

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**Desarrollo del proceso de producción a escala de laboratorio,
para el crecimiento de un consorcio microbiano con
propiedades biofertilizantes aislados de bioinsumos
artesanales.**

Trabajo de diploma presentado por:

Br. Laura Sofía Guillén Rodríguez

Br. Griselda Isabel Martínez Laguna

Para optar a Título de:

Ingeniero Químico

Tutor:

PhD. Leandro Alberto Páramo Aguilera

Managua, Nicaragua

Noviembre 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a Dios por haberme permitido cumplir esta meta en mi vida, por darme cada día la fuerza y el conocimiento necesarios para culminar este trabajo.

A mi madre por brindarme su cariño, apoyo incondicional y por enseñarme a superarme a pesar de las dificultades.

A un amigo muy cercano, el Ingeniero Norlan Caldera a quien considero como parte de mi familia por siempre estar dispuesto a brindarme su ayuda en todo momento.

Al Doctor Leandro Alberto Páramo Aguilera por confiar en nosotros al poner en nuestras manos la realización de esta investigación, por ser un tutor paciente y siempre dispuesto a compartir sus conocimientos.

A mi compañera en este camino Griselda Martínez y a la ingeniera Johana Lisseth O`Connor Mendoza por su compromiso y esfuerzo para culminar esta investigación.

También agradezco a mi familia y amigos, en especial a mi tía Sonia Pérez, a mis primos y padrinos Ivette García y Pedro Rodríguez por sus palabras de ánimo y consejos que me brindaron a lo largo de todo este proceso.

Finalmente agradezco al Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA) por poner a nuestra disposición sus instalaciones lo cual hizo posible la realización de este trabajo.

Laura Sofía Guillén Rodríguez.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado la oportunidad de cumplir esta meta, por darme salud, fuerzas y esta maravillosa oportunidad de aprendizaje.

A nuestro tutor el Doctor Leandro Páramo Aguilera, por habernos dado la oportunidad y la confianza para desarrollar este proyecto, por haber tenido la paciencia de guiarnos y corregirnos durante todo el proceso de este trabajo.

A la Ing. Johana O`Connor Mendoza, quien también depositó su confianza en nosotras y nos dio la oportunidad de realizar este proyecto, por su constante apoyo y consejo.

Al Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA) por abrirnos las puertas y permitirnos el uso de sus laboratorios para el desarrollo de esta investigación, y también al personal del Laboratorio de microbiología.

A mis padres que me han dado su apoyo y se han esforzado por darme la oportunidad de prepararme profesionalmente.

A mi compañera de tesis Laura Guillén Rodríguez que tuvo la confianza de realizar esta investigación conmigo, por su constante apoyo y amistad.

A mis amigos y familiares quienes me brindaron consejos y fortalezas para continuar y culminar este proyecto tan importante de mi vida.

Griselda Isabel Martínez Laguna.

DEDICATORIA

A mi Dios Jehová por el hermoso regalo de la vida, por ser mi luz y esperanza en mis momentos difíciles y mi motivo de celebración es mis mejores momentos.

A mi madre Rosario Rodríguez por ser mi pilar y mi ejemplo a seguir, quien siempre ha estado a mi lado para corregirme y guiarme. Es gracias a su esfuerzo que he llegado hasta aquí.

Y a mi hermano Diego por ser mi compañía en todo momento.

Laura Sofía Guillén Rodríguez.

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía y mi fuerza durante toda mi vida, por darme paciencia y salud para culminar esta etapa, por colmarme de su infinita misericordia, bondad y amor.

A mi madre Griselda Antonia Laguna Orozco, quien es mi luz y mi fuerza para poder superarme, por ser el mayor pilar en mi vida, por sus consejos y sus valores, por creer siempre en mí, por darme su amor infinito y porque ha dado su vida para que pueda ser una persona de bien.

A mi padre Manuel Salvador Martínez Fonseca, quien ha sido un gran ejemplo en mi vida, por ser perseverante y darme su amor, apoyo y fuerzas para continuar y poder superarme y así poder convertirme en una persona de bien.

A mis familiares que me han dado su infinito apoyo y amor durante todo este proceso.

Griselda Isabel Martínez Laguna.

RESUMEN

Los biofertilizantes pueden estar formados por cepas individuales o en consorcios microbianos también conocidos como bioinoculantes. En Nicaragua al ser un país predominantemente agrícola existe una alta dependencia de los fertilizantes químicos debido a la poca oferta de bioinsumos (biofertilizantes o bioplaguicidas) y los que hay en existencia se elaboran a nivel artesanal por lo que no existen estudios que respalden la composición exacta ni el funcionamiento de estos. Es debido a lo anterior, que el principal objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de un consorcio microbiano con propiedades biofertilizantes a partir de aislados de bioinsumos artesanales. Para lograr el cumplimiento del objetivo antes mencionado, se realizó la caracterización morfológica (macroscópica y microscópica) y molecular a través de los resultados de la extracción y secuenciación del ADN de 29 microorganismos (23 bacterias y 6 hongos filamentosos) aislados de 4 bioinsumos artesanales provenientes del occidente y norte de Nicaragua.

Al finalizar el trabajo, se obtuvo 14 tipos de morfología macroscópica de las colonias del total de bacterias (Color crema, consistencia cremosa y bordes redondeados) y mediante la tinción Gram se obtuvo que 22 presentan forma bacilar (15 Gram positivas y 7 Gram negativas) y 1 una de forma cocal Gram positiva. De los 6 hongos filamentosos, se obtuvo una variedad de caracteres de la morfología de sus colonias y se observó que 5 hongos filamentosos presentaron esporas esféricas y 1 con forma ovalada. La identificación bacteriana por vía molecular, permitió identificar 12 bacterias hasta el nivel de especie (*B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* (2), *B. cereus*, *B. subtilis* (2), *B. flexus*, *Lysinibacillus macroides* (2), *Agrobacterium tumefaciens* y *Staphylococcus succinus*) y 11 hasta nivel de género (*Bacillus* sp. (6), *Stenotrophomonas* sp. (4) y *Paenibacillus* sp), mientras que la identificación molecular de hongos filamentosos permitió identificarlos como: *Monascus purpureus*, *Neosartorya glabra*, *Byssoschlamys nivea*, *Aspergillus flavus* y 1 a nivel de género *Neosartorya* sp.

Las pruebas de antagonismo permitieron seleccionar a los integrantes del consorcio microbiano, quedando conformado por: *B. megaterium*, (solubiliza fosfatos, produce ácido indol acético y fija nitrógeno), *B. marisflavis*, (fija nitrógeno), *Exiguobacterium aurantiacum*, (productora de ácido indol acético) y *Pseudomonas mendocina* (promotora del crecimiento vegetal, aumenta la biomasa de brotes y raíces, y los niveles de P y Fe). La cinética microbiana, para todas las bacterias seleccionadas mostró índices máximos de crecimiento que rondan los 10⁹ UFC/mL en producciones desarrolladas a nivel de shaker, con tiempos para alcanzar su punto máximo de crecimiento que oscilan entre 4.57 a 6.38 horas. Finalmente, la evaluación de la estabilidad de cada una de las bacterias que conformaron el consorcio microbiano, almacenadas a temperaturas de refrigeración de 4° C durante 60 días, arrojó que *B. megaterium* y *Exiguobacterium aurantiacum*, redujeron su viabilidad entre el 14 al 17 % aproximadamente; mientras que *B. marisflavis* y *Pseudomonas mendocina*

permanecen con índices de viabilidad prácticamente constantes durante el periodo en estudio.

Otros resultados que destacan de este trabajo, son que cada bioinsumo en estudio mostró que contiene por muestra: **TS**: 5 bacterias (*B. thuringiensis*, *B. pumilus*, 2 *Bacillus sp.* y *Stenotrophomonas sp.*) y 4 hongos filamentosos (*Monascus purpureus*, *Neosartorya glabra*, *Neosartorya sp.* y *Aspergillus flavus* – reportado como patógeno para cultivos); **LS**: 6 bacterias (*B. megaterium*, *B. subtilis*, 2 *Stenotrophomonas sp.*, 1 *Paenibacillus sp.* y 1 *Bacillus sp.*) y 1 hongo filamentosos no secuenciado; **LL**: 3 bacterias (*B. megaterium*, *Staphylococcus succinus* y *Bacillus sp.*) y 1 hongo filamentosos (*Byssochlamys nivea*) y el bioinsumo **DCL** contiene: 9 bacterias (*B. subtilis*, *B. flexus*, *B. cereus* – patógeno para el ser humano, 2 *Lysinibacillus macroides*, *Agrobacterium tumefaciens*, 2 *Bacillus sp.* y *Stenotrophomonas sp.* En cuanto a los hongos filamentosos, se encontró que la **TS**, contiene *Aspergillus flavus* (patógeno para el ser humano y los animales), *Monascus purpureus* y *Neosartorya glabra* (beneficiosos a la industria farmacéutica), *Neosartorya sp.* (utilizado en procesos de biorremediación) y la muestra **LL** contiene *Byssochlamys nivea* (Beneficioso para la agricultura como controlador biológico, Indeseable en procesos de preservación de fruta).

Del análisis de las aplicaciones biotecnológicas de las bacterias se logró identificar que algunos de los bioinsumos presentan bacterias patógenas al ser humano como *B. cereus* (**muestra DCL**) y otras bacterias que pudiesen estar desarrollando actividades no útiles agrónomicamente, como *Agrobacterium tumefaciens*, *B. flexus* (**muestra DCL**), y *Staphylococcus succinus* (**muestra LL**); así como algunas que poseen importantes aplicaciones industriales y ambientales como *B. flexus* y *Lysinibacillus macroides* (**muestra DCL**), además de *Stenotrophomonas sp.* (**Muestras DCL y LS**).

Contenido	Página
AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA.....	III
RESUMEN	V
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo General	4
2.2 Objetivos Específicos	4
III. MARCO TEÓRICO	5
3.1 Consorcio Microbiano.....	5
3.2 Rizobacterias Promotoras del crecimiento vegetal (RPCV)	5
3.2.1 Mecanismos de acción	5
3.3 Aplicación de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) en las especies vegetales.....	7
3.3.1 Biofertilizantes	8
3.3.1.1 Tipos de biofertilizantes.....	8
3.4 Cultivo de microorganismos en el laboratorio	10
3.4.1 Siembra de microorganismos	10
3.5 Identificación de microorganismos	11
3.5.1 Morfología bacteriana	11
3.5.1.1 Macroscópica	12
3.5.1.2 Microscópica	13
3.5.2 Morfología de los hongos.....	15
3.5.3 Identificación molecular de los microorganismos	18
3.5.3.1 Fundamentos de la identificación molecular	19
3.6 Antagonismo microbiano	22
3.7 Crecimiento microbiano.....	23
3.7.1 Crecimiento microbiano en cultivo discontinuo.....	23
3.7.2 Medición del crecimiento microbiano	25
IV. METODOLOGÍA.....	27

