecanismo de competencia por espacio, es el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio. Otro de los mecanismos es el de interacción directa con el patógeno, en este se puede presentar el parasitismo, el cual consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista.

5.7. CRECIMIENTO MICROBIANO

El crecimiento se considera como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo, lo cual, para los organismos unicelulares, conduce a un aumento en el número de individuos en la población. Se puede considerar el crecimiento al nivel de individuos dentro de una población (ciclo celular) o el crecimiento de poblaciones (ciclo de crecimiento). El crecimiento de las poblaciones celulares se puede subdividir en sistemas cerrados, como el cultivo intermitente y en sistemas abiertos, como el cultivo alimentado por lotes y el cultivo continuo (Scragg, 1999).

La mayoría de los microorganismos continúan su crecimiento hasta que la célula se divide en dos células hijas mediante el proceso de fisión binaria, el cual conduce al crecimiento de las poblaciones. El estudio del crecimiento de forma individual de la célula, presenta complicaciones, debido a que los métodos analíticos no son los suficientemente sensibles como para ser aplicados a estructuras tan pequeñas. Es por esto que habitualmente para evaluar el crecimiento se analiza el aumento de la población microbiana (Apella y Araujo, 2005).

5.7.1. Crecimiento exponencial

El crecimiento de una población tiene lugar en forma exponencial. Una célula se divide en dos células hijas y luego éstas se dividen a su vez en dos nuevas células, o sea que, en cada período de división, la población se duplica por lo que la multiplicación corresponde a una progresión geométrica: $2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \dots \rightarrow 2^n$ (Apella y Araujo, 2005). Schlegel y Zaborosch (1997) describen, que el número de células aumenta con un factor determinado cada unidad de tiempo. Se habla de crecimiento exponencial. Si la unidad de volumen de un cultivo discontinuo en crecimiento contiene un número inicial de células (N_0), el número de células en el tiempo (N) al cabo de n divisiones es $N_0 * 2^n$. Pasando a los logaritmos se obtiene la siguiente ecuación:

$$N = \log N_0 + n * \log 2 \quad \text{Ecc. 1}$$

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} \quad \text{Ecc. 2}$$

Para el número de divisiones celulares por hora, también llamada tasa de división v , se obtiene:

$$v = \frac{n}{t} = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2 * (t - t_0)} \quad \text{Ecc. 3}$$

El tiempo necesario para un ciclo de división es el tiempo de generación:

La tasa de división o velocidad de crecimiento (v) varía con la naturaleza y concentración de los nutrientes, pH, temperatura, fuerza iónica del medio, etc., además de factores genéticos (Apella y Araujo, 2005).

$$g = \frac{t}{n} = \frac{1}{v} \quad \text{Ecc. 4}$$

5.7.2. Crecimiento microbiano en cultivo por lotes

El cultivo por lotes o intermitente representa el crecimiento en un sistema cerrado puesto que no se añade medio nuevo al cultivo. Cuando un medio de crecimiento adecuado se inocula con células viables, tiene lugar una secuencia de eventos característica llamada ciclo de crecimiento, el cual se puede describir por medio de una gráfica del peso seco celular (x), (g/L) contra el período de incubación en horas (h) (Scragg, 1999). Esta gráfica tiene un aspecto sigmoide y permite diferenciar varias fases de crecimiento que se presentan regularmente: fase de latencia (lag) o de retraso, fase exponencial (logarítmica), fase estacionaria y fase de muerte (Schlegel y Zaborosch, 1997), tal como se muestran en la **Figura 6**.

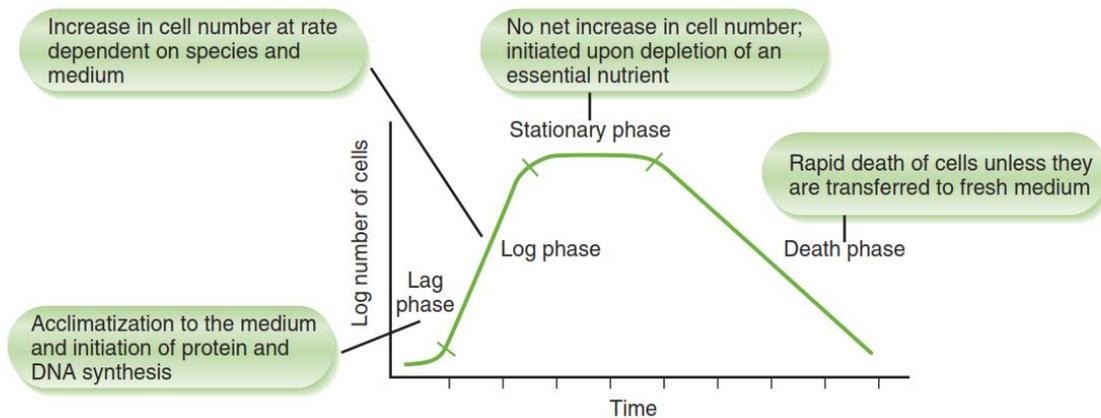


Figura 6. Curva de crecimiento bacteriano que muestra las cuatro fases típicas del crecimiento. Adaptado de (Rosenthal and Tan, 2011).

▪ Fase de latencia o de retraso

La fase de latencia abarca el lapso de tiempo entre la inoculación y el momento en que se alcanza la tasa de división máxima. La duración de la fase de latencia depende sobre todo del cultivo previo, de la edad del inóculo, así como de lo apropiado que sea el medio de cultivo (Schlegel y Zaborosch, 1997). En esta fase las células sintetizan enzimas involucradas en el metabolismo de los nutrientes disponibles, se incrementa la síntesis de macromoléculas como RNA y proteínas. Sin embargo, la síntesis de ADN permanece constante y las células no se dividen. Si las células provienen de un medio de cultivo diferente, o de un cultivo agotado (viejo) con acumulación de metabolitos tóxicos para las células, éstas requerirán mayor tiempo para reiniciar el crecimiento activo y presentarán una fase lag larga.

En contraposición, si las células provienen de un medio idéntico y han sido obtenidas de un cultivo joven, la fase de latencia será corta o inexistente. A continuación, se detallan las fases del crecimiento microbiano, según Apella y Araujo (2005).

- **Fase exponencial**

Es la fase en que las células comienzan a dividirse y entran en un periodo de crecimiento o de incremento logarítmico, razón por la cual es denominada como fase logarítmica o de crecimiento exponencial (Tortora *et al.*, 2007). Frecuentemente se habla de ésta como la fase de “crecimiento equilibrado”, donde la síntesis de todos los constituyentes celulares aumenta con rapidez constante, de modo que la población de células se duplica y continúa duplicándose a intervalos regulares (Scragg, 1999), se debe considerar que la velocidad de crecimiento exponencial es afectada por condiciones ambientales, tales como, la temperatura, composición del medio entre otras.

- **Fase estacionaria**

La fase estacionaria se presenta como consecuencia del agotamiento de nutrientes o la acumulación de productos tóxicos del metabolismo, lo cual disminuye la velocidad de crecimiento hasta que llega a detenerse. La transición entre la fase exponencial y estacionaria implica una etapa de crecimiento desequilibrado, durante el cual los componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades. En consecuencia, las células en fase estacionaria tienen una composición química diferente a la de las células en fase exponencial.

- **Fase de muerte**

Si la incubación del cultivo se prolonga varias horas después que la población ha alcanzado la fase estacionaria, las células alcanzarán la fase de muerte que se caracteriza porque la velocidad de crecimiento es constante, indicando que el número de células vivas decrece con el tiempo en progresión geométrica. En ciertos casos, la muerte se acompaña de lisis celular que se manifiesta por una disminución del número de células viables y masa celular. Cuando no hay lisis, el número de células viables decrece mientras que la masa celular permanece constante.

5.7.3. Medición del crecimiento microbiano

La medición del crecimiento microbiano implica distinguir entre el número de células viables y el número de células totales. El segundo incluye células vivas y muertas, mientras el primero incluye sólo las células vivas. Para distinguir entre ambos tipos de células se utilizan métodos físicos y químicos. En la **Tabla 1**, se muestran algunas de las técnicas empleadas.

**Tabla 1. Métodos empleados para determinar el crecimiento microbiano
(Fuente: Apella y Araujo, 2005)**

Determinación del número de células		Determinación de la masa celular	
Vivas y muertas	Vivas	Directos	Indirectos
Recuento en cámara	Recuento en medio sólido	Determinación de peso seco	Turbidimetría
Recuento indirecto en porta objetos Nefelometría	Filtración sobre membrana	Estimación de proteínas	Consumo de un nutriente

El recuento en placa, es uno de los métodos más prácticos para distinguir células viables y no viables en una suspensión bacteriana, cada bacteria viable da lugar a la formación de una colonia después de la incubación en un medio agarizado apropiado. Se diluye la muestra, se toma un volumen determinado y se siembra en un medio agarizado contenido en cajas de Petri. Se incuba y una vez desarrollado el cultivo, se cuenta el número de colonias expresándose el resultado como UFC/mL (unidades formadoras de colonia por mL).

Al utilizar el método de turbidimetría se obtiene ventaja del hecho de que, en una celda espectrofotométrica, las células microbianas desvían la luz, de modo que la cantidad de ésta que llega al detector del espectrofotómetro está relacionada directamente con el número de células presentes en la muestra del cultivo de acuerdo a la Ley de Beer. Por lo general, se emplean longitudes de onda alrededor de 600 nm. Es importante entender que como la absorbancia es afectada por el tamaño y la forma de las células, la relación entre la absorbancia y el número de células cambia si el tamaño o la forma de ésta cambian durante el crecimiento del cultivo (Scragg, 1999).

La absorbancia se utiliza para graficar el crecimiento bacteriano, cuando las bacterias están en fase exponencial de crecimiento o de declinación, la representación de la absorbancia frente al tiempo forma una línea recta. Si las lecturas absorbancia son compatibles con el recuento en placa se puede utilizar en estimaciones del número de bacterias obtenidas por turbidimetría. Para que puedan visualizarse las primeras trazas de turbidez debe haber más de un millón de células por mililitro y se precisan de 10 a 100 millones por mililitro para que la suspensión sea lo bastante turbia para ser medida por el espectrofotómetro (Tortora *et al.*, 2007).

5.8. BIOFERTILIZANTE

El desarrollo de este nuevo tipo de productos ha llevado a la necesidad de definir exactamente lo que significa el término. De hecho, en los últimos veinte años se ha definido de diferente manera, lo que refleja el desarrollo de nuestra comprensión de las relaciones entre los microorganismos y las plantas. Los biofertilizantes, podrían definirse como inoculantes microbianos, que contienen formulaciones vivas o latentes de microorganismos beneficiosos que pueden mejorar y promover el crecimiento de las plantas (Malusá, 2012). Los biofertilizantes también podrían denominarse cultivos microbianos, bioinoculantes, inoculantes bacterianos o fertilizantes bacterianos. Estos biofertilizantes también podrían incluir: los fijadores de N₂, solubilizadores de P, movilizadores de P, y rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas.

El biofertilizante es un fertilizante natural que contiene una gran población de microorganismos específicos o un grupo de microorganismos beneficiosos para mejorar la productividad del suelo, ya sea fijando N atmosférico o solubilizando el fósforo del suelo o estimulando el crecimiento de las plantas a través de la síntesis de sustancias promotoras de crecimiento o células latentes, que activan el proceso biológico para facilitar la disponibilidad de nutrientes (Simarmata *et al.*, 2017).

5.8.1. Tipos de biofertilizantes

A partir del conocimiento sobre la función de los microorganismos, se pueden crear bioinoculantes para diversos tipos de suelo y sistemas de cultivo (Ahmad *et al.*, 2008). Aquellos microorganismos con atributos específicos para la movilización de fósforo en el suelo se denominan microorganismos movilizadores de fósforo. Según el Instituto Colombiano Agropecuario - ICA (2011) pueden clasificar en:

- **Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno:** Son microorganismos capaces de establecer una simbiosis efectiva con las leguminosas hospederas para fijar nitrógeno.
- **Bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno:** Son microorganismos de vida libre, capaces de fijar nitrógeno atmosférico.
- **Hongos micorrizógenos:** Son hongos simbióticos mutualistas capaces de asociarse eficazmente con las raíces de las plantas para aumentar la absorción de nutrientes.
- **Microorganismos solubilizadores de fosfatos:** Son aquellos capaces de solubilizar formas no disponibles de fósforo.
- **Microorganismos productores de promotores de crecimiento vegetal (MPGP):** Son aquellos capaces de sintetizar sustancias que estimulan o favorecen el crecimiento de la planta.

- **Microorganismos transformadores de materia orgánica:** Son aquellos capaces de acelerar el compostaje y otros procesos de transformación de la materia orgánica para la producción de abonos.

En la **Tabla 2**, se muestran los diferentes tipos de biofertilizantes que existen y algunos de los principales microorganismos (bacterias y hongos) que se utilizan para la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato, la movilización de fosfato y la movilización de zinc y potasio (Afanador, 2017). Se destacan los géneros de bacterias como *Pseudomona*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Rhizobium*, que se encuentran en múltiples categorías de biofertilizantes, lo que los hace muy atractivos para el desarrollo de productos.

Tabla 2. Principales tipos de biofertilizantes (fuente: Afanador, 2017)

Fijadores N ₂	Microorganismos fijadores de fosfato	PGPR*	Movilizadores de fosfato (micorrizas)	Movilizadores de zinc y potasio
Vida libre:	<i>Aspergillus niger</i> (no virulento)	<i>Azotobacter</i>	<i>Glomus spp.</i>	Zinc:
<i>Achromobacter</i>	<i>Trichoderma spp.</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Entrophospora</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Acetobacter</i>	<i>Paecilomyces spp.</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Acaulospora spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Escutellaspara</i>	<i>Rhizobium spp.</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Glomus spp.</i>	Potasio:
<i>Azotobacter</i>	<i>Torulospora globasa</i>	<i>Arthrobacter</i>		<i>Bacillus spp.</i>
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i>		<i>Pseudomonas</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Thiobacillus (SOM)</i>	<i>Rhizobium</i>		
Simbióticos:	<i>Aspergillus niger</i> (no virulento)	<i>Streptomyces</i>		
<i>Rhizobium spp.</i>		<i>Xanthomonas</i>		
<i>Bradyrhizobium spp.</i>				
<i>Azolla</i>				
Simbióticos:				
<i>Rhizobium spp.</i>				
<i>Bradyrhizobium spp.</i>				
<i>Azolla</i>				

- PGPR*: Plant growth-promoting rhizobacteria

5.8.2. Consorcios microbianos

Uno de los mayores desafíos del campo de inoculantes microbianos es prosperar haciendo uso de consorcios microbianos eficientes que se basa en diversas cepas que exhiben propiedades de PGP y que operan de forma sinérgica junto con los recursos minerales, así como la coexistencia en interacción con los hospedadores de plantas, como lo muestra la **Figura 7**. Es decir, la absorción de nutrientes a través de la fijación de N, solubilizando P, produciendo sustancias que promueven

el crecimiento de las plantas (PGP como el ácido indolacético, giberelina y citoquinina, etc.) y efectos indirectos (como: alivio y/o protección contra restricciones bióticas y abióticas) en el crecimiento de las raíces, simbiótico (rizobial y micorrízico, etc.) y sobre el rendimiento de la planta (crecimiento, productividad, etc.) La heterogeneidad de la rizosfera y el microbioma benéfico influye en el crecimiento y en la plasticidad de la arquitectura de la raíz que conduce a una exploración efectiva del suelo y, por lo tanto, a una captación eficiente de nutrientes con consecuencias positivas sobre el crecimiento y el rendimiento de la planta huésped (Bargaz *et al.*, 2018).

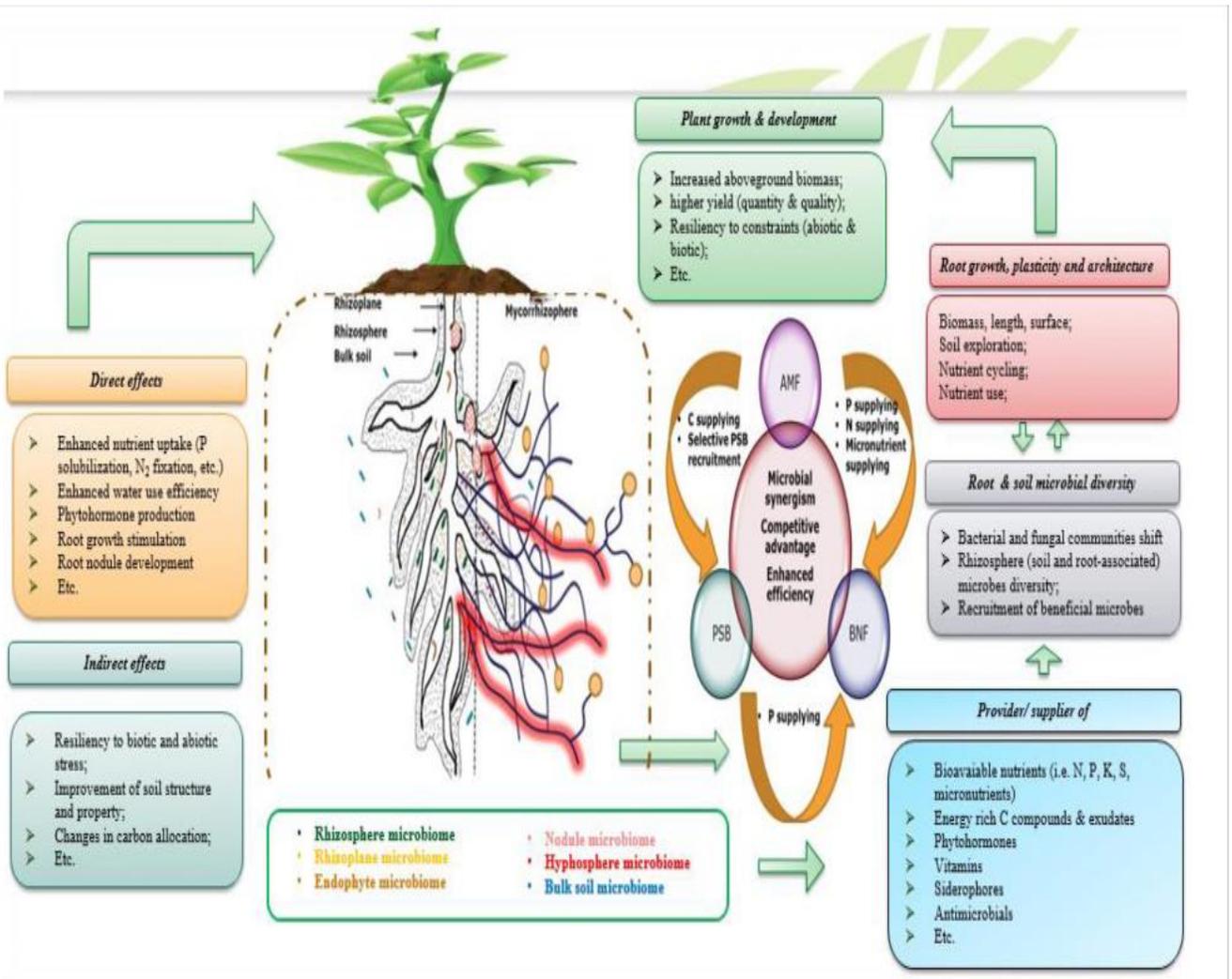


Figura 7. Ilustración simplificada del concepto de consorcios microbianos que destaca la PGPM de la rizosfera beneficiosa y su acción directa. Bargaz *et al.*, (2018).

5.8.3. Modo de aplicación del biofertilizante formulado.

Existen muchas formas de aplicar el biofertilizante formulado en el suelo y estas son: (a) inoculación de semillas con formulaciones en polvo, (b) biofertilizantes secos mezclados con las semillas en la tolva de semillas, (c) método de rociado (una pequeña cantidad de agua mezclada con semillas antes de agregar y mezclar el polvo de turba), (d) método de suspensión (el biofertilizante se suspende en agua, luego se agrega a las semillas y se mezcla), (e) sedimentación de semillas, (f) el biofertilizante y el adhesivo se aplican como suspensión a las semillas y se recubren con material molido como cal, (g) suspensión de turba en agua rociada en el surco durante la siembra, (h) tratamiento de semillas o inoculación de semillas, (i) aplicación de suelo y (j) inmersión de raíz de plántulas (Bashan, 2014).

5.9. PRUEBAS DE MACROTÚNEL

El macrotúnel es una construcción agrícola de estructura metálica, usada para el cultivo y/o protección de plantas, con cubierta de película plástica traslúcida que no permite el paso de la lluvia al interior es una estructura económica y muy sencilla, que permite cubrir grandes superficies de cultivo cuando no se precisa controlar en exceso las condiciones interiores del invernadero, cuyas dimensiones posibilitan el trabajo de las personas en el interior. Los macrotúneles pueden contar con un cerramiento total de plástico en la parte superior y malla en los laterales (Hydro environment, 2015).

5.9.1. Diseño de bloques al Azar

Según Gemmell (2002) en algunos experimentos las unidades experimentales no son homogéneas, es decir, algunas tienen características diferentes a las demás. Para eficientar el experimento las unidades experimentales se agrupan por su homogeneidad y a esos grupos se les aplican los tratamientos. Así se evalúa también el impacto del grupo de unidades llamado bloque. La varianza total se va a separar en tres varianzas, la de tratamientos, la de bloques y la del error.

Características del diseño: Las unidades experimentales se agrupan en r bloques. Se definen los t tratamientos que se van a aplicar a las n unidades experimentales. Las unidades experimentales de cada bloque se sortean para la asignación a cada tratamiento como lo muestra la **Tabla 3**.

Tabla 3. Diseño de Bloques al azar para estudio de variables (Gemmell, 2002).

	Bloq 1	Bloq 2	Bloq 3
Trat 1	Y11	Y12	Y1j
Trat 2	Y21	Y22	Y2j
Trat 3	YI1	YI2	YIj

5.9.2. Cultivos:

- **Chiltoma (*Capsicum annuum L.*)**, mostrada en la **Figura 8**, la planta es herbácea de forma variable, con un ciclo de cultivo anual, de porte variable, dependiendo principalmente de la variedad, de las condiciones climáticas y del manejo, entre los 0.5 m (en determinadas variedades de cultivo al aire libre) y más de 2 m (gran parte de los híbridos cultivados en invernadero). El ciclo vegetativo también varía de acuerdo a las variedades. Este puede durar entre los 120 a 150 días. La planta de chiltoma es monoica, tiene los dos sexos incorporados en una misma planta, y es autógama, es decir que se autofecunda, aunque puede experimentar hasta un 45% de polinización cruzada, es decir, ser fecundada con el polen de una planta vecina (INTA 2006).



Figura 8. Fruto de Chiltoma. Fuente: (IICA, 2007).

Fertilización: Recomendaciones generales según la disponibilidad de fósforo y potasio es: baja (N: 150; P: 75; K: 100) Kg/H; Medio (N: 150; P: 50; K: 50) Kg/H; Alto (N: 150; P: 0; K: 0) Kg/H (INTA 2006).

- **Rábano (*Raphanus sativus*)** El rábano es un cultivo hortícola de rápida maduración que puede ser cultivado tanto en suelos minerales como orgánicos. El producto comestible de esta especie es su raíz engrosada de color rojizo, rosa, blanco o combinado, que se consume fresca en ensaladas la que generalmente alcanza su tamaño a cosecha aproximadamente 20 o 30 días después de haber sido sembrado (Ohio State University, 2001).

Fertilización: El rábano es un cultivo muy exigente a un adecuado balance nutricional del suelo, debido fundamentalmente a su ritmo de crecimiento y el poco desarrollo de su sistema radical. Algunos autores plantean que sus requerimientos están comprendidos entre: 60 – 120 Kg/ha de nitrógeno, 40 – 100 Kg/ha de P₂O₅ y 70 – 140 Kg/ha de K₂O y para lograr 100 Kg de producción las sustancias nutritivas extraídas diariamente son de: 16.6 g de N, 6.0 g de P₂O₅ y 17.0 g de K₂O (Ohio State University, 2001).

- **Cultivo de pepino (*Cucumis sativus*)** mostrado en la **Figura 9**. El ciclo del pepino es corto y varía de una localidad a otra dependiendo de las condiciones edafoclimáticas del cultivar sembrado y del manejo agronómico que reciba durante su desarrollo. Se considera como una baya falsa (pepónide), alargado cilíndrico, mide entre 15 y 35 cm de longitud, según el cultivo. Es un fruto carnoso color blanco en su interior y el exterior de color verde oscuro o claro, ásperos y verrugosos. Contiene flores de ambos sexos en la misma planta, por lo que se le considera monoica, de polinización cruzada; algunas variedades presentan flores hermafroditas (CENTA 2003).



Figura 9. Planta de Pepino, Fuente: (CENTA, 2003).

Fertilización: Recomendaciones generales según la disponibilidad de fósforo y potasio es muy bajo (N: 100; P: 75; K: 75) Kg/H; bajo (N: 100; P: 50; K: 50) Kg/H; Alto (N: 100; P: 0; K: 0) Kg/H (CENTA, 2003).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO

La caracterización del contenido microbiano de bioinsumos comerciales fabricados en Nicaragua, pruebas de antagonismos entre cepas seleccionadas y la formulación de un consorcio microbiano para un biofertilizante a nivel de laboratorio se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología de las Aguas del Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA) de la Universidad Nacional de Ingeniería, ubicado en el Recinto Universitario Simón Bolívar, en la Avenida Universitaria, Managua, Nicaragua. Localizada geográficamente en las coordenadas UTM 12.1435887 - 86.2675189; Las pruebas del efecto biofertilizante del consorcio bacteriano en macrotúnel sobre cultivos de interés agrícola se realizaron en un macrotúnel instalado en el mismo Recinto Universitario.

Los microorganismos aislados y seleccionados fueron enviados al Centro de Biología Molecular (CBM) de la Universidad Centroamericana (UCA), donde se contrataron los servicios de extracción de ADN; posteriormente el ADN extraído fue enviado al centro MACROGEN INC de Corea del Sur del Genomic Medicine Institute of the Seoul National University College of Medicine, donde se contrataron los servicios de secuenciación de ADN genómico. Una vez recibidas las secuencias se continuó con las actividades de bioinformática en el PIENSA-UNI.

6.2. CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO MICROBIANO DE BIOINSUMOS COMERCIALES FABRICADOS EN NICARAGUA

Esta etapa se realizó a través de observaciones microscópicas y macroscópicas, y también por medio de técnicas moleculares mediante el análisis del ADN ribosomal 16S para bacterias e ITS 1 e ITS4 para hongos. El presente trabajo relacionado con el aislamiento y caracterización microbiana a partir de bioinsumos artesanales, en su primera etapa (Búsqueda de *Bacillus subtilis*) efectuada por Méndez-Úbeda *et al.*, (2017), identificó 7 microorganismos de interés y que estaban presentes en bioinsumos artesanales procedentes de las zonas norte y occidental del país. Mediante el presente, se muestra la completa identificación y caracterización de la fracción cultivable de microorganismos, siguiendo con ésta línea de investigación.

6.2.1. Conservación de los microorganismos aislados de bioinsumos artesanales

La conservación de los microorganismos se llevó a cabo por medio del método de transferencia periódica. Este método consiste en transferir las cepas a un medio de cultivo nutritivo y fresco a intervalos que asegure su viabilidad (Hernández y Loaiza, 2014). En esta investigación la transferencia de los microorganismos se efectuó cada 30 días utilizando dos medios de cultivos específicos, Agar Miller (LB) para

bacterias y Agar Papa Dextrosa (PDA) para hongos (**Figura 10A**), y se almacenaron en un refrigerador a una temperatura de 10 °C.

■ Preparación de medios de cultivo

Las relaciones requeridas para la preparación de los medios de cultivos según las especificaciones del fabricante son:

Agar Miller (LB): se agregarán 40 gramos de LB comercial en un litro de agua destilada.

Agar Papa Dextrosa (PDA): Se agregaron 39 g de agar papa dextrosa comercial en un litro de agua destilada.

Una vez disueltos en agua destilada, los medios de cultivo se sometieron a calentamiento hasta llegar al punto de ebullición en el Hot Plate CORNING PC-620D (**Figura 10B**), posteriormente se dosificaron 10 mL en tubos de ensayos, los cuales fueron esterilizados por medio de calor húmedo en autoclave YAMATO SQ810C a 121 °C durante 15 minutos a una presión de 121 kPa (**Figura 10C**). Se utilizó una cinta adhesiva para el control de la autoclave, que cambia su color al alcanzar los 121 °C indicando una correcta esterilización. Finalizada la esterilización, los medios se vertieron en las placas de Petri en la proximidad de la llama del mechero (**Figura 10D**) y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Los medios, una vez esterilizados se conservaron en refrigeración a una temperatura de 10 °C (adaptado de Sanz, 2011).



Figura 10. Preparación de los medios de cultivo. A) Medios de cultivo comerciales en sus envases; B) Calentamiento del medio de cultivo en el Hot Plate; C) Esterilización en autoclave a 121°C durante 15 minutos; D) Placas Petri con el medio de cultivo solidificado (Fuente: Elaboración propia).

■ **Transferencia periódica de microorganismos aislados de bioinsumos artesanales**

La transferencia periódica (siembra) de los microorganismos aislados de bacterias y hongos, se llevó a cabo en un área de trabajo previamente esterilizada y cercana a la llama de un mechero, debido a que es capaz de crear un ambiente estéril en la zona alrededor y debajo de la llama. La técnica utilizada para la siembra de bacterias fue la de agotamiento por estrías, el procedimiento a seguir fue el descrito por Sanz (2011) y adaptado a los equipos del laboratorio:

- Como paso inicial se esterilizó el asa flameándola en el mechero hasta conseguir un rojo incandescente y dejándola enfriar en la proximidad de la llama, luego se tomó un inóculo de la muestra y se transfirió a un área pequeña de la superficie de la placa, próxima al borde, el inóculo se extendió formando estrías muy juntas sobre la superficie de una porción pequeña de la placa.
- Finalizado el paso anterior se flameó de nuevo el asa y se dejó enfriar, se tomó un inóculo del primer patrón de rayas formado, el segundo patrón de estrías se realizó sobre una porción virgen de la placa.
- Posteriormente el asa fue flameada y enfriada, se repitió el paso anterior esta vez usando como inóculo el segundo patrón de estrías.
- Para finalizar se flameó y dejó enfriar el asa, repitiendo el mismo procedimiento empleando, ésta vez tomando como inóculo el tercer patrón de estrías, por último, se flameó el asa, se tapó la placa de Petri y se incubó en posición invertida.

Para la incubación de las bacterias se utilizó la incubadora MEMMERT a una temperatura de 35°C, en la cual se dejaron crecer durante 24 a 48 horas (Aquiahuatl y Pérez, 2004).

Para los hongos filamentosos se tomó una parte del micelio con palillos de madera o hisopos estériles cerca de la llama del mechero, luego la muestra extraída se colocó en el centro y en los cuatro cuadrantes de la placa de Petri. Finalmente se dejaron crecer en posición invertida a una temperatura de 28°C a 30°C durante 3 a 5 días (Aquiahuatl y Pérez, 2004). La siembra de hongos se llevó a cabo en el cuarto de siembra del PIENSA, en la cabina de flujo laminar TELSTAR AV-100.

6.2.2. Caracterización morfológica de los microorganismos aislados de bioinsumos artesanales

La identificación morfológica de los microorganismos, se realizó por medio de la observación de sus respectivas características macro y microscópicas. Para las características macroscópicas en bacterias se describieron: forma, borde,

superficie, consistencia, transparencia y coloración. En el caso de hongos se describieron el anverso y reverso de cada una de las cepas según forma, textura, elevación, color, margen y la presencia de pigmentos difusos en el medio.

La caracterización microscópica de las bacterias se realizó por medio de la observación de la morfología bacteriana utilizando el método de tinción diferencial de Gram, mientras que para los hongos filamentosos se efectuó una observación de esporas. En la **Tabla 4**, se muestran la cantidad de microorganismos aislados de muestras de bioinsumos, fase realizada por Méndez-Ubeda *et al. en* 2018.

Tabla 4. Cantidad de microorganismos aislados a partir de las muestras de los 4 bioinsumos, estado del producto (sólido o líquido), zona de procedencia y código de estos (Fuente: Méndez-Úbeda *et al.*, 2018).

No.	Estado de la muestra	Zona de procedencia	Código	No. Bacterias	No. Hongos	
					Filamentosos	Levaduriforme
1	Sólido	Norte	TS	5	3	-
2	Sólido	Norte	LS	6	1	-
3	Líquido	Norte	LL	3	2	-
4	Líquido	Occidente	DCL	9		1
Total				23	6	1

Nota: Tisey sólido (TS), Licoroy sólido (LS), Licoroy líquido (LL), Del campo líquido (DCL).

a. Caracterización microscópica de bacterias

Se realizó la tinción de Gram a los aislados de bacterias a las 24 horas de incubación siguiendo el procedimiento descrito por Moreno y Albarracín (2012). Inicialmente se preparó y fijó un frotis (**Figura 11A-B**), tomando una pequeña parte de la colonia con el asa de inoculación, la cual se dispersó en una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjetos. Luego, usando el asa se extendió homogéneamente la muestra sobre el portaobjetos para formar una capa delgada y uniforme. Simultáneamente el portaobjetos se flameaba sobre la llama del mechero hasta conseguir la sequedad total de éste. Posteriormente se realizó la aplicación de colorantes y decolorantes (**Figura 11C**) en el siguiente orden: Cristal violeta por 1 minuto, Yodo-Lugol por 1 minuto, Alcohol-acetona durante 20 segundos y Safranina por 1 minuto. Luego de cada aplicación se enjuagaba suavemente con agua para eliminar el exceso. Finalmente se dejó secar y se observó en el microscopio (OLYMPUS) con el objetivo 100X y aceite de inmersión (**Figura 11D**). Esta técnica nos permitió determinar si las bacterias asiladas eran Gram positivas o Gram negativas, así como la forma de las colonias si eran cocales, bacilares, esféricas, etc.

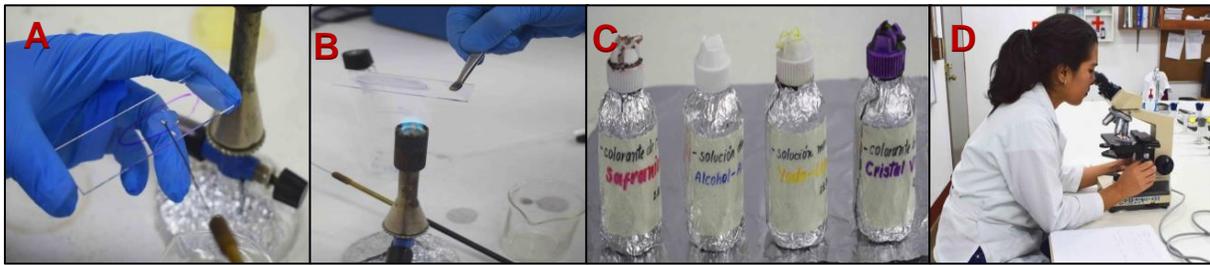


Figura 11. Tinción diferencial de Gram. A) Preparación del frotis en un portaobjetos; B) Fijación del frotis con calor; C) Recipientes de los colorantes, solución mordiente (yodo-lugol) y decolorante utilizados en la tinción de Gram; D) Observación en el microscopio con objetivo 100X (Fuente: Elaboración propia).

b. Caracterización microscópica de Hongos filamentosos

La observación microscópica de los hongos filamentosos se realizó según el procedimiento descrito por Aquiahuatl y Pérez (2004), a cultivos con crecimiento de 3 a 5 días por medio de observación de esporas, mediante la técnica de cinta adhesiva, la cual consistió en cortar un trozo de cinta adhesiva transparente de 4 a 5 cm tomándola de los extremos. Luego cerca del mechero se abrió la placa de Petri que contenía al hongo y se presionó suavemente la cinta transparente sobre la superficie de la colonia (**Figura 12A**). La cinta con la muestra se colocó sobre un portaobjetos, el cual funciona como un cubreobjetos, por lo que se debe aplanar lo mejor posible evitando la formación de burbujas y sin alterar demasiado las estructuras (**Figura 12B**). Las observaciones se hicieron en el microscopio OLYMPUS BH-2, con el objetivo de 50X (**Figura 12C**).

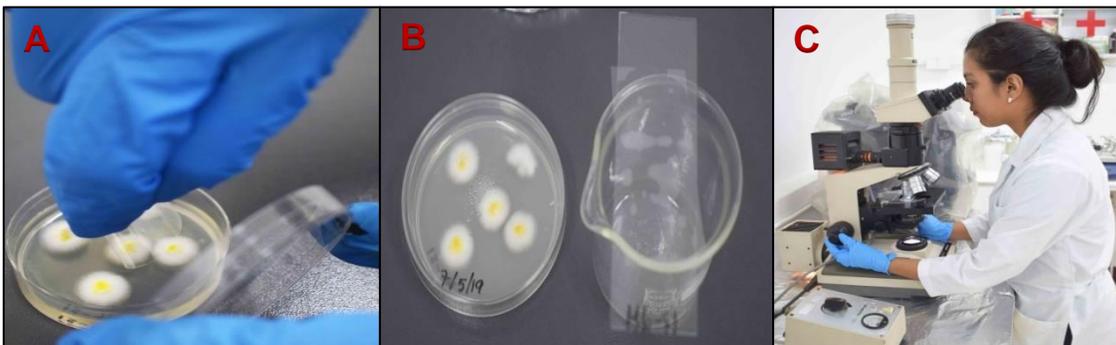


Figura 12. Técnica de cinta adhesiva para la observación de esporas en hongos. A) Toma de esporas con la cinta adhesiva transparente; B) Fijación de la cinta adhesiva sobre el portaobjetos; C) Observación de esporas al microscopio OLYMPUS BH-2 con el objetivo 50X (Fuente: Elaboración propia).

6.2.3. Identificación molecular de los microorganismos aislados de bioinsumos artesanales

Una vez finalizada la caracterización morfológica se procedió a la identificación molecular de las 17 bacterias y 6 hongos filamentosos, de las restantes para completar la identificación iniciada por Méndez-Úbeda *et al.* (2018) aislados de bioinsumos artesanales. La identificación se realizó por medio de la secuenciación

parcial del gen ADN ribosomal 16S para bacterias del ADNr con los cebadores pA (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTCAG 3') y pc5B (5' TAC CTT GTT ACG ACT T 3'). La identificación taxonómica de los aislamientos de hongos se realizó con base en la amplificación de las regiones ITS1 (5 TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3)-ITS4 (5' TCC TCCGCT TAT TGA TAT GC 3') (Internal Transcribed Spacer, ya que la comparación de sus secuencias permite establecer las relaciones filogenéticas para ambos tipos de microorganismos (Villota, 2013).

Para esto se contrataron los servicios del Centro de Biología Molecular (CBM) de la Universidad Centroamericana para la extracción de ADN. Quienes declaran que la metodología de extracción utilizada fue: extraer ADN genómico utilizando el kit de PROMEGA Wizard® Genomic DNA Purification para bacterias y para hongos se realizó extracción orgánica con buffer basado en Mercaptoetanol. Revisión de calidad del ADN: La calidad ADN fue comprobada en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. La cuantificación y el ratio 260/280 fueron medidos con espectrofotómetro modelo Perkim Elmer Lambda 25 uv/vis.

Para la secuenciación del ADN extraído se contrató los servicios del centro MACROGEN INC de Corea del Sur, que utilizó un secuenciador a gran escala modelo del equipo ABI3730XL, este equipo trabaja utilizando el método Sanger y genera resultados en 48 horas, consta de un apilador integrado a la placa, lector de código de barras interno y sistema de entrega de polímero a bordo. Posteriormente se recibieron los electroferogramas con las secuencias de bases (Adenina, Guanina, Citosina y Timina), y se procedió a realizar el análisis para la obtención de los árboles filogenéticos, lo cual permitió identificar a nivel de especie la mayoría de los microorganismos con los que se cuenta. Los pasos que se siguieron para la identificación molecular se describen a continuación:

A. Corrección de las secuencias

El primer paso de la identificación molecular de los microorganismos fue el análisis de las secuencias recibidas, lo cual consistió en la observación del electroferograma (**Figura 13A**) debido a que ocurren errores entre este y la secuencia, por ejemplo, la asignación de dos T existiendo tres, o posiciones ambiguas N (Bou *et al.*, 2011). Es por esta razón que se reedita visualmente y se corrige el electroferograma, usando el programa Bioedit v7.0.9 y una vez corregida la secuencia se guardó en formato FASTA (**Figura 13B**).

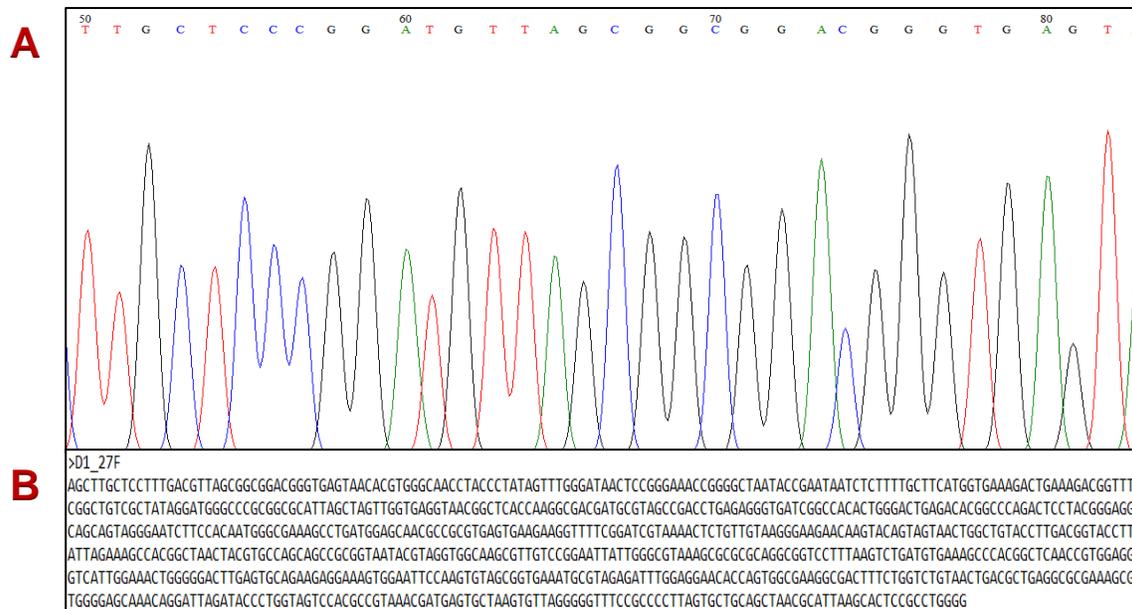


Figura 13. Corrección de errores. A) Electroferograma corregido con el uso de Bioedit v7.0.9.; B) Secuencia corregida guardada en formato FASTA (Fuente: Elaboración Propia).

B. Comparación de las secuencias

Las secuencias corregidas se compararon con las secuencias correspondientes al gen 16S para bacterias e ITS 1 e ITS4 para hongos, depositadas en la base de datos del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para el alineamiento de secuencias, además, GenBank contiene una sección de taxonomía (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>) que incluye información y secuencias sobre más de 160.000 organismos (Bou *et al.*, 2011).

La introducción de la secuencia y su comparación con otras disponibles en la base de datos del programa BLAST del GenBank, proporciona un informe constituido de varias secciones, en la primera sección aparece un gráfico que indica el nivel y el tamaño de los fragmentos alineados, seguido de un listado en orden decreciente de las secuencias de microorganismos con los que se muestra la identidad (% de identidad) (**Figura 14**). En la siguiente sección, aparece cada alineamiento de la secuencia problema o query frente a cada secuencia de otro microorganismo, indicando el número y porcentaje de bases idénticas (identity) (Bou *et al.*, 2011). Por último, se seleccionaron las cinco secuencias que presentaron mayor Identidad y frecuencia con la secuencia del microorganismo en estudio.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus macroides strain Colony4.T17-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1530	1530	100%	0.0	98.95%	KT074245.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sphaericus isolate NUC-5.16 ribosomal RNA gene, partial sequence	1530	1530	100%	0.0	98.95%	DQ833758.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus sp. strain NT1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1528	1528	100%	0.0	98.95%	MH559628.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus sp. YS11 chromosome, complete genome	1528	16739	100%	0.0	98.95%	CP026007.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus xylanilyticus strain C4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1528	1528	100%	0.0	98.95%	KX703024.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus macroides strain LJB15 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1528	1528	100%	0.0	98.95%	KX027335.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus fusiformis strain SFBH 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1528	1528	100%	0.0	98.95%	KF840158.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus xylanilyticus strain L13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1528	1528	100%	0.0	98.95%	KX832715.1
<input type="checkbox"/> Bacillus anthracis strain L12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1528	1528	100%	0.0	98.95%	KX832714.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus fusiformis strain F1-1-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1528	1528	100%	0.0	98.95%	KX349992.1
<input type="checkbox"/> Lysinibacillus sp. mxk-32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1528	1528	100%	0.0	98.95%	KU159215.1

Figura 14. Comparación de la secuencia en estudio según el % de identidad con las otras secuencias disponibles en la base de datos del GenBank del NCBI (Fuente: Elaboración propia).

C. Alineamiento de secuencias

El alineamiento múltiple se efectuó con las cinco secuencias seleccionadas de cada secuencia de los microorganismos en estudio. Esto se realizó con la herramienta Clustal W Multiple Alignment for Version 1.4, incluida en el programa Bioedit v7.0.9 (**Figura 15**), utilizando los parámetros por defecto para efectuar los alineamientos (Villota, 2013). Posteriormente se corrigieron las secuencias alineadas en el BLAST y se seleccionaron de las cinco secuencias con mayor identidad para ser guardadas en formato FASTA (Méndez-Úbeda *et al.*, 2018).

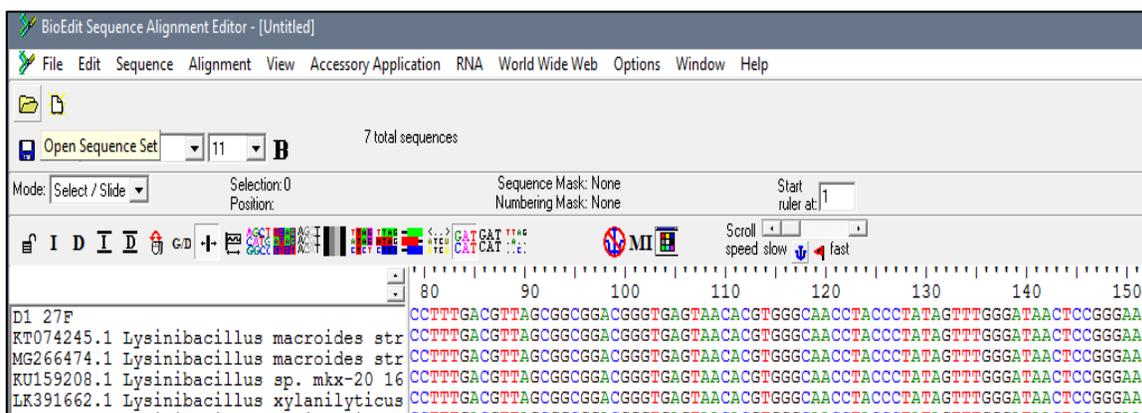


Figura 15. Alineamiento de la secuencia en estudio con las 5 secuencias seleccionadas del GenBank del NCBI, utilizando la aplicación Clustal W Multiple alignment for version 1.4 incluido en el programa BioEdit v7.0.9 (Elaboración propia).

D. Construcción de árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos se construyeron con el programa MEGA 7.0.14, usando Neighbor-Joining como método de construcción y evaluando la confiabilidad

haciendo bootstrapping de 1000 repeticiones, teniendo en cuenta que cada rama se debe repetir como mínimo en el 50% de las veces (Villota, 2013).

6.3. PRUEBAS DE ANTAGONISMO Y SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS QUE CONFORMARÁN EL CONSORCIO MICROBIANO

Se realizó una búsqueda bibliográfica de las aplicaciones biotecnológicas de cada uno de los microorganismos aislados, con el objetivo de determinar el papel que juegan dentro de los bioinsumos y seleccionar aquellos que sean promisorios de acuerdo a sus características promotoras del crecimiento vegetal conocidos como PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), ya que estos presentan efectos positivos sobre las plantas (Moreno y Reyes, 2018). También se tuvo como opción en la formulación del consorcio utilizar el banco de microorganismos del PIENSA.

Para realizar las pruebas de antagonismo seleccionaron 9 bacterias: 5 aisladas de bioinsumos artesanales, 3 aisladas por Delgado *et al.* (2018) y 1 por Páramo *et al.* (2018), estas se seleccionaron según las características antes descritas, fueron sometidos a pruebas de antagonismo con el fin de verificar que no existiera inhibición entre ellos y así poder formar los consorcios, también se les asignó un número a cada bacteria seleccionada con la cual se le identificó en el resto de los experimentos, como lo muestra la **Tabla 5**. Las pruebas de antagonismo se realizaron en agar Luria-Bertani (LB) mediante el método de difusión en pozos.

Tabla 5. Asignación de nuevos códigos de las cepas seleccionadas a confrontar en las pruebas de antagonismo (Fuente: Elaboración Propia).

Código de laboratorio	Especie	Nuevo Código
DCL4-31F	<i>Bacillus subtilis</i>	1
LS5-11B	<i>Bacillus megaterium</i>	2
TS13-111u	<i>Bacillus pumilus</i>	3
LS6-11G	<i>Bacillus subtilis</i>	4
LL9-21	<i>Bacillus megaterium</i>	5
MVIA-01	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	6
MIVB-01	<i>Bacillus marisflavi</i>	7
MVIB-02	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	8
PTLL4g	<i>Pseudomonas mendocina</i>	9

✓ Ajuste de inóculos según la escala de turbidez estándar de McFarland

El primer paso que se realizó en las pruebas de antagonismo fue la preparación de la escala de turbidez estándar de McFarland, según lo establecido en el documento de la CDC y OMS (2009), con el objetivo de ajustar todos los inóculos de las bacterias seleccionadas para la confrontación en un rango de concentración. Se tomaron con el asa inóculos de cada cultivo y se colocaron de forma individual en

tubos con solución salina estéril (0.85%) previamente rotulados, posteriormente los inóculos se ajustaron a 0.5 unidades (equivalentes a 10^8 cel/mL) según la escala de McFarland y se verificó la absorbancia a 625 nm en el espectrofotómetro marca Thermo modelo Genesys 6 (Sánchez *et al.*, 2016). Se prepararon 10 estándares que contenían cloruro de bario deshidratado ($BaCl_2 \bullet 2H_2O$) al 1.175% (p/vol) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1% (vol/vol). Los valores de absorbancia obtenidos y la densidad aproximada de bacterias correspondientes se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Valores obtenidos en la preparación de la escala de McFarland (CDC y OMS, 2009).

Número de la turbidez estándar	Absorbancia de la escala de Mcfarland	Densidad de bacterias aproximada (UFC/mL)
0.5	0.169	1×10^8
1	0.327	3×10^8
2	0.524	6×10^8
3	0.560	9×10^8
4	0.872	1.2×10^9
5	0.942	1.5×10^9
6	1.168	1.8×10^9
7	1.257	2.1×10^9
8	1.384	2.4×10^9
9	1.463	2.7×10^9
10	1.651	3×10^9

Posteriormente se prepararon los inóculos de los cultivos de las cepas seleccionadas con 24 horas de crecimiento en solución salina estéril al 0.85%, una vez listos se procedieron a ajustar según los valores de absorbancia obtenidos en la escala de Mcfarland, equivalentes a las concentraciones de 1×10^8 hasta 9×10^8 UFC/mL, como se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Valores de absorbancia de los inóculos ajustados (Fuente: Elaboración propia).

Código de las cepas seleccionadas	Absorbancia de los inóculos ajustados
1. <i>Bacillus subtilis</i>	0.163
2. <i>Bacillus megaterium</i>	0.230
3. <i>Bacillus pumilus</i>	0.190
4. <i>Bacillus subtilis</i>	0.513
5. <i>Bacillus megaterium</i>	0.200
6. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0.190
7. <i>Bacillus marisflavi</i>	0.299
8. <i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	0.160
9. <i>Pseudomona mendocina</i>	0.192

✓ **Prueba de antagonismo por la técnica de difusión en pozos**

Para la siembra masiva con cada uno de los inóculos previamente ajustados se sumergió un hisopo estéril en cada inóculo bacteriano y posteriormente se sembró de forma masiva en la superficie de cada una de las placas de Petri previamente rotuladas (**Figura 16**) que contenían medio de cultivo LB solidificado, hisopando en tres direcciones y alrededor de la periferia del Agar para conseguir una siembra uniforme (Sánchez, 2016). Este procedimiento se realizó para cada uno de los inóculos preparados de las bacterias seleccionadas, dejándolas secar durante 15 minutos.

Transcurrido los 15 minutos, se hicieron pozos en las superficies de las placas inoculadas con la ayuda de un sacabocados estéril de 6mm de diámetro y en cada uno de ellos con ayuda de una pipeta estéril se depositaron 25 µL de los inóculos preparados, como lo muestra la **Figura 16** donde se ilustra la distribución y combinaciones de las bacterias confrontadas en este ensayo, luego se dejó reposar durante 30 minutos (para evaporar el líquido) y finalmente se incubó de forma invertida a 35°C por 24 horas (Sánchez *et al.*, 2016). El criterio de selección consistió en la observación de la presencia de halos de inhibición.

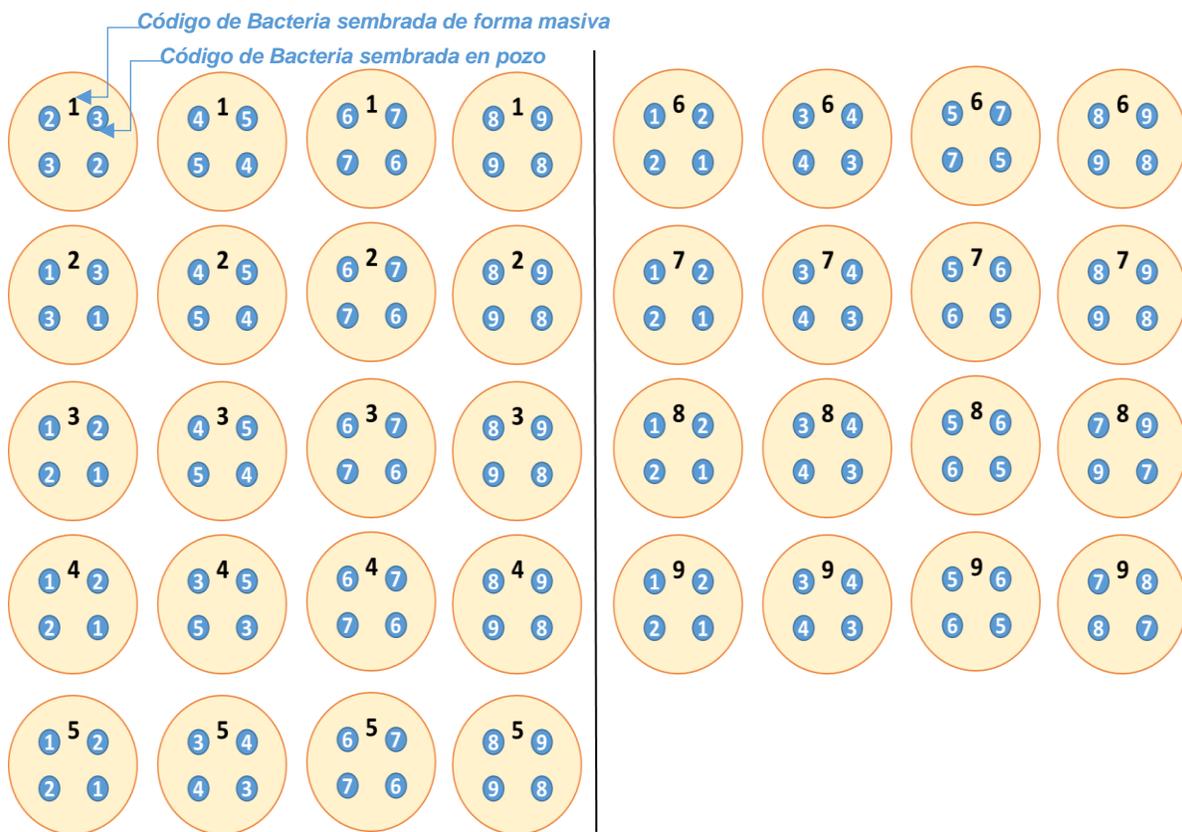


Figura 16. Muestra la combinación y distribución de las bacterias confrontadas, el número en negro representa la bacteria sembrada de forma masiva; los círculos de color azul, muestra las bacterias sembradas en pozos (los números representan los códigos de las bacterias confrontadas) (Fuente: Elaboración propia).

6.4. FORMULACIÓN DEL CONSORCIO MICROBIANO PARA UN BIOFERTILIZANTE Y ESTABILIDAD DE LAS CEPAS INDIVIDUALES

Finalizada la selección de los microorganismos y las pruebas de antagonismo, con las que se determinaron las especies que conformaron el consorcio microbiano, se procedió a desarrollo de la cinética bacteriana de cepas individuales para la producción del biofertilizante.

6.4.1. Construcción de curva cinética de crecimiento por método turbidimétrico

■ Preparación de los pre inóculos

En cinco frascos de Erlenmeyer con capacidad de 200 mL, se preparó soluciones de 100 mL de medio de cultivo LB Broth líquido; de una placa Petri para cada bacteria que contenía cultivo de: *Bacillus megaterium*, *Bacillus marisflavi*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Pseudomona mendocina*, con 24 h de crecimiento, se tomó una pequeña porción con el asa de siembra y se inoculó en el Erlenmeyer con LB Broth (**Figura 17A**), las bacterias se dejaron en crecimiento por 16 horas, con agitación constante en un shaker de laboratorio marca SCILOGEX SK-O330-Pro, a una velocidad de 170 rpm (**Figura 17B**). (Cabeza, 2013; Páramo, 2014).

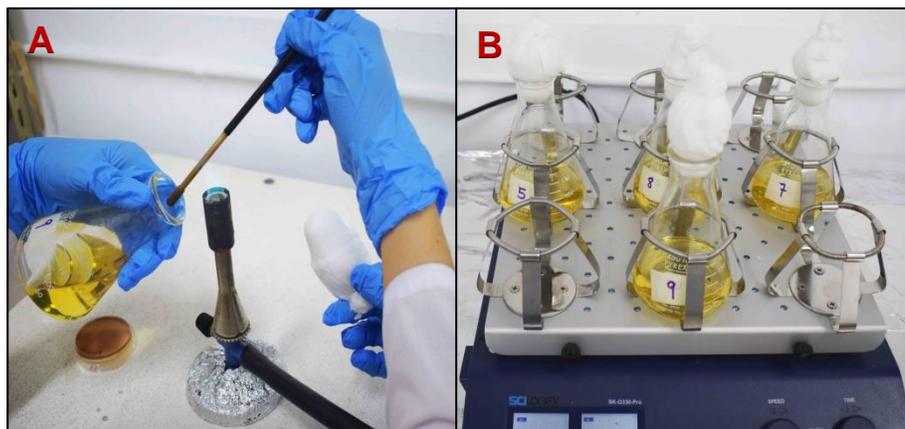


Figura 17. Muestra la preparación del pre-inóculo. A) Inoculación de bacterias seleccionadas en medio líquido; B) Crecimiento de las 4 bacterias en Shaker durante 16 horas a 170 rpm (Fuente: Elaboración propia).

■ Determinación de la cinética de crecimiento microbiano

Lectura de absorbancia en espectrofotómetro. Esta medición se realizó utilizando un espectrofotómetro UNICO UV-2100, la cual se basa en el hecho de que un cultivo de bacterias actúa como una suspensión coloidal que intercepta la luz que pasa a través de ella. Dentro de ciertos límites, la cantidad de luz que es absorbida es directamente proporcional a la concentración de células; es decir que la densidad óptica es una medida de la luz absorbida y/o dispersada por la muestra. Para medir turbidez se utilizó una longitud de onda de $\lambda = 540$ nm, ya que es sabido

que los cultivos bacterianos no presentan una absorción significativa a esta longitud de onda (Cabeza, 2013; Páramo, 2014).

En un shaker de laboratorio SCIOLOGEX SK-O330-Pro, equipado para trabajar con Erlenmeyer de 250 mL se dispuso una muestra para cada una de las 4 bacterias y un control con 90 mL del medio de cultivo LB Broth líquido, previamente preparado. Del pre-inoculo que desde la noche anterior se dejó en crecimiento y se encontraba en condiciones metabólicas aptas para ser inoculado a un volumen mayor de medio, se tomaron 10 mL (**Figura 18A**) y se inoculó en cada uno de los Erlenmeyer preparados en el paso anterior para cada bacteria y se llevó al Shaker (**Figura 18B**) a una velocidad de 170 rpm, anotando el tiempo cero y habiendo hecho una primera lectura de absorbancia a 540 nm. Cada 15 minutos se tomaron 3mL de la muestra a las cuales se les midió la absorbancia (**Figura 18C**). El experimento inició a las 9:30 a.m. y terminó a las 4:15 p.m.; obteniendo como resultado la curva de crecimiento bacteriano (absorbancia vs tiempo) (Cabeza, 2013; Páramo, 2014).

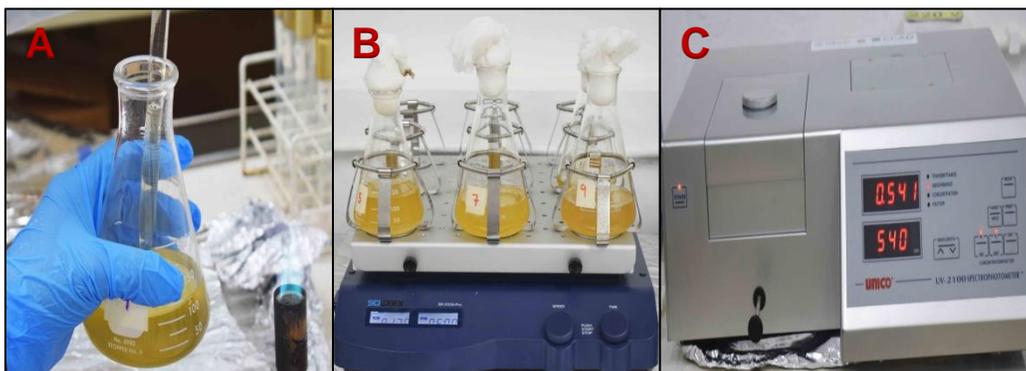


Figura 18. Muestra la construcción de la curva cinética de crecimiento. A) Inoculación a un volumen mayor; B) Crecimiento en Shaker durante 6 horas; C) Medición de la absorbancia en el espectrofotómetro (Fuente: Elaboración propia).

■ Diluciones seriadas y conteo en placa de células viables

Se realizaron una serie de diluciones, lo cual consistió en preparar 9 mL de agua destilada estéril en tubos de ensayo previamente marcados desde 10^{-1} hasta 10^{-6} . De acuerdo a los intervalos de tiempo establecidos en el que se midió la absorbancia a cada uno de los Erlenmeyer se tomaron muestras de 1 mL con una pipeta y se inocularon en los tubos de ensayos correspondientes a la dilución de 10^{-1} , luego se agitaron en un vortex marca JANKE & KUNKEL y se descartó la pipeta. Con una nueva pipeta se transfirieron alícuotas de 1 mL a los tubos de la dilución 10^{-2} , repitiendo el mismo proceso hasta llegar a la dilución de 10^{-6} (Páramo, 2014).

Posteriormente con una nueva pipeta se tomó 1 mL de la dilución y se depositó en una placa de Petri con LB sólido marcada con el número de muestra y dilución, y con ayuda de un asa Drigalsky previamente esterilizada se distribuyó en toda la superficie de la placa y se dejó absorber el líquido durante 10 minutos (Aquiahuatl y Pérez, 2004); este paso se efectuó a partir de las diluciones de 10^{-5} hasta 10^{-6} , tal

y como se muestra en la **Figura 19**. Luego se incubaron en forma invertida durante 24 horas a una temperatura de 35 °C (Páramo, 2014). Por último, se cuantificó el número de UFC/mL, siendo el número de bacterias/mL igual al producto del número de colonias en la placa por la inversa de la dilución de la muestra. Con los resultados obtenidos se graficó la concentración UFC/mL vs Tiempo y UFC/mL vs Absorbancia

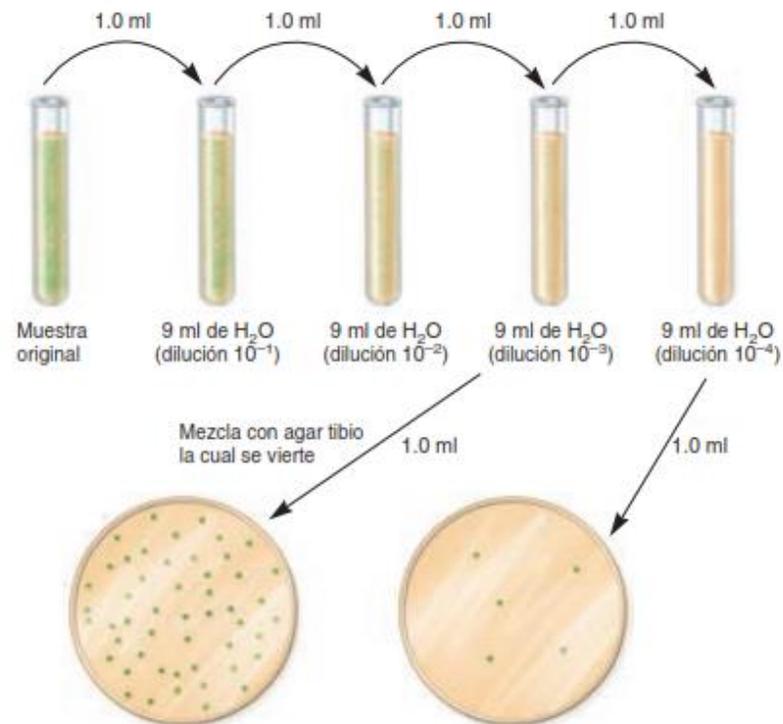


Figura 19. Técnica de recuento en placa y diluciones seriadas (Prescott *et al*, 2008)

6.4.2. Pruebas de estabilidad por viabilidad celular del biofertilizante

Una vez finalizada la construcción de la curva cinética de crecimiento de cada bacteria seleccionada para formar parte del consorcio microbiano, se procedió a realizar las pruebas de anaquel o de estabilidad. Para esto se prepararon pre-inóculos (según el procedimiento descrito en el acápite anterior) se inocularon 15 mL del pre-inóculo en Erlenmeyer que contenían 135 mL del medio de cultivo estéril LB Broth líquido y se dejaron en crecimiento en shaker hasta que alcanzaron valores altos de absorbancia. Alcanzado este punto, con pipetas estériles se tomaron muestras de 1 mL de cada Erlenmeyer y se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-6} y posteriormente se hizo una siembra en profundidad partiendo de las diluciones de 10^{-4} hasta 10^{-6} . Luego se incubaron en forma invertida durante 24 a 48 horas a una temperatura de 35 °C. Por último, se cuantificó el número de UFC/mL.

Luego estos Erlenmeyer se almacenaron en refrigeración a 10 °C durante un periodo de 2 meses. Durante el periodo de almacenamiento se determinó la viabilidad celular mediante diluciones seriadas y conteo en placa por siembra en profundidad cada 15 días durante los 2 meses de evaluación (Camelo, 2010).

6.4.3. Efecto del consorcio biofertilizante sobre cultivos de interés agrícola en macrotúnel

■ Instalación del macrotúnel

Según requerimientos óptimos para los cultivos seleccionados: Chiltoma, rábano y pepino, se definieron los parámetros de la instalación del macrotúnel. Según las condiciones climáticas de la ciudad de Managua que se encuentra a una altura aproximada de 82.97 msnm y una temperatura promedio de 27°C (Según características generales de los distritos de Managua, Alcaldía de Managua), por lo tanto se debe tener en cuenta el movimiento del aire en el interior del macrotúnel, el cual es de vital importancia en las zonas tropicales en especial por debajo de los 1000 metros sobre el nivel del mar, donde la alta radiación solar calienta el aire dentro de las estructuras (Marlow, 2011).

El macrotúnel utilizado para realizar el estudio (**Figura 20**) tiene dimensiones de 3 m de ancho y 7 m largo, conformado por tres arcos de tubos de hierro galvanizado y la cubierta externa de malla antiviral y plástico transparente en el techo, los cuales se sujetaron a la estructura del túnel utilizando lockers y zigzag de hierro galvanizado. Para evitar el exceso de luz solar, se colocó una malla sarán (30% sombra) también conocida como malla sombra.



Figura 20. Macrotúnel Individual instalado en predios de la UNI, para el desarrollo de las pruebas (Elaboración propia)

■ **Instalación del riego**

Se ha escogido el riego por goteo, ya que es el método más desarrollado en los cultivos, por su fácil instalación, su reducido costo económico y por su eficiencia. Con este sistema el cultivo recibe las proporciones óptimas de agua (Sela, 2017).

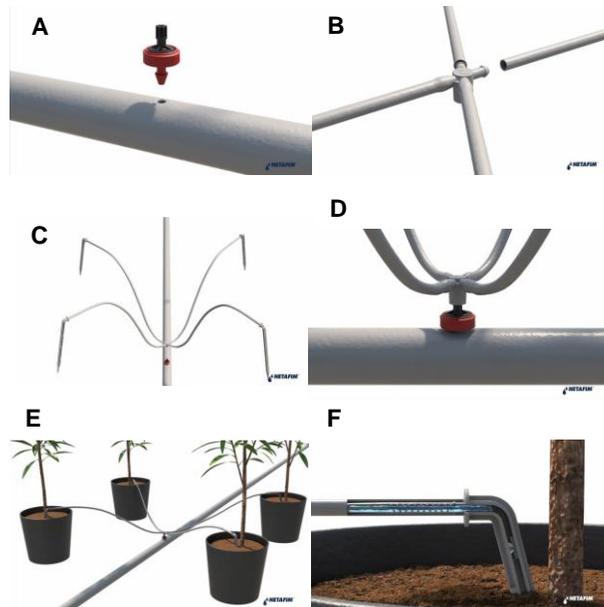


Figura 21. Riego por goteo tipo espagueti. A. Gotero de botón conectado a un lateral de polietileno, B. Conexión de distribuidor y microtubo de 8 mm de diámetro, C. Conexión de goteros de estaca en el microtubo, D. Conexión de los goteros de estaca al gotero de botón, E. Colocación de goteros de estaca en cada macetera, F. Aplicación del agua en cada macetera (Fuente: Netafim, 2017).

Como se observa en la **Figura 21**, el sistema de riego instalado fue del tipo espagueti, para lo cual se instalaron goteros de botón de 4 litros/hora sobre un lateral de manguera de Polietileno de 16mm de diámetro (**Figura 21A**), seguidamente se conectaron microtubos de 8 mm de diámetro en un distribuidor (**Figura 21B**); al final de cada microtubo se conectaron goteros de estaca de 1 litro/hora (**Figura 21C**), los cuales se unieron a los goteros de botón por medio del distribuidor (**Figura 21D**), posteriormente los goteros de estaca fueron distribuidos en las maceteras insertándolos en el sustrato (**Figura 21E**); finalmente, se suministró el agua necesaria para el cultivo, se realizó 2 frecuencias de riego a las 7:00 a.m. y a las 6:00 p.m., cada uno con una duración entre 1 a 2 hora, en dependencia de las condiciones climatológicas, a través de los goteros de estaca en las maceteras (**Figura 21F**) Netafim, 2017. El sistema de riego estuvo alimentado por la red de agua potable que abastece al Recinto Universitario Simón Bolívar (UNI-RUSB).

Para reducir la temperatura en el interior del macrotúnel, se colocaron Nebulizadores, los cuales se ubicaron en la parte más alta del mismo, de tal forma que cuando se pusieran a funcionar se creara una neblina que posibilitara disminuir las altas temperaturas en las horas más críticas del día.

■ *Preparación y esterilización del sustrato*

Se utilizó tierra abonada producida en un vivero y arena en proporciones 70 – 30 (70% tierra abonada y 30% arena), para obtener una textura que permitiera una buena aireación y retención de humedad. El sustrato preparado con los componentes y las proporciones descritas anteriormente (**Figura 22A**) y se esterilizo utilizando el método de solarización, para lo cual se cubrió el sustrato con plástico negro (**Figura 22B**) y se dejó expuesto al sol por 60 días. Con un termómetro digital, se monitoreo las temperaturas alcanzadas en el sustrato (**Figura 22C**), que permitieran eliminar cualquier microorganismo presente que pudieran afectar el desarrollo del experimento (Sandoval Villa, 2010).



Figura 22. Preparación del sustrato. A. Homogenización de tierra abonada y arena; B. Recubrimiento del sustrato con plástico negro; C. Medición de temperatura (Fuente: elaboración propia)

■ *Preparación y llenado de maceteras*

Para este ensayo se utilizaron maceteras plásticas con capacidad de 15 litros, a las cuales se les perforaron 4 ranuras en los costados, con los cuales se pudiera facilitar la observación del crecimiento radicular y la tuberización (**Figura 23**) (Elhayes, 2017).



Figura 23. Preparación y llenado de maceteras. A. Macetera plástica de 15 L, B. Perforación de ranuras en los costados, C. Inserción de macetera ranurada en otra macetera sin ranurar, D. Llenado de maceteras con sustrato (Fuente: Elhayes, 2017).

■ Siembra

Chiltoma (Capsicum annum L). Se realizó la siembra manualmente en bandejas de germinación de poliestireno de 96 cavidades en arreglos de 8X12, con un volumen de celda de 55 cc, colocando de 1 a 2 semillas en cada cavidad, al proceso de germinación fue de 40 días, la **Figura 24** muestra plántulas de chiltoma germinada; posteriormente se realizó el trasplante a maceteras (descritas en la **Figura 23**), colocando 3 plántulas en cada macetera. (INTA 2006).



Figura 24. Plántulas de chiltomas con 25 días en bandejas de germinación (Elaboración propia)

Rábano (Raphanus sativus). Se realizó la siembra directa (**Figura 24**) en maceteras, colocando 5 semillas, una en cada cuadrante y otra en el centro a 5 cm de profundidad y cubriendo con una capa de tierra (Ohio State University, 2001).

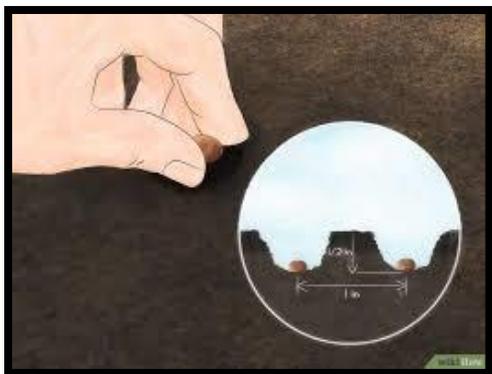


Figura 25. Siembra de rábano de forma directa, muestra la distancia y profundidad a la que se debe colocar la semilla (Fuente: wikiHow, 2019)

Pepino (Cucumis sativus). Se realizó siembra directa, colocando de 3 semillas por macetera, en forma de triángulo a una distancia de 15 cm de arista. La semilla fue colocada a 5 cm de profundidad y cubierta con tierra (CENTA 2003). Se colocó una malla hecha con mecate para el agarre de la enredadera y desarrollo correcto del fruto.

■ Descripción de los tratamientos

En esta investigación se fertilizó 3 tipos de cultivos aplicando el consorcio bacteriano. Así mismo, a los tres cultivos se le aplicó fertilización química con fórmula completa 15-15-15 (fuente de los tres macro nutrientes primarios N-P-K) para darle a la planta la mayor cantidad de nutrientes en una sola aplicación. También se consideró un testigo absoluto sin ninguno de los tipos de fertilización la **Figura 26**, muestra el arreglo y distribución de los cultivos y los diversos tratamientos en el macrotúnel.

- **En Chiltoma:**
 - TB -Ch: Planta tratada con el Consorcio Microbiano
 - TQ -Ch: Planta tratada con Fertilización Química
 - To -Ch: Planta Sin Fertilización (Testigo)
- **Rábano**
 - TB -R: Planta tratada con el Consorcio Microbiano
 - TQ -R: Planta tratada con Fertilización Química
 - To -R: Planta Sin Fertilización (Testigo)
- **Pepino**
 - TB -P: Planta tratada con el Consorcio Microbiano
 - TQ -P: Planta tratada con Fertilización Química
 - To -P: Planta Sin Fertilización (Testigo)

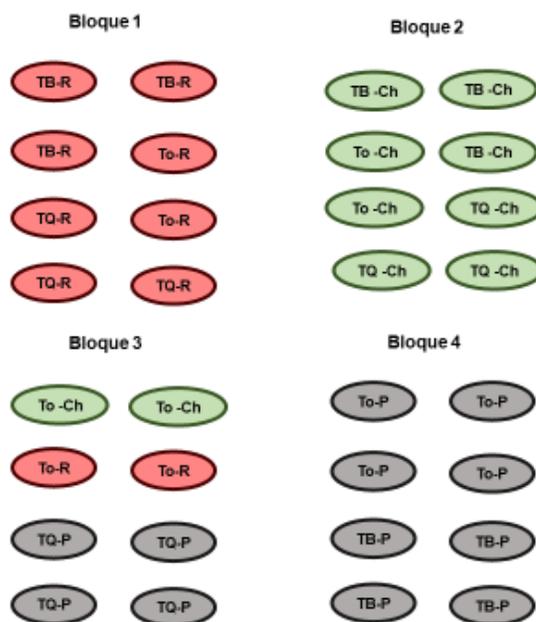


Figura 26. Arreglo y distribución de los cultivos y tratamientos en el macrotúnel (Fuente: Elaboración Propia)

■ Inoculación de los tratamientos

Tratamiento Biológico - Biofertilizante: Para la fertilización con el uso de microorganismos capaces de mejorar los procesos esenciales en la nutrición de los cultivos, se realizó una primera aplicación del tratamiento a base del consorcio formado por: *B. megaterium*, *B. marisflavi*, *E. aurantiacum*, *P. mendocina*; al momento de la siembra, aplicando 5 mL del consorcio por semilla a una concentración de 10^8 UFC/mL según la escala de McFarland. Únicamente se inocularon las semillas en los tratamientos que se contempló el uso del biofertilizante, siguiendo la metodología de Díaz *et al.*, (2001) para cultivo de

lechuga y adecuándolo al cultivo de Chiltoma, Rábano y Pepino. Posteriormente, se realizaron aspersiones, en la superficie del sustrato, aplicando 5 mL por planta a los 30 y 60 Días Después de la Siembra (DDS). En la **Tabla 8** que se presenta a continuación, se detallan las concentraciones y periodos de aplicación del biofertilizante.

Tabla 8. Concentración del consorcio biofertilizante aplicado (Fuente: Elaboración propia).