4.1	Ubicación del estudio	27
4.2	Caracterización morfológica y molecular de los microorganismos aislados de bioinsumos artesanales	27
4.2.1	Conservación de los microorganismos aislados de bioinsumos artesanales	27
4.2.2	Caracterización morfológica de los microorganismos aislados de bioinsumos artesanales.....	30
4.2.3	Identificación molecular de los microorganismos aislados de bioinsumos artesanales.....	32
4.3	Pruebas de antagonismo y selección de los microorganismos que conformaron el consorcio microbiano	35
4.4	Construcción de la curva cinética de crecimiento y evaluación de la estabilidad de los cultivos producidos individualmente que forman parte del consorcio microbiano.....	38
4.4.1	Construcción de curva de crecimiento por método turbidimétrico ..	38
4.4.2	Pruebas de anaquel o de estabilidad acelerada.....	39
V.	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
5.1	Caracterización morfológica y molecular de los microorganismos aislados de bioinsumos artesanales	41
5.1.1	Caracterización morfológica de bacterias aisladas de bioinsumos artesanales	42
5.1.2	Caracterización morfológica de hongos filamentosos aislados de bioinsumos artesanales.....	46
5.1.3	Identificación molecular de bacterias aisladas de bioinsumos artesanales	49
5.1.4	Identificación molecular de hongos filamentosos aislados de bioinsumos artesanales.....	54
5.2	Pruebas de antagonismo y selección de los microorganismos que conformaron el consorcio microbiano	57
5.3	Construcción de la curva cinética de crecimiento y evaluación de la estabilidad de los cultivos producidos individualmente que forman parte del consorcio microbiano.....	74
5.3.1	Construcción de curva de crecimiento por método turbidimétrico ..	74
5.3.2	Pruebas de anaquel o de estabilidad acelerada.....	80

VI.	CONCLUSIONES	83
VII.	RECOMENDACIONES	85
VIII.	GLOSARIO	86
IX.	ABREVIATURAS	89
X.	BIBLIOGRAFÍA	91
XI.	ANEXOS	103
	Anexo 1. Árbol filogenético de bacterias 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. Fuente: Propia.	103
	Anexo 2: Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de bacterias identificadas molecularmente.....	106
	Anexo 3. Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de hongos filamentosos identificados molecularmente.....	114
	Anexo 4. Resultados de pruebas de antagonismo de las bacterias seleccionadas y tinciones de Gram realizadas a los pozos.....	116
	Anexo 5. Publicaciones realizadas.	121
	Anexo 5.1 Identificación molecular de microorganismos aislados a partir de Bioinsumos producidos artesanalmente en Nicaragua	121
	Anexo 5.2 Descifrando el contenido microbiano de los bioinsumos artesanales producidos en Nicaragua y su utilidad agrícola	121

Índice de Figuras

<i>Figura 1.</i> Representación esquemática de la forma, superficie y bordes de diferentes tipos de colonias bacterianas desarrolladas. Adaptado de (Pumarola <i>et al.</i> , 1991).	13
<i>Figura 2.</i> Tipos de bacterias según su morfología microscópica. Adaptado de (Liébana, 2002).	14
<i>Figura 3.</i> Método de tinción de Gram. Adaptado de (Murray <i>et al.</i> , 2013).	15
<i>Figura 4.</i> Formación de una colonia por un hongo filamentoso. En los cuadros se muestran los tipos de hifas, y el micelio vegetativo y reproductor. Adaptado de (Liébana, 2002).	16
<i>Figura 5.</i> Formas y superficie de las esporas asexuales. Adaptado de (Pumarola <i>et al.</i> , 1991).	17
<i>Figura 6.</i> Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S. Adaptado de (Rodicio y Mendoza, 2004).	19
<i>Figura 7.</i> Fases del crecimiento bacteriano. Adaptado de (Murray, 2013).	24
<i>Figura 8.</i> 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 el autoclave a 121° C durante 15 minutos; D) Placas Petri con el medio de cultivo solidificado. Fuente: Propia.	28
<i>Figura 9.</i> Método de siembra de bacterias por agotamiento de estrías. Fuente: Propia.	29
<i>Figura 10.</i> Siembra de hongos filamentosos. A) Toma de muestra del micelio; B) Deposito de la muestra en el medio PDA; C) Crecimiento del hongo después de 5 días. Fuente: Propia.	30
<i>Figura 11.</i> 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: Propia.	31
<i>Figura 12.</i> Técnica de cinta adhesiva para la observación de esporas en hongos filamentosos. 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: Propia.	32
<i>Figura 13.</i> Corrección de errores. A) Electroferograma corregido con el uso de Bioedit v7.0.9.; B) Secuencia corregida guardada en formato FASTA. Fuente: Propia.	33

<i>Figura 14.</i> 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: Propia.....	34
<i>Figura 15.</i> 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. Fuente: Propia.	34
<i>Figura 16.</i> Se muestra la distribución de las bacterias confrontadas, (1): bacteria sembrada de forma masiva; (2 y 3): bacterias sembradas en pozos en los 4 círculos de color azul, donde los números representan los códigos de las bacterias confrontadas. Fuente: Propia.	37
<i>Figura 17.</i> Combinaciones utilizadas en las pruebas de antagonismo para cada una de las cepas seleccionadas. Fuente: Propia.....	37
<i>Figura 18.</i> Preparación del pre-inóculo. A) Inoculación de bacterias seleccionadas en medio líquido; B) Crecimiento en Shaker durante 16 horas a 170 rpm. Fuente: Propia.....	38
<i>Figura 19.</i> Construcción de la curva de crecimiento. A) Inoculación a un volumen mayor; B) Crecimiento en Shaker durante 6 horas; C) Medición de la absorbancia espectrofotómetro. Fuente: Propia.	39
<i>Figura 20.</i> Recuento en placa y diluciones seriadas. Adaptado de (Tortora <i>et al.</i> , 2007).....	40
<i>Figura 21.</i> 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; Fuente: Propia.	45
<i>Figura 22.</i> 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: Propia.....	47
<i>Figura 23.</i> 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: Propia.	50
<i>Figura 24.</i> 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: Propia.	55

Figura 25. Morfología en placa y Tinción de Gram de bacterias seleccionadas del banco de microorganismos del PIENSA. AI: *Acinetobacter calcoaceticus* (MVIA-01); AII: *Bacillus marisflavi* (MIVB-01); BI: *Exiguobacterium aurantiacum* (MVI B-02); BII: *Pseudomonas mendocina* (PTLL4g). Fuente: Propia. 65

Figura 26. Resultados de las pruebas de antagonismo. AI, AII, BI y BII: casos en los que se observó antagonismo, AI: bacteria 7 sembrada de forma masiva con bacterias 1 y 2 sembradas en pozos, AII: bacteria 1 sembrada de forma masiva con bacterias 7 y 6 sembradas en pozos, BI: bacteria 8 sembrada de forma masiva con bacterias 3 y 4 sembradas en pozos y BII: bacteria 3 sembrada de forma masiva con bacterias 7 y 8 sembradas en pozos; AIII y BIII: casos en los que no hay antagonismo, AIII: bacteria 8 sembrada de forma masiva con bacterias 7 y 9 sembradas en pozos y BIII: Bacteria 9 sembrada de forma masiva con bacterias 3 y 5 sembradas en pozos. Fuente: propia. 71

Figura 27. Tinciones 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 la tinción de Gram realizada alrededor de los pozos, columna III morfología microscópica de las bacterias sembradas en forma masiva y en la columna IV morfología microscópica de las bacterias sembradas en pozos. AI-IV: bacteria 9 sembrada de forma masiva y bacteria 2 sembrada en pozos, observando que no hay antagonismo; BI-IV: bacteria sembrada de forma masiva 7 y bacteria 1 sembrada en pozos y CI-IV: bacteria 1 sembrada de forma masiva y bacteria 6 sembrada en pozos, en ambos casos se observa antagonismo. Fuente: Propia. 72

Figura 28. Tinciones de Gram realizadas para evidenciar los comportamientos observados de 4 las bacterias seleccionadas en las pruebas de antagonismo. En la columna I se muestra la foto de los pozos, en la columna II la tinción de Gram realizada alrededor de los pozos, columna III morfología microscópica de las bacterias sembradas en forma masiva y en la columna IV morfología microscópica de las bacterias sembradas en pozos. AI-IV: bacteria 9 sembrada de forma masiva y bacteria 2 sembrada en pozos (No hay antagonismo); BI-IV: bacteria 5 sembrada de forma masiva y bacteria 7 sembrada en pozos (No hay antagonismo); CI-IV: bacteria 7 sembrada de forma masiva y bacteria 6 en pozos (No hay antagonismo); DI-IV: bacteria 7 sembrada de forma masiva y bacteria 1 sembrada en pozos (Hay antagonismo); EI-IV: bacteria 8 sembrada de forma masiva y bacteria 2 sembrada en pozos (Hay antagonismo). Fuente: Propia. 73

Figura 29. Curvas cinéticas de crecimiento de las bacterias 5,7, 8 y 9. Curva de Absorbancia vs tiempo. Fuente: Propia. 77

Figura 30. Curvas cinéticas de crecimiento de las bacterias 5, 7, 8 y 9. Curva de crecimiento UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias) vs tiempo. Fuente: Propia. 77

Figura 31. Curva de calibración UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias) vs Absorbancia. Fuente: Propia. 78

Figura 32. Resultados de la prueba de estabilidad realizada por dos meses. A: Conteo de UFC/mL de la bacteria 5; B: Conteo de UFC/mL de la bacteria 7; C: Conteo de UFC/mL de la bacteria 8; D: Conteo de UFC/mL de la bacteria 9. Fuente: Propia..... 82

Figura 33. Confrontación de la bacteria 1 (*B. subtilis* DCL4-31F), bacteria 2 (*B. megaterium* LS5-11B) y bacteria 3 (*B. pumilus* TS13-2111u) frente al resto de las bacterias seleccionadas. Fuente: Propia. 116

Figura 34. Confrontación de la bacteria 4 (*B. subtilis* LS6-11G), bacteria 5 (*B. megaterium* LL9-21) y bacteria 6 (*Acinetobacter calcoaceticus* MIVA-01) frente al resto de las bacterias seleccionadas. Fuente: Propia..... 117

Figura 35. Confrontación de la bacteria 7 (*B. marisflavi* MIVB-01), bacteria 8 (*Exiguobacterium aurantiacum* MVIB-02) y bacteria 9 (*Pseudomonas mendocina* PTL4g) frente al resto de las cepas seleccionadas. Fuente: Propia. 118

Figura 36. 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 la tinción de Gram realizada alrededor de los pozos, columna III morfología microscópica de las bacterias sembradas en forma masiva y en la columna IV morfología microscópica de las bacterias sembradas en pozos. AI-IV: bacteria 9 sembrada de forma masiva y bacteria 2 sembrada en pozos; BI-IV: bacteria 5 sembrada de forma masiva y bacteria 7 sembrada en pozos; CI-IV: bacteria 7 sembrada de forma masiva y bacteria 6 en pozos, observando en los 3 casos que no hay antagonismo. Fuente: Propia. 119

Figura 37. 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 la tinción de Gram realizada alrededor de los pozos, columna III morfología microscópica de las bacterias sembradas en forma masiva y en la columna IV morfología microscópica de las bacterias sembradas en pozos. AI-IV: bacteria 7 sembrada de forma masiva y bacteria 1 sembrada en pozos; BI-IV: bacteria 8 sembrada de forma masiva y bacteria 2 sembrada en pozos; CI-IV: bacteria 1 sembrada de forma masiva y bacteria 6 sembrada en pozos; DI-IV: bacteria 5 sembrada de forma masiva y bacteria 3 sembrada en pozos; observando en los 4 casos antagonismo. Fuente: propia..... 120