Tiempo aplicación después de siembra (DDS)	Bacteria 5	Bacteria 7	Bacteria 8	Bacteria 9
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL
Siembra	1.26E+08	1.26E+08	1.26E+08	1.26E+08
30	1.57E+08	1.57E+08	1.57E+08	1.57E+08
60	1.70E+08	1.70E+08	1.70E+08	1.70E+08

Como se observa en la **Tabla 8**, los valores de concentración del consorcio biofertilizante utilizados en las pruebas de macrotúnel oscilan en el rango de 1.26×10^8 y 1.7×10^8 ; siendo estos valores similares al reportado por Lara y Negrete (2015).

Tratamiento Químico - Fertilización química: Se realizó el análisis físico y químico del suelo midiendo las siguientes características: Materia Orgánica (MO)= 4%; Fósforo disponible (P)= 26.6 ppm, Densidad Aparente (DA)= 1.3 g/cm y Potasio disponible (K)= 1.14 meq/ 100g); la fertilización química se realizó de acuerdo al análisis de suelo y los requerimientos nutricionales para cada cultivo, determinándose cantidades de: N, P y K. De acuerdo a lo anterior al tratamiento con fertilizante químico se le aplicó el fertilizante completo 15-15-15, a los 5 días después de la siembra (DDS), aplicando 4 g de fertilizante a una distancia de 2 cm de cada planta para evitar daños en esta.

■ **Medición de variables**

Se realizaron mediciones a los 21 y 35 días después de la germinación, en cada muestreo se recogieron 3 plantas al azar de cada repetición, las variables a tener en cuenta fueron los siguientes parámetros biométricos (Hernández, 2002 y Ramírez y Pérez, 2006):

Variables de Desarrollo:

- a) Número de hojas (No.): conteo de las hojas en cada una de las plantas de cada macetera.
- b) Longitud del tallo (cm): se midió la longitud del tallo principal con cinta métrica desde la base del tallo hasta la yema apical.

c) Diámetro del tallo (mm): haciendo uso de un vernier o pie de rey se midió el diámetro del tallo en milímetros.

d) Longitud de hojas (cm): con una regla graduada en centímetros se midió manualmente la longitud de la hoja en el cultivo de Rábano.

Variables de cosecha

a) Número de frutos (No.): conteo del número de frutos cosechados por cada uno de los tratamientos y cultivos evaluados.

b) Longitud del fruto (cm): Haciendo uso de una cinta métrica y un vernier, se registró la longitud de los frutos cosechados.

c) Diámetro ecuatorial (cm): Con un vernier se registró el diámetro ecuatorial del fruto.

d) longitud de la planta (cm): se tomó en cuenta la medida desde la raíz hasta la hoja más larga de cada una de las plantas muestreadas para el caso de rábano.

e) Peso del fruto (g): se registró el peso de cada uno de los frutos de los tres cultivos mediante el uso de una balanza de precisión.

Análisis estadístico

Una vez recopilados los datos de las variables se procedió a realizar un análisis de varianza (ANDEVA) y comparaciones de medias mediante Tukey haciendo uso del programa estadístico InfoStat. El método de Tukey se utiliza en ANOVA para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores mientras controla la tasa de error por familia que especifique. Para contrapesar esta mayor tasa de error, el método de Tukey ajusta el nivel de confianza de cada intervalo individual, de modo que el nivel de confianza simultáneo resultante sea igual al valor que especifique (Fallas, 2012).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS DE BIOINSUMOS ARTESANALES

La identificación morfológica de los 30 microorganismos aislados de bioinsumos, se realizó mediante observaciones macroscópicas y microscópicas, tanto para bacterias como para hongos, los microorganismos que se caracterizaron fueron 23 aislados bacterianos, 6 hongos filamentosos y 1 levaduriforme, el total de microorganismos aislados de cada muestra de bioinsumos artesanales se plasma en la **Tabla 4** de materiales y métodos. Por último, se realizó la identificación molecular de estos microorganismos por medio de la secuenciación parcial del gen ADN ribosomal 16S para bacterias e ITS 1- ITS 4 (Internal Transcribed Spacer) para hongos.

Zeballos (2017), aisló y purificó cepas provenientes de cuatro biofertilizantes diferentes, a partir de la purificación se obtuvo siete cepas de microorganismos: cuatro cepas de bacterias, dos de levaduras y una de hongos. La baja abundancia y diversidad de microorganismos posiblemente se dio por la presencia de algunos ingredientes de los biofertilizantes que influyen en el medio de crecimiento.

Esto difiere con los resultados de este estudio, ya que la variedad microbiológica es muy rica, teniendo en cuenta que se aislaron un total de 30 microorganismos: 23 bacterias y 7 hongos: 6 filamentosos y 1 levaduriforme. Estos resultados son similares a lo reportado Herrmann *et al.*, (2015), quienes analizaron el contenido 65 inoculantes comerciales, se aisló, purificó e identificó un total de 259 cepas. Se obtuvieron varios tipos de colonias para la mayoría de los productos, más del 50% de los inoculantes analizados produjeron más cepas de las esperadas, lo que para ellos sugiere altos niveles de contaminación.

Lo anterior podría explicarse por el tipo de medio de cultivo o sustrato que se han utilizado en las formulaciones. Idealmente, un sustrato debería proporcionar condiciones óptimas para permitir que los microorganismos sobrevivan durante la formulación, el transporte y el almacenamiento. Las condiciones óptimas pueden ser diferentes para cada cepa, y los fabricantes también deben asegurarse de que las diferentes cepas no compitan entre sí (Malusá *et al.*, 2012). Por ejemplo, Kellman (2008) dijo que algunas cepas contenidas en un inoculante podían producir bacteriocinas o antibióticos para suprimir el crecimiento de cepas "competidoras" en la mezcla.

Los bioinsumos utilizados en este estudio, están compuestos por una cantidad de microorganismos de los cuales no se conoce su identidad y su función dentro del producto (si son o no benéficos), de ahí que este trabajo sienta las bases de futuras investigaciones con vistas a desarrollar productos más y mejor tecnificados, cuya

constitución sea conocida y mantenida en el producto que se oferte y a la vez se conozca la función que espera sea desarrollada por dichos microorganismos, estos resultados resaltan la necesidad de sistemas de control de calidad, para garantizar que los inoculantes eficaces lleguen a los usuarios finales.

7.1.1. Caracterización morfológica de bacterias aisladas de bioinsumos artesanales

Como resultado de la caracterización macroscópica mostrada en la **Tabla 9**, se observaron 14 tipos de morfología (superficie papilada, bordes ondulados, consistencia seca, etc.), la mayoría presentan una coloración crema, de consistencia cremosa y predominan las colonias con bordes redondeados.

Tabla 9. Presenta la caracterización morfológica realizada mediante la observación macroscópica y microscópica de las bacterias aisladas de bioinsumos artesanales (Fuente: Elaboración Propia).

Código del Microorganismo	Observación Macroscópica	Observación Microscópica
TS10-111	Colonias opacas de coloración crema, con forma circular, superficie papilada, borde redondeado y de consistencia cremosa.	Estreptobacilos Gram positivos
TS11-31	Colonias opacas de coloración crema, con forma irregular, superficie papilada, borde ondulado y de consistencia cremosa.	Estreptobacilos Gram positivos
TS11-3(C)	Colonias opacas, con coloración crema, de forma irregular, superficie papilada, borde ondulado y de consistencia cremosa.	Estreptobacilos Gram positivos
TS13-111(J)	Colonias brillantes con coloración crema, de forma puntiforme, superficie convexa, borde redondeado y de consistencia cremosa.	Diplobacilos Gram negativos
TS13-211(u)	Colonias con coloración crema, de forma circular, superficie plana, borde redondeado y de consistencia seca.	Diplobacilos Gram positivos
LS5-1K	Colonias con coloración crema, de forma circular, superficie convexa, borde redondeado y de consistencia cremosa.	Estreptobacilos Gram positivos
LS5-11(B)	Colonias opacas con coloración crema, de forma circular, superficie planoconvexa, borde ondulado y de consistencia cremosa.	Estreptobacilos Gram positivos

Continuación Tabla 9. Caracterización morfológica de bacteria

LS5-21	Colonias brillantes con coloración crema, de forma puntiforme, superficie convexa, borde redondeado y de consistencia cremosa.	Diplobacilos Gram negativos
LS6-11(G)	Colonias translúcidas con coloración crema, de forma circular, superficie convexa, borde redondeado y de consistencia viscosa.	Diplobacilos Gram positivos
LS6-211(P)	Colonias brillantes con coloración crema, de forma puntiforme, superficie convexa, borde redondeado y de consistencia cremosa.	Diplobacilos Gram negativos
LS7-2111	Colonias semitransparentes con coloración crema, de forma circular, superficie plana, borde redondeado y de consistencia viscosa.	Diplobacilos Gram negativos
LL8-111(M)	Colonias de coloración blanca, con forma circular, superficie convexa, borde redondeado y consistencia cremosa.	Estafilococos Gram positivos
LL8-221	Colonias translúcidas, coloración crema, con forma irregular, superficie planoconvexa, borde ondulado y consistencia cremosa.	Diplobacilos Gram positivos
LL9-221	Colonias opacas, de coloración crema, con forma circular, superficie planoconvexa, borde ondulado y de consistencia cremosa.	Diplobacilos Gram positivos
DCL1-11	Colonias con coloración crema, de forma circular, superficie planoconvexa, borde redondeado, consistencia cremosa y de coloración crema.	Diplobacilos Gram positivos
DCL1-2(A)	Colonias con coloración crema, de forma circular, superficie planoconvexa, borde redondeado y de consistencia cremosa.	Diplobacilos Gram positivos
DCL2-11	Colonias translúcidas con coloración crema, de forma irregular, superficie planoconvexa, borde ondulado, consistencia cremosa.	Diplobacilos Gram negativos
DCL2-411(H)	Colonias opacas con coloración blanca, de forma circular, superficie papilada, borde redondeado y de consistencia cremosa.	Estreptobacilos Gram positivos
DCL3-3	Colonias con coloración crema, de forma circular, superficie papilada, borde redondeado y de consistencia cremosa.	Estreptobacilos Gram positivos
DCL3-4	Colonias brillantes con coloración crema, de forma puntiforme, superficie convexa, borde redondeado y de consistencia cremosa.	Diplobacilos Gram negativos

Continuación Tabla 9. Caracterización morfológica de bacterias

DCL4-31F	Colonias opacas con coloración blanca, de forma irregular, superficie plana, borde filamentoso y de consistencia seca.	Diplobacilos Gram positivos
DCL12-111(Q)	Colonias opacas con coloración blanca, de forma irregular, superficie papilada, borde lobulado y de consistencia cremosa.	Bacilos individualizados Gram positivos
DCL12-21(L)	Colonias con coloración crema, de forma irregular, superficie planoconvexa, borde ondulado y de consistencia cremosa.	Diplobacilos Gram negativos

De la aplicación de las pruebas de tinción diferencial Gram a los cultivos bacterianos (**Tabla 9**) se obtuvieron los siguientes resultados: 22 bacterias de forma bacilar (15 Gram positivas y 7 Gram negativas) y 1 de forma cocal Gram positiva. En la **Figura 27**, se detallan las 23 bacterias con las que se cuenta. Se puede observar que 16 bacterias se clasifican como Gram positivas, 15 poseen forma bacilar (TS10-111, TS13-2111u, TS11-3C, TS11-31, LS5-1K, LS5-11B, LS6-11G, LL8-221, LL9-21, DCL1-11, DCL1-2A, DCL2-411H, DCL3-3, DCL4-31F y DCL12-111Q) y un coco (LL8-111M); también se observaron 7 bacilos Gram negativos (TS13-111J, LS5-21, LS6-2111P, LS7-2111, DCL2-11, DCL3-4 y DCL12-21L). Los aislados bacterianos se conservaron en medio de cultivo fresco LB en placas Petri a 10°C, con siembra periódicas mensuales para su posterior identificación por vía molecular.

En la **Figura 27** se observa que de los 23 aislados bacterianos, 22 son de forma bacilar y una de forma cocal, predominando la presencia de bacilos Gram positivos (68%), estos resultados concuerdan con los obtenidos por Orberá y Pérez (2005) ya que del total de cepas aisladas la mayoría presentaban forma bacilar, de 91 cepas aisladas 58 fueron identificadas morfológicamente como parte del género *Bacillus* representado el 63.7%, de los cuales la mayoría fueron Gram Positivos (34.3%).

Según Paulitz y Bélanger (2001), esto puede deberse a que el género *Bacillus* es el más abundante de bacterias de vida libre, debido a su amplia distribución en todas las regiones geográficas del planeta, alcanzando el 24% del total de bacterias aisladas del suelo y un 40% de la rizósfera. Sin embargo, en la caracterización morfológica no se observaron coincidencias en las características de las colonias aisladas por Orberá y Pérez (2005), ya que describe colonias brillantes, grasosas, rizoides y de coloración marrón y amarillo. Estas diferencias pueden deberse a que la densidad bacteriana en el suelo principalmente en la rizósfera es demasiado grande, por lo tanto, debe tomarse en cuenta las zonas de aislamiento de las bacterias para poder establecer comparaciones.

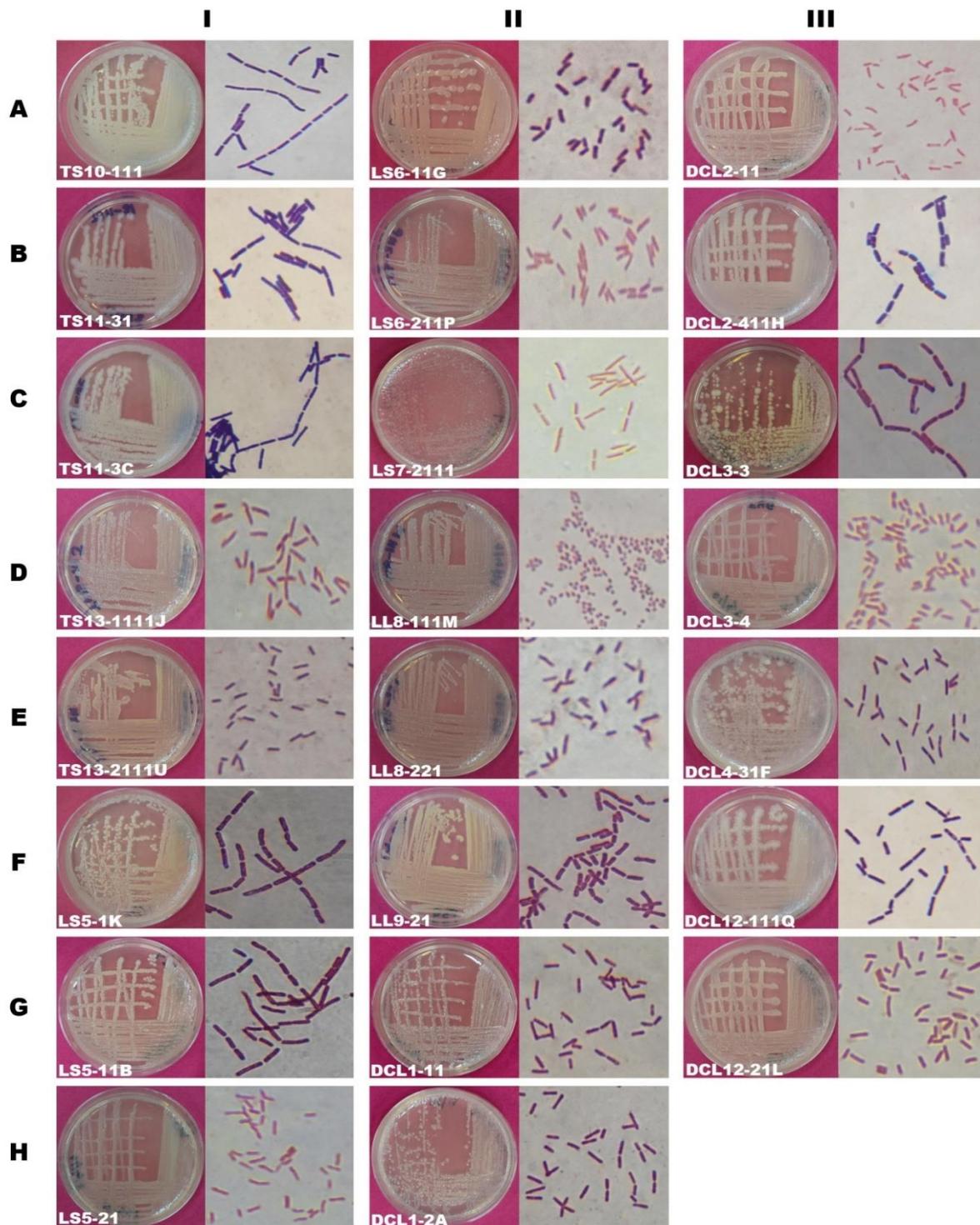


Figura 27. Morfología en placa y tinción de Gram de bacterias aisladas de bioinsumos artesanales. AI-EI: Muestra TS; FI-CII: Muestra LS; DII-FII: Muestra LL; GII-GIII: DCL; HI: Muestra LS; HII: Muestra DCL (Fuente: Elaboración propia).

En este estudio de los aislados bacterianos proveniente de los bioinsumos artesanales, resalta un grupo bien representado que corresponde a los bacilos

Gram positivos, los cuales en la rizosfera forman una comunidad microbiana de gran valor, representados por el género *Bacillus*, con las especies *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. thuringiensis*. Lo que nos sugiera un gran potencial de los microorganismos para ser utilizados en productos de calidad.

7.1.2. Caracterización morfológica de hongos filamentosos aislados de bioinsumos artesanales

En este trabajo se realizó una descripción de las características macroscópicas y microscópicas de los hongos filamentosos, tomando en cuenta su aspecto físico, lo cual incluye las características de las colonias (forma, elevación, margen, superficie, textura, tamaño, color y presencia de pigmentos difusos) y la observación de las esporas reproductivas mediante el uso del microscopio de luz con un objetivo de 40X. En la **Figura 28**, se muestran los 6 hongos filamentosos aislados de bioinsumos artesanales cuyas características se describen en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos filamentosos aislados de bioinsumos artesanales (Fuente: Elaboración Propia).

Código de microorganismos	Observación macroscópica			Observación microscópica
	Anverso	Reverso	Aspecto del micelio	Forma de esporas
TSI-2111	Color beige, centro oscuro y contorno blanco	Color marrón con bordes crema	Micelio elevado con forma circular, margen entero, de textura lanosa y con crecimiento limitado	Esférica
TSII-211	Color blanco	Pigmentación rosada con bordes blancos	Micelio plano con forma irregular, de margen entero, superficie plegada, textura pulverulenta y aterciopelada y crecimiento invasivo	Esférica
TSIII-2111	Blanco verdoso	Color crema con centro marrón	Micelio plano con forma circular, de margen entero, superficie estriada, textura aterciopelada y pulverulenta y crecimiento limitado	Esférica
TSIII-1212	Color verde oscuro	Color verde	Micelio plano con forma irregular, textura	Esférica

Continuación Tabla 10. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos

LLVII	Color blanco	Color con marrón	crema centro	Micelio umbilicado con forma filamentosa, margen rizoide, textura vellosa y de crecimiento limitado	Esférica
LSVI-121	Color verde con borde blanco	Color con blanco	vede borde	Micelio elevado con forma circular, de margen entero, textura lanosa y de crecimiento limitado	Ovalada

Los resultados presentados en la **Tabla 10**, específicamente TSIII-1212, concuerda con la descripción de Zeballos (2017) donde describe el único hongo aislado de bioinsumo según Color: verde Forma: filamentosa Elevación: umbilicada Textura: pulverulenta Borde: desflecado Superficie: surcos radiales.

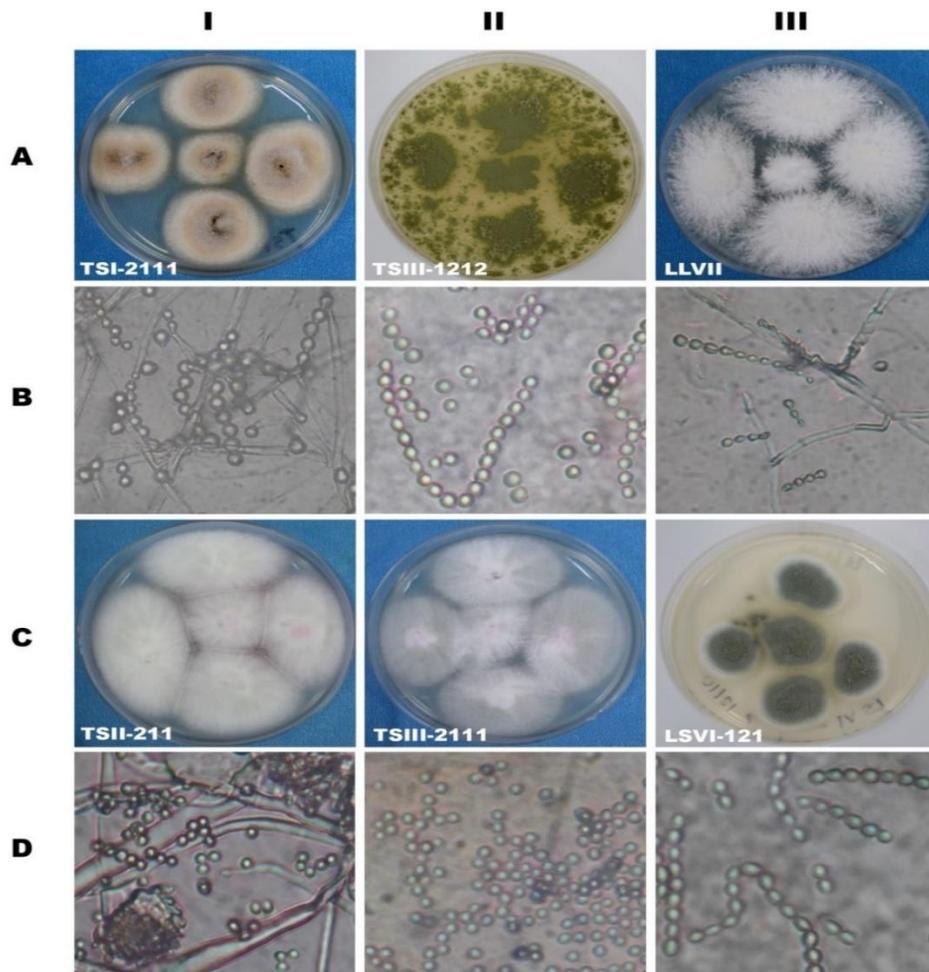


Figura 28. Hongos filamentosos aislados de muestras de bioinsumos artesanales. En las filas A y C se muestran la morfología en placa, mientras que en las filas B y D se muestran las esporas observadas de cada uno de ellos (Fuente: Elaboración propia).

Los resultados de la observación de las características macroscópicas y microscópicas y su comparación con lo descrito en la literatura (Samson *et al.*, 2007; Varga *et al.*, 2011) nos condujeron a una aproximación del posible género de dos aislados de hongos filamentosos con códigos TSIII-2111 y TSIII-1212, los cuales por su morfología en placa y sus esporas esféricas sugiere que se trate de los géneros *Neosartorya sp.* (**Figura 28AII y 28BII**) y *Aspergillus sp.*(**Figura 28CII y 28DII**) respectivamente. Sin embargo, para los demás no se logró dar una aproximación debido a que las características observadas no coincidieron con las encontradas en la literatura consultada. Según Masaquiza (2019), la identificación de hongos filamentosos basándose en la fenología y morfología de las estructuras es un método que presenta un importante grado de dificultad, debido a que la fiabilidad de la identificación depende de la experiencia del observador y tiene un importante componente subjetivo, por lo que se sugiere utilizar técnicas moleculares para obtener resultados más confiables.

7.1.3. Identificación molecular de bacterias aisladas de Bioinsumos artesanales

El gen ribosomal 16S es empleado para estudios filogenéticos debido a que es una secuencia altamente conservada entre las diferentes especies de bacterias; además es una región hiper variable lo cual garantiza una especificidad de especie, esto resulta muy útil para la identificación de especies bacterianas (Castillo *et al.*, 2015).

Una sección del árbol filogenético generado en este estudio se muestra en la **Figura 29**. En la amplificación de los productos de PCR de la región 16S del ADNr de bacterias, los amplicones obtenidos tuvieron un tamaño aproximado de 1300-1600 pb. El árbol filogenético presentó una agrupación similar a la taxonomía establecida en el Genbank y permitió verificar la variabilidad en el gen ADNr 16S, lo cual justifica la separación de los géneros como linajes diferentes. Cada especie bacteriana (cepa) confirma su identidad en su mayoría en 100% con las secuencias contenidas en el Genbank. De las 23 bacterias identificadas molecularmente es importante destacar que 14 pertenecen al género *Bacillus*. El dendrograma resultante presentó 6 clados, el primero de ellos ocupado por representantes del género *Bacillus* constituido por: *pumilus*, *Bacillus sp.*, *safensis*, *subtilis*, *velezensis*, *kochii*, *flesus*, *aryabhatai*, *megaterium*, *thuringiensis*, *cereus*, *toyonensis*, *cereus* y *anthracis*. Pudiéndose identificar 8 de los microorganismos en estudio a nivel de especie y 6 a nivel de género spp.

El segundo clado presentó cepas del género *Staphylococcus* (*xylosus*, *succinus*). El tercer clado presentó cepas de referencia *alvei* del género *Paenibacillus*. El cuarto clado presentó cepas del género *Lysinibacillus* (*macrides*, *xylanilyticus* y *fusiformis*). El quinto clado presentó cepas del género *Agrobacterium* (*tumefaciens*) y

Rhizobium sp. El sexto clado prestó cepas del género *Stenotrophomonas* (*rhizophilia*, *maltophilia*).

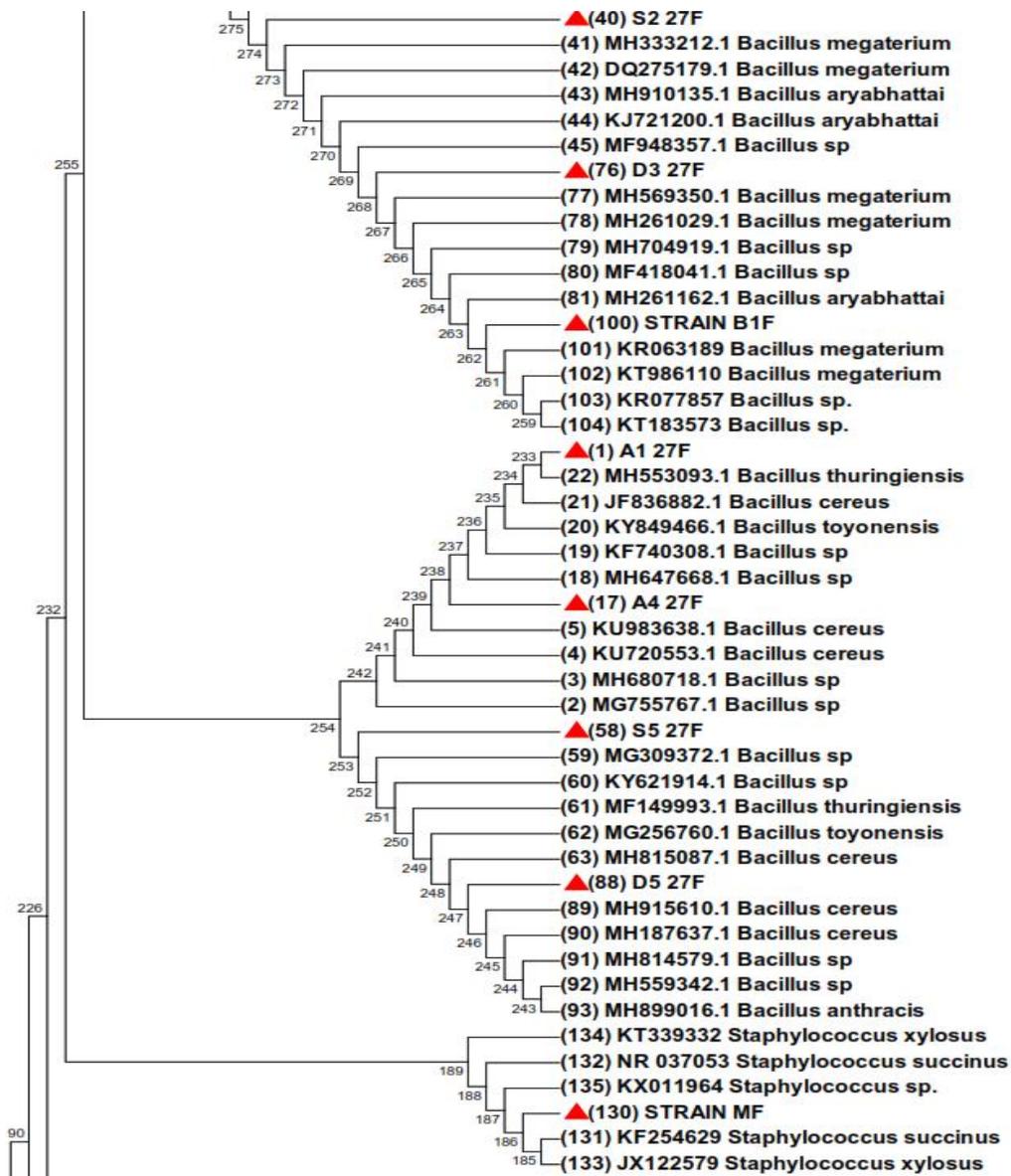


Figura 29. Se muestra una sección del árbol filogenético de aislados bacterianos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado con el programa MEGA 7.0.14, el código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo (Fuente: Elaboración propia).

De los 23 aislados bacterianos de bioinsumos artesanales, en este trabajo se secuenciaron 17 bacterias (Las 6 bacterias restantes fueron identificadas hasta nivel de especie por Méndez-Úbeda *et al.*, (2018)), del total de bacterias inicial, 12 se lograron identificar a nivel de especie y 11 hasta nivel de género. Una sección de dicho árbol se muestra en la **Figura 29** y su versión completa en el **Anexo 1**. Las secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA se muestran en el **Anexo 2**.

La **Tabla 11** obtenida a partir del análisis del árbol filogenético de la **Figura 29**, detalla las 23 bacterias identificadas a partir de las muestras de bioinsumos proveniente de la zona occidente y norte del país.

Tabla 11. Identificación de bacterias mediante secuenciación genética. En la tabla se muestra el código de la secuencia y el código del microorganismo, la máxima puntuación, identidad máxima con el vecino cercano y la identidad final de la bacteria, de la base de datos de NCBI (Fuente: Elaboración propia).

Código de secuencia	Código de microorganismo	Vecino cercano (Número de acceso)	Máx. Punt.	Máx. Ident. (%)	Identidad final
A1	TS11-31	<i>Bacillus thuringiensis</i> (MH553093.1)	1487	99	<i>Bacillus thuringiensis</i>
A2	TS13-1111J	<i>Stenotrophomonas</i> sp.(MH718840.1)	1478	100	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
A3	TS13-2111U	<i>Bacillus pumilus</i> (MF692773.1)	1648	99	<i>Bacillus pumilus</i>
A4	TS13-3C	<i>Bacillus</i> sp. (MH647668.1)	1657	100	<i>Bacillus</i> sp.
B	LS5-11	<i>Bacillus megaterium</i> (KR063189)	1105	99	<i>Bacillus megaterium</i>
D1	DCL1-2(A)	<i>Lysinibacillus macroides</i> (MH458746.1)	1511	100	<i>Lysinibacillus macroides</i>
D2	DCL2-11	<i>Bacillus</i> sp. (MH813429.1)	1604	100	<i>Bacillus</i> sp.
D3	DCL3-3	<i>Bacillus</i> sp. (MF948357.1)	1836	100	<i>Bacillus</i> sp.
D4	DCL3-4	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (LC133695.1)	1526	100	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
D5	DCL12-111(Q)	<i>Bacillus Cereus</i> (MH915610.1)	1522	100	<i>Bacillus cereus</i>
D6	DCL1-11	<i>Lysinibacillus macroides</i> (MF079282.1)	1554	100	<i>Lysinibacillus macroides</i>
F*	DCL4-31	<i>Bacillus subtilis</i> (KX454091)	1022	99	<i>Bacillus subtilis</i>
G*	LS6-11	<i>Bacillus subtilis</i> (KU764381)	1057	99	<i>Bacillus subtilis</i>
H*	DCL2-411	<i>Bacillus flexus</i> (KC713922)	1114	100	<i>Bacillus flexus</i>
L*	DCL12-21	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (KM894180)	2490	99	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
L1	LL9-21	<i>Bacillus megaterium</i> (MH910311.1)	1781	100	<i>Bacillus megaterium</i>

Continuación Tabla 11. Identificación de bacterias

M*	LL8-111	<i>Staphylococcus succinus</i> (KF254629)	2601	100	<i>Staphylococcus succinus</i>
S1	LS5-21	<i>Stenotrophomonas sp.</i> (JQ359101.1)	1652	100	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
S2	LS5-1K	<i>Bacillus sp.</i> (MG309429.1)	1836	100	<i>Bacillus sp.</i>
S3	LS6-211P	<i>Stenotrophomonas sp.</i> (KP258175.1)	1886	100	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
S4	LS7-2111	<i>Paenibacillus sp.</i> (MH628020.1)	1640	99	<i>Paenibacillus sp.</i>
S5	TS10-111	<i>Bacillus sp.</i> (MG309372.1)	1585	100	<i>Bacillus sp.</i>

Nota: * microorganismos identificados en una primera fase por Méndez-Úbeda et al., (2018).

La **Tabla 11** muestra las bacterias identificadas hasta nivel de especie: *B. thuringiensis* (TS11-31), *B. pumilus* (TS13-2111u), *B. megaterium* (LS5-11B), *Lysinibacillus macroides* (DCL1-2A), *B. cereus* (DCL12-111Q), *Lysinibacillus macroides* (DCL1-11), *B. subtilis* (DCL4-31F), *B. subtilis* (LS6-11G), *B. Flexus* (DCL2-411H), *Agrobacterium tumefaciens* (DCL12-21L), *B. megaterium* (LL9-21) y *Staphylococcus succinus* (LL8-111M). Las bacterias identificadas hasta nivel de género fueron: *Stenotrophomonas sp.* (TS13-1111J), *Bacillus sp.* (TS13-3C), *Bacillus sp.* (DCL2-11), *Bacillus sp.* (DCL3-3), *Stenotrophomonas sp.* (DCL3-4), *Bacillus sp.* (LL8-221), *Stenotrophomonas sp.* (LS5-21), *Bacillus sp.* (LS5-1K), *Stenotrophomonas sp.* (LS6-211P), *Paenibacillus sp.* (LS7-2111) y *Bacillus sp.* (TS10-111).

Cuervo (2010) logró aislar e identificar únicamente tres especies microbianas (*Bacillus subtilis* en medio sólido, *Bacillus firmus* y *Bacillus sphaericus* en medio líquido) partiendo de dos presentaciones diferentes de biofertilizantes. De igual forma Zeballos (2017), aisló 7 cepas provenientes de 4 muestras de biofertilizantes, de estas 7 cepas 4 fueron bacterias: 2 *Bacillus sp.*, 1 *Micrococcus sp.* y 1 *Streptococcus sp.*; lo que difiere con los resultados del presente trabajo se logró aislar e identificar un número mucho mayor de bacterias (23), llegándose a identificar 12 a nivel de especie como (*B. thuringiensis*, *B. Megaterium* (2), *B. cereus*, *Lysinibacillus macroides*, *B. subtilis* (2), *B. pumilus*, *B. flexus*, *Agrobacterium tumefaciens*, y *Staphylococcus succinus*). Otros géneros de interés que se lograron identificar son *Stenotrophomonas* y *Paenibacillus*. Esta diferencia puede deberse a los materiales empleados para elaborar los sustratos utilizados en la fabricación de estos biofertilizantes artesanales, además de la falta de control y manejo adecuado.

Según el análisis anterior se logró identificar la microbiota cultivable contenida en cada una de las 4 muestras de bioinsumos artesanales recolectadas en las zonas

de occidente y norte del país. La muestra de la región norte en presentación sólida con código de procedencia **TS contenía**: 5 bacterias (*B. thuringiensis*, *B. pumilus*, 2 *Bacillus sp.* y 1 *Stenotrophomonas sp.*); la muestra de la región norte en presentación sólida con código de procedencia **LS contenía**: 6 bacterias (*B. megaterium*, *B. subtilis*, 2 *Stenotrophomonas sp.*, 1 *Paenibacillus sp.* y 1 *Bacillus Sp.*); la muestra de la región norte en presentación líquida con código de procedencia **LL contenía**: 3 bacterias (*B. megaterium*, *Staphylococcus succinus* y 1 *Bacillus sp.*). Finalmente, la muestra de la región occidente en presentación líquida con código de procedencia **DCL contenía**: 9 bacterias (*B. subtilis*, *B. flexus*, *B. cereus*, 2 *Lysinibacillus macroides*, *Agrobacterium tumefaciens*, 2 *Bacillus sp.* y 1 *Stenotrophomonas sp.*).

De los bioinsumos analizados el único que estaba libre de patógenos bacterianos era la muestra LS, en los otros 3 (LL, DCL y TS) se reporta la presencia de al menos una cepa patógena al ser humano como *Bacillus cereus* (DCL) y muchos otros pudieran estar desarrollando actividades que no son aplicables a todo tipo de suelos, ni a todo tipo de cultivos, por ejemplo: *Agrobacterium tumefaciens* (DCL) y *Staphylococcus succinus* (LL). Otro punto a destacar, es que en los 4 bioinsumos analizados, se encuentran *Bacillus sp.*, en dos de ellos y en los otros dos *B. subtilis* (DCL y LS), estos últimos presentaron antagonismo con las 7 bacterias confrontadas, lo que podría inhibir la acción de las otras bacterias benéficas con las que convive. Todos estos inconvenientes, se pretenden superar, con la selección de bacterias aisladas de estos bioinsumos, elegidas por la función que realicen en los cultivos, por su no patogenicidad para el ser humano, por no mostrar antagonismo e inhibición entre las mismas y por garantizar un número de unidades formadoras de colonia estable para el cultivo final en el bioproceso desarrollado para ello.

7.1.4. Identificación molecular de hongos filamentosos aislados de bioinsumos artesanales

En esta investigación se identificaron molecularmente, a través de la amplificación de los productos de PCR de las regiones ITS del ADNr de los hongos generó un fragmento de aproximadamente 600 a 800 pb con los cebadores ITS1 e ITS4, para 5 hongos filamentosos que contenían las muestras de bioinsumos artesanales pertenecientes a las muestras con códigos TS, LS y LL. De los resultados del análisis de las secuencias se obtuvo el siguiente árbol filogenético (**Figura 30**).

El árbol filogenético para hongos presentó una agrupación similar a la taxonomía establecida en el Genbank y permitió verificar la variabilidad en las regiones ITS del ADNr, lo cual justifica la separación de los géneros como linajes diferentes.

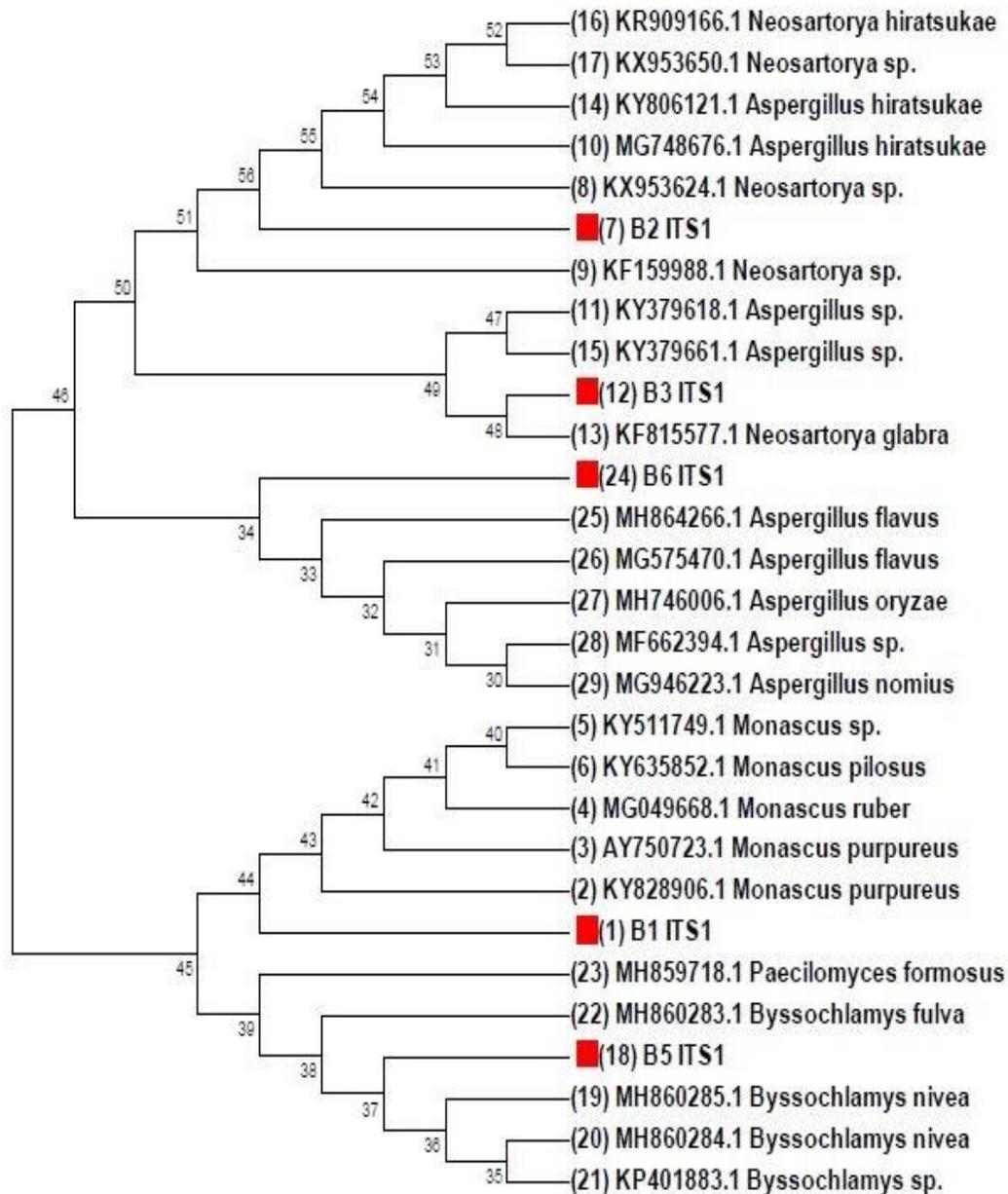


Figura 30. Árbol filogenético de hongos aislados de bioinsumos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado con el programa MEGA 7.0.14, el código de acceso al Gen Bank se especifica al inicio del nombre del microorganismo (Fuente: Elaboración Propia).

En la **Figura 30**, cada especie bacteriana (cepa) confirma su identidad en su mayoría en 100% con las secuencias contenidas en el Genbank. De los 5 hongos identificados molecularmente, el dendrograma resultante presentó 4 clados, el primero de ellos ocupado por representantes del género *Neosartorya* y *Aspergillus*, de las especies *hiratsukae*. El segundo constituido por *Aspergillus* (*flavus*, *oryzae* y *nomius*). El tercero *Monascus* (*pilosus*, *ruber*, y *purpureos*). Y un cuarto clado por *Paecilomyces* (*formosus*) y *Byssoschlamys* (*fulva* y *nivea*).

De los 6 hongos filamentosos aislados de los bioinsumos artesanales en estudio, 4 de ellos se lograron identificar a nivel de especie: TSI-2III (B1) como *Monascus purpureus*, TSIII-2III (B3) como *Neosartorya glabra*, LLVII (B5) como *Byssochlamys nivea*, TSIII-1212 (B6) como *Aspergillus flavus* y 1 a nivel de género: TSII-2II (B3) como *Neosartorya sp.* Estos resultados se resumen en la **Tabla 12**. Finalmente, uno de los hongos con código LSVI-121 no se logró identificar debido a resultados no satisfactorios durante el proceso de secuenciación. De igual forma, el hongo levaduriforme no pudo ser identificado.

Tabla 12. Identificación final de hongos aislados de bioinsumos. La tabla resume el código de la secuencia y el código de laboratorio del microorganismo, la máxima puntuación, identidad máxima con el vecino más cercano y la identidad final del hongo, de la base de datos de NCBI (Fuente: Elaboración propia).

Código de secuencia	Código del microorganismo	Vecino cercano (Numero de acceso)	Máx. Punt.	Máx. Ident. (%)	Identidad final
B1	TSI-2111	<i>Monascus purpureus</i> (KY828906.1)	961	99	<i>Monascus purpureus</i>
B2	TSII-211	<i>Neosartorya sp.</i> (KX953624.1)	979	100	<i>Neosartorya sp.</i>
B3	TSIII-2111	<i>Neosartorya glabra</i> (KF815577.1)	946	100	<i>Neosartorya glabra</i>
B5	LLVII	<i>Byssochlamys nivea</i> (MH860285.1)	976	100	<i>Byssochlamys nivea</i>
B6	TSIII-1212	<i>Aspergillus flavus</i> (MH864266.1)	953	100	<i>Aspergillus flavus</i>

De los resultados aquí obtenidos, podemos decir que de los 4 bioinsumos solamente 2 muestras recolectadas en la zona norte del país contenían hongos que pudieron ser identificados. La muestra en presentación sólida con código de procedencia **TS** contenía: *Monascus purpureus*, *Neosartorya sp.*, *Neosartorya glabra*, *Aspergillus flavus*. La muestra en presentación líquida con código de procedencia **LL** contenía únicamente a *Byssochlamys nivea*.

Zeballos (2017) aisló 7 cepas provenientes de 4 muestras de biofertilizantes, de las cuales se aislaron 2 hongos levaduriformes: *Sacharomyces sp.*, *Candida sp.* y 1

hongo filamentoso que no se identificó molecularmente, mientras que Álvarez (2012) identificó por medio del análisis de secuencias ITS1-5.8S-ITS2 del gen ADNr 8 hongos filamentosos aislados de la rizósfera de plantas de vainilla, estos fueron: 3 *Plectosphaerella cucumerina*, 1 *Penicillium griseofulvum*, 1 *Bionectria ochroleuca*, 1 *Aspergillus fumigatus*, 1 *Phoma sp.*, 1 *Fusarium sp.*; estos resultados contrastan con los obtenidos en el presente trabajo, en donde se aislaron 6 hongos filamentosos de los cuales 4 pudieron ser identificados molecularmente y cuyas especies no coinciden con los estudios mencionados. Las diferencias de las especies de hongos filamentosos identificados pueden deberse a los sustratos utilizados en la fabricación de los biofertilizantes artesanales y el lugar de aislamiento, ya que estos microorganismos son propios de las regiones de donde se aislaron.

Un gran número de biofertilizantes comerciales están disponibles en todo el mundo; sin embargo, la calidad y la eficacia de muchos de ellos no están probadas ni aprobadas. En ausencia de biofertilizantes eficaces de buena calidad y calidad constante, no es probable que disminuya a corto plazo la dependencia del uso de fertilizantes minerales. Por lo tanto, la disponibilidad de biofertilizantes de alta calidad debe ser una prioridad, especialmente en países donde la producción agrícola juega un papel clave en la economía y la seguridad alimentaria (Lesueur *et al.*, 2016).

7.2. PRUEBAS DE ANTAGONISMO Y SELECCIÓN DEL CONSORCIO MICROBIANO

7.2.1. Propiedades y funciones de bacterias y hongos aislados de Bioinsumos

Una vez identificadas las bacterias y los hongos filamentosos aislados de bioinsumos artesanales, se realizó la búsqueda bibliográfica de las aplicaciones biotecnológicas de cada uno de ellos (**Tabla 13** y **Tabla 14**) con el propósito de conocer las funciones que desempeñan y seleccionar aquellos que sean promotores del crecimiento vegetal conocidos como PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), ya que estos se caracterizan por mejorar la disponibilidad o absorción de minerales, ayudan a la producción de hormonas necesarias para el desarrollo de los vegetales, además protegen a las plantas y cultivos contra agentes patógenos (Benjumeda, 2017). Una vez caracterizados los microorganismos con la propiedad de interés se procedió a realizar las pruebas de antagonismo con las cuales se determinaron las especies que conforman el consorcio microbiano.

Tabla 13. Propiedades y funciones de bacterias aisladas de bioinsumos artesanales (Fuente: Elaboración Propia).

Especie	Propiedades y funciones de las bacterias	Referencia
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Durante el proceso de esporulación produce una inclusión parasporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos. Estas proteínas se llaman Cry y constituyen la base del insecticida biológico más difundido a nivel mundial.	Sauka y Benintende, 2008
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i> ha sido ampliamente identificado como un patógeno de plantas y humanos. Es un patógeno que causa la enfermedad de la pudrición del rizoma del jengibre al invadir los tejidos parenquimatosos del rizoma, crecer en el espacio extracelular y producir enzimas degradadoras de la pared de las células vegetales para destruir las células del jengibre.	Yuan & Gao, 2015
<i>Bacillus pumilus</i>	Las estructuras de la comunidad bacteriana del suelo pueden ser modificadas por algunas cepas de PGPR, incluida la <i>Bacillus pumilus</i> , suponemos que la regulación de la estructura de la comunidad bacteriana del suelo es uno de los mecanismos que promueven el crecimiento de la planta de <i>B. pumilus</i> WP8, en lugar de depender de Células de alta densidad en suelo	Kang et al., 2013
<i>Bacillus pumilus</i>	Produce metilbenceno como metabolito secundario que podría suprimir el crecimiento de patógenos (<i>Cytospora chrysosperma</i> , <i>Phomopsis macrospora</i> y <i>Fusicoccum aesculi</i>) de manera efectiva.	Ren et al., 2013
<i>Bacillus pumilus</i>	Presenta dos propiedades importantes asociadas con el crecimiento de las plantas, la solubilización de fosfato tricálcico y la producción de ácido indolacético (IAA). Otra característica es la producción de compuestos difusibles y volátiles que inhiben el crecimiento de dos fitopatógenos, <i>Alternaria alternata</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> .	Trivedi & Pandey, 2008
<i>Bacillus megaterium</i>	También se ha reportado que es capaz de fijar nitrógeno, Posee actividad de la enzima nitrogenasa y que el gen nifH amplifica por la reacción en cadena de la polimerasa.	Ding et al., 2005
<i>Bacillus megaterium</i>	Se caracteriza por su capacidad promotora de crecimiento vegetal (PGPR) a partir de la producción de compuestos volátiles, la inhibición del crecimiento de la raíz primaria y el incremento en el número y longitud de pelos radiculares y raíces secundarias. Solubilizadora de fosfatos y biocontroladora de patógenos en <i>Capsicum annuum</i>	Zou et al., 2010. Akgül y Mirik, 2008
<i>Bacillus megaterium</i>	Es un productor biotecnológico de vitamina B12. También produce Polihidroxi butirato (PHB) y anticuerpos	Tortolo & Bell, 2015

Continuación Tabla 13. Propiedades y funciones de bacterias aisladas

	<p>recombinantes. <i>B. megaterium</i> fue aislada de las hojas de <i>Avicennia marina</i> para la producción extracelular de α-amilasa.</p>	
<i>Bacillus cereus</i>	<p><i>Bacillus cereus</i> es una bacteria genéticamente diversa que se encuentra comúnmente en el ambiente. Contamina los alimentos afectando la salud humana, al ingerir el microorganismo y/o sus toxinas, la emética o las enterotoxinas</p> <p>También se reporta un comportamiento antagonista contra patógenos de plantas como <i>Pseudomonas syringae</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.</p> <p>Promotor de crecimiento en cultivos de maíz (<i>zea mays</i>) y tomate (<i>solanum lycopersicum</i>).</p>	<p>Sánchez et al., 2016</p> <p>Banerjee et al. 2017</p> <p>Pulido, 2016</p>
<i>Bacillus subtilis</i>	<p>Fijador nitrógeno y fosforo.</p> <p>Actividad antagónica contra <i>Fusarium oxysporum</i>, <i>Rhizoctonia solani</i>, producción de enzimas hidrolíticas y lipopéptidos. También presenta antagonismo contra <i>Fusarium stilboides</i>, <i>F. xylarioides</i>, producción de lipasas, proteasas, β-1,3-glucanasa.</p>	<p>Orberá et al., 2005</p> <p>Tejera et al., 2011</p>
<i>Bacillus flexus</i>	<p>Es caracterizado como un microorganismo endófito halotolerante. Esta cepa puede mejorar el crecimiento de las plántulas huésped en condiciones de estrés salino, debido a que posee genes relacionados con la promoción del crecimiento de las plantas (PGP).</p> <p>Se considera como un potencial productor de lipasa termoestable y alcalina que puede ser utilizada en industrias de alimentos, farmacéuticas y de detergentes.</p> <p>Otra aplicación reportada es la biorremediación de aguas residuales alcalinas, al presentar una alta tasa de eliminación de DQO.</p>	<p>Wang et al., 2017</p> <p>Tambekar et al., 2017</p> <p>Wang y Zhao, 2013</p>
<i>Lysinibacillus macroides</i>	<p>Se reporta como un candidato para la biodegradación sinérgica y la biorremediación de ambientes contaminados especialmente los sitios ricos en metales pesados, debido a que presentó una notable tendencia de tolerancia de múltiples metales.</p>	<p>Oladipo et al., 2018</p>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<p><i>A. tumefaciens</i> induce la formación de tumores en plantas, lo cual ha sido fundamental para su uso como herramienta en la ingeniería genética de plantas. Así mismo, esta interacción ha dado pie a formular modelos de señalización celular, transporte célula a célula, importe nuclear de proteínas y ADN y mecanismos de integración genómica.</p> <p>La inserción de nuevos genes y sus elementos reguladores en el ADN-T ha permitido la transformación genética de plantas susceptibles con genes de importancia agronómica. Esto a su vez ha servido para el estudio de la</p>	<p>Tzfira & Citovsky, 2000</p> <p>Gelvin, 2003</p>

Continuación Tabla 13. Propiedades y funciones de bacterias aisladas

	<p><i>función y expresión de genes, y para el desarrollo de plantas con nuevas características.</i></p>	
<i>Staphylococcus succinus</i>	<p>Se reporta como una bacteria halófila, este tipo de microorganismo se caracteriza por prosperar en condiciones de alta concentración de sal y estrés osmótico. Debido a estas razones, los microorganismos halófilos con capacidad para fijar nitrógeno o movilizar fosfato representan un potencial como biofertilizante para aumentar el crecimiento y el rendimiento de los cultivos en suelos salinos.</p>	Delgado et al., 2013
<i>Bacillus sp.</i>	<p><i>Se caracteriza por ser controlador biológico de microorganismos fitopatógenos, por la participación en la nutrición mineral y la fijación biológica de nitrógeno. También produce sustancias con actividad funguicida y bactericida, entre las que figuran la subtilisina y la iturina. Otra propiedad es la mineralización de componentes nutricionales entre los que predominan el nitrógeno, fósforo, hierro y potasio, procedentes de fuentes orgánicas e inorgánicas, transformándolos a formas asimilables por las plantas.</i></p>	Orberá et al., 2005
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	<p>Se ha reportado que puede degradar eficientemente ocho pesticidas organofosforados (OP) y es un candidato muy excelente para aplicaciones en la remediación de la contaminación de OP.</p>	Deng et al., 2016
	<p>Produce un biosurfactante, el cual es de interés debido a la capacidad para emulsionar petróleo crudo y este puede ser útil en la biorremediación para reducir el derrame de petróleo en las fases acuosa y de suelo. Además, este biosurfactante exhibió propiedades antimicrobianas y antioxidantes, por lo que podría ser de interés en la industria de alimentos, cosméticos y detergentes.</p>	Gargouri et al., 2016
<i>Paenibacillus sp</i>	<p><i>Muchas especies de Paenibacillus pueden promover el crecimiento de cultivos directamente a través de la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fosfato, la producción de la fitohormona ácido indol-3-acético (IAA) y la liberación de sideróforos que permiten la adquisición de hierro. También pueden ofrecer protección contra los herbívoros y fitopatógenos de los insectos, incluyendo bacterias, hongos, nematodos y virus. Esto se logra mediante la producción de una variedad de antimicrobianos e insecticidas, y activando una respuesta defensiva hipersensible de la planta, conocida como resistencia sistémica inducida (ISR).</i></p>	Grady et al., 2016

Con el fin de entender la función desempeñada por los diferentes microorganismos que fueron aislados e identificados de los bioinsumos en estudio, se plasmó la información de la **Tabla 13**, al analizarla, se puede deducir que empleando estos bioinsumos artesanales, en los cuales no se tiene control de los microorganismos que se producen y están presentes en el producto final; se estarían aplicando microorganismos a los cultivos que pueden ser beneficiosos para algunos procesos de promoción del crecimiento vegetal (*Bacillus Pumilus*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus Subtilis*), a la inhibición y resistencia de patógenos (*Bacillus Pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Bacillus Subtilis*). No obstante, estas propiedades benéficas no se presentan en todos los bioinsumos estudiados por igual y no es posible preservar esta propiedad benéfica en el tiempo y en cada lote de producción, debido a que el proceso de selección del material de partida es siempre aleatorio (suelo de bosques con materia orgánica en proceso de degradación). Adicionando además estiércol, melaza y suero láctico, con sus propias cargas microbianas (Ito, 2006).

Algunos de los bioinsumos estudiados presentan bacterias patógenas al ser humano como *Bacillus cereus* aislado de la muestra DCL y otras bacterias que pudieran estar desarrollando actividades que no son aplicables a todo tipo de suelos, ni a todo tipo de cultivos como *Agrobacterium tumefaciens* y *Bacillus flexus* ambas aisladas del bioinsumo con código de procedencia DCL, y *Staphylococcus succinus* procedente del bioinsumo con código de procedencia LL; así como algunas que poseen importantes aplicaciones industriales y ambientales como *Bacillus flexus* y *Lysinibacillus macroides* identificadas a partir de la muestra con código de procedencia DCL, y *Stenotrophomonas sp.*, presente en los bioinsumos con código de procedencia DCL y LS.

A partir del análisis anterior se puede determinar que en relación al contenido bacteriano de los bioinsumos artesanales, el de mayor utilidad de acuerdo a sus aplicaciones biotecnológicas es el proveniente de la región norte en presentación sólida con código LS, debido a que contiene 4 especies que se caracterizan por ser promotoras del crecimiento vegetal (PGPM), como: *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus Sp.* *Paenibacillus sp.* y además de contener a *Stenotrophomonas sp.*; mientras los bioinsumos de menor conveniencia son los provenientes de la región de occidente en presentación líquida con código DCL, el cual presentaba un mayor número de bacterias aisladas entre las cuales estaba *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus sp.*, *Bacillus flexus*, *Lysinibacillus macroides* y *Stenotrophomonas sp.*, ya que este bioinsumo a pesar de contener una especie promotora del crecimiento vegetal, contenía una especie patógena para el ser humano y otras en su mayoría orientadas a ser utilizadas en biorremediación. El otro bioinsumo que según su contenido resulta ser de poca utilidad es el proveniente de la región norte en presentación líquida con código LL

conformado por *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus succinus* y *Bacillus sp.*, debido a que contiene poca diversidad microbiana y de los cuales solamente *Bacillus megaterium* está orientado a la promoción del crecimiento vegetal. El menos recomendado de los bioinsumos es el TS, que contiene 5 bacterias, entre ella una *B pumilus*, que ha sido reportada como patógena, pero que también está orientada más a biorremediación, adicionalmente, contiene hongos patógenos, como lo veremos posteriormente.

Con el propósito de seleccionar los hongos filamentosos que presentaran propiedades benéficas para la promoción del crecimiento vegetal se realizó una búsqueda de sus aplicaciones biotecnológicas las cuales se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Propiedades y funciones de hongos aislados de bioinsumos artesanales (Fuente: Elaboración Propia).

Especie	Propiedades y funciones de hongos	Referencia
<i>Monascus purpureus</i>	Produce pigmentos de color rojo y amarillo usados en la industria alimentaria.	Patakova, 2013
	Produce lovastatina y mevastatina usados en la producción industrial de estatinas para reducir el colesterol.	Rasheva et al., 1998
<i>Neosartorya sp.</i>	Se utiliza para biodegradación de petróleo.	Taewoo et al., 2011
<i>Neosartorya glabra</i>	Produce glabramicinas B y C, estas son dos productos naturales de macrolactona aislados por primera vez de <i>N. glabra</i> , en un esfuerzo por descubrir antibióticos clínicamente útiles. Ambas glabramicinas exhiben actividad antibacteriana contra <i>S. pneumoniae</i> ; además, la glabramicina C posee actividades antibacterianas adicionales contra <i>S. aureus</i> y <i>B. subtilis</i> .	Jayasuriya et al., 2009
	También se ha reportado que <i>N. glabra</i> al utilizar residuos de cáscara de fruta como fuente de carbono produce poligalacturonasas (PG), enzimas con potencial biotecnológico para su uso en la clarificación de jugos de frutas y para la mejorar de la eficiencia de la filtración.	Pinheiro et al., 2017
<i>Byssochlamys Nivea</i>	Se ha reportado que <i>B. Nivea</i> en presencia de <i>S. brumptii</i> y un compost de residuos urbanos sólidos, mostraron una buena capacidad para tolerar y degradar pentaclorofenol (PCP), de modo que pudieran usarse con éxito en el efecto sinérgico para tratar los suelos contaminados con PCP, el cual es un compuesto tóxico utilizado como agente de tratamiento de la madera y biocida general.	Bosso et al., 2015

Continuación Tabla 14. Propiedades y funciones de hongos aislados

<i>Aspergillus flavus</i>	Es un hongo saprófito del suelo extremadamente común que infecta y contamina las cosechas de semillas antes y después de la cosecha con el metabolito secundario carcinógeno aflatoxina, especialmente los cultivos que contienen aceite, como el maíz, el maní y la semilla de algodón. También es un patógeno animal y humano oportunista que causa enfermedades por aspergilosis	Amaike y Keller, 2011
---------------------------	---	-----------------------

El análisis de los resultados en la **Tabla 14**, mediante la identificación de los hongos aislados de los bioinsumos, nos muestra que algunos de las cepas identificados encuentran utilidad en la industria farmacéutica (*Monascus purpureus* y *Neosartorya glabra* (Patakova, 2013; Pinheiro *et al.*, 2017)), en procesos de biodegradación (*Neosartorya sp.* y *Byssochlamys nivea* (Taewoo *et al.*, 2011)), en la agricultura (*Neosartorya glabra* (Pinheiro *et al.*, 2017)), algunos podrían resultar indeseables cuando se desea preservar productos de fruta procesada (*Byssochlamys nivea* (Booso *et al.*, 2015)) y hasta algunos pudieran resultar patógenos para los seres humanos y los animales como *Aspergillus flavus* (Amaike and Keller, 2011). Lo anterior aunado al análisis hecho para las bacterias, nos presenta que el 75% de los bioinsumos en estudio están afectando los cultivos mediante la introducción de hongos y/o bacterias que no son adecuados para todo tipo de cultivos y suelos, además de que estarían afectando la salud humana.

De lo antes dicho se deduce, que el menos recomendado para su utilización en la agricultura es el bioinsumo proveniente de la región norte en presentación sólida con código TS debido a que contiene la mayor cantidad de hongos filamentosos aislados los cuales no poseen propiedades de interés para la promoción del crecimiento vegetal y además de poseer un hongo patógeno que afecta la salud humana por la producción de esporas y aflatoxinas que generan diferentes enfermedades.

7.2.2. Selección de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal para ser sometidas a pruebas de antagonismo

De la búsqueda bibliográfica realizada se seleccionaron 5 cepas bacterianas aisladas de bioinsumos artesanales que presentaron las mejores características en la promoción del crecimiento vegetal, estas fueron: 2 *Bacillus subtilis* (DCL4-31F y LS6-11G), 2 *Bacillus megaterium* (LS5-11B y LL9-21) y 1 *Bacillus pumilus* (TS13-211u). En el caso de *B. pumilus* se seleccionó debido a que Myresiotis *et al.*, (2012) y Almaghrabi *et al.*, (2013), la han reportado como promotora del crecimiento en planta (PGPM), aunque los dos estudios están más orientados a evaluar sus propiedades biodegradadoras, es importante entender mejor su función en los bioinsumos.

También se buscaron aplicaciones biotecnológicas de las cepas pertenecientes al banco de microorganismos del PIENSA y se seleccionaron 4 bacterias, de las

cuales *Acinetobacter calcoaceticus* (MVIA-01), *Bacillus marisflavi* (MIVB-01), *Exiguobacterium aurantiacum* (MVIB-02) fueron aisladas e identificadas por Delgado *et al.*, (2018); y *Pseudomona mendocina* (PTLL4g) aislada e identificada por Páramo *et al.*, (2018) (**Figura 31**), las cuales aportaban nuevas propiedades de interés al consorcio microbiano, dichas aplicaciones se muestran en la **Tabla 15**.

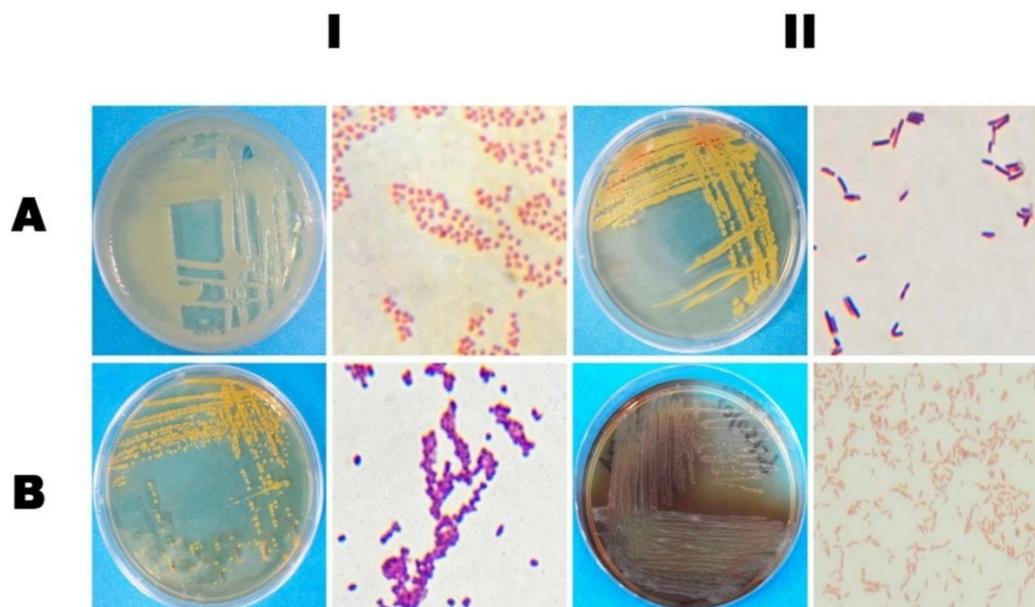


Figura 31. Morfología en placa y Tinción de Gram de bacterias seleccionadas del banco de microorganismos del PIENSA. AI: *Acinetobacter calcoaceticus* (MVIA-01); All: *Bacillus marisflavi* (MIVB-01); BI: *Exiguobacterium aurantiacum* (MVIB-02); BII: *Pseudomona mendocina* (PTLL4g) (Fuente: Elaboración Propia)

Tabla 15. Aplicaciones biotecnológicas de las 4 cepas seleccionadas pertenecientes al banco de microorganismos del PIENSA (Fuente: Elaboración Propia).

Especie	Aplicaciones biotecnológicas de interés	Referencia
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<p>Mostró múltiples rasgos que promueven el crecimiento de las plantas, tales como la solubilización de fosfato, la producción de ácido indol-3-acético (IAA) y producción de sideróforos.</p> <p>También se reporta que produce giberelina (GA) y secreta 10 tipos de GA diferentes en su entorno, incluidas las bioactivos GA1, GA3 y GA4; también se observó que es capaz de solubilizar fosfato tricálcico reduciendo el pH del medio durante el proceso, demostrando que la producción de ácidos (probablemente el ácido glucónico y el ácido 2-</p>	<p>Zhao <i>et al.</i>, 2013</p> <p>Kang <i>et al.</i>, 2009</p>

Continuación Tabla 15. Aplicaciones biotecnológicas de las 4 cepas seleccionadas

	cetoglucónico) sean los responsables de la solubilización del fosfato.	
<i>Bacillus marisflavi</i>	<i>Presenta la capacidad de fijar nitrógeno y además también se demostró por el método de amplificación por PCR que posee fragmentos del gen nifH, este gen codifica la proteína de hierro y los genes nifDK que codifican la proteína de hierro molibdeno, estas dos proteínas conforman a la enzima nitrogenasa la cual cataliza la fijación de nitrógeno.</i>	Ding et al., 2005
	<i>También se reporta la producción carotenoides. La función de los carotenoides es la fotoprotección, y las esporas que contienen carotenoides mostraron niveles significativamente más altos de resistencia a la radiación UV que las especies de Bacillus que no contienen carotenoides.</i>	Khaneja et al., 2010
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	Produce Ácido Indol Acético (AIA) que contribuyó al crecimiento de la cianobacteria de interés <i>Arthrospira platensis</i> Produce un pigmento naranja, cuyo análisis reveló la presencia de carotenoides. Estos carotenoides demostraron actividad antifúngica contra <i>Fusarium sp.</i> , <i>Penicilium sp.</i> , y <i>Alternaria sp.</i>	Gómez et al., 2012 Shatila et al., 2013
<i>Pseudomona mendocina</i>	<i>Aumentó significativamente la biomasa de los brotes y las raíces de lechuga y los contenidos de nutrientes foliares (P, Fe), incrementó los carbohidratos solubles en agua del suelo y el porcentaje de agregados estables. También tuvo un efecto significativo sobre las actividades de deshidrogenasa y fosfatasa; todo esto fue evaluado bajo condiciones de campo</i>	Kohler et al., 2006

7.2.3. Pruebas de antagonismo por la técnica de difusión en pozos

En este acápite se presenta el antagonismo microbiano como una relación deletérea o negativa; es la inhibición, deterioro o muerte de un microorganismo por acción de otro. Como resultado de la caracterización bibliográfica se seleccionó un total de 9 cepas bacterianas (2 *Bacillus subtilis* (DCL4-31F y LS6-11G), 2 *Bacillus megaterium* (LS5-11B y LL9-21), 1 *Bacillus pumilus* (TS13-211u) *Acinetobacter calcoaceticus* (MVIA-01), *Bacillus marisflavi* (MIVB-01), *Exiguobacterium aurantiacum* (MVI B-02) y *Pseudomona mendocina* (PTLL4g)) las cuales se sometieron a pruebas de antagonismo con el fin de verificar que no existiera inhibición entre ellas y así realizar una selección final de las cepas bacterianas que conformaron el consorcio microbiano.

Moreno (2017) efectuó una evaluación del antagonismo y sinergismo en aislados microbianos obtenidos de *Plukenetia Volúbilis L.*, para la conformación de un consorcio microbiano en condiciones *invitro*. La evaluación de la inhibición se realizó

entre 9 bacterias mediante la prueba de “botón en césped”, evidenciando que el 80.8% promedio de los enfrentamientos no presentó inhibición de crecimiento bacteriano, entre los cuales la cepa TSEBT 04-03 tuvo la capacidad de interactuar positivamente en todos los enfrentamientos realizados. De igual forma Gaitán y Pérez (2007) realizaron un aislamiento y evaluación de 8 cepas bacterianas con actividad celulolítica, con el fin de potencializar la actividad celulolítica de algunos de los microorganismos aislados y plantearon la posibilidad de establecer un consorcio microbiano para lo cual se llevaron a cabo pruebas de antagonismo.

En el presente trabajo, al realizar las pruebas de antagonismo, se observaron los siguientes comportamientos: la presencia de crecimiento de las cepas sembradas en pozos sobre las cepas masivas, indicando una coexistencia entre ambas, decimos entonces que no hay antagonismo (esto se representa en la **Tabla 16** con el signo (-)), lo cual se comprobó con una tinción de Gram al observar dos tipos de morfología bacteriana (**Figura 32**). También se observó comportamientos tales como la presencia de halos de inhibición, esto indicaba que existía un efecto antagónico (+), o la ausencia de crecimiento de las cepas sembradas en pozos, lo cual podría estar indicando una inhibición (+) o una coexistencia (-) en dependencia de la similitud de morfología que exista entre las especies en contacto, esto se representa en la **Tabla 16** con el signo (+/-). En el **Anexo 4** se muestran todos los resultados obtenidos en la prueba de antagonismo.

Tabla 16. Resultados de pruebas de antagonismos de las cepas seleccionadas. Se representa el antagonismo con el signo (+), la ausencia de antagonismo con el signo (-) y duda de antagonismo (+/-) (Fuente: Elaboración Propia).

Cepas sembradas de forma masiva	Cepas sembradas en pozos								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>Bacillus subtilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	-
2. <i>Bacillus megaterium</i>	+		+	+	-	-	-	+	-
3. <i>Bacillus pumilus</i>	+	+		+	+	-	+	+	-
4. <i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+		+	+	+	+	-
5. <i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+	+		-	-	+/-	-
6. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+	-	-	+	+/-		-	-	+
7. <i>Bacillus marisflavi</i>	+	+/-	+	+	+/-	-		+/-	-
8. <i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	+	+	+	+	-	-	-		-
9. <i>Pseudomona mendocina</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

En la **Tabla 16**, se presenta la duda de antagonismo de los comportamientos observados en los siguientes casos de bacterias: a) 5 masiva – 8 en pozo; b) 6 masiva – 5 en pozo; c) 7 masiva – 2, 5 y 8 en pozo. Esto se debe a que no existe reciprocidad de respuesta, lo cual, podría estar indicando que cuando una de las bacterias estaba sembrada de forma masiva, ésta se encontraba en mayor proporción que la otra bacteria sembrada en pozos y que en realidad, el tipo de competencia que se esté produciendo sea debido a espacio. Esta situación, no afecta el desarrollo del consorcio microbiano, porque en la formulación se tienen iguales oportunidades de crecimiento, ya que, estarán siendo inoculadas en la misma proporción, por tanto, esto no deberá afectar su efectividad. No obstante, todos estos, son elementos que deberán seguirse investigando a futuro para el mejoramiento del producto. Este comportamiento se explica en la **Figura 32**.

En la **Figura 32**, se observa la tinción Gram realizada a los resultados de las pruebas de antagonismo, donde se refleja comportamientos como: (a) Ausencia de antagonismo o coexistencia entre ambas, **Figura 32 AI**: Cepa masiva 9 y cepa 2 en pozos y la **Figura 32 BI** Cepa masiva 5 y Cepa 7 en pozos, tinción Gram de la periferia del pozo mostrando presencia de ambas cepas (**Figura 32 AII y BII**) y la tinción Gram de las cepas individuales (**Figura 32 AIII-IV y BIII-IV**). (b) la presencia de halos de inhibición en la **Figura 32 DI** cepa masiva 7 - cepa 1 en pozos y **Figura 32 FI** cepa 1 masiva y cepa 6 en pozos, muestra la tinción Gram realizada al halo (**Figura 32 DII y FII**) y donde se demuestra la presencia de una sola bacteria como lo muestra la tinción Gram de las cepas individuales (**Figura 32 DIII-IV y FIII-IV**) evidencia presencia de antagonismo. (c) y la duda de antagonismo, (representada por +/-), en dependencia de la similitud de morfología que exista entre las especies en contacto, **Figura 32 CI** cepa masiva 7 y cepa 6 en pozos, donde se realizó tinción Gram en la periferia del pozo (**Figura 32 CII**) y se evidencia la coexistencia entre ellas (Gram de cepas individual **Figura 32 CIII-IV**). La **Figura 32 FI**: Cepa 1 masiva y Cepa 6 en pozos, muestra la ausencia de crecimiento de las cepas sembradas en pozos, se realizó tinción Gram en la periferia del pozo (**Figura 32 FII**) esto indicaba que existía un efecto antagónico (Gram de cepas individual **Figura 32 FIII-IV**). En el **Anexo 4** se muestra las tinciones de Gram realizadas al resto de pozos seleccionados.

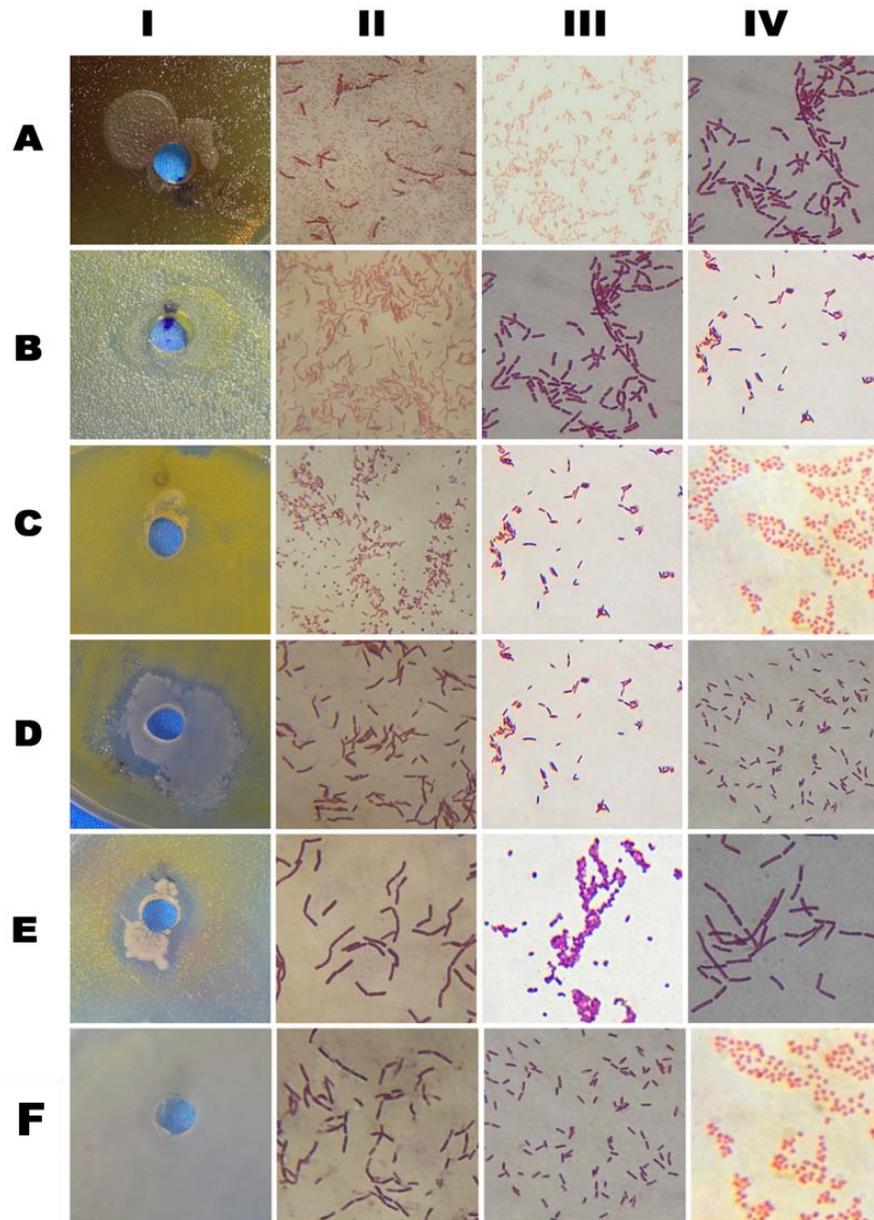


Figura 32. Tinciones de Gram realizadas para evidenciar los comportamientos observados en las pruebas de antagonismo. En la columna I se muestra la foto de los pozos, en la columna II tinción de Gram realizada a los pozos, columna III tinción de Gram de la Cepa sembrada en forma masiva y en la columna IV tinción de Gram de la cepa sembrada en pozos. AI-IV: Cepa masiva 9 y Cepa 2 en pozos (no hay antagonismo); BI-BIV: Cepa masiva 5 y Cepa 7 en pozos (no hay antagonismo); CI-CIV: Cepa masiva 7 y Cepa 6 en pozos (no hay antagonismo) DI-IV: Cepa masiva 7 y Cepa 1 en pozos (Hay antagonismo) y FI-IV: Cepa 1 masiva y Cepa 6 en pozos, presenta antagonismo.