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Especies de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) y sus efectos en los cultivos en los que se han evaluado.....</i>	6
Tabla 2 <i>Principales tipos de biofertilizantes que existen y las especies microbianas que los conforman.....</i>	9
Tabla 3 <i>Métodos empleados para determinar el crecimiento microbiano.</i>	25
Tabla 4 <i>Composición de la turbidez estándar de McFarland.</i>	36
Tabla 5 <i>Total de microorganismos aislados de bioinsumos artesanales, según el estado y procedencia de la muestra recolectada.....</i>	41
Tabla 6 <i>Caracterización morfológica realizada mediante la observación macroscópica y microscópica de las bacterias aisladas de bioinsumos artesanales.....</i>	42
Tabla 7 <i>Caracterización morfológica realizada mediante la observación macroscópica y microscópica de los hongos filamentosos aislados de bioinsumos artesanales.....</i>	48
Tabla 8 <i>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 obtenida del análisis del árbol filogenético.</i>	51
Tabla 9 <i>Identificación final de hongos aislados de bioinsumos y otras muestras. 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 obtenido del análisis del árbol filogenético.....</i>	56
Tabla 10 <i>Aplicaciones biotecnológicas reportadas de bacterias aisladas de bioinsumos artesanales utilizadas para la selección de los microorganismos que conformaron el consorcio microbiano.</i>	57
Tabla 11 <i>Aplicaciones biotecnológicas de los hongos filamentosos aislados de bioinsumos artesanales utilizadas para la selección de los microorganismos que conformaron el consorcio microbiano.</i>	63
Tabla 12 <i>Aplicaciones biotecnológicas de las 4 bacterias seleccionadas pertenecientes al banco de microorganismos del PIENSA utilizadas en la formulación del consorcio microbiano.....</i>	66
Tabla 13 <i>Asignación de nuevos códigos de las bacterias seleccionadas a confrontar en las pruebas de antagonismo, mostrando el código de laboratorio y especie de las bacterias seleccionadas.....</i>	67

Tabla 14 <i>Valores de absorbancia obtenidos en la preparación de la escala de Mcfarland.</i>	68
Tabla 15 Valores de absorbancia de los inóculos ajustados.....	68
Tabla 16 <i>Resultados de pruebas de antagonismos de las cepas seleccionadas, donde se indica con signo (+) los casos en que hubo antagonismo, con signo (-) los casos en que no se observó antagonismo entre las bacterias confrontadas y con signo (+/-) donde se presenta duda de antagonismo.</i>	70
Tabla 17 <i>Valores de absorbancia a 540 nm y valores de UFC/mL a partir de los cuales se construyen las curvas de crecimiento de la bacteria 5, 7,8 y 9.</i>	76
Tabla 18 Resultados de pruebas de estabilidad realizada durante dos meses a las bacterias 5, 7, 8 y 9. Se muestran los intervalos de tiempo (días) y los conteos de UFC/mL correspondientes.	81

I. INTRODUCCIÓN

Las prácticas agrícolas y el aumento de la demanda mundial de alimentos han afectado al medioambiente, especialmente la calidad del suelo en términos de su equilibrio ecológico (Malusá *et al.*, 2016). Esta elevada necesidad de producción de alimentos ha llevado a un uso intensivo de la tierra, provocando un agotamiento de los suelos debido a la explotación de grandes cantidades de elementos nutritivos, además de producir una disminución progresiva de la fracción orgánica del suelo (Trujillo, 2012), causada en gran parte por el uso indiscriminado de los fertilizantes químicos, otro problema que trae consecuencias ambientales importantes debido a que el porcentaje de efectividad de estos es bajo y afectan la población microbiana nativa de la zona (Pereira & Castro, 2014; Pereg & McMillan, 2015). Esto ha hecho que la agricultura se enfoque en buscar soluciones a estas problemáticas al fomentar nuevas prácticas agrícolas con las que se minimicen los impactos ambientales, sean más baratas y aprovechen mejor los recursos disponibles del suelo, para ello se están usando diversos microorganismos para suplir la necesidad de nutrientes que fertilicen el suelo, los cuales son llamados biofertilizantes o bioinoculantes (Afanador, 2017).

Los biofertilizantes pueden estar formados por cepas individuales o en consorcios microbianos también conocidos como bioinoculantes. Los microorganismos vivos que lo conforman son beneficiosos tanto para la planta como para el suelo, y 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 biológica de nitrógeno, la solubilización del fósforo, la producción de hormonas promotoras de crecimiento, la producción de antibióticos y la generación de agentes quelantes de hierro, que también ayudan a recuperar la microbiota perdida y a su vez mejorar la salud del suelo en general (Afanador, 2017).

En Nicaragua al ser un país predominantemente agrícola existe una alta dependencia de los fertilizantes químicos debido a la poca oferta de bioinsumos (biofertilizantes o bioplaguicidas) y los que hay en existencia se elaboran a nivel artesanal por lo que no existen estudios que respalden la composición exacta ni el funcionamiento de estos. A pesar del interés que han generado los bioinsumos todavía existe un bajo nivel de industrialización por lo que no se cuenta con un procedimiento patentado para la elaboración de los bioinsumos a escala piloto o industrial. Todo esto ha conllevado a que las instituciones públicas que están a cargo de regulación de este tipo de productos establecieran en el año 2017 los requisitos que deben cumplir los bioinsumos para ser certificados (NTON 11 048-16).

Frente a estas problemáticas se ha demostrado en numerosas investigaciones que es posible obtener una asociación de dos o más poblaciones microbianas de diferentes especies con el objetivo de aplicarlos en forma de inóculo debido a su potencial biofertilizante. Entre se ellas se destacan, Lara y Negrete (2015) quienes evaluaron la capacidad de solubilizar fosfatos de consorcios formados

por bacterias nativas de los géneros *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas luteola* y *Pantoea sp*, con el fin de encontrar el más eficiente. Realizando pruebas de antagonismo entre las cepas para conformar los consorcios y evaluar cualitativa y cuantitativamente la solubilización de fosfatos, para así preparar un bioinoculante que fue evaluado en semillas de plantas de pasto angleton (*Dichantium aristatum*). Obteniendo como resultado un incremento significativo en los parámetros peso seco y área foliar usando el consorcio microbiano, indicando mayor beneficio en comparación con el control.

Por otro lado, Borda *et al.* (2009) realizaron un estudio para producir un biofertilizante a partir de aislados de *Azotobacter Nigricans*, los cuales fueron evaluados mediante una cinética de crecimiento y la cepa con mayor velocidad se utilizó para la elaboración de un biofertilizante por fermentación discontinua. La evaluación preliminar del biofertilizante se realizó mediante su inoculación en un cultivo de *S. rebaudiana Bert* y el rendimiento se determinó con base en la producción de biomasa y concentración de glucósidos, su evaluación en campo mostró una relación respuesta entre las dos variables estudiadas.

Farfán (2017) realizó una investigación con el objetivo de identificar posibles microorganismos viables en la formulación de un bioinsumo fertilizante, aislando bacterias nativas no patógenas de los suelos de cultivo con capacidad fijadora de nitrógeno N, y movilizadora de fósforo P y potasio K, seleccionando tres cepas evaluadas *in vitro* mediante la medición de las concentraciones de N, P, y K en los suelos inoculados.

Se debe destacar la investigación realizada por Flores y Roque (2017) quienes efectuaron el aislamiento de la diversidad microbiana cultivable de cuatro bioinsumos comerciales producidos artesanalmente en Nicaragua, además de caracterizar microbiológica y molecularmente una parte de los microorganismos aislados, con el fin de encontrar cepas nativas de *Bacillus subtilis* para ser confrontadas frente a hongos fitopatógenos, ya que diversos autores reportan su actividad antifúngica. A partir de la investigación realizada por los autores antes mencionados se obtuvo la base microbiana con la que desarrolló la presente investigación.

El presente trabajo investigativo se enfocó en el desarrollo de un proceso de producción a escala de laboratorio para un consorcio microbiano a partir de microorganismos aislados de bioinsumos producidos artesanalmente. Para lograr esto se realizó la identificación morfológica y molecular de los microorganismos que conformaban estos bioinsumos. Posteriormente se realizó una selección de aquellos microorganismos que presentaran características de promoción del crecimiento vegetal conocidos como PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) y que no presentaran antagonismo *in-vitro* entre ellos para llevar a cabo la formulación del consorcio microbiano con las propiedades de interés. Finalmente se evaluó individualmente la cinética de crecimiento microbiano y estabilidad de cada uno de los microorganismos que conformaban el consorcio microbiano formulado. Al realizar este estudio se pretende ser la base de trabajos posteriores para escalar la producción de este producto y reemplazar con el tiempo o servir como complemento al uso de fertilizantes

sintéticos y así disminuir el impacto ambiental que causan, además de impulsar el desarrollo de la industria biotecnológica (hacia la industrialización de los bioinsumos) en el país y obtener un producto que pueda competir con estándares de calidad a nivel nacional.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Desarrollar el proceso de producción para un consorcio microbiano a escala de laboratorio con propiedades biofertilizantes a partir de microorganismos previamente aislados de bioinsumos artesanales.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar morfológica y molecularmente los microorganismos previamente aislados a partir de bioinsumos artesanales.
- Obtener una forma de asociación de diferentes especies microbianas (consorcio microbiano), realizando las pruebas requeridas de antagonismo a nivel de laboratorio que muestren su convivencia.
- Evaluar la cinética de crecimiento y la estabilidad individualmente de los cultivos que forman parte del consorcio microbiano obtenido, escalando su producción de placa Petri a Shaker.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Consorcio Microbiano

Consortio microbiano es una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás. La asociación refleja estilos de vida sinérgicos o sintróficos (que significa “comiendo juntos”) en el que el crecimiento y el flujo cíclico de nutrientes se conduce eficientemente y más efectiva que en poblaciones individuales (Ochoa y Montoya, 2010).

La producción total de un consorcio depende de la combinación de tareas desempeñadas por los constituyentes individuales, es decir, por las poblaciones microbianas involucradas. Otra importante característica de los consorcios es su habilidad para desempeñar funciones que requieren múltiples pasos, mediante especies microbianas especializadas (Brenner *et al.*, 2008). Existe la posibilidad de formar consorcios con Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (RPCV) que interactúen sinérgicamente, los estudios en esta área indican que algunas mezclas de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal proveen nutrientes a la planta, remueven productos inhibitorios y se estimulan unas a otras mediante actividades físicas o bioquímicas, que podrían aumentar algunos aspectos benéficos de su fisiología, como por ejemplo, la fijación de nitrógeno (Fisher y Jofré, 2009).

3.2 Rizobacterias Promotoras del crecimiento vegetal (RPCV)

La expresión Rizobacterias Promotoras del crecimiento vegetal o *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) por sus siglas en inglés fue acuñada por J. W. Kloepper y M. N. Schroth en 1978, son bacterias que habitan la rizósfera y que afectan positivamente el desarrollo de las plantas (Labra *et al.*, 2012). Estas bacterias tienen la capacidad de colonizar activamente el sistema radicular para favorecer y/o mejorar su crecimiento y rendimiento (Berendsen *et al.*, 2012). Las RPCV (Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal) representan alrededor del 2 al 5 % de las bacterias rizosféricas (Jha & Saraf, 2015). Las siglas RPCV hacen referencia a todas las bacterias que son capaces de mejorar el crecimiento de las plantas a través de uno o más mecanismos. Los siguientes géneros de bacterias han sido reportados como RPCV: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcous*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia* (Ahmed & Holmström, 2014).

3.2.1 Mecanismos de acción

Las RPCV (Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal) ejercen efectos benéficos en las plantas a través de mecanismos directos e indirectos, o una combinación de ambos. Los mecanismos directos ocurren cuando las bacterias sintetizan metabolitos que facilitan a las plantas, o bien cuando éstas incrementan la disponibilidad de diferentes elementos nutritivos, requeridos para

su metabolismo y para mejorar su proceso de nutrición. Entre los mecanismos directos destacan: la fijación de nitrógeno (N); la síntesis de fitohormonas, vitaminas y enzimas, la solubilización de fósforo (P) inorgánico y la mineralización de fosfato orgánico, la oxidación de sulfuros, el incremento en la permeabilidad de la raíz, la producción de nitritos, la acumulación de nitratos, la reducción de la toxicidad por metales pesados y de la actividad de la enzima desaminasa del ácido ACC (1-aminociclopropano-1-carboxílico), la secreción de sideróforos, la reducción de los niveles de etileno en los suelos, y el incremento de la permeabilidad de las raíces (Moreno *et al.*, 2018).

Mientras que, los mecanismos indirectos se caracterizan porque las RPCV ocasionan la disminución o eliminación de microorganismos fitopatógenos, ya sea a través de la producción de sustancias antimicrobianas o de antibióticos, de enzimas líticas o una combinación de éstas; por competencia de nutrientes o de espacio en el nicho ecológico, así como por estimulación de las defensas naturales de la planta mediante mecanismos de biocontrol; la inducción de resistencia sistémica (IRS) a un amplio espectro de organismos patógenos y la producción de sideróforos, como mecanismo para secuestrar el Fe disponible en los suelos y con esto limitar el desarrollo y la presencia de dichos fitopatógenos; producción de antibióticos y cianuros de hidrógeno que impactan sobre los fitopatógenos; hidrólisis de moléculas como el ácido fusárico generado por éstos para liberar 1-3-glucanasa, con la cual se inhibe el desarrollo de la pared fúngica de hongos como *Phyitium ultimum* y *Rhizoctonia solani* (Moreno *et al.*, 2018).

Una de las limitantes de las RPCV es que el efecto benéfico que promueven sobre una determinada especie vegetal no es el mismo para otras plantas. En relación a lo anterior Xu *et al.* (2011) señalan que el empleo combinado de agentes de biocontrol, generalmente no debe recomendarse en la práctica sin contar con una clara comprensión de sus principales mecanismos de control y de su competitividad relativa. Para evitar lo anterior, a la fecha existe un sinnúmero de reportes que clarifican acerca del tipo de RPCV, su efecto y los cultivos donde éstas se pueden aplicar, ver ejemplos en la **Tabla 1**.

Tabla 1

Especies de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) y sus efectos en los cultivos en los que se han evaluado.

RPCV	Efecto	Cultivos
<i>Azospirillum spp.</i> , <i>Azotobacter spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Burkholderia spp.</i> , <i>Gluconobacter spp.</i> , <i>Herbaspirillum spp.</i>	Biofertilización, Fijan N ₂	Maíz, arroz, trigo, sorgo, caña de azúcar.

Continuación de la Tabla 1

<p><i>Bacillus spp.</i>, <i>Pseudomonas spp.</i>, <i>Streptomyces spp.</i>, <i>Paenibacillus spp.</i>, <i>Enterobacter spp.</i>, <i>Azospirillum spp.</i></p>	<p>Biocontrol (enfermedades, patógenos, insectos)</p>	<p>Tomate, Tabaco, pepino, pimiento morrón, maní, alfafa, garbanzo, frijol, ciruelo.</p>
<p><i>Methylobacterium spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Alcaligenes spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Variovorax spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Azpsírium spp.</i> , <i>Rhizobium spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i></p>	<p>Elongación, crecimiento</p>	<p>Nabo, clavel, canola, soya, frijol, maíz, judías y chicharos.</p>
<p><i>Aeromonas spp.</i> , <i>Agrobacterium spp.</i> , <i>Alcaligenes spp.</i> , <i>Azospirillum spp.</i> , <i>Bradyrhizobium spp.</i> , <i>Comamonas spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Rhizobium spp.</i> , <i>Paenibacillus spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i></p>	<p>Productoras de fitohormonas, [Acido-3-indol-acético,citoquininas,giberelinas]</p>	<p>Arroz, lechuga, trigo, soya, rábano, colza, aliso.</p>

Fuente: Moreno *et al.* (2018)

3.3 Aplicación de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) en las especies vegetales.

Los mecanismos de acción de las RPCV, a través de los cuales favorecen el incremento de la productividad agrícola de diferentes regiones, desde un enfoque sustentable, se describen en el siguiente apartado.

3.3.1 Biofertilizantes

Como una alternativa a los fertilizantes químicos está la posibilidad de utilizar bacterias del suelo, que como parte de su metabolismo incrementan la fertilidad y benefician a las plantas. Estas bacterias y otros microorganismos usados en la fertilización de los suelos constituyen los biofertilizantes (Escobar *et al.*, 2011).

Se entiende por biofertilizantes todos aquellos productos que contienen microorganismos vivos, con capacidad para colonizar la rizósfera o el interior de las plantas, que aplicados al suelo y/o a éstas, a través de la inoculación, pueden vivir asociados o en simbiosis con las especies vegetales y les ayudan a su nutrición y protección, con ellos se pretende sustituir parcial o totalmente la aplicación de fertilizantes sintéticos, y reducir su efecto contaminante (Moreno *et al.*, 2018). A diferencia de los fertilizantes sintéticos y orgánicos, los biofertilizantes no suministran directamente ningún elemento nutritivo a los cultivos y éstos son bioproductos, elaborados principalmente a base de bacterias. Armenta *et al.* (2010), describen que los microorganismos empleados en los biofertilizantes se agrupan en aquellos que: a) tienen capacidad para sintetizar sustancias que promueven el crecimiento de las plantas, a través de varios procesos como fijación de N₂ atmosférico, solubilización de Fe y P inorgánicos, incrementan la tolerancia al estrés por sequía, salinidad, metales tóxicos y exceso de plaguicidas; b) son capaces de disminuir o prevenir los efectos de organismos patógenos; y c) cumplen ambas funciones – promueven crecimiento e inhiben efectos de patógenos, ejemplo *Bacillus subtilis* produce auxinas para promover el crecimiento de tomate e induce resistencia sistémica contra *F. oxysporum*, responsable de la marchitez y pudrición de sus raíces.

La inoculación de biofertilizantes que contienen bacterias rizosféricas ha provocado incrementos significativos en la productividad de los cultivos agrícolas (Armenta *et al.*, 2010). Esto se debe a que, las bacterias asociadas a las especies vegetales poseen la capacidad de producir o generar reguladores de crecimiento y aproximadamente el 80 % de éstas son productoras de auxinas. En términos cuantitativos, la auxina de mayor importancia es el ácido indol acético (AIA), el cual es responsable de incrementar tanto el sistema radicular como la absorción de elementos nutritivos (Moreno *et al.*, 2018).

Es importante destacar que muchos de estos microorganismos en ambientes naturales no viven aislados, sino que forman parte de consorcios que tienen una dinámica poblacional interna. La competencia por los recursos y la cooperación entre los microorganismos que integran un consorcio microbiano pueden determinar el éxito de su desempeño biotecnológico (Subashchandrabose *et al.*, 2011).

3.3.1.1 Tipos de biofertilizantes

En la **Tabla 2** se muestran los tipos de biofertilizantes que existen y algunos de los principales microorganismos que se utilizan para conformarlos de acuerdo a sus funciones. Se destacan los géneros de bacterias como *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Rhizobium* (Afanador, 2017).

Tabla 2

Principales tipos de biofertilizantes que existen y las especies microbianas que los conforman.

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

PGPR*: Plant growth-promoting rhizobacteria

Fuente: (Afanador, 2017)

3.4 Cultivo de microorganismos en el laboratorio

Los estudios realizados en el área de microbiología dependen de la capacidad de cultivar y mantener microorganismos en un laboratorio y esto sólo es posible si se dispone de los medios de cultivos adecuados. Un medio de cultivo es una preparación líquida o sólida utilizada para el crecimiento, transporte, o mantenimiento de microorganismos (Prescott *et al.*, 2004).

Si se utilizan para el crecimiento, los medios de cultivo deben contener todos los nutrientes esenciales para un microorganismo en concreto. Aunque todos los microorganismos necesitan fuentes de energía, carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y varios minerales; la composición precisa de un medio adecuado dependerá de la especie que se quiere cultivar, porque las necesidades nutricionales varían considerablemente. Frecuentemente los medios se utilizan para seleccionar y cultivar microorganismos específicos o para facilitar la identificación de una especie en particular, en estos casos la función de un medio está determinada por su composición, y según ella se dividen en medios sintéticos o definidos cuando conoce su composición química y en medios complejos cuando están compuestos de materiales complejos (peptonas, extracto de carne y de levadura) (Prescott *et al.*, 2004).

3.4.1 Siembra de microorganismos

La siembra o inoculación consiste en introducir artificialmente una porción de la muestra o inóculo en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incubaba 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. La siembra 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 (Flores y Roque, 2017).

Existen diversos tipos de siembra de microorganismos de acuerdo al medio utilizado y los requerimientos del microorganismo a estudiar. En Prescott *et al.* (2004), se describen las técnicas de siembra más comunes utilizadas en medios sólidos, las cuales son:

- Siembra en placa por extensión: es una forma directa y fácil de conseguir colonias independientes, esto se logra al pasar un volumen pequeño de una mezcla microbiana diluida en el centro de una placa de agar y se extiende uniformemente sobre la superficie con un asa Drigalsky estéril, y luego de su incubación las células diseminadas sobre la superficie desarrollarán colonias aisladas. El número de colonias debe ser igual al número de organismos viables de la muestra. Este tipo de siembra es recomendado para microorganismos aerobios estrictos.
- Siembra en estrías: es otro tipo de siembra con el que se pueden obtener colonias aisladas; esta técnica consiste en inocular la mezcla microbiana

sobre un extremo de la placa de agar con un asa de siembra o un hisopo, y se extiende formando estrías sobre la superficie en uno o varios sentidos. Las células individuales se irán desprendiendo del asa al frotarla sobre la superficie y desarrollarán colonias aisladas.

- Siembra en profundidad: se emplea frecuentemente con bacterias y hongos, ya que, también puede generar colonias aisladas. La muestra original se diluye varias veces para reducir la población microbiana, con el fin de obtener colonias separadas. Luego se mezclan volúmenes pequeños de las muestras diluidas con agar previamente fundido, antes de mezclarlo se deja atemperar hasta aproximadamente 45 °C. Este método se utiliza para microorganismos aerobios.

3.5 Identificación de microorganismos

Los organismos vivos se pueden dividir en dos tipos celulares: eucariotas y procariontas, estos dos 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. Dentro de este esquema, las bacterias son microorganismos unicelulares procariontas y se dividen en eubacterias y arqueobacterias. Mientras que los organismos multicelulares, animales y plantas, están constituidos por células eucariotas. Los protistas, los hongos y las algas que se organizan de forma unicelular, multicelular o en colonias (como los protistas), también poseen células eucariotas (Pérez y Mota, 2006).

La detección, diferenciación e identificación de microorganismos puede realizarse mediante numerosos métodos que incluyen: ensayos fenotípicos, bioquímicos e inmunológicos y, en la actualidad, también se aplican, técnicas moleculares. La identificación de microorganismos, cuando se basa exclusivamente en características fisiológicas y bioquímicas, es intrínsecamente ambigua. Es por esto que los métodos genotípicos (moleculares) son útiles para identificar microorganismos como complemento o alternativa a los métodos fenotípicos; además de mejorar la sensibilidad y la especificidad del proceso de detección y reducen gran parte de la subjetividad inherente a la interpretación de datos morfológicos y biológicos, ya que básicamente el ADN es invariante en todo el ciclo de vida de los microorganismos, por lo tanto, los métodos moleculares son generalmente aplicables (Roselló & Amann, 2001).

3.5.1 Morfología bacteriana

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. La mayoría son de vida libre, a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada. Tienen los mecanismos productores de energía y el material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento (Pérez y Mota, 2006).