En la **Figura 33** se exponen una parte de los resultados del antagonismo en placa en donde se evidencian los comportamientos.

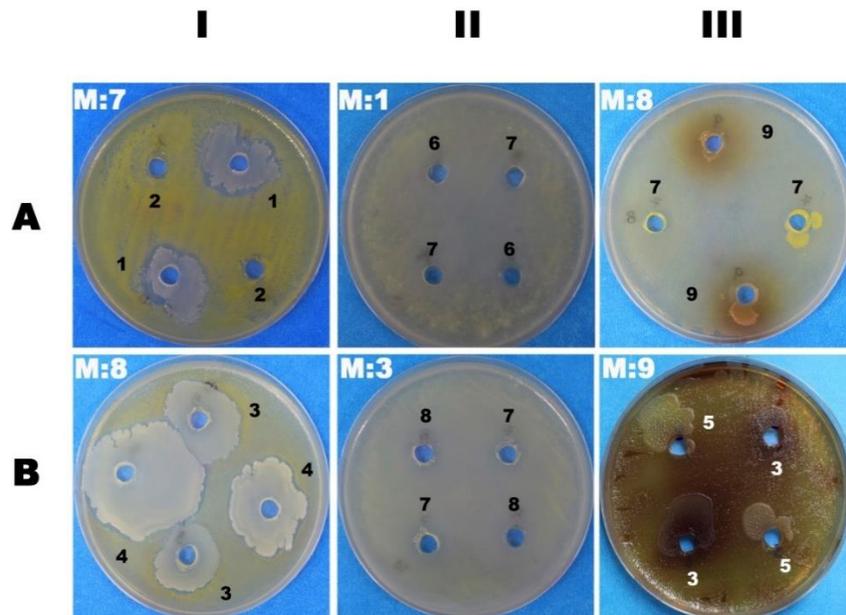


Figura 33. Comportamiento del efecto antagónico de las cepas sembradas en forma masiva y en pozo. **Al:** Cepa 1 en pozo crecimiento de halo de inhibición y cepa 2 en pozos sin crecimiento, ambas sobre cepa 7 sembrada masiva; **All:** Cepas 6 y 7 en pozos sin crecimiento sobre cepa 1 masiva); **AIII:** Cepa 7 y 9 en pozos creciendo sobre cepas 8 masiva; **Bl:** Cepa 3 y 4 en pozos crecimiento de halo de inhibición sobre cepa 8 masiva; **BII:** Cepa 7 y 8 en pozos sin crecimiento sobre cepa 3 masiva; **BIII:** Cepa 5 y 3 en pozos creciendo sobre cepa 9 masiva. Fuente: Elaboración propia

Otro de los resultados de las pruebas de antagonismo, fue que las bacterias confrontadas que presentaron mayor actividad antagónica con el resto de las bacterias seleccionadas fueron *Bacillus subtilis* (bacteria 1 y 4) y *Bacillus pumilus* (bacteria 3), estos resultados concuerdan con Stein (2005), debido a que *Bacillus subtilis* posee una reconocida actividad antimicrobiana, lo cual ha permitido emplearlo como un agente de control biológico y produce más de dos docenas de antibióticos, donde la clase predominante son los de naturaleza peptídica. También *Bacillus pumilus* ha sido reconocida como productora de componentes antimicrobianos que tienen una fuerte acción en contra de bacterias Gram positivas (Leifert, 1995).

Por el contrario, *Pseudomonas mendocina* (bacteria 9) fue la que no presentó antagonismo con ninguna de las bacterias confrontadas (**Figura 33 BIII**), además de poseer propiedades promotoras del crecimiento vegetal, ya que aumenta la biomasa (brotes – raíces) en lechuga, así como los niveles de P y Fe (Kohler *et al.*, 2006); razón por la cual, se seleccionaron las bacterias que mejor interactuaron con ella y aportaban otras propiedades de interés, siendo estas: *Bacillus megaterium* (bacteria 5) caracterizada por solubilizar fosfatos, producir ácido indolacético y fijar nitrógeno (Trivedy y Pandey, 2008; Ding *et al.*, 2005), *Bacillus marisflavi* (bacteria 7) tiene la propiedad de fijar nitrógeno (Ding *et al.*, 2005), *Exiguobacterium aurantiacum* (bacteria 8) produce ácido indol acético (Gómez *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos en esta investigación, con la formación de un consorcio con 4 bacterias, son similares a los reportados por Lara y Negrete (2015) quienes formaron tres tipos de consorcios combinando 2 y 3 bacterias, destacándose el consorcio formado por: *Pantoea sp* + *Pseudomona sp* a una concentración de 10^8 UFC/mL. Similar a lo reportado por Bobadilla & Rincón (2008), quienes formaron un consorcio fosfato solubilizador SMRS1 con 5 cepas, que pueden tratarse de *B. subtilis* y *B. megaterium* (no hicieron identificación molecular). En ambos casos en la prueba de antagonismo indicaron que no existe inhibición (no existe ningún tipo de antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas que impidan el libre desarrollo de los microorganismos) en el crecimiento de las cepas evaluadas, similar al comportamiento de las cuatro bacterias reportadas en este estudio para formar el consorcio. Por tanto, al no haber ningún tipo de inhibición, se puede elaborar inóculo mixto a partir de las cepas aisladas.

7.3 FORMULACIÓN DEL CONSORCIO MICROBIANO PARA UN BIOFERTILIZANTE Y ESTABILIDAD DE LAS CEPAS INDIVIDUALES

Finalizada la prueba de antagonismo y seleccionadas las 4 bacterias: *Bacillus megaterium*, *Bacillus marisflavi*, *Exiguobacterium aurantiacum* y *Pseudomona mendocina*, que formaron el consorcio se procedió a evaluar la cinética de crecimiento y su estabilidad lo cual indica su viabilidad a lo largo del tiempo.

7.3.1. Construcción de curva de crecimiento por método turbidimétrico

Es importante entender las diversas fases del comportamiento cinético de los microorganismos estudiados: Fase lag, exponencial, estacionaria y muerte. Ya que esto dará la pauta para conocer el tiempo óptimo para obtener mejores rendimientos del producto de interés. Los resultados a continuación describen el comportamiento de la cinética microbiana que presentan *Bacillus megaterium*, *Bacillus marisflavi*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Pseudomona mendocina*.

Villamil y Esguerra (2017) construyeron las curvas cinéticas de 3 cepas seleccionadas (*Exiguobacterium sp. I9*, *Enterococcus faecalis I15* y *Myroides odoratimimus I19*) de un total de 120 aislados, a través del método turbidimétrico. Se observó diferencia en la curva de crecimiento de los aislados estudiados; a las 24 horas el aislado I9 presentó el crecimiento más rápido en comparación con los aislados I15, I19. A partir de las 36 horas el crecimiento de I9 se estabilizó, seguido de I15, por su parte el de I19 se mantuvo muy bajo durante todo el tiempo de estudio. Todos los aislados iniciaron con una absorbancia de 0.05 y finalizaron para I9: 0,84; para I15:1,81 y para I19: 0,11; a las 72 horas de crecimiento.

Páramo (2012), realizó un ensayo de cinética de crecimiento microbiano a dos cepas de *Bacillus subtilis* (IS16 y IIS10). Como resultados obtuvo que la fase de adaptación fue cercana a las 6 horas, a partir de la cual entran en fase exponencial

permaneciendo así hasta 20 horas, entrando posteriormente en la fase estacionaria en la cual se detuvo el experimento. Las concentraciones obtenidas al final del experimento para la cepa IS16 fueron de $8.13E+08$ UFC/mL y la cepa IIS10 de $9.56E+08$ UFC/mL y una absorbancia final de 2.44 y 2.87 respectivamente.

Méndez-Úbeda *et al.* (2018), mostró el siguiente comportamiento cinético: la etapa de latencia (fase lag) de la bacteria *Bacillus subtilis*, se encontró en los primeros 75 minutos del experimento (1.25 h), durante ese tiempo la bacteria solo tuvo un incremento en absorbancia de 0.16; la etapa exponencial inicio a los 75 minutos y finalizó a los 285 minutos (de 1.25 hasta 4.75 h), observándose un mayor crecimiento bacteriano al aumentar la lectura de absorbancia de 0.16 a 2.95.

En este estudio, la etapa de latencia (fase lag) de las cuatro bacterias estudiadas, se encontró en los primeros 60 y 120 minutos del experimento (1 a 2 horas), durante ese tiempo las bacterias solo tuvieron un incremento en absorbancia (abs) de: Bac 5 = 0.19; Bac 7 = 0.06; Bac 8 = 0.083; Bac 9 = 0.087. La etapa exponencial inició en 1 – 2 h y finalizó de acuerdo a cada cepa: Bac 5 = 4.57h (abs: 1.7); Bac 7 = 5h (abs: 1.40); Bac 8 = 6.38h (abs: 1.19); Bac 9 = 6.36h (abs: 1.39), observándose un mayor crecimiento bacteriano al aumentar la lectura de absorbancia en promedio mayor a 1.2 (**Figura 34**); posteriormente la bacteria entra a la etapa estacionaria donde deja de crecer por agotamiento de nutrientes.

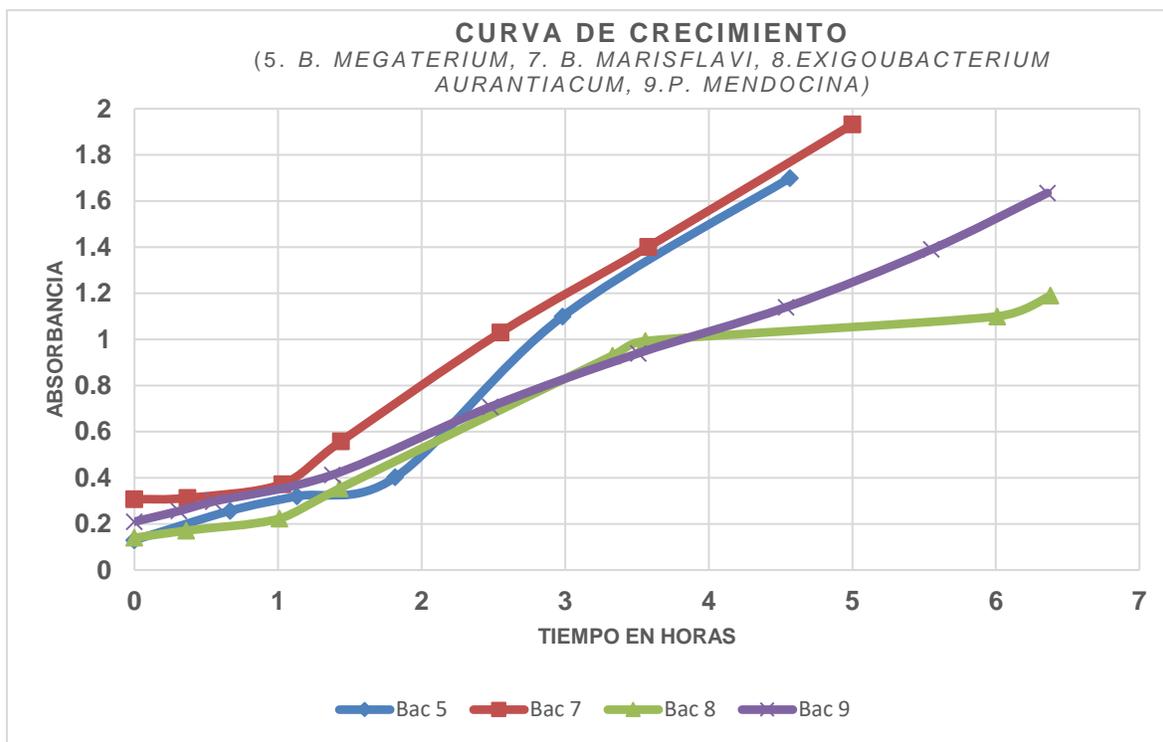


Figura 34. Curva de crecimiento bacteriano (Absorbancia Vs Tiempo) para Bac 5 - *Bacillus megaterium*, Bac 7 - *Bacillus marisflavi*, Bac 8 - *Exiguobacterium aurantiacum*, Bac 9 - *Pseudomona mendocina* (Fuente: Elaboración propia).

Con los resultados mostrados en la **Figura 34**, podemos notar que para la bacteria 5 (*Bacillus megaterium*) su fase de adaptación duró aproximadamente 2 horas y alcanzó su punto máximo de crecimiento a las 4.57 horas presentando una absorbancia de 1.7 equivalente a 1.70×10^9 UFC/mL. Contreras *et al.*, (2011) reportó que *Bacillus megaterium* alcanzó su punto máximo de crecimiento a las 24 horas con un conteo celular de 1.41×10^{10} UFC/mL, por otra parte, Vargas (2002) mostró que el crecimiento máximo de *B. megaterium* fue a las 28 horas con un valor de 42×10^{10} UFC/mL y una fase de adaptación de 4 horas. Comprando los resultados en este estudio se obtuvo el menor valor de UFC/mL, con respecto de los resultados reportados por Contreras *et al.*, (2011) y Vargas (2002), estas diferencias pueden deberse a las condiciones en las que se realizaron estos experimentos como: la utilización de medios con diferentes sustratos, diferencias de temperaturas y pH, suministro de diferentes caudales de aire y el método usado para el conteo celular.

Por otro lado, la bacteria 7 (*Bacillus marisflavi*), presentó una fase de latencia de 37 minutos y su punto de crecimiento máximo fue aproximadamente a las 5 horas presentando una absorbancia de 1.932 equivalente a 1.93×10^9 UFC/mL; a pesar que no se encontró literatura sobre la cinética de esta bacteria los resultados obtenidos se compararon con otras cepas del género *Bacillus*. Álvarez y Sánchez (2016), determinaron que existen especies como *Bacillus cereus* y *Bacillus Pumilus* que presentan una fase lag o de adaptación corta similar al comportamiento observado en *Bacillus marisflavi* que presentó una fase lag de 37 minutos y una fase exponencial que fue un tiempo no mayor de 5 horas.

La bacteria 8 (*Exiguobacterium aurantiacum*), tuvo una fase de adaptación de 36 minutos y su punto máximo de crecimiento se alcanzó hasta las 6.38 horas presentando una absorbancia de 1.19 equivalente a 1.19×10^9 UFC/mL, en cambio Orozco (2001) reportó que el crecimiento máximo fue a las 8 horas y no se observó la fase estacionaria en un lapso de 20 horas, para ésta misma bacteria. Puede que este comportamiento se deba a la variación de condiciones como la temperatura, ya que este es el factor más determinante del crecimiento bacteriano, dado que proporciona la energía necesaria para la transición del umbral de activación que es requerido en las diferentes reacciones posteriores a la fase de adaptación (Álvarez y Sánchez, 2016).

Por último, con la bacteria 9 (*Pseudomona mendocina*) presentó una fase de adaptación de aproximadamente 1 hora y alcanzó su punto máximo de crecimiento máximo a las 6.36 horas presentado una absorbancia de 1.635 equivalente a 1.64×10^9 UFC/mL. Acosta (2018), estableció la cinética de crecimiento de 2 especies de bacterias del género *Pseudomona*: *Pseudomona proteus* alcanzó el máximo crecimiento a las 6 horas aproximadamente mostrando una fase estacionaria muy inestable; mientras que *Pseudomona veronii* alcanzó su máximo crecimiento a las 10 horas aproximadamente.

De forma general, se puede decir que la **Figura 34**, muestra 3 de las 4 fases del crecimiento microbiano de las bacterias en estudio; las cuales, a partir de un inóculo inicial alto y en condiciones metabólicas ideales, la fase de adaptación se reduce a aproximadamente 1 a 2 h en los 4 casos, es bastante imperceptible, casi una recta, por lo que favorece el proceso de producción. Los valores obtenidos en esta investigación, son similares a los reportados por Villamil y Esguerra (2017), Méndez-Úbeda *et al.*, (2018) y Páramo (2012); los cuales obtuvieron absorbancias del mismo orden de las cepas evaluadas. La diferencia está el tiempo de crecimiento obtenido por Páramo (2012) y Villamil y Esguerra (2017), el cual, para obtener las concentraciones reportadas, las cepas bacterianas demoraron un periodo de crecimiento que va desde 20 a 72 horas respectivamente, mientras que en este estudio el periodo en fase exponencial fue de solo 4.57 y 6.36 horas, similares a las obtenidas por Méndez – Úbeda *et al.*, (2018) de 4.75. La diferencia en tiempo pudo deberse a: 1) tipo de microorganismo con los que se está trabajando; 2) las condiciones metabólicas en la que se encontraba la bacteria y 3) concentración del pre-inóculo, el cual fue superior 5 veces en esta investigación que el pre-inóculo utilizado por Villamil y Esguerra (2017) y Páramo (2012).

Con lo expuesto anteriormente, podemos decir que en esta investigación se presenta tiempos cortos de crecimiento de las bacterias, lo cual es favorable a la hora de producir, haciendo más eficiente los procesos y reduciendo costos de elaboración de productos a mayor escala.

✓ **Curva de concentración (UFC/mL)**

Páramo (2012), para la construcción de la curva de concentración consideró que según el índice de Mcfarland la absorbancia en un rango de 0.09-0.1 corresponde aproximadamente a 1×10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colonias). En este experimento, una vez registrados los valores de absorbancia, se usó esa relación para la construcción gráfica de la curva de concentración de biofertilizante UFC mL⁻¹ vs Tiempo (min) como se presenta en la **Figura 35**.

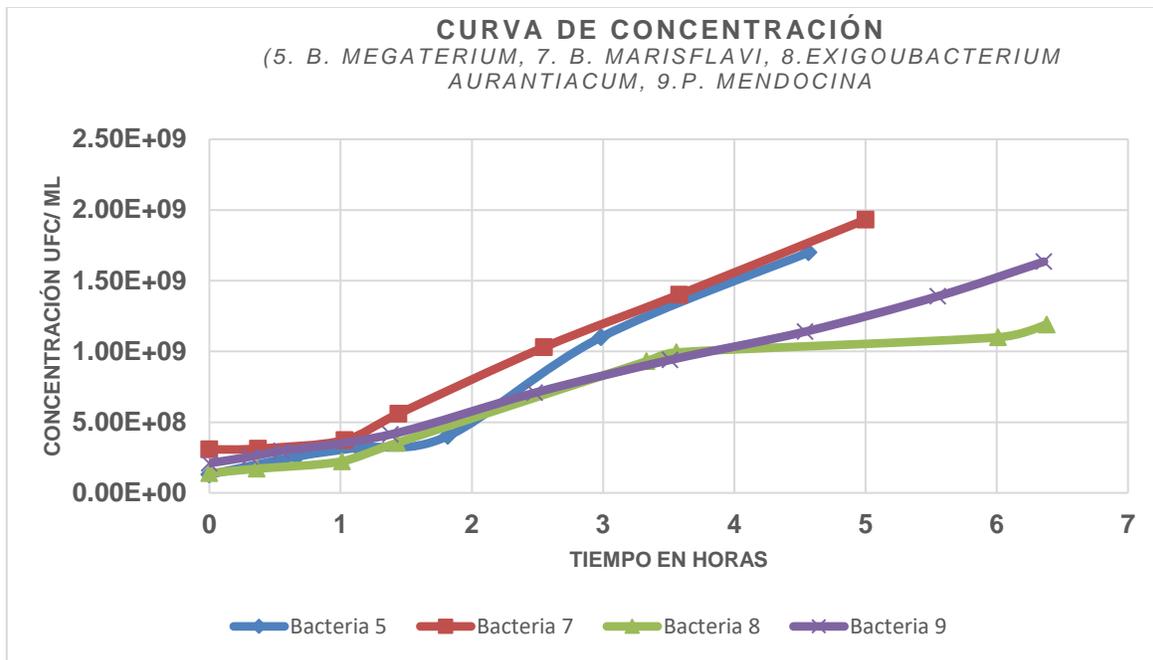


Figura 35. Curva de Concentración UFC/ mL vs Tiempo (h) para Bac 5 - *Bacillus megaterium*, Bac 7 - *Bacillus marisflavi*, Bac 8 - *Exiguobacterium aurantiacum*, Bac 9 - *Pseudomona mendocina* (Fuente: Elaboración propia).

- ✓ **Concentración del biofertilizante a base de *Bacillus megaterium*, *Bacillus marisflavi*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Pseudomona mendocina*, aplicado en los tratamientos**

Lara y Negrete (2015) formaron 3 consorcios microbianos por su capacidad de solubilizar fosfatos, probando 3 combinaciones posibles en las concentraciones, destacándose el consorcio formado por *Pantoea sp.* + *Pseudomona sp.* a una concentración de 10^8 UFC/mL, dicha concentración también ha sido reportada por Sotelo *et al.*, (2012), Angulo-Castro *et al.*, (2017), Aguirre-Medina y Espinosa (2016). En este estudio, previo a la aplicación de los tratamientos cada cepa se sometió individualmente a crecimiento en caldo de cultivo, similar a lo reportado en Sotelo *et al.*, (2012). Las concentraciones del biofertilizantes aplicado en el ensayo en macrotúnel, fueron determinadas a través de los valores de absorbancia medidos al final del tiempo de máximo crecimiento de cada bacteria (de 4 a 6 h), determinado en la cinética. En la **Tabla 17** se muestra la concentración UFC mL⁻¹ vs Absorbancia, la cual fue determinada en el ensayo de cinética de crecimiento microbiano en Laboratorio.

Tabla 17. Concentración de biofertilizante mostrando la Absorbancia - UFC/mL para cada una de las bacterias que forman el consorcio (Fuente: Elaboración propia).

Bacteria 5		Bacteria 7		Bacteria 8		Bacteria 9	
Abs.	UFC/mL	Abs.	UFC/mL	Abs.	UFC/mL	Abs.	UFC/mL
0.13	1.30E+8	0.307	3.07E+8	0.14	1.40E+8	0.21	2.1E+8
0.257	2.57E+8	0.313	3.13E+8	0.171	1.71E+8	0.256	2.56E+8
0.32	3.20E+8	0.373	3.73E+8	0.223	2.23E+8	0.297	2.97E+8
0.402	4.02E+8	0.559	5.59E+8	0.354	3.54E+8	0.413	4.13E+8
1.1	1.10E+9	1.03	1.03E+9	0.93	9.30E+8	0.708	7.08E+8
1.7	1.70E+9	1.402	1.40E+9	0.993	9.93E+8	0.94	9.40E+8
				1.1	1.10E+9	1.14	1.14E+9
				1.19	1.19E+9	1.39	1.39E+9

Para los tratamientos que se contemplaron en la aplicación del biofertilizante, las semillas a utilizar fueron roseadas al momento de la siembra con 5mL de una solución del biofertilizante que contenía una concentración ajustada de 1.26×10^8 UFC mL⁻¹ de las bacterias *Bacillus megaterium*, *Bacillus marisflavi*, *Exiguobacterium aurantiacum* y *Pseudomona mendocina*; posteriormente se realizaron aplicaciones al sustrato en el momento de la siembra, a los 30 y 60 después de siembra (según el cultivo).

7.3.2. Pruebas de estabilidad por viabilidad celular del biofertilizante

La estabilidad de los productos depende, por una parte, de factores ambientales, tales como la temperatura, humedad y la luz ambiente, y, por otra parte, de factores relacionados con la cinética propia del microorganismo, disponibilidad de nutrientes, entre otros.

Camelo (2010), evaluó durante 105 días a tres temperaturas 4°C, 20°C y 32°C la viabilidad de la cepa AC1 (*Azotobacter chroococcum*), en donde se observó que la concentración bacteriana nunca estuvo por debajo del orden de 10^8 UFC/mL, en las tres temperaturas de almacenamiento. También determinó que en condiciones de refrigeración (4°C) la concentración final obtenida estuvo alrededor de 1×10^9 UFC/mL, siendo esta la mejor temperatura para el almacenamiento.

En este estudio se realizaron pruebas de estabilidad con el objetivo de verificar la viabilidad en el tiempo de cada una de las bacterias que conforman el consorcio

biofertilizante. Para realizar las pruebas se llevó a cabo la producción de cada bacteria seleccionada hasta asegurar que estaban en la fase de crecimiento exponencial. Los valores iniciales para las pruebas de estabilidad fueron: para Bac 5 = 2.51×10^6 UFC/mL; Bac 7 = 1.03×10^6 UFC/mL; Bac 8 = 3.95×10^6 UFC/mL; Bac 9 = 5.05×10^8 UFC/mL. En la **Figura 36** se muestran los resultados de la cuantificación de viabilidad de cada bacteria.

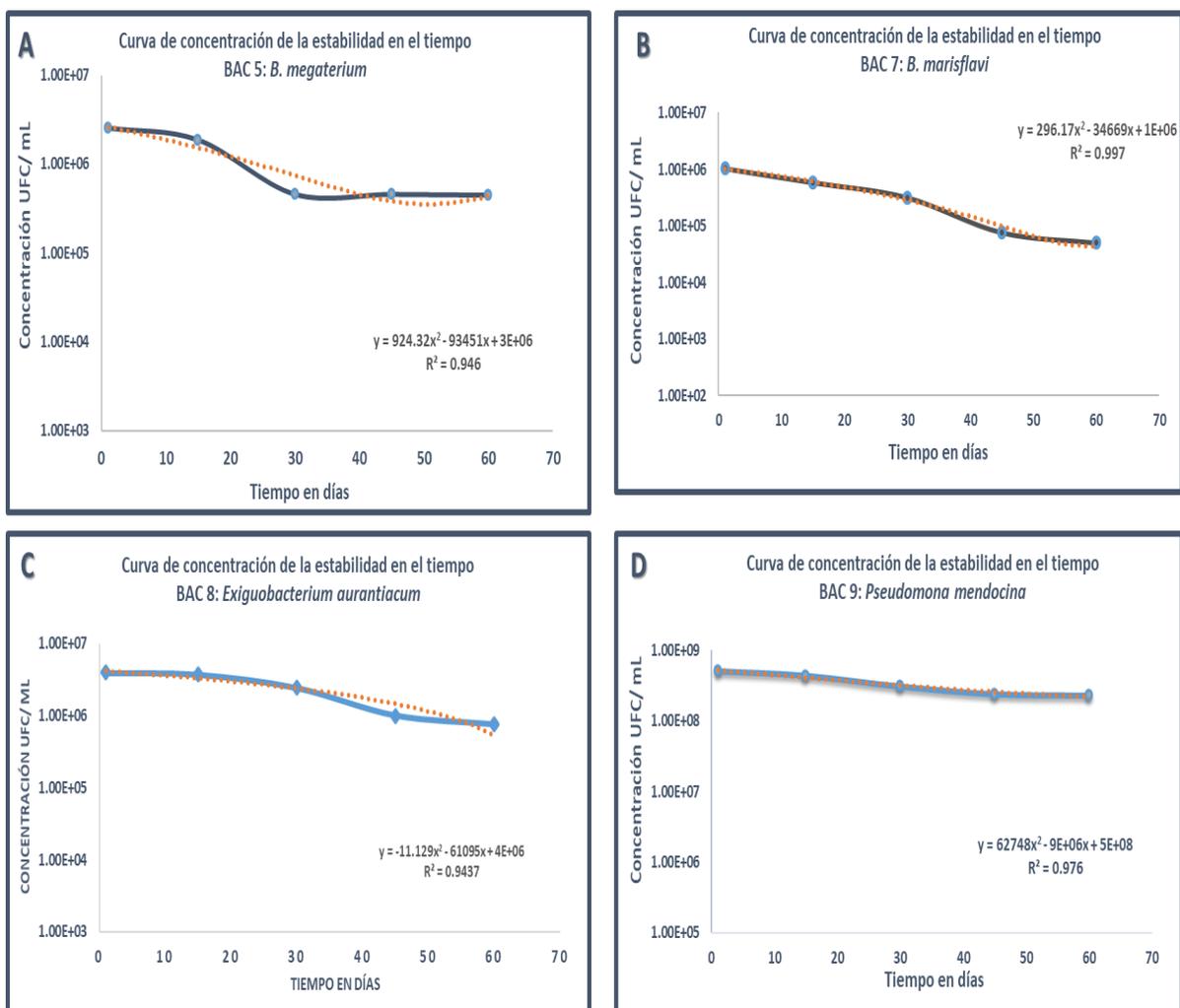


Figura 36. Curva de UFC para la prueba de estabilidad en el tiempo de cada bacteria. **A:** Concentración - Tiempo para *Bacillus megaterium*; **B:** Concentración - Tiempo para *Bacillus marisflavi*; **C:** Concentración - Tiempo para *Exiguobacterium aurantiacum*; **D:** Concentración - Tiempo para *Pseudomona mendocina* (Fuente: Elaboración propia).

González (2017), determinó la viabilidad de la cepa D7 (*Azospirillum sp.*) en medios líquidos y sólidos durante 4 semanas a tres temperaturas 4°C, 25°C y 60°C, en el cual, el medio líquido presentó una disminución de la UFC/mL a las tres temperaturas evaluadas al finalizar el tiempo de almacenamiento y que la

temperatura que mantuvo más estable las poblaciones en el tiempo fue la de 4°C. De igual forma Rojas *et al.*, (2009), estudió la estabilidad de la cepa C50 (*Rhizobium sp.*) en medio de cultivo tradicional y alterno, determinando las UFC a los 15 y 30 días de almacenamiento en refrigeración, observando que las UFC se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo establecido.

En la **Figura 36**, se refleja el comportamiento de la estabilidad de las bacterias evaluadas en un tiempo de 60 días (2 meses), las bacterias: 5 (*Bacillus megaterium*), 7 (*Bacillus marisflavi*), 8 (*Exiguobacterium aurantiacum*) y 9 (*Pseudomonas mendocina*), fue posible observar que la concentración en UFC/mL de la bacteria 5 disminuyó de un orden de 10^6 a 10^5 , lo que representa un 17%, mientras que las bacterias 7 disminuyó de 10^6 a 10^4 lo que representa un 33%, la bacteria 8 de 10^6 a 10^5 lo que representa un 17% y la 9 se mantuvo prácticamente constantes (con una disminución del 4%). Estos resultados son similares con los descritos por Camelo (2010) y Rojas *et al.* (2009) quienes reportaron a temperaturas de refrigeración de 4°C que las UFC/mL tuvieron poca variabilidad a lo largo del tiempo de evaluación. Esto se pudo deber a que el medio de cultivo utilizado presenta una alta variedad de nutrientes (Páramo, 2012), sumado a esto, la baja temperatura provoca un frenado parcial de la actividad celular, por lo tanto, el efecto conjunto puede provocar el mantenimiento de las bacterias por un periodo prolongado de tiempo (Rojas *et al.*, 2009).

Así mismo, se puede decir que la eficacia del producto, según la normativa de varios países, se define con el número de células viables que contiene. Por ejemplo, en Australia se requieren 10^5 rizobias por semilla (Bashan, 1998), mientras que en Tailandia se requieren de 10^5 a 10^6 rizobias por semilla (Herridge, 2008). En E.E.U.U. y Latinoamérica, entre otros países, no existe legislación al respecto (Hungria *et al.*, 2005).

El resultado de este trabajo en la estabilidad de las bacterias es promisorio, debido a que muestra que las cepas sobrevivieron y que conservaban células viables en concentración del orden de 10^4 a 10^8 UFC/ mL, que están en el rango de las normas establecidas para algunos países. Sin embargo, es necesario continuar con la evaluación por un mayor tiempo, para determinar el período real de la supervivencia de las cepas, manteniendo temperaturas de 4°C, pero iniciando con concentraciones de UFC/ mL del mayor rango posible que permita apreciar de forma más contundente el comportamiento en el tiempo de cada cepa, lo cual serviría para fijar tiempos de almacenamiento, distribución y usos del producto final.

7.4 PRUEBAS DEL CONSORCIO BIOFERTILIZANTE EN MACROTÚNEL SOBRE CULTIVOS DE INTERÉS AGRÍCOLA.

Es importante iniciar la presentación de los resultados de este acápite de la investigación exponiendo que la dinámica de las poblaciones de la rizosfera es un aspecto muy complejo que involucra numerosos factores que actuando en conjunto benefician el desarrollo de ciertas poblaciones microbianas, también cumplen un papel importante las características de las plantas y las sustancias o exudados producidos por las raíces que sirven como fuente energética y pueden llegar a inducir incluso cambios de pH, disponibilidad de sustratos, nutrientes y factores de crecimiento microbiano en la rizosfera moldeando de esta manera su dinámica poblacional (Calvo y Zúñiga, 2008).

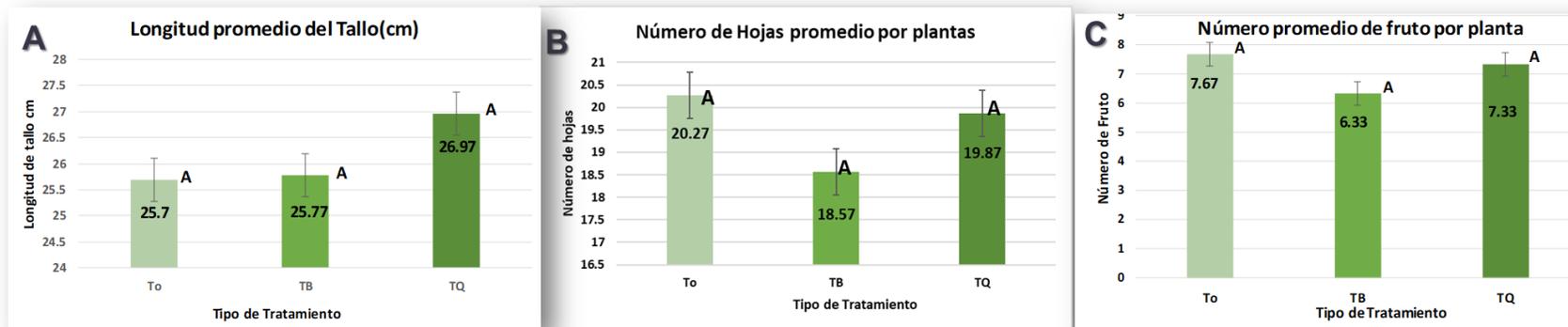
7.4.1 Efecto del Consorcio Biofertilizante en Chiltoma (*Capsicum annum L*)

De acuerdo con los parámetros evaluados en el presente estudio, en condiciones de macrotúnel para el cultivo de Chiltoma, al realizar el análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey a variables de tanto en el desarrollo vegetativo del cultivo (altura de tallo, número de hojas y número de fruto) y variables de cosecha (peso del fruto y longitud del fruto), a nivel estadístico los tres tratamientos no muestran diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$) como lo muestran las gráficas de la **Figura 37**, la única variable que presentó diferencias estadística fue el diámetro del fruto, donde el TB y TQ, son mayores que el testigo To, reflejado en la **Figura 37-F**.

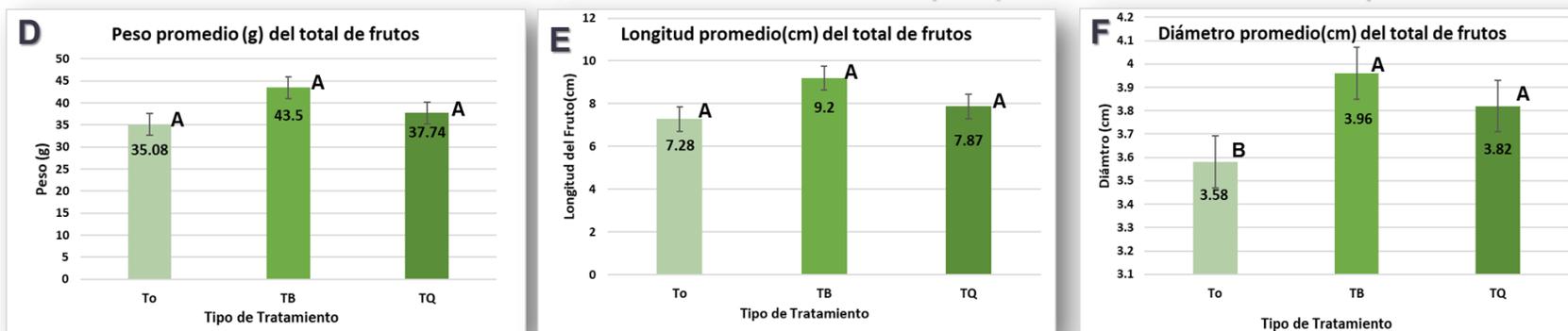
Es importante destacar que, en las observaciones realizadas en campo para la chiltoma con el TB, se pudo registrar una floración temprana con una diferencia de 7 días con respecto a los otros dos tratamientos (TQ y To), además de diferencias apreciables en la coloración de hojas transcurridos 30 días después de la primera cosecha, las plantas tratadas TQ y To estaban amarillentas y presentaban marchitez, en relación a las tratadas con el TB. Otro punto a señalar, es que, al hacer el análisis del suelo, el sustrato utilizado cubre la demanda de nutrientes del cultivo, requiriéndose únicamente 0.96 g N por planta.

Los resultados de chiltoma de éste estudio para las variables del peso del fruto y longitud promedio del fruto, son similares a los encontrados por Aguirre-Medina y Espinosa, (2016) quienes presentan que la coinoculación de *R. intraradices* + *P. fluorescens* y la inoculación individual de *A. brasilense* indujeron frutos más grandes. Se ha demostrado que *Pseudomonas* en la rizosfera aumenta la biomasa y la productividad en los cultivos (Sood, 2003), como en el caso de chile habanero (Reyes *et al.*, 2014).

I Variables de desarrollo en Chiltoma (*Capsicum annum L*)



II Variables de cosecha en Chiltoma (*Capsicum annum L*)



Medidas con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Figura 37. Variables de desarrollo y cosecha en cultivo de Chiltoma (*Capsicum annum L.*) en macrotúnel. IA - Longitud promedio del tallo. IB - Número de hojas promedio por planta. IC – Número promedio del fruto por planta. IID – Peso promedio del fruto. IIE– Longitud promedio del fruto. IIF– Diámetro promedio del fruto (Fuente: Elaboración propia).

En el caso de los valores de peso, longitud y diámetro de la chiltoma, podemos decir que se ven favorecidos debido a microorganismos como los solubilizadores de fósforo y fijadores de nitrógeno utilizados en este ensayo (*Bacillus megaterium*, *Bacillus marisflavi*), favorecen la disponibilidad de nutrientes y fitohormonas por parte de la planta demostrando mejores resultados en los parámetros agronómicos medidos (Vestberg *et al.*, 2004). Otro género de bacteria contenidas en el consorcio biofertilizante *Pseudomona mendocina*, ésta incrementa la absorción de nutrimentos, como Fe y P, además de producir fitohormonas en la rizosfera, lo cual promueve mayor crecimiento de las plantas.