Las características fenotípicas clásicas de las bacterias comprenden características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. La morfología de una bacteria incluye caracteres celulares (forma, endospora, flagelos, cuerpos de

inclusión, tinción Gram) y caracteres coloniales (color, dimensiones, forma). Las características fisiológicas y bioquímicas incluyen datos sobre el crecimiento a diferentes temperaturas, valores de pH, concentraciones de sal o condiciones atmosféricas (por ejemplo, aeróbicos/anaeróbicos), crecimiento en presencia de varias sustancias como agentes antimicrobianos y datos sobre la presencia o actividad de varias enzimas, metabolización de compuestos, etc. (Roselló & Amann, 2001).

3.5.1.1 Macroscópica

La mayoría de las bacterias se multiplican rápidamente y son visibles como colonias cuando se siembran en medios de cultivo sólidos adecuados. Requieren una incubación de aproximadamente 24 horas en una atmósfera que favorezca su desarrollo a temperatura óptima. Una colonia está constituida por los descendientes de una o unas pocas células y sus características dependen de la movilidad de la bacteria (Pírez y Mota, 2006). Según Pumarola *et al.*, (1991), el tamaño así como el aspecto, es bastante constante para cada género y especie bacterianos y de ahí que puedan utilizarse como características diferenciales las siguientes cualidades:

- **Tamaño:** puede ser puntiformes de alrededor de 1 mm de diámetro o menor, medianas de 1 a 2 mm de diámetro, grandes de 4 a 6 mm y extendidas en velo invadiendo toda la superficie del medio de cultivo.
- **Forma:** se tienen en cuenta tanto los bordes (enteros, lobulados, dentados, rizoides, etc.) como el espesor (planas, elevadas, semiconvexas, semiesféricas, etc.)
- **Superficie:** puede ser lisa, rugosa, filamentosa, mucosa, seca, papilada, umbilicada, etc.; quizás el carácter diferencial más importante consista en la separación de las colonias lisas y rugosas. Las primeras traducen la presencia de cápsula u otros componentes superficiales que le dan el aspecto compacto.
- **Consistencia:** puede ser dura y seca, friable y viscosa, y cremosa en ocasiones. La mayoría producen colonias de consistencia mantecosa, fácilmente arrastrables por el asa de siembra.
- **Transparencia y coloración:** son muy variables, pueden ser transparentes, semitransparentes, translúcidas y opacas. En ocasiones aparecen pigmentadas con una coloración blanca, amarilla, roja u otras por la producción de pigmentos por la propia bacteria, que al ser lipófilos e hidrófobos no salen al exterior del medio de cultivo.

Algunos de estos aspectos morfológicos de las colonias bacterianas se representan esquemáticamente en la **Figura 1**.



Figura 1. Representación esquemática de la forma, superficie y bordes de diferentes tipos de colonias bacterianas desarrolladas. Adaptado de (Pumarola *et al.*, 1991).

3.5.1.2 Microscópica

Las bacterias son células pequeñas que solo se pueden visualizar con ayuda de un microscopio óptico o electrónico y aunque el tamaño de estas varía enormemente de unas a otras, se puede establecer un patrón entre 0,5 y 1 μm de ancho y 1-10 μm de largo; su forma depende de la pared celular, la cual le proporciona elasticidad y al mismo tiempo rigidez (Liébana, 2002). Básicamente las tres principales formas de las bacterias son: esférica, cilíndrica y helicoidal.

Se conocen con el nombre de cocos a las formas esféricas, se suelen presentar perfectamente redondeadas en ocasiones y suelen mostrar variaciones morfológicas, tales como, ovoideas, lanceoladas y reniformes. Según la orientación de los planos de división de la bacteria y de la rapidez en separarse las células hijas surgen distintos tipos de agrupaciones (Pumarola *et al.*, 1991). Estas pueden ser de dos en dos (diplococos), de cuatro en cuatro (tétradas), en cadenas (estreptococos), en racimos (estafilococos) o en forma de cubos (sacarinas) (Liébana, 2002).

Las formas cilíndricas llamadas bacilos pueden ser rectas, incurvadas como vibriones o ramificadas. La forma es variable y pueden sufrir ligeras desviaciones de acuerdo con los bordes (paralelos, convergentes, convexos, cóncavos, etc.) y los extremos (redondeados, afilados o en escuadra). Como la división de las bacterias tiene lugar por fisión binaria transversal, la agrupación de los bacilos sólo puede ser en parejas (diplobacilos) o en cadenas (estreptobacilos). También aparecen agrupaciones en empalizada o en L, V y letras chinas (Pumarola *et al.*, 1991).

También se presentan formas incurvadas, estos son elementos generalmente aislados con una o varias curvaturas. Si presentan una sola, pueden adoptar aspecto de coma (vibriosis); a veces son varias en un solo plano, rígidas, y se desplazan por flagelos (espirilos); en ocasiones se sitúan en planos distintos,

son flexibles y se mueven por filamentos axiales (espiroquetas) (Liébana, 2002). En la **Figura 2** se muestran las principales formas de las bacterias.

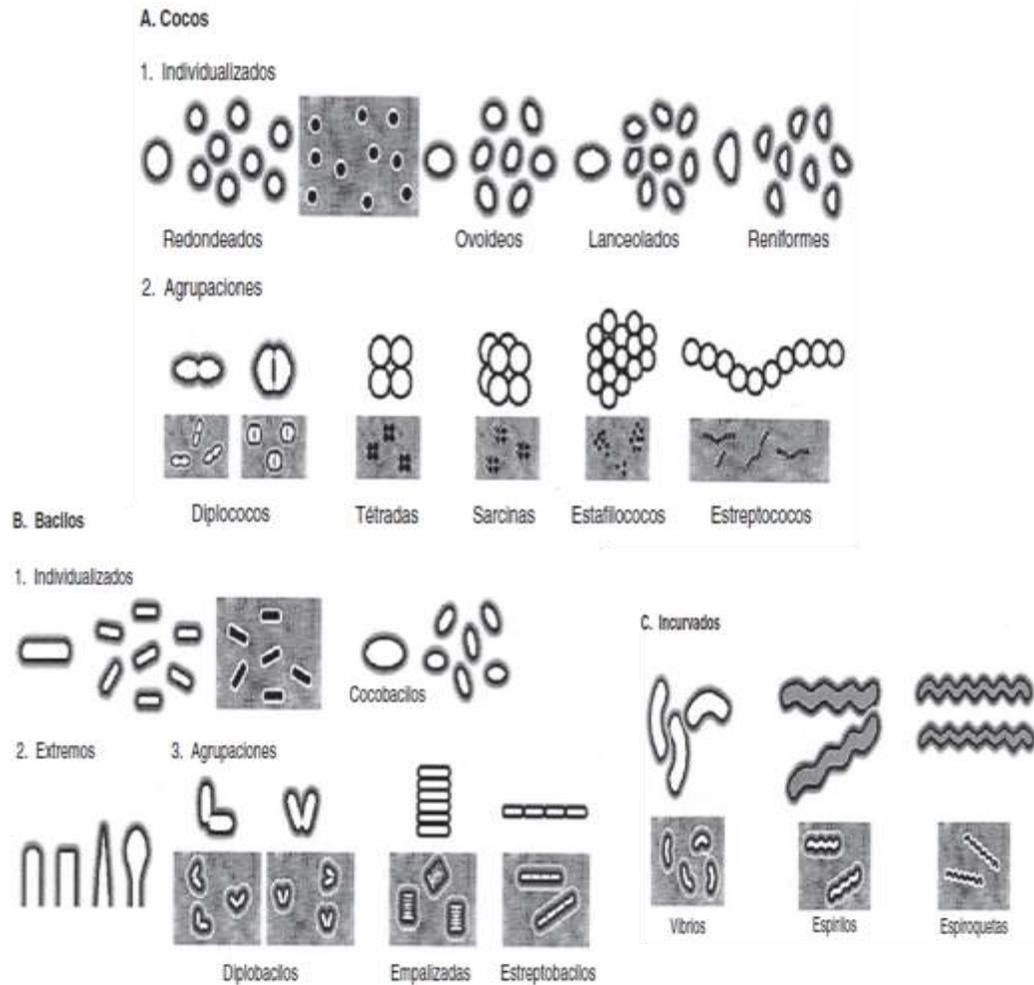


Figura 2. Tipos de bacterias según su morfología microscópica. Adaptado de (Liébana, 2002).

Las bacterias pueden observarse al realizar un examen en fresco si se las coloca en glicerol o soluciones no acuosas que aumenten el índice de refracción; sin embargo, esta técnica no es muy utilizada por lo que sólo se puede verificar la existencia de estas y la capacidad de moverse. También se pueden observar al realizar tinciones usando distintos colorantes que presentan una afinidad por las estructuras bacterianas, ya que, son catiónicos y son atraídos por los componentes de carga negativa como los ácidos nucleicos y los polisacáridos, ejemplo de este tipo son: el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina. Estas tinciones se pueden dividir en simples, diferenciales y especiales. Las primeras permiten observar la existencia de bacterias, su morfología, su agrupación, la presencia de esporos y la existencia de otros tipos celulares. Las diferenciales como la tinción de Gram y la de Ziehl Nielsen además de lo anterior, permiten la diferenciación de las bacterias porque usan diferentes colorantes que se comportan distinto según el microorganismo en cuestión. Por

último, las tinciones especiales se usan para objetivar distintas estructuras como la cápsula, el núcleo, los flagelos, los esporos, etc. (Pírez y Mota, 2006).

- **Tinción Gram**

La coloración o tinción Gram es la más usada en bacteriología, es una tinción 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 (Pírez y Mota, 2006). Este proceso se inicia fijando la muestra por calor y luego 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. A continuación, se usa un decolorante, alcohol acetona, que hace perder el cristal violeta a los Gram negativos. En ese instante, las Gram positivas mantienen el color violeta, pero los Gram negativos no se ven al no estar coloreadas. Para visualizarlas se usa el colorante de contraste, generalmente safranina o fucsina, que las tiñe de rojo (Liébana, 2002), este proceso se resume en la **Figura 3**.

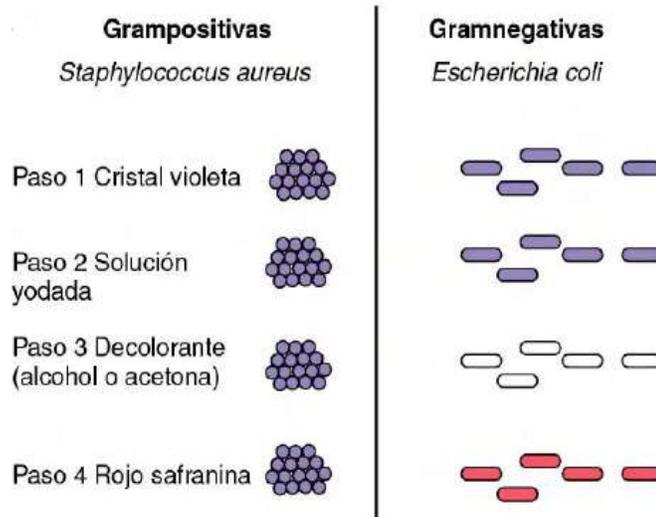


Figura 3. Método de tinción de Gram. Adaptado de (Murray *et al.*, 2013).

La diferente reacción de las bacterias a la coloración de Gram se relaciona con las diferencias fundamentales de la envoltura celular de estas dos clases de células. Las bacterias Gram positivas se tiñen de violeta porque el colorante queda atrapado en una gruesa capa de peptidoglicanos a modo de malla entrelazada, que rodea a la célula, mientras que, las bacterias Gram negativas poseen una capa de peptidoglicanos más delgada, que no retiene el cristal violeta, de forma que las células se tiñen con la safranina empleada como contraste y se ven rojas (Murray *et al.*, 2013).

3.5.2 Morfología de los hongos

Los hongos poseen una estructura celular eucariota y por sus caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y ecológicos conforman un nuevo reino, Fungi; son heterótrofos, es decir, necesitan de compuestos orgánicos como nutrientes, poseen una pared rígida y se reproducen de forma sexual o

asexualmente (Pumarola *et al.*, 1991). Pueden ser unicelulares o multicelulares. El agrupamiento más sencillo, basado en la morfología divide a los hongos en levaduras y mohos, estos últimos también se denominan como hongos filamentosos. Las levaduras son unicelulares y se pueden definir morfológicamente como células que se reproducen mediante gemación o fisión binaria, de manera que una célula progenitora o madre desprende una porción de sí misma para producir una célula descendiente o hija; las levaduras producen colonias redondeadas, pálidas o mucoides en agar (Murray *et al.*, 2013).

Los hongos filamentosos son multicelulares y están formados por estructuras tubulares llamadas hifas, que son sistemas tubulares comunicantes y ramificados, con muchos núcleos en el citoplasma, rodeado de una pared celular única y rígida; es una estructura cenocítica. Las hifas pueden ser septadas (con paredes o septos que pueden poseer agujeros), algunas hifas tabicadas tienen estructuras especiales llamadas fibulas o conexiones en grapas, otro tipo de hifa son las sifonadas (Pumarola *et al.*, 1991); normalmente se desarrollan a partir de esporas, aunque también pueden originarse a partir de fragmentos de otras hifas, y crecen depositando nuevos materiales en su extremo, ramificándose con mucha frecuencia hasta generar una maraña de filamentos que constituyen el micelio, el cual en medios de cultivos sólidos y sobre cualquier superficie que se desarrollen (p. ej., frutas y alimentos), producen colonias algodonosas o pulverulentas que son muy características. En una colonia de un hongo filamentoso se produce una diferenciación de las funciones, de tal forma que el micelio vegetativo es aquel que penetra en el sustrato para obtener nutrientes, mientras el que se proyecta por encima del sustrato se llama micelio aéreo o reproductor, porque tiene la misión reproductora o de dispersión de la especie mediante esporas (Liébana, 2002). El proceso de formación de una colonia de un hongo filamentoso se muestra en la **Figura 4**.

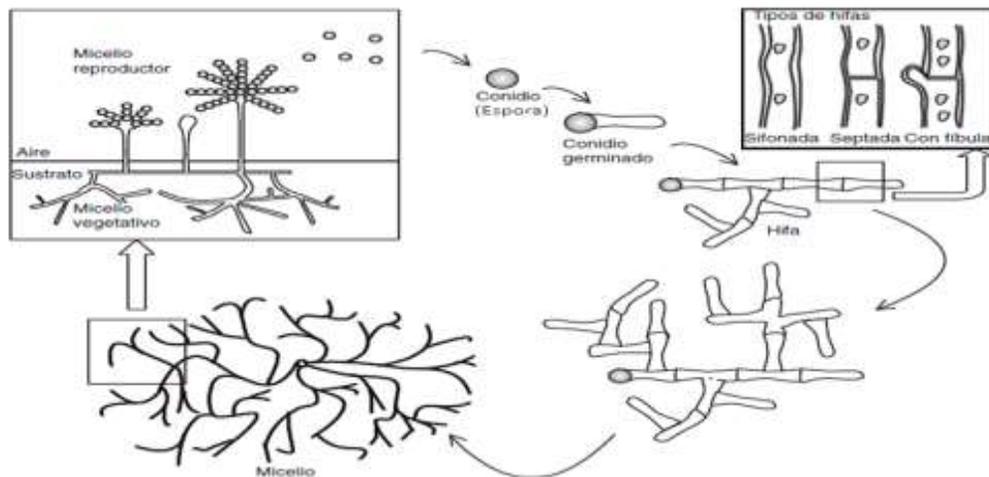


Figura 4. Formación de una colonia por un hongo filamentoso. En los cuadros se muestran los tipos de hifas, y el micelio vegetativo y reproductor. Adaptado de (Liébana, 2002).

Por su forma y superficie se distinguen diversos tipos de esporas como esféricas, cilíndricas, poliédricas, ovaladas, falciformes, aciculares, verrugosas, espinosas, lisas y fabeadas, tal como se muestra en la **Figura 5**. Pueden ser pigmentadas y proporcionar un determinado y característico color a la colonia o talo del hongo. Si se originan en el interior de una hifa se denominan internas y son externas si surgen en la superficie por un proceso directo de gemación y diferenciación en los extremos de la hifa o sobre formaciones llamadas cuerpos fructíferos. Las esporas son elementos de desarrollo y resistencia, y pueden tener carácter sexual o asexual (Pumarola *et al.*, 1991).

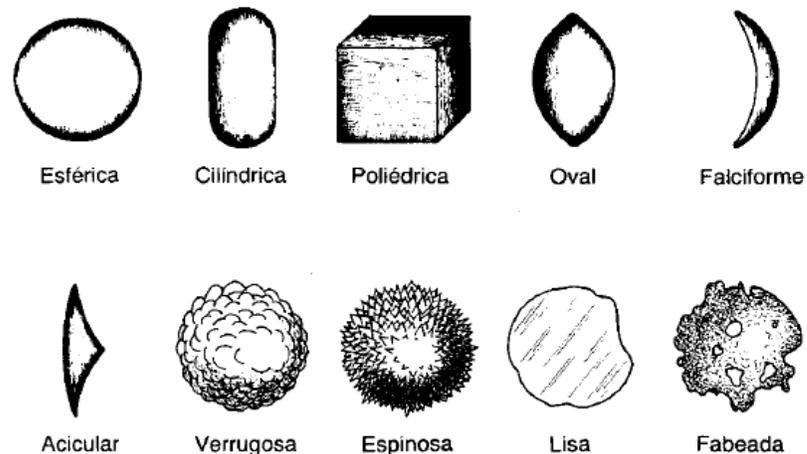


Figura 5. Formas y superficie de las esporas asexuales. Adaptado de (Pumarola *et al.*, 1991).

La identificación de las levaduras, como la de las bacterias, implica la realización de pruebas bioquímicas y el estudio de sus características macroscópicas y microscópicas. Sin embargo, los hongos filamentosos se identifican sobre la base de su aspecto físico, que incluye las características de las colonias y las esporas reproductivas (Tortora *et al.*, 2007). Según Ochei & Kolhatkar (2000), se describen los caracteres que definen la morfología de las colonias formadas por los hongos filamentosos:

- Forma: puede ser circular, irregular, filamentosa.
- Elevación: las colonias pueden ser planas y extendidas, elevadas y limitadas, umbilicadas.
- Margen: entero, lobulado, desflecado, rizoide.
- Superficie: plegadas o arrugadas, estriadas, con surcos radiados, cerebriformes.
- Textura: granulosa, pulverulenta, vellosa, lanosa, aterciopelada, algodonosa, sedosa o cerosa.
- Tamaño: pueden presentar un crecimiento limitado o uno invasivo.

- Color: el color puede ser blanco, gris, crema, beige, naranja pálido, marrón, morado oscuro o verde.
- Pigmentos difusos: los pigmentos producidos por los hongos se pueden ver en el reverso de la placa como los colores beige, naranja pálido, amarillo intenso, gris, marrón o rojo.

La observación de estas características, complementada con la tasa de crecimiento y el aspecto microscópico ayudan en la identificación de los hongos filamentosos (Ochei & Kolhatkar, 2000).

3.5.3 Identificación molecular de los microorganismos

Los métodos de identificación genotípicos o moleculares surgen para solventar los problemas presentados por los sistemas de identificación fenotípica, y por lo tanto se han erigido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos (Bou *et al.*, 2011). Las técnicas del ADN 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 estudiando la secuencia total de nucleótidos del genoma del microorganismo (Herrera, 2005).

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 ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas, es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* o ADN ribosómico ARNr 16S (ADN 16S) incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (Bou *et al.*, 2011). En eucariotas el ARNr 18S 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). La identificación mediante el ARNr 16S se fundamenta en su secuencia, el cual forma aproximadamente 1500 pb, este tamaño proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas, además de actuar como un cronometro molecular al presentar un alto grado de conservación (Bou *et al.*, 2011).

El estudio molecular para diversas especies de hongos se puede llevar a cabo a través del análisis de los espacios transcritos internos, ITS (Internal Transcribed Spacer) u otras regiones variables de genes conservados. En los hongos el ADN que codifica para el ARN ribosomal está organizado en unidades que se repiten cientos de veces a lo largo del genoma. Cada unidad está formada por tres genes uno que codifica la subunidad 18S, uno la subunidad 5.8S y otro que codifica para subunidad 26S. Estos genes están intercalados por secuencias no codificantes, denominadas ITS1 e ITS2; a su vez, cada unidad se separa de la otra por una región denominada IGS (Inter Genetic Spacer), intercalada por el gen 5S (González, 2014). En particular la región ITS (ITS1 e

ITS2) representa una secuencia de bases suficientemente variable para comparar entre si taxones cercanos (Llorens *et al.*, 1997).

3.5.3.1 Fundamentos de la identificación molecular

Las técnicas de identificación molecular mediante el análisis del ARNr 16S y 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 (Bou *et al.*, 2011). A continuación, se describen las etapas metodológicas (**Figura 6**) a considerar en la identificación molecular.

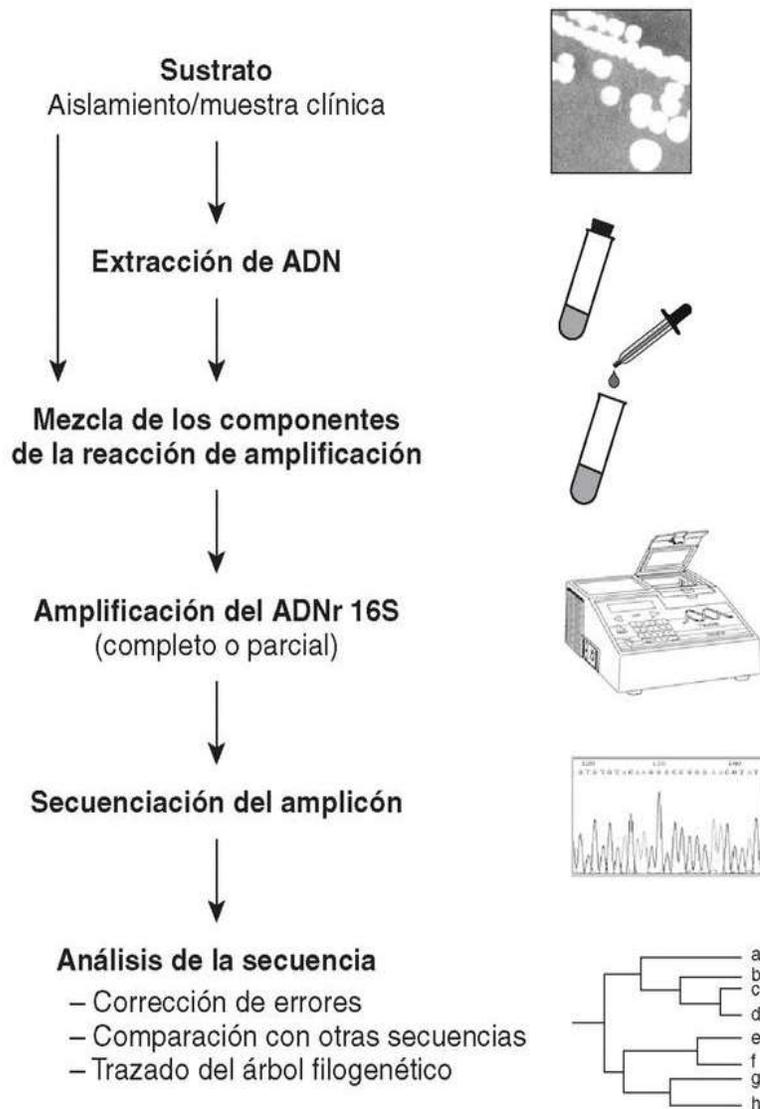


Figura 6. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S. Adaptado de (Rodicio y Mendoza, 2004).