En los parámetros foliares evaluados en este trabajo, se observa que el número de hojas por plantas fue mayor en el testigo en los valores promedios absolutos (To=20.27 hojas/planta), los resultados son similares a los encontrados por Angulo-Castro *et al.*, (2017) quienes muestran, en las plantas del cultivar 1, con todas las bacterias ensayadas se obtuvo un mayor número de hojas que en el testigo. En lo que respecta a los tratamientos con HMA, que en cultivar 1 los 3 inóculos micorrízico, H1, H2 y H3, se asociaron a un mayor número de hojas que en el testigo. Similar a lo reportado por Aguirre-Medina, y Espinosa (2016) encontraron que el número de hojas fue similar entre los tratamientos, incluyendo al testigo, y la menor cantidad de hojas se presentó con la inoculación de los tres microorganismos, como sucedió en esta investigación, donde el número de hojas es el valor más bajo en el TB.

Para los valores de longitud de la planta, los resultados obtenidos en este estudio difieren a los presentados por Lara y Negrete (2015), quienes en el tratamiento T2 (consorcio) mostró un valor más alto que el testigo (T1) lo cual puede ser debido a la disponibilidad del fósforo proporcionado por el consorcio teniendo en cuenta que éste nutriente es esencial para el desarrollo y crecimiento de las plantas (Coyne, 2000); también es posible que las cepas puedan producir fitohormonas de crecimiento vegetal favoreciendo el crecimiento de la planta puesto que dentro de los géneros bacterianos que han sido reportados como productores de AIA, se encuentra *Pseudomona sp.* (Ahmad *et al.*, 2008). Los datos obtenidos están en concordancia con las investigaciones realizadas por Rajkumar *et al.*, (2006) quienes reportan incremento en la longitud de las plantas de mostaza inoculadas con *Pseudomona sp* y *Bacillus sp* en comparación con las plantas no inoculadas.

Los resultados reflejan la relevancia que tiene el consorcio microbiano desarrollado en los rendimientos de plántulas de interés hortícola como el chiltoma, pues permitirían reducir la demanda de insumos agrícolas, especialmente fertilizantes químicos, llegando incluso hasta poder sustituirla a un mediano plazo. Así mismo, se demostró que la concentración de 10^8 UFC/mL, del consorcio fue adecuada. Es importante continuar con ensayos en chiltoma, de tal forma que pueda evaluarse el

consorcio formulado a nivel de campo en el **Anexo 5**, apartado 5.1, se presenta fotografías que muestran las diversas fases del cultivo de *Chiltoma* en macrotúnel.

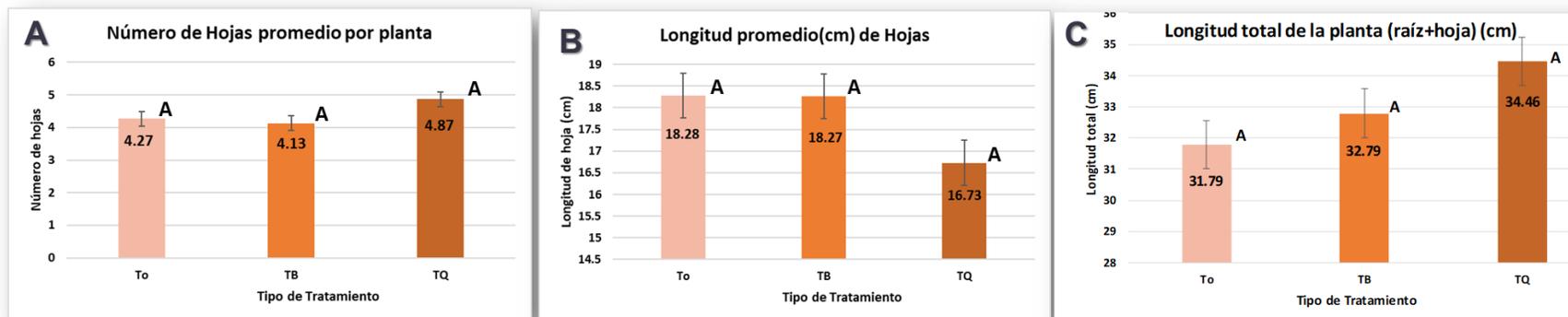
7.4.2 Efecto del Consorcio Biofertilizante en Rábano (*Raphanus sativus L.*)

De los resultados obtenidos en este estudio con los parámetros evaluados, en condiciones de macrotúnel para el cultivo de rábano. Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey a variables tanto en el desarrollo vegetativo del cultivo (número de hojas, longitud de hoja y longitud de la planta) y variables de cosecha (peso de la raíz tuberosa, longitud de la raíz tuberosa y diámetro ecuatorial), a nivel estadístico los tres tratamientos no muestran diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$) como lo muestran las gráficas de la **Figura 38**, la única variable que presentó diferencias estadísticas fue el peso promedio de la raíz tuberosa, donde el TQ y To, son mayores que el tratamiento biológico TB, reflejado en la **Figura 38-D**. Resulta de interés, analizar que con TB la longitud promedio de la raíz tuberosa es mayor que en las otras variantes, en valores absolutos, y esto podría deberse a un aceleramiento del ciclo de producción u otros factores que benefician el proceso productivo del rábano, **Anexo 5**, apartado 5.3 se presenta fotografías que muestran las diversas fases del cultivo del rábano en macrotúnel.

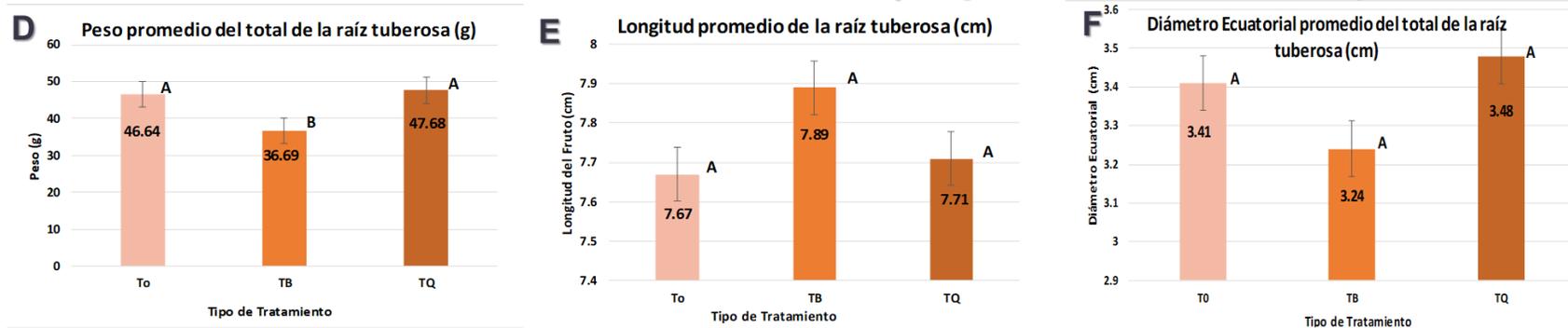
Los resultados obtenidos en esta investigación en la variable de longitud total del rábano, donde el tratamiento químico tiene mayor valor TQ = 34.46cm, concuerda con lo reportado por Sotelo *et al.* (2012) y Lara *et al.* (2010), quienes reportan mayor incremento promedio del crecimiento de plántulas de rábano corresponde al tratamiento de fertilización química, siendo este considerado referencia en cuanto al incremento promedio de las plántulas debido a que el tratamiento de suelos con fertilizantes químicos aumenta la disponibilidad inmediata de los macronutrientes necesarios para el crecimiento de la planta (López *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos en la variable del promedio de número de hojas obtenido en este estudio, donde la fertilización química -TQ (4.8) y testigo -To (4.27) son mayores que el biológico -TB (4.13), concuerdan con lo reportado en Sotelo *et al.*, (2012), quienes inocularon cepas de *Azotobacter sp.*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis* en un cultivo de rábano y observaron que el incremento en el promedio de número de hojas para los tratamientos testigos y con fertilizante sintético, fue mayor que los tratamientos con inóculos bacterianos. Por otro lado, difiere con lo presentado por Lara *et al.*, (2013) quienes evaluaron la actividad solubilizadora de fosfato de algunas bacterias nativas (*Enterobacter sp.* y *Klebsiella sp.*) sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano, quienes reportan que no hubo diferencias entre el tratamiento con fertilización química e inoculantes bacterianos.

I Variables de desarrollo en Rábano (*Raphanus sativus* L.)



II Variables de cosecha en Rábano (*Raphanus sativus* L.)



Medidas con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Figura 38. Variables de desarrollo y cosecha en cultivo de Rábano (*Raphanus sativus* L.) en macrotúnel. IA - Número de hojas promedio por planta. IB - Longitud promedio de hojas. IC – Longitud total de la planta (raíz+hoja). IID– Peso promedio del total de la raíz tuberosa. IIE – Longitud promedio de la raíz tuberosa. IIF – Diámetro ecuatorial promedio del total de la raíz tuberosa (Fuente: Elaboración Propia).

Los resultados mostrados en rábano, pueden deberse a que las cepas no son nativas de la rizosfera de ésta planta, lo que podría afectar su habilidad para colonizar eficientemente la rizosfera del rábano. Autores, como Kaur y Reddy (2014), han encontrado efectos significativos de diferentes inóculos de consorcios comparados con el suelo sin inocular, hasta el tercer ciclo de cultivo en un sistema orgánico de rotación maíz-trigo, en el mismo suelo. Castro-Sowinski *et al.*, (2007) identificaron muchos factores que pueden afectar la efectividad de las RPCV inoculadas, entre los más destacados se encuentran la competencia con los microorganismos nativos, características físicas y químicas del suelo, genotipo y edad de la planta a inocular, tipo de exudados radicales y manejo agrícola.

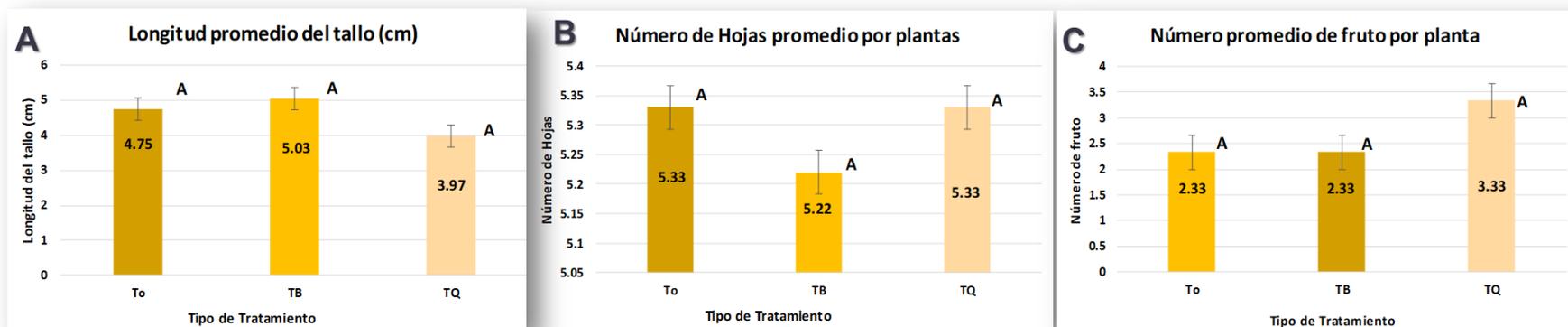
En general el uso del consorcio microbiano probado en este estudio, presentó buenos resultados para el cultivo del rábano, en cuanto a su posible utilización en procesos combinados de fertilización. Se recomienda que para futuros estudios se analice un mecanismo de adaptación del consorcio más adecuado a cultivos de ciclo corto como el rábano, orientado a la inoculación del sustrato con anterioridad. Tomando en cuenta que entre las plantas y las bacterias existe también un lenguaje dinámico y complejo para su colonización, como su capacidad de utilizar los exudados radicales como fuentes de carbono y su habilidad para interactuar y colaborar con otros microorganismos en la rizosfera (Holguín, 2008).

7.4.3 Efecto del Consorcio Biofertilizante en Pepino (*Cucumis sativus*)

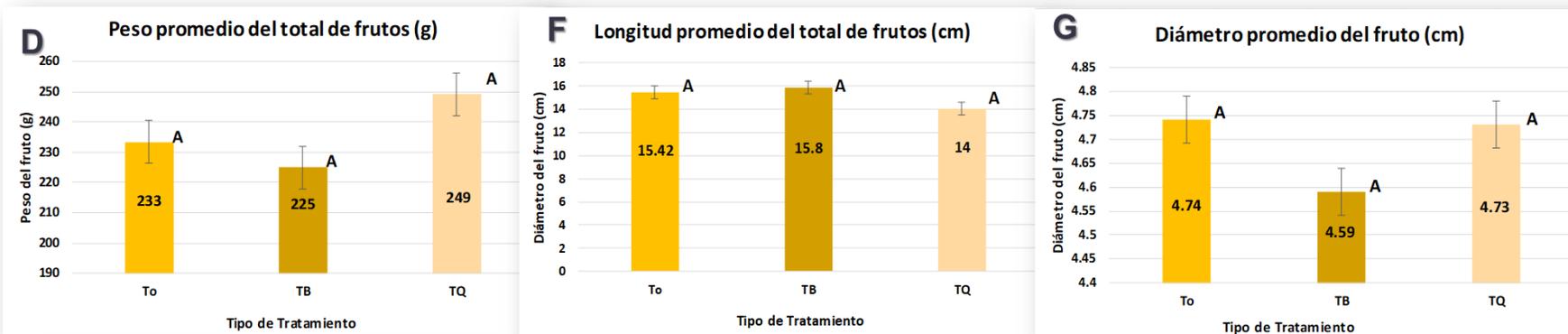
Para este estudio, los parámetros que se evaluaron en condiciones de macrotúnel para el cultivo de Pepino, se aprecia que al realizar el análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey a variables de desarrollo vegetativo del cultivo (longitud del tallo, número de hojas y número promedio de frutos) y variables de cosecha (peso promedio del fruto, longitud del fruto y diámetro del fruto), a nivel estadístico los tres tratamientos no muestran diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$) como lo muestran las gráficas de la **Figura 39**.

Es importante destacar, que, en el caso del pepino en macrotúnel, la planta sufrió de un estrés térmico, debido a que, en los meses de prueba comprendidos entre marzo a mayo 2019, se registraron temperaturas dentro del macrotúnel de hasta 42 °C, lo que impidió a la planta desarrollarse de la forma esperada. En el caso del tratamiento biológico se pudo observar mejor coloración en las hojas incluso en la fase de muerte de las plantas, así como plantas más vigorosas. En general los resultados muestran que la riqueza del suelo utilizado, es tal, que no se nota diferencia significativa para ninguna de las variantes utilizadas, por lo que, en un futuro, se deberá considerar el efecto del suelo a utilizar y el factor climático que afecta el desarrollo del cultivo del pepino.

I Variables de desarrollo en Pepino (*Cucumis sativus*)



II Variables de cosecha en Pepino (*Cucumis sativus*)



Medidas con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Figura 39. Variables de desarrollo y cosecha en cultivo de Pepino (*Cucumis sativus*) en macrotúnel. IA - Longitud promedio del tallo. IB - Número de hojas promedio por planta. IC - Número promedio del fruto por planta. IID - Peso promedio del fruto. IIE - Longitud promedio del fruto. IIF - Diámetro promedio del fruto (Fuente: Elaboración Propia).

Los datos obtenidos en esta investigación en longitud promedio del tallo, donde el mayor valor se da en el tratamiento biológico, son similares a los reportados por Vásquez-Santiago *et al.*, (2014) y Pérez (2012), quienes reportan que la longitud del tallo de las plantas de pepino mostró mejores resultados con biofertilizantes comparado con los otros tratamientos. Terry-Alfonso y Leyva-Galán (2006) reportaron resultados similares en plantas de tomate biofertilizadas con *Azospirillum brasilense* + *Glomus clarum*. Estos efectos promotores del crecimiento en las plantas pueden ser atribuidos a que las bacterias tienen capacidad de fijar N; producir fitohormonas y sideróforos; solubilizar P y sintetizar enzimas benéficas para las plantas (Mohammadi y Sohrabi, 2012).

En este trabajo, los resultados sugieren que la inoculación en pepino con el consorcio formulado, es una alternativa para obtener plántulas que soporten el estrés provocado por las condiciones ambientales, principalmente temperaturas altas, que fueron las que afectaron el cultivo en este experimento. Así mismo, podemos decir que las concentraciones utilizadas del consorcio fueron adecuadas, pero es necesario repetir el experimento a campo abierto y en una zona más fresca, donde las plantas se sometan a menor estrés y podamos evaluar las respuestas de este experimento en condiciones más favorables para el cultivo **Anexo 5**, apartado 5.2 se presenta fotografías que muestran las diversas fases del cultivo del pepino en macrotúnel.

De manera general podemos decir que la respuesta del consorcio microbiano depende de varios factores, en especial del sustrato utilizado, en variables como: materia orgánica, temperatura, humedad, aireación y estado nutricional de los suelos. Por lo tanto, estos resultados deben evaluarse mediante la realización de ensayos de campo en condiciones variables de fertilidad del suelo con diferentes fuentes y tasas de fertilizantes de N, P y K, en combinación con el consorcio. El biopreparado a partir de las cepas estudiadas, puede llegar a tener mucha utilidad si se inoculan en los cultivos de la región. Podrán aumentar la población microbiana de la rizosfera y contribuir al sistema nutricional de las plantas. A su vez, el consorcio biofertilizante puede ser una alternativa al uso de fertilizantes químicos, a la vez convertirse en un componente vital en los sistemas agrícolas sustentables, ya que constituyen un medio económico y pueden, en corto tiempo, ser un sustituto o complemento de los fertilizantes tradicionales en los cultivos de interés, por sus propiedades para solubilizar fósforo, fijar nitrógeno y enriquecer los suelos deficientes de macronutriente.

VIII. CONCLUSIONES

La realización del presente trabajo y el análisis de los resultados alcanzados, permiten plantear las siguientes conclusiones considerando los objetivos que se expusieron al inicio del mismo:

- ✓ Al analizar el contenido microbiano de bioinsumos comerciales fabricados en Nicaragua, se obtuvieron 30 aislados diferentes de colonias de microorganismos. Por su identidad morfológica al microscopio, se caracterizaron 22 bacterias de forma bacilar (15 Gram positivas y 7 Gram negativas) y 1 de forma cocal Gram positiva. Al mismo tiempo, se obtuvieron 6 hongos filamentosos y 1 hongo levaduriforme.
- ✓ Se logró la identificación molecular del 93% (28 de 30) microorganismos aislados (23 bacterias: 12 especies, 11 géneros; 5 hongos filamentosos: 4 especie y 1 género). Encontrándose en los Bioisumos zona norte: **muestra TS:** 5 bacterias (*Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, 2 *Bacillus sp.* y *Stenotrophomonas sp.*) y 3 hongos filamentosos (*Monascus pupureus*, *Neosartorya glabra* y *Aspergillus flavus* – reportado como patógeno para cultivos); **muestra LS:** 6 bacterias (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, 2 *Stenotrophomonas sp.* y *Paenibacillus sp.*); **muestra LL:** 3 bacterias (*Bacillus Megaterium*, *Staphylococcus succinus* y *Bacillus sp.*) y 2 hongos filamentosos (*Byssochlamys nívea* – reportado como contaminante en fruta procesada y uno no secuenciado). Zona de occidente, **muestra DCL:** 9 bacterias (2 *Lysinibacillus macroides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus flexus*, *Bacillus cereus* – patógeno para ser humano, *Agrobacterium tumefaciens*, 2 *Bacillus sp.* y una *Stenotrophomonas sp.*) y 1 hongo levaduriforme – no secuenciado.
- ✓ Se determinó que el 75% de los bioinsumos contienen al menos una cepa contaminante y solo un 25% no contienen patógenos. Podemos decir que, los bioinsumos artesanales estudiados presentaban microorganismos promotores de crecimiento y fijadores de nutrientes, no obstante, estas propiedades benéficas no se presentan en todos los bioinsumos por igual, además, no es posible preservarlas en el tiempo y en cada lote de producción. Finalmente, al no poder, los bioinsumos artesanales garantizar un mismo tipo y mucho menos una misma cantidad de células por microorganismo, cada ciclo de producción podría estar aportando al suelo patógenos, tanto para los cultivos como para el ser humano, con los correspondientes daños a la salud y al rendimiento de las cosechas.
- ✓ Las pruebas de antagonismo se realizaron entre 9 bacterias promisorias, escogidas de la revisión de las aplicaciones biotecnológicas de cepas en estudio, seleccionándose como resultados de las pruebas de antagonismo, 4 bacterias, las cuales formaron el consorcio propuesto: *Bacillus megaterium*, *Bacillus marisflavi*, *Exiguobacterium aurantiacum* y *Pseudomona mendocina*.

Además, en estas pruebas se evidenció que *B. subtilis* es antagonista de todas las bacterias con las que fue confrontada.

- ✓ El consorcio biofertilizante formado por las cepas bacterianas seleccionadas, presenta características propias de cada microorganismo, *Bacillus megaterium* aporta propiedades importantes como promotor de crecimiento vegetal (PGPR), solubilización de fosfato, fijador de nitrógeno y productor de ácido indolacético (AIA); *Bacillus marisflavi* la capacidad de fijar nitrógeno; *Exiguobacterium aurantiacum* es productor de ácido indolacético (AIA); *Pseudomonas mendocina* como movilizador de nutrientes (solubiliza Fe y P) y estimula la biomasa.
- ✓ La formulación del consorcio para un biofertilizante con las cepas seleccionadas, demostraron tener una cinética de crecimiento acelerado en laboratorio, alcanzando concentraciones máximas en un periodo que oscila entre 4.57 y 6.36 horas. La alta velocidad de crecimiento de las bacterias del consorcio, permite hacer más eficientes los procesos, reduciendo los tiempos para la producción de metabolitos secundarios con propiedades fertilizantes y finalmente, colonizar el ambiente donde se inocula, para promover el crecimiento de la planta.
- ✓ Al realizar las pruebas de estabilidad de las bacterias, se ha demostrado que, para un período de 2 meses, a una temperatura de 4°C, las cepas sobrevivieron y que conservaban valores de concentración del orden de 10^5 a 10^8 UFC/mL.
- ✓ Al evaluar el efecto del consorcio microbiano biofertilizante sobre cultivos de interés agrícola (chiltoma, rábano y pepino) en macrotúnel se observó que al realizar el análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey a variables de tanto en el desarrollo vegetativo del cultivo (longitud del tallo, número de hojas y número promedio de frutos) y variables de cosecha (peso promedio del fruto, longitud del fruto y diámetro del fruto), a nivel estadístico los tres tratamientos (To, TB y TQ) no muestran diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$). Los resultados reflejan la relevancia que tiene el consorcio microbiano desarrollado en los rendimientos de plántulas de interés hortícola, pues permitirían reducir la demanda de insumos agrícolas, especialmente fertilizantes químicos, así mismo se demostró que la concentración de 10^8 UFC/mL, del consorcio fue adecuada.
- ✓ El biopreparado a partir de las cepas estudiadas puede llegar a tener mucha utilidad si se inocula en los cultivos de la región. Podrá aumentar la población microbiana de la rizosfera y contribuir al sistema nutricional de las plantas. Así mismo, puede ser una alternativa al uso de fertilizantes químicos, a la vez convertirse en un componente vital en los sistemas agrícolas sustentables, ya que constituyen un medio económico y puede, en corto tiempo, ser un sustituto o complemento de los fertilizantes tradicionales en los cultivos de interés, por sus propiedades para solubilizar fósforo, fijar nitrógeno y enriquecer los suelos deficientes de macronutriente.

IX. RECOMENDACIONES

Al presentar los resultados de esta investigación, se abren nuevas puertas y nuevas interrogantes continúan por resolver, por ello se sugieren considerar las siguientes recomendaciones:

- ✓ Establecer en la regulación nacional actual la necesidad de hacer análisis de calidad microbiana a bioinsumos comerciales y exigir la ausencia de patógenos en el producto final como parámetro de calidad para su distribución.
- ✓ Desarrollar la producción del consorcio biofertilizante a escala piloto, diseñando medios o matrices elaboradas con materiales de bajo costo, que haga posible una industrialización y comercialización del producto, a través de un proceso eficiente y productivo.
- ✓ Al mismo tiempo, se hace necesario continuar con la evaluación de la estabilidad del consorcio formulado por un mayor tiempo, para determinar el período real de la supervivencia de las cepas, manteniendo temperaturas de 4°C, pero iniciando con concentraciones de UFC/ mL del mayor rango posible que permita apreciar de forma más contundente el comportamiento en el tiempo de cada cepa, lo cual serviría para fijar tiempos de almacenamiento, distribución y usos del producto final.
- ✓ Se recomienda que para futuros estudios se analice un mecanismo de adaptación del consorcio más adecuado a cultivos de ciclo corto como el rábano, orientado a la inoculación del sustrato con anterioridad. Tomando en cuenta que entre las plantas y las bacterias existe también un lenguaje dinámico y complejo para su colonización, como su capacidad de utilizar los exudados radicales como fuentes de carbono y su habilidad para interactuar y colaborar con otros microorganismos en la rizosfera.
- ✓ Es necesario desarrollar el experimento del consorcio aplicado en pepino en condiciones de campo abierto y en una zona más fresca, donde las plantas se sometan a menor estrés y podamos evaluar las respuestas de este experimento en condiciones más favorables para el cultivo.
- ✓ Los resultados del presente estudio deben evaluarse mediante la realización de ensayos de campo en condiciones variables de fertilidad del suelo con diferentes fuentes y tasas de fertilizantes de N, P y K, en combinación con el consorcio.
- ✓ Realizar evaluaciones en condiciones semi controladas (invernadero) y no controladas (campo abierto), del consorcio bacteriano formado por: *Bacillus megaterium*, *Bacillus marisflavi*, *Exiguobacterium aurantiacum* y *Pseudomonas mendocina*, considerando los resultados obtenidos en esta investigación, con el fin de ampliar el tipo de cultivo y corroborar su efecto biofertilizante en cultivos de interés agrícola.

X. BIBLIOGRAFIA

- Afanador, L. (2017). Biofertilizantes conceptos, beneficios y su aplicación en Colombia. *Ingeciencia*, 201 2(1), 65-79. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/331454557_Biofertilizantes_conceptos_beneficios_y_aplicacion_en_Colombia
- Aguirre-Medina, F., y Espinosa, M., J., A., (2016). Crecimiento y rendimiento de *Capsicum annuum* L. inoculado con *endomycorriza* y *rizobacterias*. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* Vol. 7 Núm. 7
- Ahmad, F., Ahmad, I., y Khan M. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163 (2), 173-181.
- Akgül, D., S., y Mirik, M., (2008) Biocontrol of *Phytophthora capsici* on pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. *J Plant Pathol.* 90(1):29-34.
- Almaghrabi, O., A., Massoud, S., I., Abdelmoneim T., S. (2013). Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences* 20, 57–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.10.004>
- Álvarez, C. (2012). Identificación y caracterización bioquímica, morfológica y molecular de microorganismos cultivables asociados a la rizosfera y al sustrato de plantas de vainilla (*Tesis de Maestría*). Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Medellín, Colombia.
- Alvarez, E., y Sánchez, L. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *NOVA*, 13(26), 53-65. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v14n26/v14n26a06.pdf>
- Amaiike, S., y Keller, N. (2011). *Aspergillus flavus*. *Anual Review of Phytoathology*, 49(1), 107-133. Doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095221
- Angulo-Castro, A., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Almaraz-Suárez, A., A., Delgadillo-Martínez, J., Jiménez-Fernández, M., y García-Barradas, O., (2017). Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plántulas de 2 variedades de *Capsicum annuum* L. inoculadas con *rizobacterias* u hongos *micorrícicos arbusculares*. *Asociación Argentina de Microbiología*. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.03.011>.
- Apella, M., y Araujo, P. (2005). Microbiología de agua: Conceptos básicos. En M.A. Blesa y J. Blanco. (Eds.), *Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua* (cap 1. pp. 33-50). San Martín, Argentina: Escuela de Posgrado de Universidad Nacional de San Martín

- Aquiahuatl, M., y Pérez, M., D. (2004). Manual de Prácticas del Laboratorio de Microbiología General (1ªed.) (pp. 22-68). Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. ISBN: 970-31-0141-0
- Arora, N., K., Khare, E., Maheshwari, D., K. (2010) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Constraints in Bioformulation, Commercialization, and Future Strategies. In: *Maheshwari D. (Eds) Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Microbiology Monographs, vol 18. Springer, Berlin, Heidelberg
- Baldauf, S. (2003). Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends in Genetics*, 19(6), 345-351. Doi: 10.1016/S0168-9525(03)00112-4
- Banerjee, G., Gorthi, S., y Chattopadhyay, P. (2017). Beneficial effects of bio-controlling agent *Bacillus cereus* IB311 on the agricultural crop production and its biomass optimization through response surface methodology. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(2, Suppl. 1), 2149-2159. Doi: 10.1590/0001-3765201720170362
- Bargaz, A., Lyamlouli, K., Chtouki, M., Zeroual, Y., Dhiba, D. (2018). Soil Microbial Resources for Improving Fertilizers Efficiency in an Integrated Plant Nutrient Management System. *Front Microbiol.* Jul 31; 9: 1606. Doi: 10.3389/fmicb.2018.01606. PubMed PMID: 30108553; PubMed Central PMCID: PMC6079243.
- Barquero, M. (2014). Caracterización y selección de bacterias y hongos micorrízicos aislados en raíces de alubia y pimiento, en la provincia de León, para el desarrollo de biofertilizantes (Tesis Doctoral). Universidad de Salamanca, Salamanca, España.
- Bashan, Y., de Bashan, L., E., Prabhu, S., R., Hernandez, J., P. (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil* 378:1–33
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16 (4), 729- 770.
- Benjumeda, D. (2017). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: mecanismos y aplicaciones (Trabajo de Grado). Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
- Bobadilla, C., H., y Rincon, S., C., V. (2008). Aislamiento y Producción de bacterias fosfatosolubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. *Pontificia Universidad Javeriana – Facultad de ciencias carrera de Microbiología Industrial Bogota, Colombia*.
- Borda, D., Pardo, J., Martínez, M., y Montaña, J. (2009). Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido de un cultivo de *Stevia rebaudiana Bert*. *Universitas Scientiarum*, 14(1), 71-78.

- Bosso, L., Scelza, R., Testa, A., Cristinzio, G., & Rao, M. (2015). Depletion of pentachlorophenol contamination in an agricultural soil treated with *Byssochlamys nivea*, *Scopulariopsis brumptii* and urban waste compost: a laboratory microcosm study. *Water air soil pollut*, 266(6), 1-9. Doi: 10.1007/s11270-015-2436-0
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J., y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608. doi:10.1016/j.eimc.2011.03.012
- Cabeza, E. (2013). Desarrollo de un modelo de relación entre densidad optica (método turbidimétrico) vs recuento en placa. Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Microbiología. Colombia.
- Calvo, P., L., Meneses, y Zúñiga, D. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizosfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas alto andinas. *Ecol. Apl.* 7(1,2), 141-148
- Camelo, M. (2010). Desarrollo tecnológico de un biofertilizante con base en la bacteria diazotrófica *Azotobacter Chroococcum* (Tesis de Maestría). Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia.
- Castillo, F., Hernández, F., Gallegos, G., Flores, A., Rodríguez, R., y Aguilar, C. (2015). Efectividad in vitro de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(3), 549-562. ISSN 2007-0934
- Castro-Sowinski, S., Y., Herschkovitz, Y., Okony, and E., Jurkevitch. (2007). Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 276: 1-11.
- Carling, D., Brainard, K., y Carter., D. (1999). Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG-12, a new group. *Phytopath.* 64: 492-496
- CDC y OMS - Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, y Organización Mundial de la Salud (2009). Medios, reactivos y control de calidad. *Medicina y Laboratorio*, 15(11-12), 549-587. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/contenido.cgi?IDPUBLICACION=2975>
- Chaudhary, S., G., S., Dheri, B., S., Brar, (2017) Long term effects of NPK fertilizers and organic manures on carbon stabilization and management index under rice-wheat cropping system. *Soiland Tillage Research*, 166, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.still.2016.10.005>
- CENTA - Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (2003). *Guía técnica del cultivo del pepino*. San Salvador, El Salvador.

- Contreras, B., López, S., Reyes, J., y Cárdenas, D. (2011). Producción de un inoculante a base de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Respuestas*, 16(2), 20-29. ISSN: 2422-505
- Coyne, M., (2000). *Microbiología del Suelo: Un enfoque exploratorio*. Barcelona, España: *Editorial Paraninfo*.
- Criollo, H., y García, J.,(2009). Efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento de plantas de rábano (*Raphanus sativus L.*) bajo macrotúnel. *Revista colombiana de ciencias hortícolas*. Vol. 3; No.2: 210-222.
- Cuervo, J. (2010). Aislamiento y caracterización de *Bacillus spp* como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. (Trabajo de Grado) *Microbiología Agrícola y Veterinaria*, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Delgado, H., Fonseca, E., y Páramo, L. (2018). Bioprospección microbiana dirigida a identificar microbiológica y molecularmente microorganismos de utilidad agrícola e industrial en Nicaragua. *Trabajo presentado en el 3er foro de proyectos I+D+i / P+E* de la Universidad Nacional de Ingeniería, Managua.
- Delgado, M., Rodríguez, I., Cruz, A., Balagurusamy, N., & Aguilar, C. (2013). Characterization and selection of halophilic microorganisms isolated from Mexican soils. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, 8(6), 457-464. ISSN: 1990-6145
- Deng, S., Chen, Y., Wang, D., Shi, T., Wu, X., Ma, X., Li, X., Hua, R., Tang, X., & Li, Q. (2015). Rapid biodegradation of organophosphorus pesticides by *Stenotrophomonas sp. G1*. *Journal of Hazardous Materials*, 297, 17–24. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.04.052
- Díaz, V., P., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suárez, J., J., y Alcántar, G., G. (2001) Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra19*: 327-335. Volumen 19, numero 4.
- Ding, Y., Wang, J., Liu, Y. & Chen, S. (2005). Isolation and identification of nitrogen-fixing *bacilli* from plant rhizospheres in Beijing region. *Journal of Applied Microbiology*, 99(5), 1271-1281. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02738.x
- El-Ghamry, M., A., Mosa, A., A., Alshaal, T., A., El-Ramady, H., R. (2018) Nanofertilizers vs. Biofertilizers: New Insights. *Env. Biodiv. Soil Security* Vol. 2, pp. DOI: 10.21608/jenvbs.2018.3880.1029.
- Elhayes, J. (7 de marzo de 2017). Easy harvest potato planter. Obtenido de youtube.com: <https://www.youtube.com/watch?v=zszmMPTg4wY>
- Fallas, J. (2012). Analisis de varianza comparando tres o mas medidas. Obtenido de <http://www.ucipfg.com/Repositorio/MGAP/MGAP->

- Farfan, D. (2017). Microorganismos promisorios fijadores de nitrógeno, movilizadores de fósforo y potasio para la formulación de un bioinsumo de uso agrícola (Tesis). Bogotá: *Universidad distrital Francisco José de Caldas*.
- Fernández, O., A., García de la F., C., Saéz, N., J., A., Valdezate, R., S., (2010). Cap 37. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. ISBN-978-84-614-7932-0.
- Gaitán, D., y Pérez, L. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) (Trabajo de Grado). *Pontificia Universidad Javeriana*, Bogotá, Colombia.
- Gargouri, B., Contreras, M., Ammar, S., Carretero, A., y Bouaziz, M. (2016). Biosurfactant production by the crude oil degrading *Stenotrophomonas* sp. B-2: chemical characterization, biological activities and environmental applications. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(4), 3769–3779. Doi: 10.1007/s11356-016-8064-4
- Gelvin, S. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16-37. Doi: 10.1128/membr.67.1.16-37.2003
- Gemmell, W. (09 de abril de 2002). Concepto de Bloque. Obtenido de Diseño de Experimentos Clásicos: <http://dm.udc.es/asignaturas/estadistica2/cap5.html>
- Gómez, L., Valero, N., & Dario, E. (2012). Bacterias halotolerantes/alcalófilas productoras de ácido indolacético (AIA) asociadas a *Arthrospira platensis* (Cyanophyceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 81-88. ISSN: 1909-8758
- González, E. (2017). Modelo factorial para el control de calidad de biofertilizantes de importancia agrícola (Trabajo de Grado). *Fundación universitaria Los Libertadores*, Bogotá, Colombia
- González, A. (2014). Identificación molecular y métodos de conservación de levaduras y hongos filamentosos de muestras provenientes de Antártida (Trabajo de Grado). *Universidad de la República*, Montevideo, Uruguay.
- Grady, E., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., & Yuan, Z.-C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb cell Fact*, 15(1). Doi: 10.1186/s12934-016-0603-7

- Gupta, M., Kiran, S., Gulati, A., Singh, B., and Tewari, R. (2012). Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiol. Res.* 167, 358–363. Doi: 10.1016/j.micres.2012.02.004.
- Hashem, A., Abd_Allah, E., F., Alqarawi, A., A., Al-Huqail, A., A., Wirth S., Egamberdieva, D. (2016). The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and endophytic bacteria enhances plant growth of *acacia gerrardii* under salt stress. *Front. Microbiol.* 7:1089. 10.3389/fmicb.2016.01089
- Hernández, D., y Loaiza, A. (2014). Selección de un método para la conservación y preservación de actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira (Trabajo de Grado). *Universidad Tecnológica de Pereira*, Pereira, Colombia
- Hernández, A. (2002). Obtención de un biopreparado a partir de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz (*Zea Mays L.*) (Tesis de doctorado). *Universidad de La Habana*, La Habana, Cuba.
- Herrera, J., M. (2005). Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S. *Universidad Nacional Autónoma de México*. Recuperado de: <http://vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/Microbiologia/images/Documentos/filogenetica.pdf>
- Herrmann, L., Atieno, M., Bräu, L., Lesueur, D. (2015) Microbial Quality of Commercial Inoculants to Increase BNF and Nutrient Use Efficiency. *Biological Nitrogen Fixation*. DOI: 10.1002/9781119053095.ch101
- Herridge, D. F. (2008). Inoculation technology for legumes. En M. J. Dilworth *et ál.* (eds.), *Nitrogen-fixing leguminous symbioses* (pp. 77-115). Dordrecht: Springer.
- Hidro environment. (13 de noviembre de 2015). HIDRO ENVIRONMENT. Obtenido de http://www.hydroenv.com.mx/catalogo/index.php?main_page=page&id=44
- Holguín, Z., G., (2008). La comunicación entre bacterias y plantas. *Rev. Ciencia.* 72-78 p
- Hungria, M., Loureiro, M. F., Mendes, I. C., Campo, R. J. y Graham, P. (2005). Inoculant preparation, production and application. En D. Werner y W. E. Newton (eds.), *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment* (pp.223- 253).Dordrecht: Kluwer
- ICA - Instituto Colombiano Agropecuario. (2011). Resolución 000698. Requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de Bioinsumos de uso agrícola y se dictan otras disposiciones. Bogotá, Colombia.