- Extracción del 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 o de matrices, en el caso de tratarse de una muestra alimentaria o ambiental (Bou *et al.*, 2011). Dependiendo del tipo microorganismo se pueden aplicar modificaciones que simplifiquen u optimicen la extracción cromosómica.

- Amplificación

El ADN extraído se utiliza como molde para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una secuencia del ARNr 16S con un rango de tamaño entre 500-1500 pb, o de otro tamaño si se analizan otros genes. Esta etapa se realiza en un termo reciclador y para confirmar una amplificación óptima, es imprescindible la electroforesis del producto de PCR en gel de agarosa. Se debe observar 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 (Bou *et al.*, 2011).

- 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 (Bou *et al.*, 2011).

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) (Bou *et al.*, 2011).

- Análisis de secuencias

La observación del electroferograma (secuencias de bases ofrecidas por los secuenciadores) constituye el primer paso del análisis de las secuencias. Algunas veces se producen errores entre el electroferograma y la secuencia; 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. (Bou *et al.*, 2011).

Por último, se realiza la comparación de la secuencia en estudio con las depositadas en bases de datos. La comparación de las secuencias del gen ARNr 16S permite establecer relaciones filogenéticas entre organismos procariontes y de forma similar la región ITS permite hacer lo mismo en eucariotas, esto 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 procariontes como de eucariotas (Villota, 2013). Actualmente existen distintas bases de datos, algunas públicas como GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), la cual es una de las que presenta mayor número de consultas por su gran versatilidad en organismos, orígenes, genes, tipo y número de secuencias depositadas (Bou *et al.*, 2011).

- 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 de 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, 2005).

Al finalizar el análisis de las secuencias se procede a la construcción de un árbol filogenético, que refleja de forma esquemática el grado de parentesco genético entre los microorganismos comparados (Rodicio y Mendoza, 2004). 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. 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), 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) (Sandria, 2003).

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, 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) (Sandria, 2003).

3.6 Antagonismo microbiano

Existe una amplia gama de interrelaciones entre especies de microorganismos en los ecosistemas, tales como sinérgicas, antagónicas, de competencia física y bioquímica, moduladas por múltiples y complejos factores bióticos y abióticos. En la rizósfera, uno de los principales sitios donde se presentan microorganismos, especialmente funcionales, como fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos, promotores del crecimiento vegetal, biocontroladores y especies patogénicas, normalmente, compiten por espacio y por nutrientes. Estas interrelaciones entre microorganismos inciden en la interacción suelo-planta-microorganismos-ambiente y repercuten, de forma directa, de forma indirecta, en el crecimiento y en el desarrollo de las especies vegetales (Cano, 2011).

De acuerdo con lo anterior 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). Es importante comprender el mecanismo de acción de los antagonistas para un mejor uso de los mismos. Hasta ahora, los conocimientos sobre los mecanismos de acción involucran: la antibiosis, competencia por los nutrientes y espacio, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia. En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicación de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico (Larrea, 2001). A continuación, se describen tres de estos mecanismos:

- La antibiosis se define como la inhibición o destrucción de un microorganismo por sustancias como metabolitos específicos o inespecíficos, agentes líticos o enzimas que son producidas por otro

microorganismo. Ciertos microorganismos comienzan a producir antibióticos solo cuando hay disponible una cantidad sustancial de sustrato, principalmente carbono, pero otros microorganismos comienzan a producir antibióticos cuando la disponibilidad del sustrato disminuye. Se piensa que esta estrategia sirve para extender la actividad general de ciertos microorganismos al evitar que otros microorganismos utilicen la cantidad restante de sustrato (Jamalizadeh *et al.*, 2011).

- El mecanismo de competencia, constituye uno de los más importantes. Este puede definirse como 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 de los demás. Un factor esencial para exista competencia es la escasez o limitación de un elemento porque si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes (carbohidratos, nitrógeno, oxígeno) o espacio (Larrea, 2001).
- Un tipo de interacción directa entre los antagonistas y los patógenos es el parasitismo, este se define como la acción de un microorganismo parasitando a otro y puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Este consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares como, quitinasa, celulasa, β 1, 3-glucanasa y proteasa (Larrea, 2001).

3.7 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 discontinuo y en sistemas abiertos, como el cultivo continuo (Scragg, 1996).

3.7.1 Crecimiento microbiano en cultivo discontinuo

El crecimiento de una población microbiana se estudia analizando la curva de crecimiento de un cultivo microbiano. Cuando los microorganismos se cultivan en un medio líquido, normalmente se trata de un cultivo discontinuo o en sistema cerrado, debido a que no se añade más cantidad de medio que la inicial, en consecuencia, las concentraciones de nutrientes disminuyen y las de residuos aumentan. Se puede representar el crecimiento de microorganismos que se multiplican por fisión binaria como el logaritmo del número de células frente al tiempo de incubación. La curva resultante tiene cuatro fases diferentes, tal como se muestra en la **Figura 7** (Prescott *et al.*, 2004).

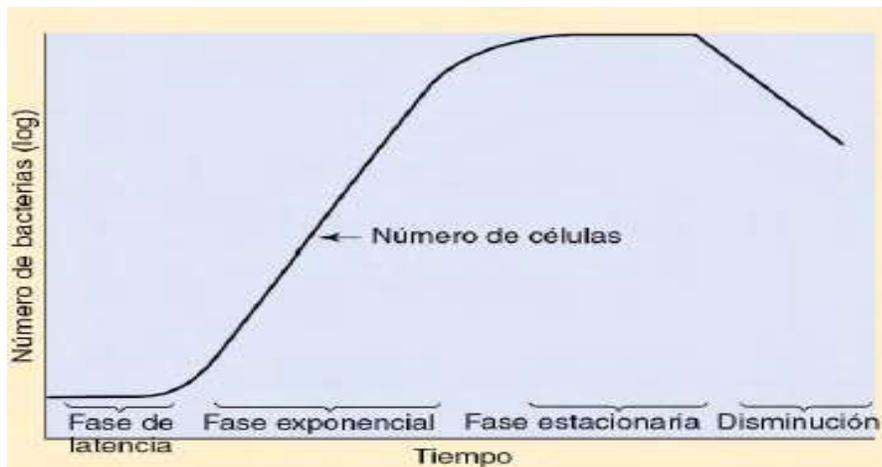


Figura 7. Fases del crecimiento bacteriano. Adaptado de (Murray, 2013).

- Fase de latencia o de retraso (lag)

La fase de latencia es el tiempo necesario para que las bacterias se adapten al nuevo medio donde se siembran, caracterizándose por ser un periodo de escasa o nula división celular (Pumarola *et al.*, 1991). 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 DNA 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. Sin embargo, si las células provienen de un medio idéntico y han sido obtenidas de un cultivo joven o en fase de crecimiento exponencial, la fase de latencia será corta o inexistente (Apella y Araujo, 2005).

- Fase exponencial o logarítmica

Frecuentemente se habla de esta fase como la 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, 1996). Durante esta fase la población total es casi uniforme en lo que se refiere a composición química de las células, actividad metabólica y otros caracteres fisiológicos, además las células son viables y su tamaño es constante (Apella y Araujo, 2005); también se deben considerar que esta fase de desarrollo logarítmico está mediatizada por una serie de factores limitantes, tales como, la velocidad de difusión osmótica, la concentración del sustrato, la presencia de oxígeno y la temperatura (Pumarola *et al.*, 1991).

- 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. El número de células viables permanece constante, porque mientras algunas de ellas se dividen otras mueren, este hecho puede ser el resultado del equilibrio entre la división y la muerte de células o simplemente, que la población deje de dividirse, aunque siga metabólicamente activa. Esta etapa puede extenderse desde horas hasta varios días dependiendo de la especie bacteriana (Apella y Araujo, 2005).

- 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 (Apella y Araujo, 2005).

3.7.2 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 (Apella y Araujo, 2005). En la Tabla 1, se muestran algunas de las técnicas empleadas.

Tabla 3

Métodos empleados para determinar el crecimiento microbiano.

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 portaobjetos	Filtración sobre membrana	Estimación de proteínas	Acumulación de metabolito
Contador automático de partículas			Consumo de un nutriente
Nefelometría			

Fuente: (Apella y Araujo, 2005).

El método utilizado con más frecuencia para la medición de poblaciones bacterianas es el recuento en placa o en medio sólido. Una ventaja importante de esta técnica es que mide el número de células viables. Una desventaja es que se requiere bastante tiempo, por lo general 24 horas o más, para que se formen colonias visibles. El recuento en placa se basa en la suposición de que cada bacteria crece y se divide para producir una sola colonia. Esto no siempre es cierto porque las bacterias con frecuencia crecen unidas en cadenas o como grumos. Por consiguiente, a menudo una colonia no se produce como resultado de una única bacteria sino de segmentos cortos de una cadena o de un agregado bacteriano. Para reflejar esta realidad los recuentos en placa suelen informarse como unidades formadoras de colonias (UFC) (Tortora *et al.*, 2007).

Cuando se realiza el recuento es importante que sólo crezca un número limitado de colonias, cuando hay demasiadas colonias algunas células se encuentran apiñadas y no pueden desarrollarse; esta situación es causa de inexactitudes en el recuento. Por este motivo el inóculo original se diluye varias veces en un proceso denominado dilución seriada, con el fin de asegurar que algunos recuentos estén dentro de esos límites (Tortora *et al.*, 2007).

Los métodos basados en la determinación de la turbidez son útiles para establecer la masa celular. 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, 1996).

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 de 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).

IV. METODOLOGÍA

El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un proceso de producción de un consorcio microbiano a escala de laboratorio con propiedades biofertilizantes, a partir de microorganismos aislados de bioinsumos artesanales, los cuales se obtuvieron como resultados de Flores y Roque (2017). A continuación se describen los procedimientos que se llevaron a cabo para la obtención del consorcio microbiano.

4.1 Ubicación del estudio

El desarrollo del proceso de producción, a escala de laboratorio, para el crecimiento de un consorcio microbiano con propiedades biofertilizantes a partir de bioinsumos artesanales, se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA), ubicado en el Recinto Universitario Simón Bolívar, en la Avenida Universitaria, Managua, Nicaragua, localizada geográficamente en las coordenadas UTM 12.1435887-86.2675189.

4.2 Caracterización morfológica y molecular de los microorganismos aislados de bioinsumos artesanales

En esta etapa se caracterizaron 29 microorganismos (23 bacterias y 6 hongos filamentosos) los cuales fueron aislados por Flores y Roque (2017) a partir de 4 muestras de bioinsumos artesanales. La caracterización morfológica se realizó a través de observaciones macroscópicas y microscópicas, mientras que la identificación molecular se realizó por medio de técnicas moleculares mediante el análisis del ADN ribosomal 16S para bacterias e ITS 1-ITS 4 para hongos. Esto permitió identificar molecularmente 17 bacterias y 6 hongos filamentosos, debido a que 6 bacterias ya habían sido identificadas hasta nivel de especie por Flores y Roque (2017).

4.2.1 Conservación de los microorganismos aislados de bioinsumos artesanales

La conservación de los 29 microorganismos se llevó a cabo por medio del método de transferencia periódica. Este método consiste en transferir el cultivo a un medio de cultivo nutritivo y fresco a intervalos que asegure la viabilidad del mismo (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 8A**), y se almacenaron en un refrigerador a una temperatura de 10° C. Las relaciones requeridas para la preparación de los medios de cultivos según las especificaciones del fabricante son:

- **Agar Miller (LB):** se agregaron 40 gramos por litro de agua destilada.
- **Agar papa Dextrosa (PDA):** se agregaron 39 gramos por litro de agua destilada.

Una vez disueltos en agua destilada, los medios de cultivo se sometieron a un calentamiento hasta llegar al punto de ebullición en el Hot Plate CORNING PC-620D (**Figura 8B**), posteriormente se dosificaron 10 mL en tubos de ensayos, los cuales fueron esterilizados por medio de calor húmedo en el autoclave YAMATO SQ810C a 121° C durante 15 minutos a una presión de 121 kPa. Se utilizó una cinta adhesiva para el control de la autoclave, que cambia su color al alcanzar los 121° C indicando una correcta esterilización (**Figura 8C**). Finalizada la esterilización, los medios se vertieron en las placas de Petri en la proximidad de la llama del mechero y se dejaron enfriar a temperatura ambiente (**Figura 8D**). Los medios, una vez esterilizados se conservaron en refrigeración a una temperatura de 10° C (Flores y Roque, 2017).



Figura 8. 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 el autoclave a 121° C durante 15 minutos; D) Placas Petri con el medio de cultivo solidificado. Fuente: Propia.

La transferencia periódica (siembra) de los microorganismos aislados (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 (**Figura 9**), y se utilizó con el objetivo de obtener y mantener los cultivos puros, el procedimiento a seguir fue el descrito por Sanz (2011):

- 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 de esto se tomó un inóculo de la muestra y se transfirió a un área pequeña de la superficie de la placa, próxima al borde, luego el inóculo se extendió formando estrías muy juntas sobre la superficie de una porción pequeña de la placa.
- Una vez finalizado el paso anterior se flameó de nuevo el asa y se dejó enfriar, el inóculo tomado fue obtenido mediante el rozamiento del asa de siembra con las estrías sembradas la primera vez, la segunda tanda de estrías se realizó sobre una porción virgen de la placa.

- Posteriormente el asa fue flameada y enfriada una tercera vez, y se repitió exactamente lo antes descrito, pero utilizando como inóculo la segunda tanda de estrías.
- Para finalizar el agotamiento por estrías de nuevo se flameó y se dejó enfriar el asa de siembra, repitiendo el mismo procedimiento empleando como inóculo la tercera tanda 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, siendo estas las condiciones necesarias para el crecimiento de las bacterias (Aquiahuatl y Pérez, 2004).



Figura 9. Método de siembra de bacterias por agotamiento de estrías. Fuente: Propia.

Para los hongos filamentosos se tomó una parte del micelio con palillos de madera o hisopos estériles cerca de la llama del mechero (**Figura 10A**), luego la muestra extraída se colocó en el centro y en los cuatro puntos cardinales de la placa de Petri que contenía el medio PDA (**Figura 10B**). Finalmente se dejaron crecer en posición invertida a una temperatura de 28° C a 30° C durante 3 a 5 días (**Figura 10C**) (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, debido a que las esporas son altamente contaminantes.

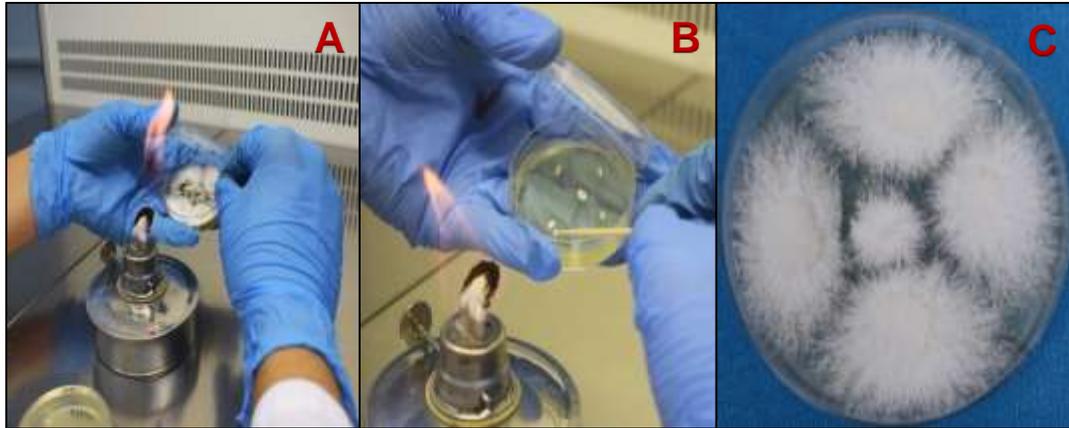


Figura 10. Siembra de hongos filamentosos. A) Toma de muestra del micelio; B) Deposito de la muestra en el medio PDA; C) Crecimiento del hongo después de 5 días. Fuente: Propia.

4.2.2 Caracterización morfológica de los microorganismos aislados de bioinsumos artesanales

La identificación morfológica de los microorganismos transferidos a medios de cultivos frescos, se realizó por medio de la observación de sus respectivas características macroscópicas y microscópicas. La caracterización macroscópica de los hongos y bacterias se realizó mediante la descripción de las características que presentaban sus colonias. En el caso de las bacterias se describieron los caracteres que las definen como su forma, borde, superficie, consistencia, transparencia y coloración. Mientras que los hongos filamentosos se les describió 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 (Flores y Roque, 2017).

Para llevar a cabo las pruebas de tinción diferencial de Gram para bacterias, se utilizaron cultivos con 24 horas de crecimiento, y los pasos a seguir fueron: la preparación y fijación del frotis, para esto los portaobjetos se lavaron y secaron con papel toalla para etiquetarlos. Inmediatamente en el centro del portaobjetos limpio se colocó una gota de agua destilada estéril. Posteriormente el asa de siembra se esterilizó con la llama del mechero y se dejó enfriar con el fin de evitar que los microorganismos sean destruidos. Una vez fría se tomó cuidadosamente una pequeña muestra de la colonia, la cual se mezcló con la gota de agua destilada estéril y se extendió suavemente sobre el portaobjetos para facilitar su secado (**Figura 11A**) (Aquiahuatl y Pérez, 2004).

La preparación se fijó al calor pasando el portaobjetos por la llama del mechero dos veces durante uno o dos segundos (**Figura 11B**). Si la preparación no está convenientemente fijada, las bacterias no se adherirán al vidrio y se perderán durante el proceso de tinción. Por el contrario, una exposición excesiva al calor lleva a la ruptura o distorsión de las bacterias (Sanz, 2011). Una vez listos los

frotis se procedió a realizar la tinción diferencial de Gram mediante la aplicación de colorantes y decolorantes por tiempos determinados en el siguiente orden: cristal violeta durante 1 minuto, yodo-lugol por 30 segundos, alcohol-acetona durante 15 segundos y por último Safranina por 1 minuto (**Figura 11C**). Al finalizar la aplicación de cada uno de los reactivos se lavó cuidadosamente el frotis con agua de la llave o agua destilada para eliminar el exceso de los colorantes. Finalmente se dejó secar y se procedió a la observación en el microscopio OLYMPUS CH2 utilizando el objetivo de 100X (**Figura 11D**).

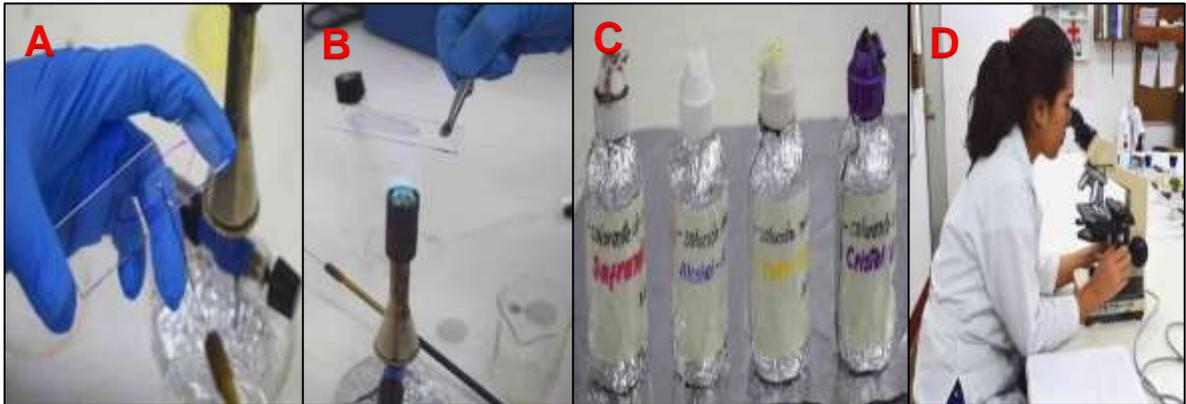


Figura 11. Tinción diferencial de Gram. A) Preparación del frotis en un portaobjetos; B) Fijación del frotis con calor; C) Recipientes de los colorantes, solución mordiente (yodo-lugol) y decolorante utilizados en la tinción de Gram; D) Observación en el microscopio con objetivo 100X. Fuente: Propia.

La observación microscópica de los hongos filamentosos se realizó 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**) (Aquiahuatl y Pérez, 2004).

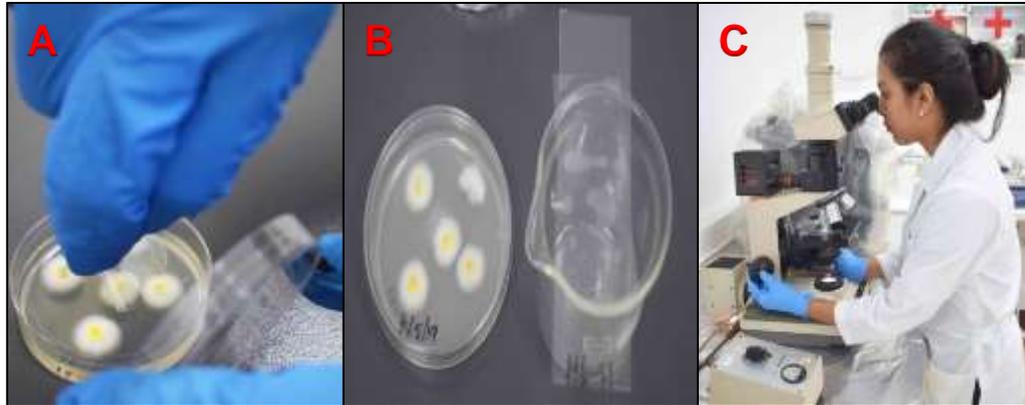


Figura 12. Técnica de cinta adhesiva para la observación de esporas en hongos filamentosos. A) Toma de esporas con la cinta adhesiva transparente; B) Fijación de la cinta adhesiva sobre el portaobjetos; C) Observación de esporas al microscopio OLYMPUS BH-2 con el objetivo 50X. Fuente: Propia.

4.2.3 Identificación molecular de los microorganismos aislados de bioinsumos artesanales

Una vez finalizada la identificación morfológica se procedió a la identificación molecular de las 17 bacterias y 6 hongos filamentosos aislados de bioinsumos artesanales, los cuales no fueron identificados molecularmente por Flores y Roque (2017). Para el caso de las bacterias se amplificó la subunidad pequeña (16S) del ADNr 27F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG), 1492R (GGT TAC CTT GTT ACG ACT T) (Acosta *et al.*, 2009). 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') e ITS4 (5' TCC TCCGCT TAT