- IICA - Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2007). *Guía práctica para la exportación de Chiltoma a EE. UU.* Representación del IICA en Nicaragua
- Ito, S. (2006). Caracterización y evaluación de los factores que determinan la calidad nutricional e inocuidad en la producción de fertilizantes orgánicos fermentados (Tesis de Maestría). *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.*
- INTA –Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (2006). *Guía Tecnológica de Chiltoma.* Managua, Nicaragua.
- Jayasuriya, H., Zink, D., Basilio, A., Vicente, F., Collado, J., Bills, G., Goldman, M., Motyl, M., Huber, J., Dezeny, G., Byrne, K., & Singh, S. (2009). Discovery and antibacterial activity of glabramycin A–C from *Neosartorya glabra* by an antisense strategy. *The Journal of Antibiotics*, 62, 265-269. Doi: 10.1038/ja.2009.26
- Kang Y., Shen, M., Wang, H., Zhao, Q., (2013) A possible mechanism of action of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strain *Bacillus pumilus* WP8 via regulation of soil bacterial community structure, *The Journal of General and Applied Microbiology*, Volume 59, Issue 4, Pages 267-277, Online ISSN 1349-8037, Print ISSN 0022-1260, <https://doi.org/10.2323/jgam.59.267>
- Kang, S., Joo, G., Hamayun, M., Na, C., Shin, D., Kim, H., Hong, J., & Lee, I. (2009). Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnology Letters*, 31(2), 277-281. Doi: 10.1007/s10529-008-9867-2
- Kellman, A., W., (2008). Rhizobium inoculation, cultivar and management effects on the growth, development and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *PhD Thesis*. 189–190.
- Khaneja, R., Fons, L., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Steiger, S., To, E., Sandmann, G., Dong, T., Ricca, E., Fraser, P., & Cutting, S. (2010). Carotenoids found in *Bacillus*. *Journal Applied Microbiology*, 108(6), 1889-1902. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04590.x
- Kohler, J., Caravaca, F., Carrasco, L., y Roldán, A. (2006). Contribution of *Pseudomonas mendocina* and *Glomus intraradices* to aggregate stabilization and promotion of biological fertility in rhizosphere soil of lettuce plants under field conditions. *Soil use and Management*, 22(3), 298-304. doi:10.1111/j.1475-2743.2006.00041.x.
- Kristiansen, K. A., Freudenstein J.V., Rasmussen F.N. y Rasmussen, H.N. (2004). Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). *Mol. Phylog. Evol.* 33:251 – 258

- Lara, M., C., y Negrete, P., J., L. (2015). Efecto de un bioinoculante a partir de consorcios microbianos nativos fosfato solubilizadores, en el desarrollo de pastos Angleton (*Dichanthium aristatum*). *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XVII No. 1 Junio 2015 122-130. DOI 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50741. 122
- Lara, C., Sanes, S., C., Oviedo, L., E., (2013). Impacto de bacterias nativas solubilizadoras de fosfato en el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.). *Bioteconología Aplicada* Vol.30, No.4; 30:271-275
- Larrea, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, (62), 96-100. ISSN: 1016-0469
- Leifert, C., Li, H, Chidburee, S., Hampson, S., Workman, S., Sigee, D., Epton, H., & Harbour, A. (1995). Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(2), 97-108. Doi: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb02829.x
- Lesueur, D., Deaker, R., Herrmann, L., Bra"u L., and Jansa, J. (2016). The Production and Potential of Biofertilizers to Improve Crop Yields. N.K. Arora *et al.* (eds.), *Bioformulations: for Sustainable Agriculture*. DOI 10.1007/978-81-322-2779-3_4
- Liébana, J. (2002). *Microbiología Oral (2ª ed.)*(pp.18-225). Madrid, España: McGRAW-HILL- INTERAMERICANA. ISBN: 84-486-0460-1
- López, M., Martínez, V., R., Brossard., F., M., Bolívar, A., Alfonso, N., Alba, A., & Pereira, A., H. (2008). Efecto de biofertilizantes bacterianos sobre el crecimiento de un cultivar de maíz en dos suelos contrastantes venezolanos. *Agronomía Tropical*, 58(4), 391-401. ISSN 0002-192X
- Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., *et al.* (2017). Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environ Sci Pollut Res* 24: 3315. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0>.
- Malusá, E., Sas-Paszt, L., and Ciesielska, J. (2012). Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers. *The Scientific World Journal*. Volume 2012, Article ID 491206, 12 pages. doi:10.1100/2012/491206
- Malloch, D., y Cain, R., F. (1972). The *Trichocomataceae*: Ascomycetes with *Aspergillus*, *Paecilomyces* and *Penicillium* imperfect states. *Canadian Journal of Botany*. 50(12):2613-2628
- Marlow, D. (1 de mayo de 2011). Elementos fundamentales de un macrotúnel hidropónico. Obtenido de Hortalizas : <http://www.hortalizas.com/horticultura-protegida/macrotúnel/elementos-fundamentales-de-un-macrotúnel-hidroponico/>

- Masaquiza, C. (2019). Caracterización morfológica y molecular de hongos asociados a la rizósfera de plantas de café en la isla Santa Cruz–Galápagos (*Trabajo de Grado*). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Méndez-Úbeda, J., Páramo, A., L., (2018). Desarrollo a nivel de laboratorio de un bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis*, para el control de hongos fitopatógenos en cultivos de interés agrícola. *Tesis de Maestría en Biotecnología*. Managua, Nicaragua.
- Micro Market Monitor (2015). North America Biofertilizer Market by Application (Cereals & Grains, Fruits & Vegetables, Pulses & Oilseeds), by type (Nitrogen Fixing Biofertilizers, Phosphate Solubilizing Biofertilizers, Potash Mobilizing Biofertilizers), by Source, by Geography-Analysis and Forecast to 2019. Available at: <http://www.micromarketmonitor.com/market/northamerica-bio-fertilizer-5250154124.html>
- Mikhak, A., A., Sohrabi, M., Z., Kassae, M., Feizian, (2017). Synthetic nanozeolite/nanohydroxyapatite as a phosphorus fertilizer for German chamomile (*Matricaria chamomilla L.*). *Industrial Crops and Products*, 95, 444-452.
- Mohammadi, K., y Sohrabi, Y. (2012). Bacterial biofertilizers for sustainable crop production: A review. *J. Agric. Biol. Sci.*, 7:307316.
- Moreno, J., y Albarracín, V. (2012). Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología)*. Serie Microbiología, 79-93.
- Moreno, A., García, V., y Reyes, J. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68-83. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707
- Moreno, C. (2017). Evaluación del antagonismo y sinergismo en aislados microbianos obtenidos de *Plukenetia volúbilis L.*, para la conformación de un consorcio microbiano en condiciones *in vitro* (Trabajo de Grado). *Universidad de Santander*, Bucaramanga, Colombia.
- Myresiotis, Ch., A, Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E., (2012) Enhanced root uptake of acibenzolar-S-methyl (ASM) by tomato plants inoculated with selected *Bacillus* plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Biodegradation*. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.01.005>
- NETAFIM. (18 de 07 de 2017). Instalación y operación de goteros PCJ de Netafim con manifold de distribución y goteros flecha para macetas. Obtenido de YouTube: <https://www.youtube.com/watch?v=-MNpZfonTEg>

- Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense de Insumos Agrícolas - Bioinsumos y Sustancias Afines NTON 11 048 – 16. *Publicado en la Gaceta No. 241 del 19 de diciembre del 2017.*
- Ohio State University. (2001). *Ohio vegetable production guide, 2001*. Columbus, Ohio: Ohio State University Extension.
- Oladipo, O., Ezeokoli, O., Maboeta, M., Bezuidenhout, J., Tiedt, L., Jordaan, A., y Bezuidenhout, C. (2018). Tolerance and growth kinetics of bacteria isolated from gold and gemstone mining sites in response to heavy metal concentrations. *Journal of Environmental Management*, 212, 357-366. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.01.038
- Orberá, T., Gonzales, Z., y Pérez, I. (2005). Aislamiento de cepas del genero *Bacillus sp* con potencialidades para la bioproteccion y la estimulacion del crecimiento vegetal. *Revista Cubana de Quimica*, 17(1), 189-195. ISSN: 0258-5995.
- Otero, V. (2011). Aislamiento, selección e identificación de actinomicetos, bacterias fotosintéticas no sulfurosas y bacterias ácido lácticas con potencial biofertilizante, a partir de suelos asociados al cultivo de plátano en la Costa Atlántica Colombiana (*Tesis de Maestría*). *Universidad Nacional de Colombia*, Bogotá.
- Orozco, C. (2001). Manejo bacteriano del cultivo de *Artemia Franciscana Kellogg*, 1906: aislamiento, caracterización y efecto en el cultivo larvario de *Artemia*, de bacterias heterótrofas aerobias asociadas a quistes comerciales de *Artemia* (*Tesis de Maestría*). *Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste*, S.C, La Paz, Baja California del Sur
- Páramo, L. (2012). Caracterización de comunidades microbianas con potencial biotecnológico para la prevención del deterioro estructural (*Tesis Doctoral*). *Instituto Politécnico Nacional*, Tamaulipas, México.
- Páramo, L. (2014). Práctica de Laboratorio, Temas I Y II: Cinética Enzimática y Cinética Microbiana. *Maestría Interinstitucional en Biotecnología*, Managua, Nicaragua.
- Páramo, L., Rios, C., & Cabistán, K. (2018). Bioprospección microbiana para el desarrollo de aplicaciones ambientales. *Trabajo presentado en el 3er foro de proyectos I+D+i / P+E de la Universidad Nacional de Ingeniería*, Managua, Nicaragua.
- Park, J., Hargreaves, J., Cole, A., Ghisalberti, E., Gams, W., y Sivasithamparam, K. (2001). Cuticular disruption and mortality of *Caenorhabditis elegans* exposed to culture: Itrate of *Byssochlamys nivea* Westling. *Nematology*, 3(4), 355-363. Doi: 10.1163/156854101317020277

- Patakova, P. (2013). Monascus secondary metabolites: production and biological activity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(2), 169-181. Doi: 10.1007/s10295-012-1216-8
- Pathak, D., V., and Kumar, M. (2016). Microbial inoculants as biofertilizers and biopesticides, in *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Research Perspectives*, Vol. 1, Eds D.P. Singh *et al.* (Delhi: Springer), 197–209. doi: 10.1007/978-81-322-2647-5.
- Paulitz, T., y Bélanger, R. (2001). Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*, 39(1), 103-133. Doi: 10.1146/annurev.phyto.39.1.103
- Pérez, R., E., (2012). Inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en pepino (*Cucumis Sativus L.*). Montecillo, Texcoco, México.
- Pinheiro, V., Desagiacomo, C., Michelin, M., Maller, A., Monteiro, L., Jorge, J., & Polizeli, M. (2017). *Neosartorya glabra* polygalacturonase produced from fruit peels as inducers has the potential for application in passion fruit and apple juices. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20. Doi: 10.1590/1981-6723.16316
- Pérez, M., y Mota, M. (2006). Morfología y Estructura Bacteriana. En Universidad de la Republica: Facultad de Medicina. (Ed.), *Temas de Bacteriología y Virología Médica (2ª ed.)* (pp. 23-42). Montevideo, Uruguay: Oficina del libro FEFMUR.
- Portero, M. (2014). Evaluación como acondicionador de suelo y a nivel de laboratorio, de un consorcio previamente seleccionado de microalgas y cianobacterias con predominio de *Calothrix sp.* (Trabajo de Grado). *Universidad de las Fuerzas Armadas*, Sangolquí.
- Prescott, Harley, and Klein's (2008). *Microbiology*. Seventh Edition. *McGraw-Hill* Pag: 115
- Pulido, A. (2016). Evaluación del efecto de *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento de *Zea mays* y *Solanum lycopersicum* a nivel de macrotúnel (Trabajo de Grado). *Universidad EAFIT*, Medellín, Colombia.
- Rajkumar, M., Nagendran, R., Jae, K., Hyu, W., y Zoo, S. (2006). Influence of plant growth promoting bacteria and Cr 6+ on the growth of Indian mustard. *Chemosphere*, 62 (5), 741-748.
- Ramirez, R., y Perez, A. (2006). Evaluación del potencial de los biosólidos procedentes del tratamiento de aguas residuales para uso agrícola y su efecto sobre el cultivo de rábano rojo (*Rahanus sativas L.*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, Medellín, 59(2):3543-3556.

- Rasheva, T., Hallet, J., N., y Kuju, A. (1998). Taxonomic Investigation of *Monascus Purpureus* 94-25 strain. *Journal of Culture Collections*, 2(1), 51-59. ISSN: 1310-8360
- Rasmussen, H. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*.
- Reyes, R., A., López, A., M., Ruiz, S., E., Latournerie, M., L., Pérez, G., A., Lozano, C., M., G., y Zavala, L., M., J. (2014). Efectividad de inoculantes microbianos en el crecimiento y productividad de chile habanero (*Capsicum chinense Jacq.*). *Agrociencia* 48:285-294.
- Ren, J.-H., Li, H., Wang, Y.-F., Yan, A.-Q., Yan, A.-Q., & Wu, X.-Q. (2013). Biocontrol potential of an endophytic *Bacillus pumilus* JK-SX001 against poplar canker. *Biological Control*, 67(3), 421-430. doi:10.1016/j.biocontrol.2013.09.012.
- Rodicio, M., y Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *ELSEVIER*, Vol. 22, No. 4, 238-245.
- Rojas, D., Garrido, M., y Bonilla, R. (2009). Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium sp. Corpoica*, 10(1), 70-80. ISSN: 0122-8706
- Rosenthal, K., S., and Tan, M., J., (2011). Rapid review microbiology and immunology, chap 6-12, third edition, *MOSBY*. ISBN: 978-0-323-06938-0
- Samson, R., Hong, S., Peterson, S., Frisvad, J., & Varga, J. (2007). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section Fumigati and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology*, 59, 147-203. Doi: 10.3114/sim.2007.59.14
- Sánchez, E., A. (2016). Efecto inhibitorio de los probióticos: *Lactobacillus Acidophilus*, *Lactobacillus Casei* y *Lactobacillus Reuteri*, sobre el crecimiento *in vitro* de *Porphyromona Gingivalis*, microorganismo predominante en la enfermedad periodontal destructiva crónica (Trabajo de Grado). *Universidad Central del Ecuador*, Quito, Ecuador
- Sánchez, E., Castillo, S., y García, P. (2016). Actividad antimicrobiana. En C. Rivas-Morales, M.A. Oranday-Cardenas y M.J. Verde-Star. (Eds.), *Investigación en plantas de importancia médica* (pp. 77-100). Barcelona, España: OmniaScience. Doi: 10.3926/oms.334
- Sandoval, V., M. (2010). Desinfección de sustratos. Primer curso Nacional de Sustratos. *Colegio de Postgraduados*. Texcoco, Estado de México
- Sandria, J. (2003). Aplicaciones de la inteligencia artificial al análisis de biosecuencias (Tesis de Maestría). *Universidad Veracruzana*, Veracruz, México

- Santambrosio, E., y Ortega, M. (2009). Cátedra de biotecnología. *Siembra y recuento de microorganismos*. Santa fe, Argentina: departamento de ingeniería química de la Facultad Regional Rosario, Universidad Tecnológica Nacional de la República Argentina.
- Sanz, S. (2011). *Prácticas de Microbiología (2ª ed.)* (pp. 13-21). Logroño, España: Universidad de La Rioja. ISBN: 978-84-694-0870-4
- Sauka, D., y Benintende, G. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, 40(2), 124-140. ISSN: 0325-7541
- Schlegel, Hans G., Zaborosch, Christiane (1997); *Microbiología General*, Nueva Edición Omega, Barcelona; Cap V. pp 213.
- Scragg, A. (1996). *Biotecnología para Ingenieros: Sistemas Biológicos en Procesos Biotecnológicos (pp.191-195)*. México: LIMUSA. ISBN: 968-18-4708-3
- Sela, G. (23 de 08 de 2017). Los sistemas de riego por goteo. Obtenido de Smart Fertilizer Management : www.smart-fertilizer.com/es/articles/drip-irrigation
- Shatila, F., Yusef, H., & Holail, H. (2013). Pigment production by *Exiguobacterium aurantiacum* FH, a novel Lebanese strain. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(12), 176-191. ISSN: 2319-7706
- Sheng, J., y Citovsky, V. (1996). *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *The plant cell*, 8(10), 1699-1710. Doi: 10.1105/tpc.8.10.1699
- Simarmata, T., Hersanti, T., Turmuktini, B., N., Fitriatin, M., R., Setiawati, Purwanto (2017). Bioameliorant and Biofertilizers Application to Increase the Soil Health and Rice Productivity. *HAYATI Journal of Biosciences*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.hjb.2017.01.001>
- Sood, G. (2003). Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria toward root of vesicular-arbuscular *mycorrhizal* tomato plants. *Microbiol. Ecol.* 45:219-227.
- Sotelo, D., L., I., Jiménez, F. J., A., De Zan, A., T., Cueto, V. M., C., (2012) Efecto de inoculación de microorganismos en crecimiento de rábano (*Raphanus sativus*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol 10 No. 1 (21 - 31).
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845–857. Doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x

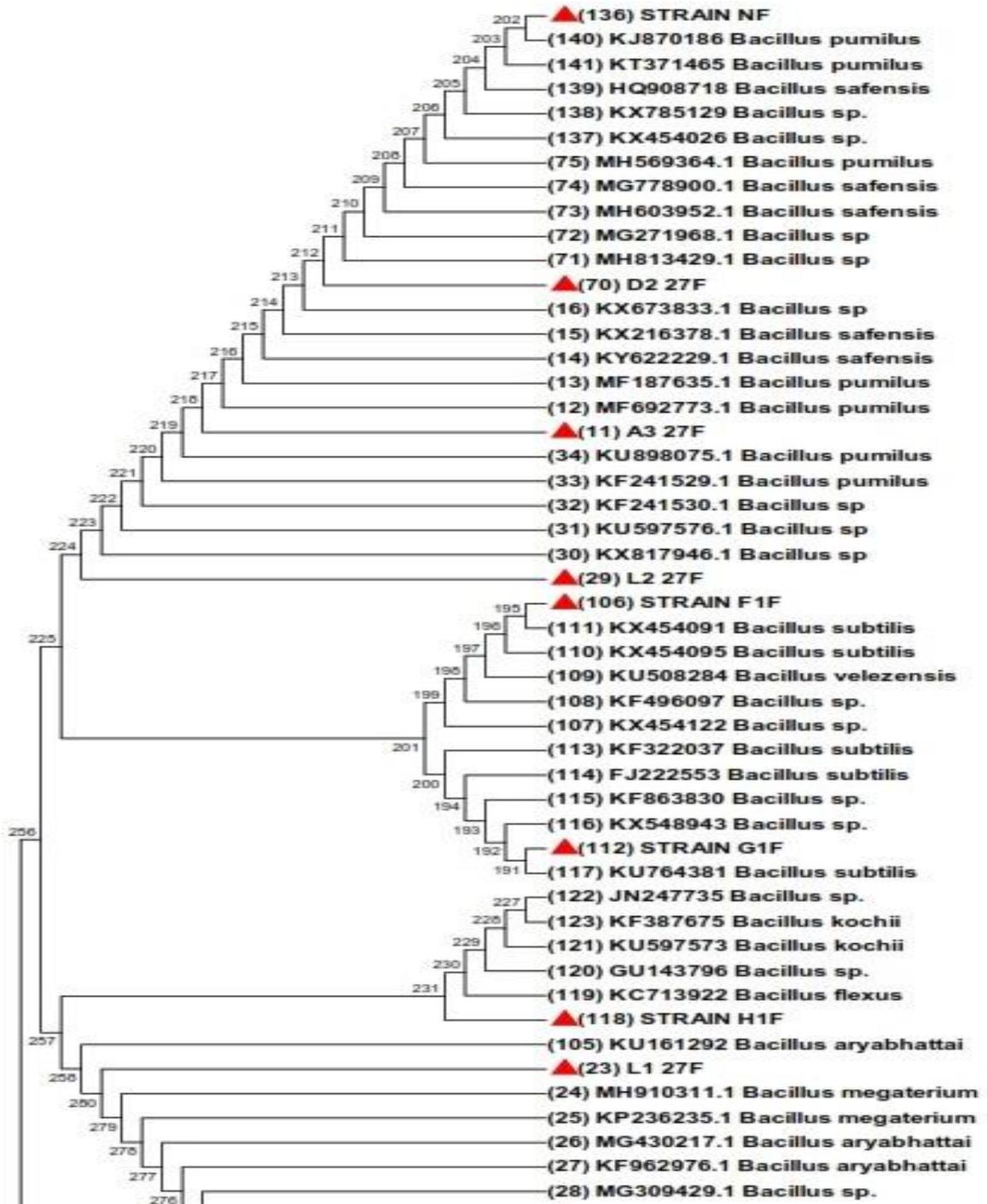
- Taewoo, Y., Eun-Hee, L., Hyerim, P., & Kyung-Suk, C. (2011). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by *Neosartorya* sp. BL4. *Journal of Environmental Science and Health*, 46(14), 1763-1768. doi:10.1080/10934529.2011.624004
- Tambekar, D., Tambekar, S., Jadhav, A., & Kharat, P. (2017). Alkaliphilic *Bacillus flexus*: a potential source of lipase producer for industrial and medical application. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(10), 4313-4317. ISSN: 0975-8232
- Tejera, B., Rojas, M., & Mayra, H. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fotopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138. ISSN: 0253-5688
- Terry-Alfonso, E., y Leyva-Galán, A. (2006). Evaluación agrobiológica de la coinoculación micorrizas rizobacterias en tomate. *Revista Agronomía Costarricense*, 30: 65-73.
- Tortolo, K., & Bell, A. (2015). Producción de proteínas recombinantes en *Bacillus megaterium*: estado del arte. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 49(1), 22-26. ISSN: 0138-6204
- Tortora, G., J., Funke, B., R., y Case, C., L. (2007). Introducción a la Microbiología (9ªed) (Cap. III – IX, pp. 176-346). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. ISBN: 978-950-06-0740-7
- Trabelsi, D., y Mhamdi, R. (2013). Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: a review. *BioMed Res. Inter.* 1-11 pp.
- Trivedi, P., y Pandey, A. (2008). Plant growth promotion abilities and formulation of *Bacillus megaterium* strain B 388 (MTCC6521) isolated from a temperate Himalayan location. *Indian J. Microbiol.*, 48(3), 342-347. Doi: 10.1007/s12088-008-0042-1
- Trujillo, Y. (2012). Bioinsumos como fuentes nitrogenadas en agroecosistemas de *Allium cepa*. *Agroecología: ciencia y tecnología*, 1(1), 44-53.
- Tzfira, T., & Citovsky, V. (2000). From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology*, 1(4), 202-212. Doi: 10.1046/j.1364-3703.2000.00026.
- Varga, J., Frisvad, J., y Samson, R. (2011). Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*, 69(1), 57-80. Doi: 10.3114/sim.2011.69.05

- Varga, J., Kevei, E., Hamari, Z., Tóth, B., Téren, J., Croft, J.H. y Kozakiewicz, Z. (2000). Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. En: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. *Harwood Academic Publishers*, Amsterdam, Holanda. Págs. 397-411.
- Vargas, S. (2002). Selección y evaluación de bacterias del género *Bacillus* productoras de amilasa en cultivo sumergido (Tesis de Maestría). *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, Lima, Perú.
- Vasquez-Santiago, E., Lira-Saldivar, R., H., Valdéz-Aguilar, L., A., Cárdenas-Flores, A., Ibarra-Jiménez, L., González-Sandoval, D., C. (2014). Respuestas del pepino a la fertilización biológica y mineral Con y sin acolchado plástico en condiciones de casa sombra. *Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica*. Año 2, No. 10. Página principal: www.riiit.com.mx
- Vestberg, M., S., Kukkonen, K., Saari, P., Parikka, J., Hut-tunen, L., Tainio, N., Devos, F., Weekers, C., Kevers, P., Thonart, M., C., Lemoine, C., Cordier, C., Alabouvette y S., Gianinazzi. (2004). Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Appl. Soil Ecol.* 27, 243-258. Doi: [10.1016/j.apsoil.2004.05.006](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.05.006)
- Villamil, D., L., M., y Esguerra, R., D. (2017). Enterococcus, Myroides y Exiguobacterium: géneros bacterianos con potencial probiótico para el cultivo de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Acta biol. Colomb.* 2017; 22(3):331-339. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v22n3.59974>
- Villota, C., P. (2013). Evaluación del potencial de promoción del crecimiento vegetal de microorganismos aislados a partir de residuos de higuera (*Ricinus Communis*), en zanahoria (*Daucus Carota*) (Trabajo de Grado). *Universidad Católica de Manizales*, Manizales, Colombia.
- Wang, T., Ding, P., Chen, P., Xing, K., Bai, J., Wan, W., & Jiang, J. (2017). Complete genome sequence of endophyte *Bacillus flexus* KLBMP 4941 reveals its plant growth promotion mechanism and genetic basis for salt tolerance. *Journal of Biotechnology*, 260, 38-41. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.09.001
- Wang, X., y Zhao, H. (2013). Isolation and Characterization of a *Bacillus flexus* Strain Used in Alkaline Wastewater Treatment. *Advanced Materials Research*, 750-752, 1381-1384. Doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.750-752.1381
- WikiHow, (consultado en enero, 2019) del sitio: <https://es.wikihow.com/plantar-%C3%A1banos>

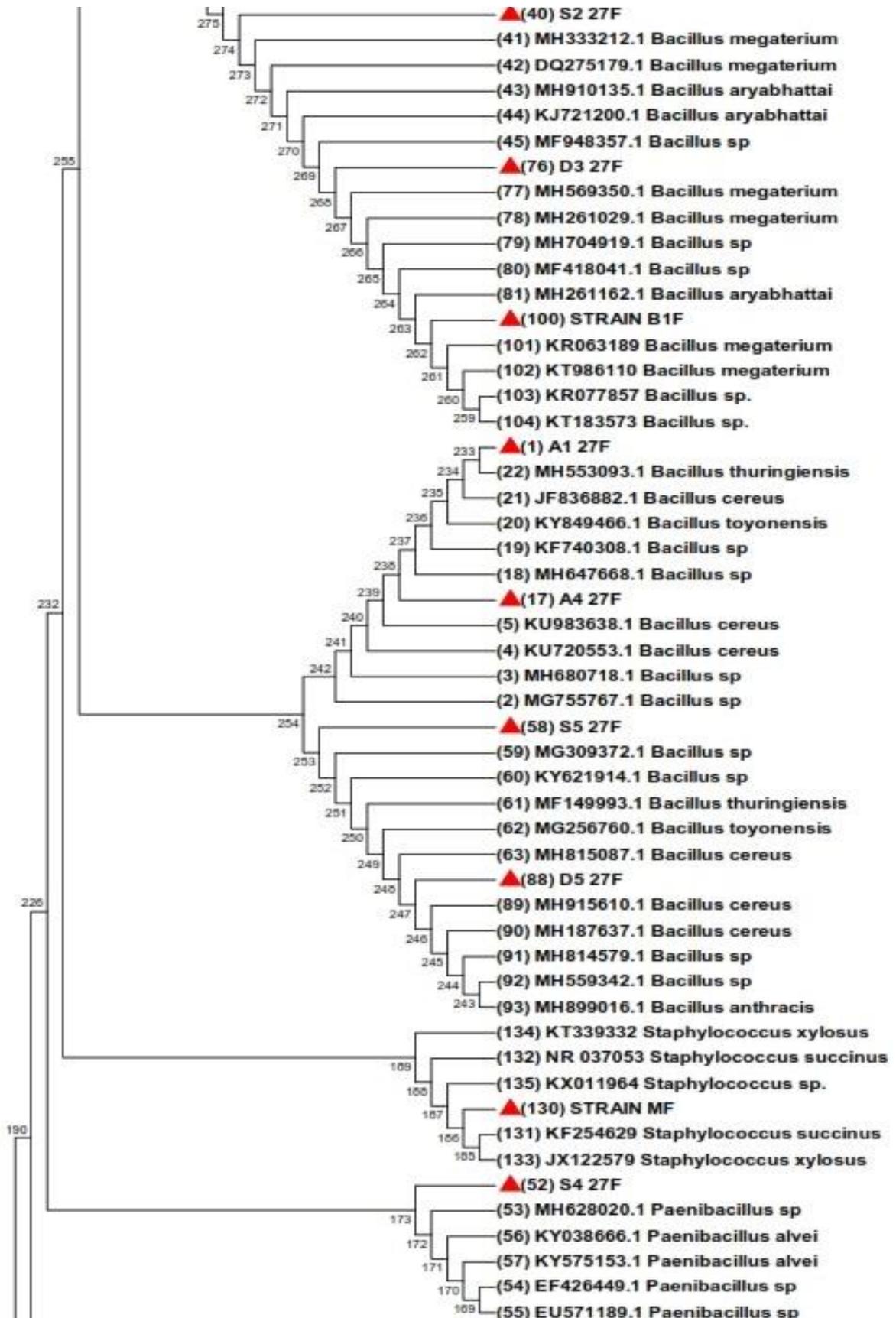
- Yuan, Y., & Gao, M. (2015). Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus Pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy. *Scientific Reports*, 5(1). Doi: 10.1038/srep10259
- Zhao, L., Wang, F., & Zhao, J. (2013). Identification and functional characteristics of *chlorpyrifos*-degrading and plant growth promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Basic Microbiology*, 54(5), 457-463. Doi: 10.1002/jobm.201200639
- Zeballos, H., M., F., (2017). Caracterización de microorganismos de montaña (MM) en biofertilizantes artesanales. Tesis. *Escuela Agrícola Panamericana*, Zamorano. Honduras
- Zou C, Li Z, Yu D. (2010). *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. *J Microbiol.* 48(4):460-466.

XI. ANEXOS

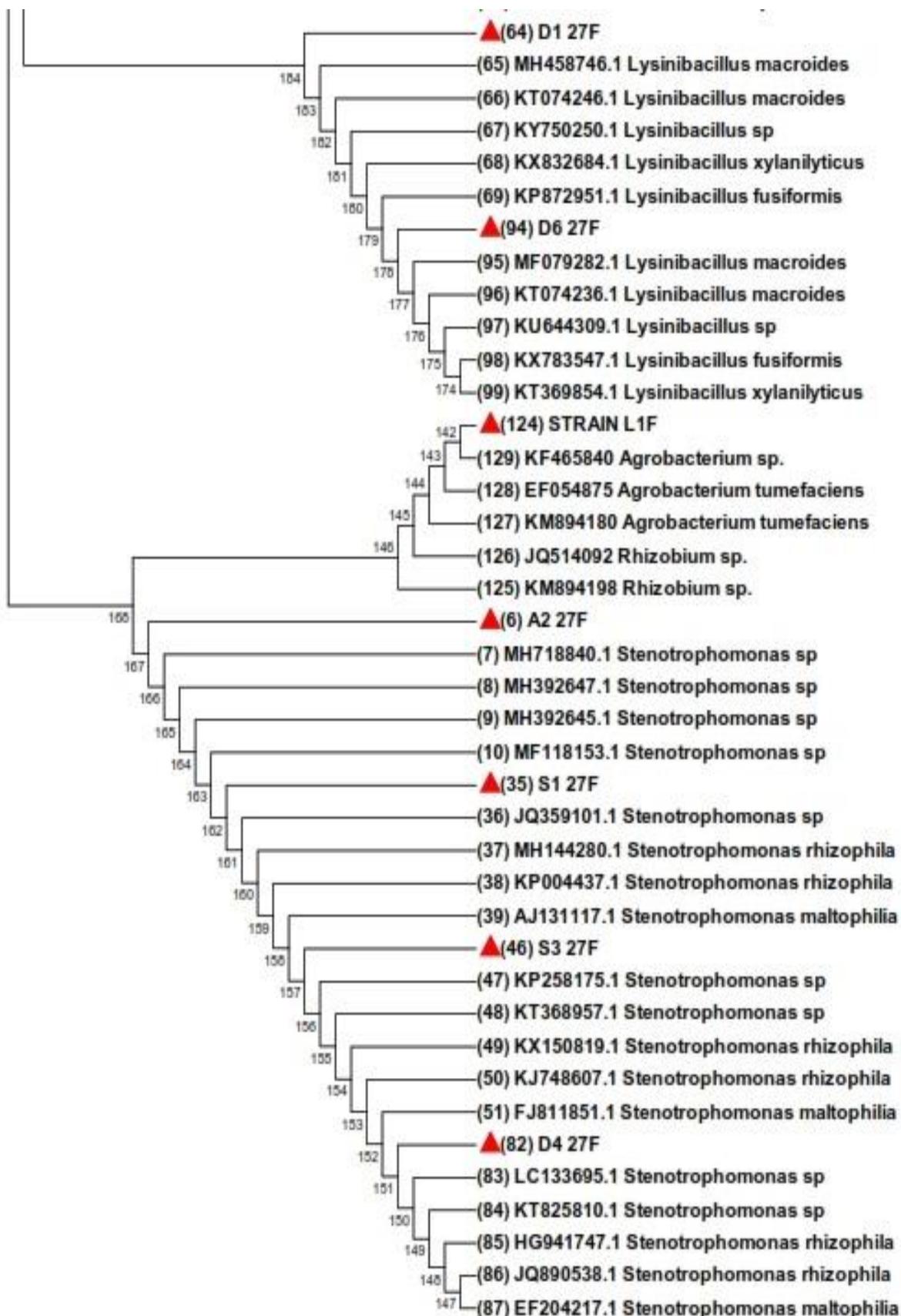
Anexo 1. Árbol filogenético de bacterias y hongos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA 5.0, el código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo.



Continuación Anexo 1. Árbol filogenético de Bacterias



Continuación Anexo 1. Árbol filogenético de Bacterias



Anexo 2. Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de bacterias identificadas molecularmente.

>A1_27F Secuencia 1. Cepa TS11-31 (*Bacillus Thuringiensis*)

GCAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
GGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGA
GCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCAATAGCTAGT
TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG
GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTC
TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTGTTGTTAGGGGAAGACA
AGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGG
TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGAGACTTGAG
TGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTG
GCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTATAGTGCTGA
AGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG

>A2_27F Secuencia 2. Cepa TS13-1111J (*Stenotrophomonas sp.*)

CAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTAC
CTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTTCGGGTGAAAGCAGGG
GACCTTCGGGCTTTCGCGGGATAGATGAGCCGATGTCCGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCCA
CCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAG
ACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCCGCG
TGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCGGCTAATACCCG
GTTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAG
GGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGGTAGGTGGTTGTTAAGTCTGTTGTGAAA
GCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGTGAA
TTCCCGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGA
CCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAAC

>A3_27F Secuencia 3. Cepa TS13-2111U (*Bacillus Pumilus*)

ACATGCAGTCGAGCGGACAGAAAGGGAGCTTGCTCCCAGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACG
TGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAA
CCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACCTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA
GTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAG
TCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAA
CAAGTGCAGAGTAAGTCTGTCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCG
GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGAAACTTGA
GTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAG
TGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTATGTC
TGACGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTT
GACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGTT
GTCGTCAGCTCGTG

>A4_27F Secuencia 4. Cepa TS13-3C (*Bacillus sp.*)

ATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTT
GAAGTGCATGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTGCATTAG
CTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA
AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTGTTGTTAGGGAA
GAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCA
GGTGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGAGAC

Continuación Anexo 2. Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de bacterias

TTGAGTGCAGAAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACAGACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTATG
GCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT
CTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATG
GTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTT
GCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGT

>D1_27F Secuencia 5. Cepa DCL1-2A (*Lysinibacillus Macroides*)

AGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGG
ATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTCTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGG
TTTCGGCTGTGCTATAGGATGGGCCCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGTAACGGCTCACCAAGC
CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTG
AAGAAGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACGGCTGTACCT
TGACGGTACCTATTAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCAC
GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAAAGTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGAAATCCAA
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGCTGTAAAC
TGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC
GATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCT
GGG

>D2_27F Secuencia 6. Cepa DCL2-11 (*Bacillus sp.*)

AGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGG
ATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACG
GTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTAACGTCTCGCAC
CTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAAAGTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCC
ACGTGATGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGT
AACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCG
CCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG

>D3_27F Secuencia 7. Cepa DCL3-3 (*Bacillus sp.*)

CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTA
ATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGG
CCCCGCGGTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAACGATGCATACCCGACCTGA
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTA
CTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACGTCTTGACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCC
ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCG
TAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTG
GAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA
TGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTGAAGTGTAGAGGGT
TTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAA
ACTCAAAGGAATTGAC

>D4_27F Secuencia 8. Cepa DCL3-4 (*Stenotrophomonas sp.*)

CTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACCTTTTTCGTGGGGGA
TAACGTAGGGAACCTACGCTAATACCGCATAACGACTTTCGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTT
GCGCGGATAGATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATC
CGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGC
CTTCCGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCCGGCTAATACCCGTTGTTCTGACGGTA
CCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTACT

Continuación Anexo 2. Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de bacterias

CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTTGTTTAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAAC
CTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGTGGAATTCCTGGTGTAGCA
GTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACTGACACT
GAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGA
ACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGT
ACGGTCGCAAGACTG

>D5_27F Secuencia 9. Cepa DCL12-111Q (*Bacillus Cereus*)

AGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGG
ATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTTCGAAATTTGAAAGGCG
GCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCAC
CTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGAAATCCA
TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAA
CTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
CGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCT
GGGGAGTAC

>D6_27F Secuencia 10. Cepa DCL1-11(*Lysinibacillus Macroides*)

GCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGGCAACCTACCCTATAGTTGGGA
TAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTGTTCATGGTGAAGACTGAAAGACGGT
TTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG
CGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGA
AAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCTGTACCT
TGACGGTACCTTATTAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCAC
GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAAACCTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGAAATCCA
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAA
TGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
GATGAGTCTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCT
GGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACT

>L1_27F Secuencia 11. Cepa LL9-21 (*Bacillus Megaterium*)

GTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTTGGGCA
ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATG
GGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAAACGGCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG
GAGCAACGCCGCGTGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAC
AAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTA
AGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAAACCTGGGGAACCTTGAGTGCAGAA
GAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAG
GCGGCTTTTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAA
CGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT
CTGACAACCTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGGGACAG

>L2_27F Secuencia 12. Cepa LL8-221 (*Bacillus sp.*)

GGCTAAACATGCAAGTTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAG
TAACACGTTGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTT
CCTTGAACCGCAGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCAT
AGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCC
ACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC
GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGTGAAAGTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTGAAGAGTAACTGCTTGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACG

Continuación Anexo 2. Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de bacterias

TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGC
AGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAA
CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGGCGACTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTCCCGCCCTTA
GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAAT
TGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG
GTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCA
TGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTA
GTTGCCAGCATTCAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAGGGGGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACCACGTGCTACATG

>S1_27F Secuencia 13. Cepa LS5-21 (*Stenotrophomonas sp.*)

GGTTGCTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGG
ACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACCTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATACC
GCATACGACCTTCGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGCGCGGATAGATGAGCCGATGTCCGA
TTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG
CCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGG
GCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCTGGGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGGCCCTTTTGTGG
GAAAGAAAAGCAGTCGGCTAATACCCGTTTGTCTGACCGTACCCAAAGAATAAGCAACCGCTTAACCT
CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGAACGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGC
GTAGGTGGTTGTTAAGTCTGTTGTAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGC
GACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGTGAATCCCGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATCGGGAGGA
ACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCAC
GCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGG
AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCAAGAACCTTACCT
GGTCTTGACATGTCGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCGAACACAGGTGCTGC
ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTT
AGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA
TGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTACTACAATGG

>S2_27F Secuencia 14. Cepa LS5-1K (*Bacillus sp.*)

GCTAAACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAG
TAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGA
TCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCAT
TAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGA
CGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGTGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTCTGTTGTTAGG
GAAGAACAAGTACGAGAGTAAGTGTGCTTACGCGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCCAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCG
CAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTATTGGAAACTGGGGA
ACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGCTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAACGTGGGGAGCAAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGT
GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG
CTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTTGC
ATGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTT
AGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGTGACAAC

S3_27F Secuencia 15. Cepa LS6-211P (*Stenotrophomonas sp.*)

ATGCAGTCGACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAAT
ACATCGGAATCTACCTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTTCG
GGTGAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTCGCGGATAGATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCG
GGGTAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGAACCTGGAAGT
AGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATC
CAGCCATACCGCTGGGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGT
CGGCTAATACCCGTTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTTGTTTA
AGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTA
GAGGGTAGTGAATCCCGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCCATGGCGAAG

Continuación Anexo 2. Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de bacterias

GCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCT
GGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAA
CGCGTTAAGTTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATGTC
GAGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAG
CTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTTGCCAGC

>S4-27F Secuencia 16. Cepa LS7-2111 (*Paenibacillus sp.*)

GGCTAAACATGCAGTCGAGCGGACTTGATGGAGTGCTTGCCTCCTGATGGTTAGCGGCGGACGGGT
GAGTAACACGTAGGTACCTGCCATAAGACTGGGATAACCCACGGAAACGTGAGCTAATACCAGATAG
GCATTTTCCTCGCATGAGGGAAATGAGAAAGGCGGAGCAATCTGTCACTTATGGATGGACCTGCGGCG
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGCC
AGGGAAGAACGCCTAGGAGAGTAACTGCTCTTAGGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAGCGTTGTCCGGAATTAATTGGGCGTAAAGCG
CGCGCAGGCGGCAATGTAAGTTGGGTGTTAAACCTAGGGCTCAACCTTGGGTGCGATCCAAAACCTGC
ATAGCTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGG
AACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTTCGATACC
CTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGACTGAAACTCAAAG
GAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAGGTCTTGACATCTGAATGACCGTCTAGAGATAGGGCTTTCCTTCGGGACATCAAGAC

>S5_27F Secuencia 17. Cepa TS10-111 (*Bacillus sp.*)

GAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACT
GGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAG
GCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC
AAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGG
CACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTATCCGGAATTAATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAAT
TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCT
GTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTTCCGCCCTTATAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGAC

Anexo 3. Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de hongos filamentosos identificados molecularmente.

>B1_ITS1 **Secuencia 18. Cepa TSI-2111 (*Monascus Purpureus*)**

CACCCGTGATTATTGTACCTCCTGTTGCTTCGGCGCGGCCCCCGGGGCCCGCCGGAGACATCTTCTC
GAACGCTGTCTTTGAAAAGGATTGCTGTCTGAGTAAACATACCAAATCGGTTAAAACTTTCAACAACGGA
TCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC
ATTACTGCCCTCAAGCGCGGCTTGTGTGTTGGGCCGCCGTCCCCTGCGCCTCCGGGCAAGGGGGAC
GGCCCGAAAGGCAGTGGCGGCCCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCA
GTAGGTCGGGCCGGGCCTTTGCCCTCTCCAACCTTTTTTTCCTTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG
GATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA

>B2_ITS1 **Secuencia 19. Cepa TSII-211 (*Neosartorya sp.*)**

CACCTCCCACCCGTGTCTATTGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTTTTCGAACGGCCGCGCCGGG
GAGGCTCGCGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAAGTATGC
AGTCTGAGTTTGATTATCATAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAA
GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAC
ATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTT
GTGTGTTGGGCCCCCGTCCCGGTTCTCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCCGACCCGCGT
CCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACACCCC
AACTTTATTTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGC

>B3_ITS1 **Secuencia 20. Cepa TSIII-2111 (*Neosartorya Glabra*)**

GTGTCTATTGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTTTTCGAACGGCCGCGCGGGGAGGCCTCGCG
CCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACCTGTTCTGAAAAGTATGCAGTCTGAGTTTG
ATTACCATAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCC
TGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGC
CCCCGTCCCGGTTCTCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCCGACCCGCGTCCGATCCTCGA
GCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACACCCCAACTTTATTTT
TCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTG

>B5_ITS1 **Secuencia 21. Cepa LLVII (*Byssochlamys Nivea*)**

TGTTGACCGACACCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAGGGCTCCCGCCCGGCCGCGGGGGGGCCTCG
TCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCTCGAACGCTGCCTTGAAGGTTGCCGTCTGAGTATA
AAATCAATCGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCGTTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGC
ATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTGCTAACCCCTCCAGCCCGGCTGGTGTGTTGGGCCG
CGTCCCCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCCGCGCCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGG
GGCTTTGTACACGCTCTGGTAGGCCCGGCCGGCTTGTGGCCAACGACCTCACGGTCACCTAACCTT
TCTCTTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT

>B6_ITS1 **Secuencia 22. Cepa TSIII-1212 (*Aspergillus Flavus*)**

GTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCGGGGGGCTCTCAGCCCCG
GGCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCA
ATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
ACTAGTGTGAATTGCAGAATTCGTTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCC
GGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGCTCGTCC
CCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCAAGGCAGCGGCCGACCCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGG
CTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGAC
CTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA

Anexo 4. Resultados de pruebas de antagonismo de las bacterias seleccionadas y tinciones de Gram realizadas a los pozos.

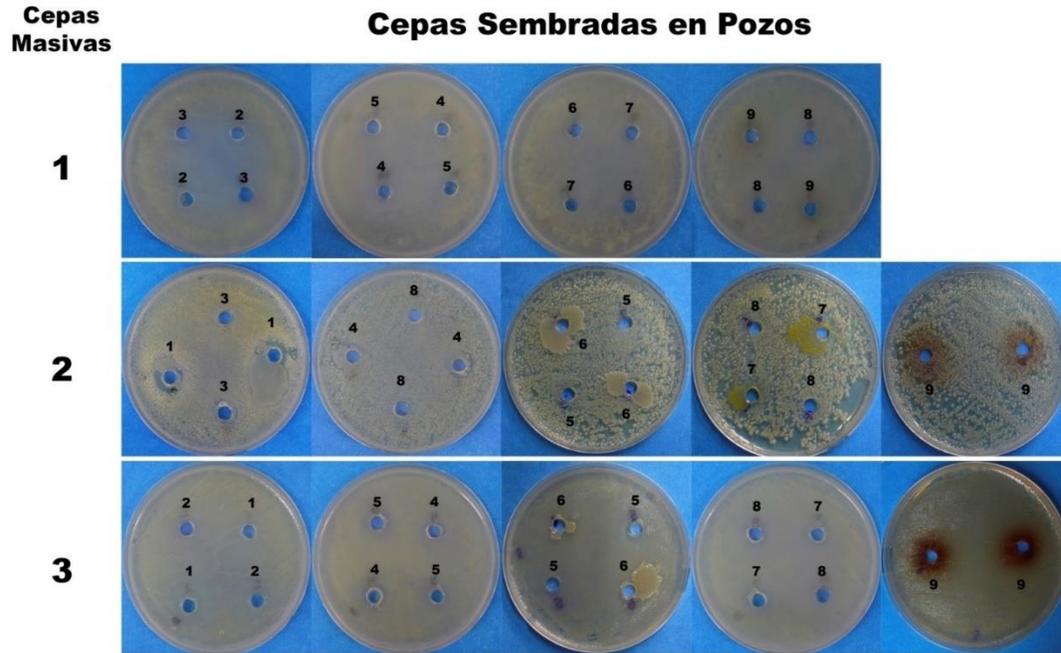


Figura 40. Confrontación de la Ceba 1 (*B. subtilis* DCL4-31F), Ceba 2 (*B. megaterium* LS5-11B) y Ceba 3 (*B. pumilus* TS13-2111u) frente al resto de las cepas seleccionadas. -

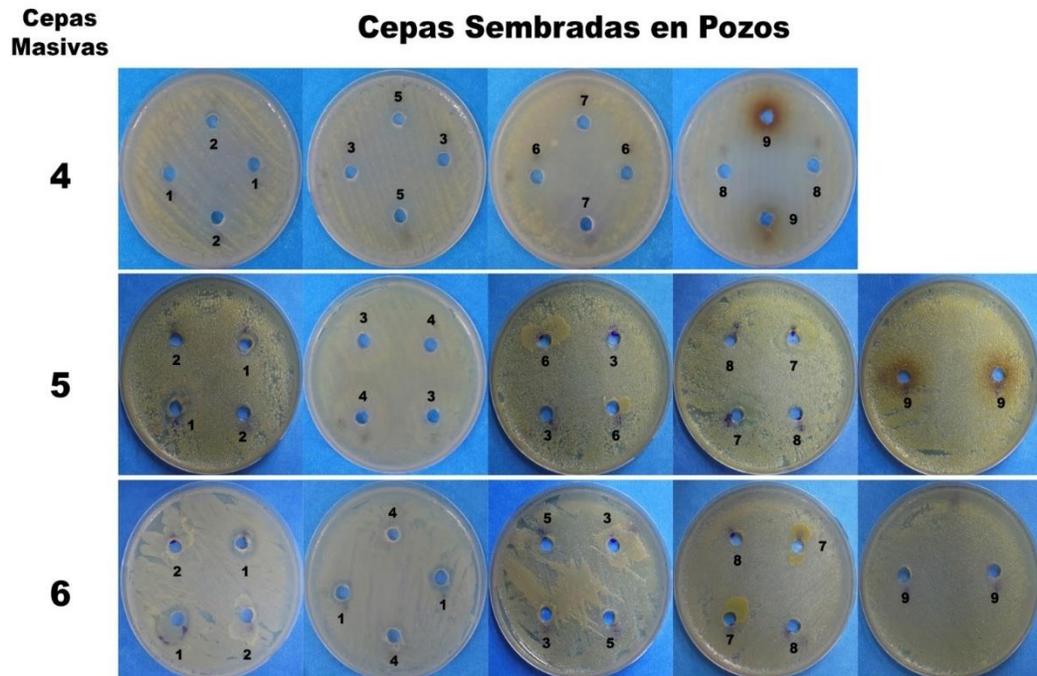


Figura 41. Confrontación de la Ceba 4 (*B. subtilis* LS6-11G), Ceba 5 (*B. megaterium* LL9-21) y Ceba 6 (*Acinetobacter calcoaceticus* MIVA-01) frente al resto de las cepas seleccionadas.

Cepas Masivas

Cepas Sembradas en Pozos

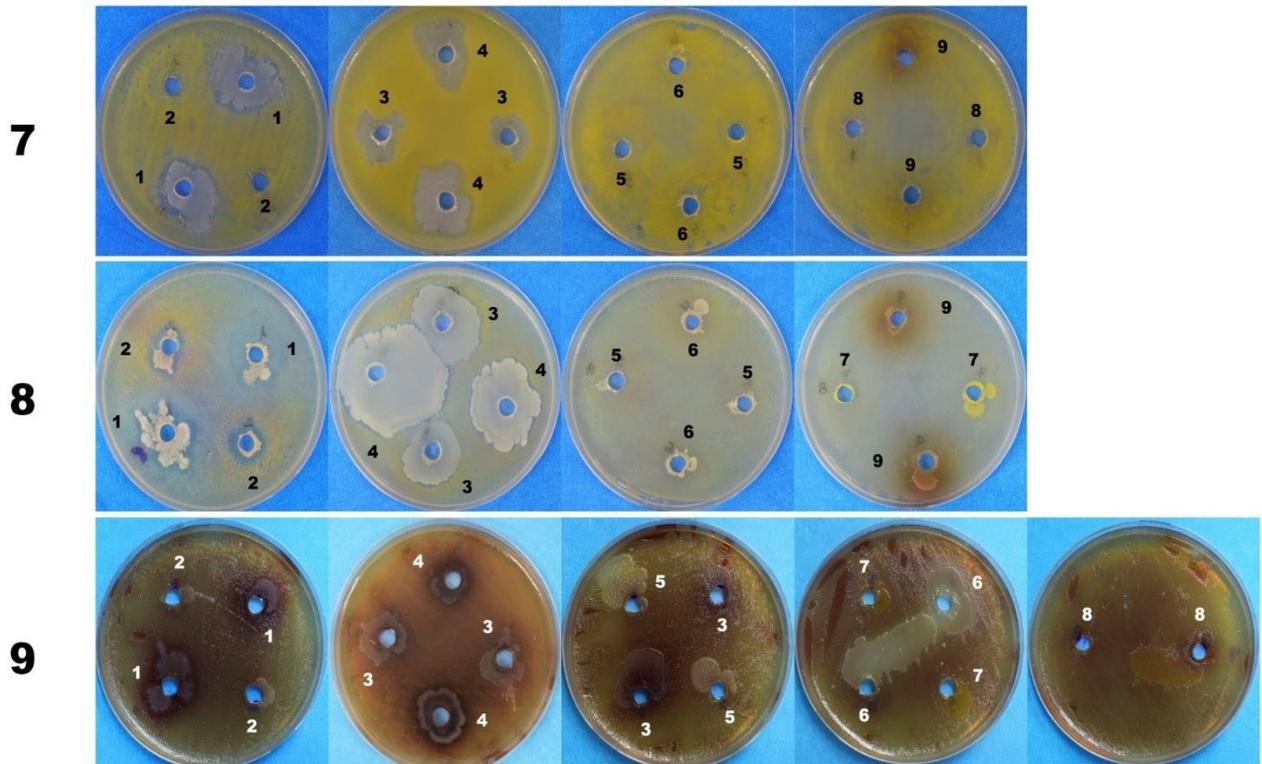


Figura 42. Confrontación de la Cepa 7 (*B. marisflavi* MIVB-01), Cepa 5 (*Exiguobacterium aurantiacum* MVIB-02) y Cepa 6 (*Pseudomona mendocina* PTLL4g) frente al resto de las cepas seleccionadas.

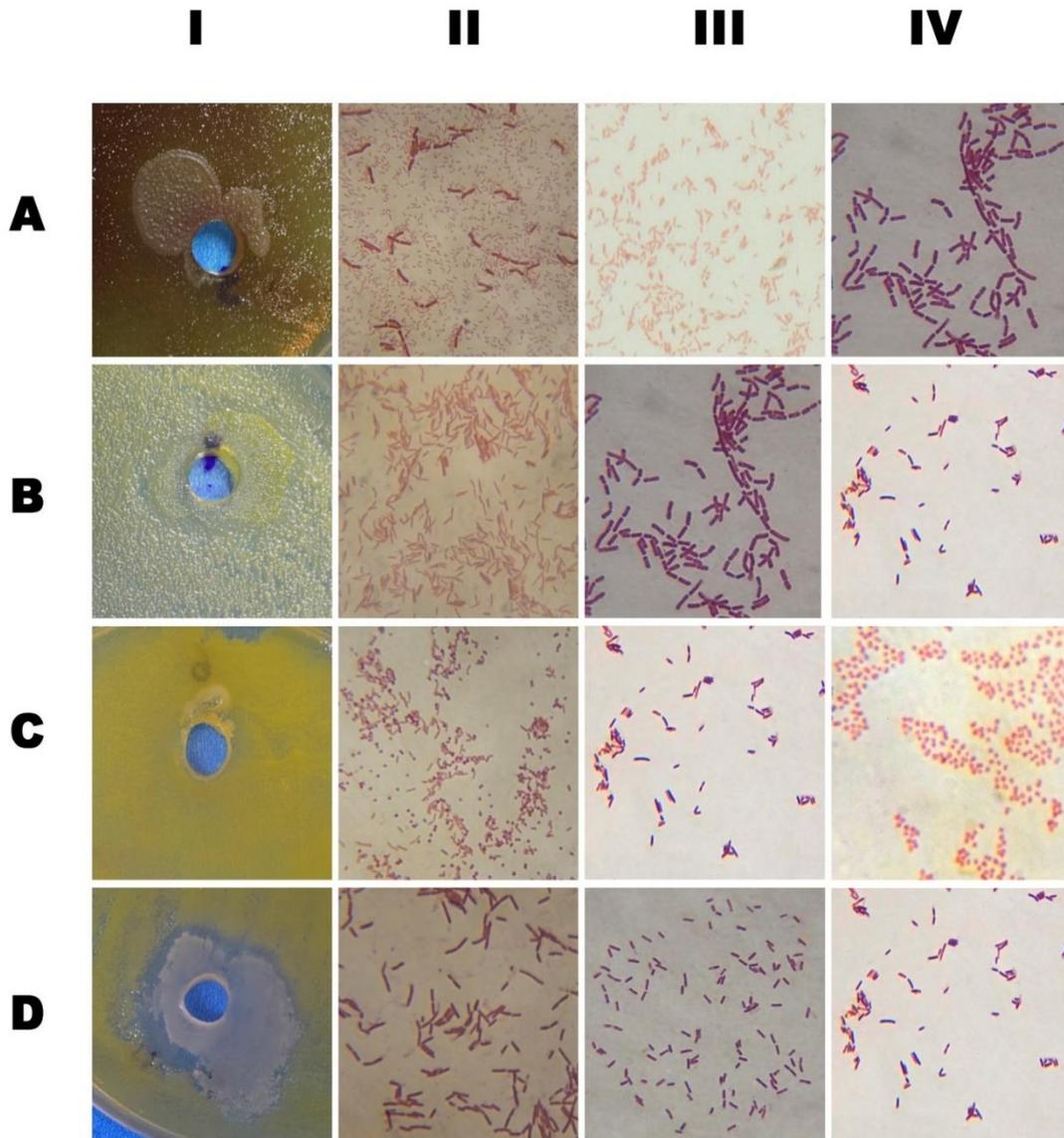


Figura 43. Tinciones de Gram realizadas para evidenciar los comportamientos observados en las pruebas de antagonismo. En la columna I se muestra la foto de los pozos, en la columna II tinción de Gram realizada a los pozos, columna III tinción de Gram de la Cepa sembrada en forma masiva y en la columna IV tinción de Gram de la cepa sembrada en pozos. AI-AIV: Cepa 9 sembrada de forma masiva y Cepa 5 sembrada en pozos (no hay antagonismo); BI-BIV: Cepa 5 sembrada de forma masiva y Cepa 7 sembrada en pozos (no hay antagonismo); CI-CIV: Cepa 7 sembrada de forma masiva y Cepa 6 sembrada en pozos (no hay antagonismo); DI-DIV: Cepa 7 sembrada de forma masiva y Cepa 1 sembrada en pozos (presencia de antagonismo).

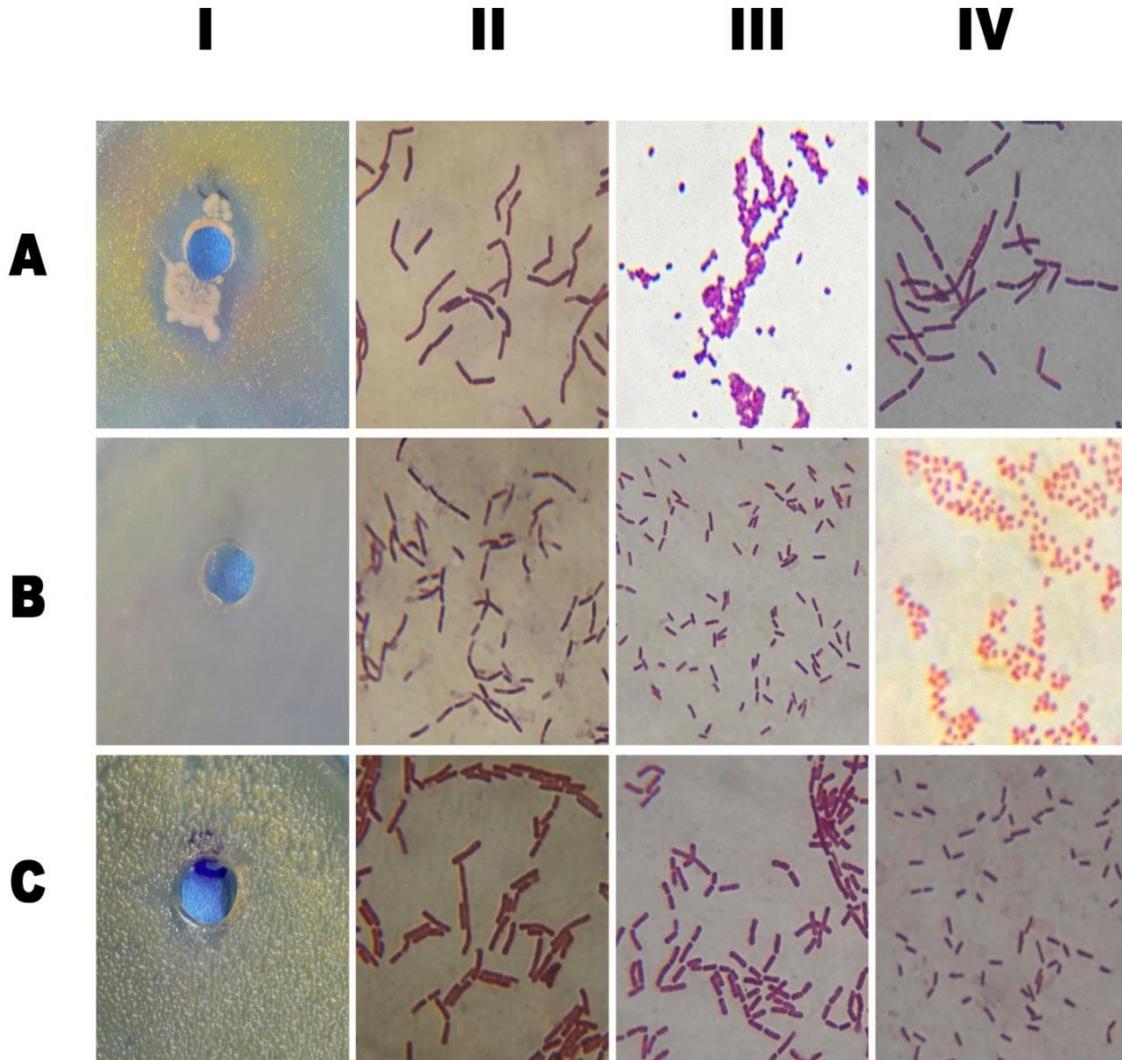


Figura 44. Tinciones de Gram realizadas para evidenciar los comportamientos observados en las pruebas de antagonismo. En la columna I se muestra la foto de los pozos, en la columna II tinción de Gram realizada a los pozos, columna III tinción de Gram de la Cepa sembrada en forma masiva y en la columna IV tinción de Gram de la cepa sembrada en pozos. AI-AIV: Cepa 8 sembrada de forma masiva y Cepa 2 sembrada en pozos (efecto antagónico positivo); BI-BIV: Cepa 1 sembrada de forma masiva y Cepa 6 sembrada en pozos (efecto antagónico positivo); CI-CIV: Cepa 5 sembrada de forma masiva y Cepa 3 sembrada en pozos (efecto antagónico positivo).

Anexo 5. Resultados de las pruebas del consorcio biofertilizante en macrotúnel para cultivos de interés agrícola
5.1 Fases del cultivo del Chiltoma en macrotúnel

Cultivo de Chiltoma



Figura 45. Fases del cultivo de chiltoma en macrotúnel. 1. Trasplante de plántulas a maceteras; 2. Fertilización química; 3. Fertilización Biológica; 4. Crecimiento de la planta; 5. Floración; 6. Desarrollo de frutos; 7 y 8. Cosecha; Medición de variables de interés en Chiltoma.

Continuación Anexo 5. Resultados de las pruebas del consorcio biofertilizante en macrotúnel para cultivos de interés agrícola

5.2 Fases del cultivo de Pepino en macrotúnel

Cultivo de Pepino

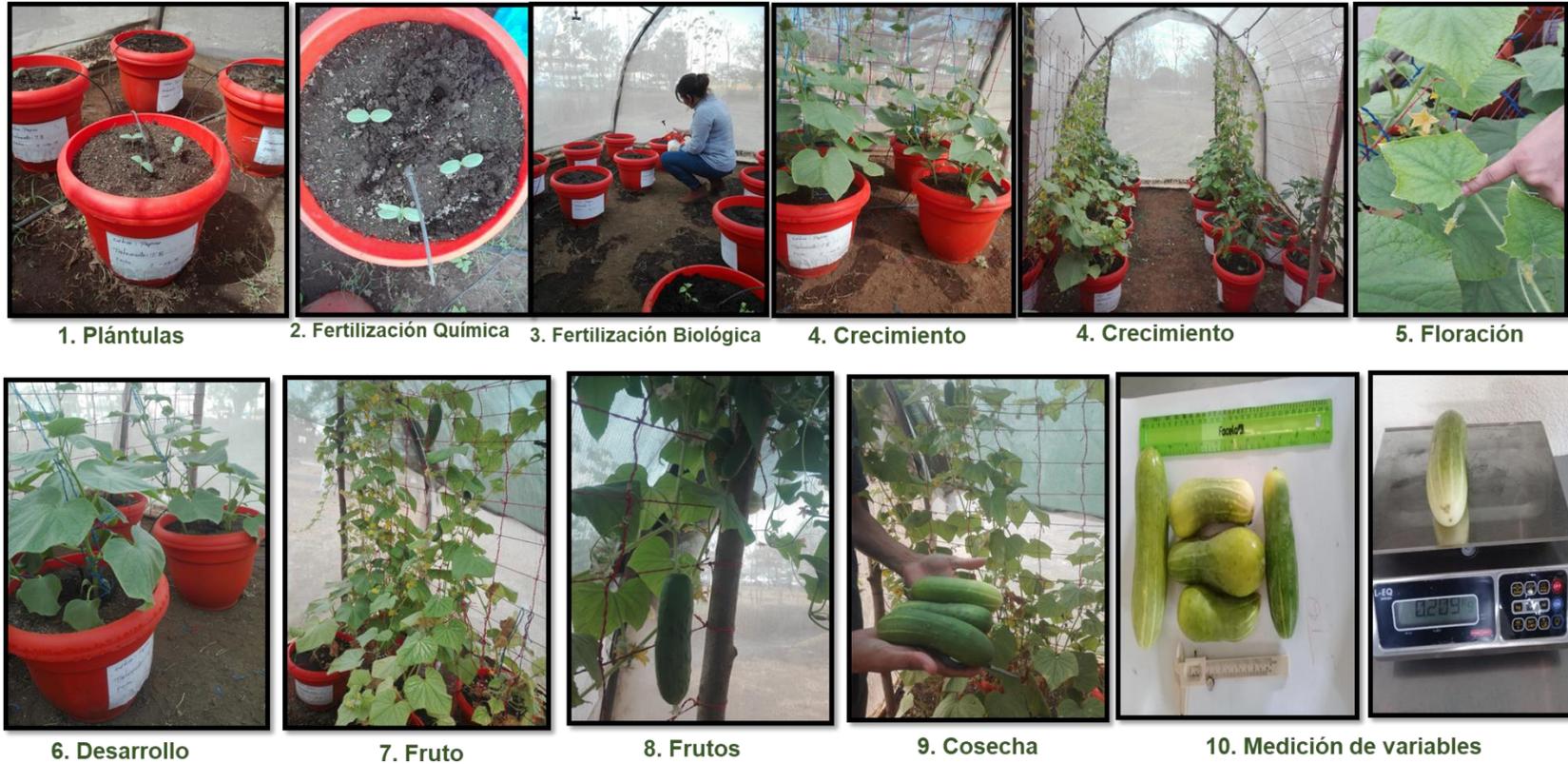


Figura 46. Fases del cultivo de Pepino en macrotúnel. 1. Crecimiento de plántulas a maceteras; 2. Fertilización química; 3. Fertilización Biológica; 4. Crecimiento de la planta; 5. Floración; 6. Desarrollo; 7. Frutos; 8. Cosecha; 9. Medición de variables de interés del pepino.

Continuación Anexo 5. Resultados de las pruebas del consorcio biofertilizante en macrotúnel para cultivos de interés agrícola

5.3 Fases del cultivo de Rábano en macrotúnel

Cultivo de Rábano

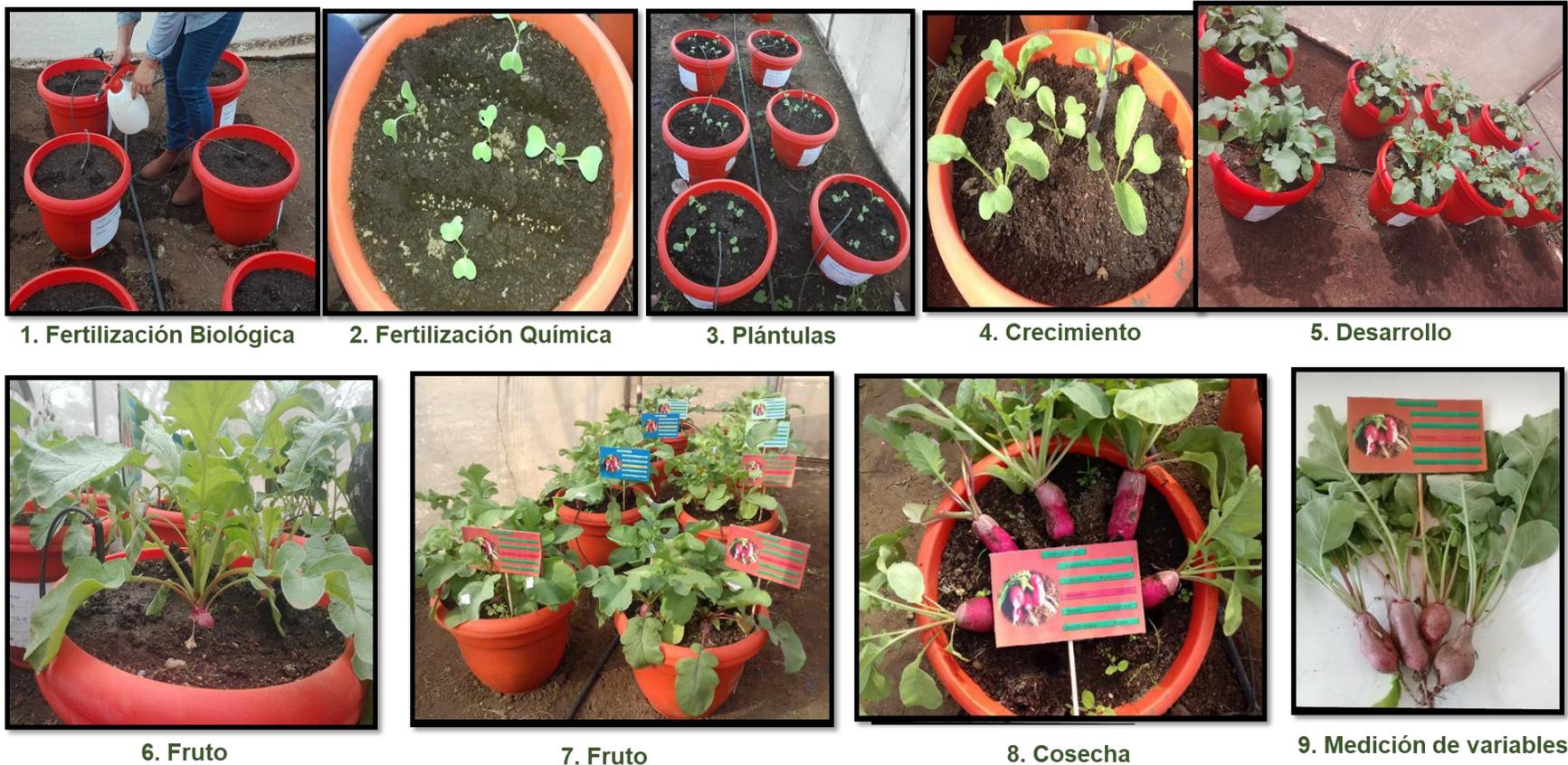


Figura 47. Fases del cultivo del Rábano en macrotúnel. 1. Fertilización Biológica a maceteras; 2. Fertilización química; 3. Crecimiento de plántulas; 4. Crecimiento de la planta; 5. Desarrollo; 6. Frutos; 7. Frutos; 8. Cosecha; 9. Medición de variables de interés del rábano.

Publicaciones

Uno de los retos que enfrentan las investigaciones realizadas en el país, es la falta de divulgación de los resultados, que llegue a los tomadores de decisión y actores de cambio. Por ése motivo en el presente trabajo se quiere resaltar las 3 publicaciones que surgieron de las diferentes etapas del proceso de investigación y que a continuación se presentan:

- 1) La presentación en el Tercer foro de Proyectos de investigación, desarrollo, innovación, posgrado y extensión de la Universidad Nacional de Ingeniería, realizado el 13 y 14 de noviembre de 2018. Conferencia denominada: “Identificación molecular de microorganismos aislados a partir de bioinsumos producidos artesanalmente en Nicaragua”.
<https://drive.google.com/file/d/13upg64lrVUcLmedkJ0tD7h9h298p3pTj/view>
- 2) La presentación en el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería 23 al 28 de junio de 2019 en León – Guanajuato, México; Denominada: “Descifrando el contenido microbiano de los bioinsumos artesanales producidos en Nicaragua y su utilidad agrícola”.
<https://smbb.mx/wp-content/uploads/2019/06/PROGRAMA-FINAL-2019-BIOTECNOLOG%C3%8DA.pdf>
- 3) Una tercera que se está gestionando la publicación una revista internacional de alto impacto. Con el título de: “Molecular identification of microbial isolated from artisanal inoculants in Nicaragua. Con lo que contribuimos a la difusión de los resultados de investigación a nivel Nacional y el trabajo científico técnico de los docentes y alumnos de la Maestría en Biotecnología.

GLOSARIO

ADN: Ácido Desoxirribonucleico. Ácido nucleico formado por nucleótidos en que el azúcar es desoxirribosa, y las bases nitrogenadas son adenina, timina, citosina y guanina. Excepto en los retrovirus que tienen ARN, el ADN codifica la información para la reproducción y funcionamiento de las células y para la replicación de la propia molécula de ADN. Representa la copia de seguridad o depósito de la información genética primaria, que en las células eucariotas esta confinada en la caja fuerte del núcleo.

Antagonismo: El antagonismo microbiano está dado por la inhibición, deterioro o muerte de alguna especie de microorganismos por la acción de otra; o una relación entre dos poblaciones en la cual una de ellas causa efectos negativos a la otra.

Antibiosis: fenómeno biológico en el que existe una detención o destrucción del crecimiento microbiano debido a sustancias producidas por otro ser vivo.

Antibióticos: sustancias producidas por un ser vivo que se oponen al desarrollo de otro ser vivo.

Anamorfo: estado asexual o imperfecto de un hongo.

Antimicrobianos: sustancias que matan o inhiben el crecimiento de los microorganismos (antibacterianos, antifungosos, etc.).

Antisepsia: operaciones o técnicas encaminadas a crear un ambiente que impida el desarrollo de los microorganismos e incluso pueda matarlos.

Antisépticos: son aquellas sustancias químicas que previenen el crecimiento o acción de los microorganismos ya sea destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento y actividad.

Asepsia: técnicas empleadas para impedir el acceso de microorganismos al ambiente de trabajo.

Bioedit: Es un programa informático de secuencias el cual permite la manipulación y análisis de múltiples secuencias y contiene aplicaciones que facilitan su alineamiento.

Biocontrol: El control biológico es un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo.

Biofertilizante: Es un fertilizante orgánico natural que ayuda a proporcionar a las plantas todos los nutrientes que necesitan y a mejorar la calidad del suelo creando un entorno microbiológico natural.

Biopreparado: Son sustancias que utilizan productos de origen vegetal animal o mineral que se encuentran presentes en la naturaleza, que contienen propiedades nutritivas para las plantas o repelentes y atrayentes de insectos para la prevención y control de plagas y/o enfermedades, mejorando así los sistemas productivos.

BLAST: Es un programa informático que emplea un algoritmo heurístico que lleva a cabo un alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (también denominada en la literatura secuencia query) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos.

Caloro: variedades de *Capsicum annuum L* (Referida al chile jalapeño)

Cepa bacteriana: es un conjunto de bacterias con igualdad en términos de sus características biológicas, es decir, bacterias de la misma especie, se llaman cepas o colonias bacterianas.

Conidios: estructuras propagativas de los hongos producidas al extremo de un conidióforo.

Esporas: unidad reproductiva de los hongos, que se forma dentro de un esporangio.

Esporulación: proceso que ocurre en los hongos y está relacionado con la producción de esporas, conidios, etc.

Eucariota: Célula que tiene el núcleo diferenciado mediante una membrana

Filogenia: La filogenia es la relación de parentesco entre especies o taxones en general

Fitopatógeno: Se denomina fitopatógeno a un microorganismo, que genera enfermedades en las plantas a través de disturbios en el metabolismo celular, al secretar enzimas, toxinas, fitoreguladores y otras sustancias y, además, absorbiendo nutrientes de la célula para su propio crecimiento.

Fluorocromo: Los fluorocromos son sustancias que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando son excitados por un fotón incidente de una longitud de onda característica.

Hifa: cada uno de los filamentos tubulares que constituyen el micelio en todo su espesor, lo cual confiere un aspecto no estratificado.

Inoculante microbiano: son productos tecnológicos basados en microorganismos, promotores del crecimiento vegetal.

MEGA: Es una herramienta para trabajar con el alineamiento de secuencias manual y automáticamente para la realización de árboles filogenéticos empleando

secuencias de bases de datos, también estima rangos de evolución molecular y examina hipótesis evolutivas.

Metabolismo: actividad bioquímica que ocurre en los seres vivos para llevar a cabo los procesos esenciales para su supervivencia.

Microbiota: Conjunto de microorganismos que se encuentran generalmente asociados al suelo y plantas, animales y humanos. Los microorganismos residen en estos lugares de forma más o menos permanente y en algunos casos realizan funciones específicas.

Monofilético: En filogenia, un grupo es monofilético (del griego: de una rama) si todos los organismos incluidos en él han evolucionado a partir de un ancestro común, y todos los descendientes de ese ancestro están incluidos en el grupo.

Morfología: estudio de la forma y estructura externa de los seres vivos.

Parafilético: En filogenia un grupo es parafilético cuando incluye al ancestro común de sus miembros, pero no a todos los descendientes de este.

Patógeno: término que se aplica a cualquier elemento que causa enfermedades. Organismo que causan una enfermedad.

Saprófito: organismo que vive de materia orgánica muerta o en descomposición.

Screen: screen es un vocablo anglosajón, como verbo se puede utilizar para indicar acciones como filtrar, cernir, separar, dividir, etc.

Teleomorfo: estado sexual o perfecto de un hongo.

Tinción: efecto de teñir o dar color.

Traslocar: acción de ser transportado de un lugar a otro.

ABREVIATURAS

Abs: absorbancia

ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosomal.

AIA: Ácido Indol Acético

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal.

ATP: trifosfato de adenosina (ATP), es la principal fuente de energía de los seres vivos.

Bac: Bacteria

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico).

BPCV: Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

DCL: Del Campo líquido.

DDS: Días después de la siembra.

ITS: Internal Transcribed Space (Espacio Interno Transcrito)

HMA: hongos micorrízico arbusculares

LB Broth: Caldo Luria Bertani.

LL: Licoroy líquido.

LS: Licoroy sólido.

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Análisis de Genética Evolutiva Molecular).

NCBI: National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información de Biotecnología).

nm: nanómetros.

pb: Pares de bases.

PIENSA: Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales.

pH: Potencial hidrógeno.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PCA: Plate Count Agar.

PDA: Papa Dextrosa Agar.

PGPM: Microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPM, por sus siglas en inglés)

PSB: Bacterias solubilizadoras de fosfato (Por sus siglas en inglés)

TB: Tratamiento Biológico

To: Tratamiento Testigo (cero)

TQ: Tratamiento Químico

TS: Tisey sólido.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias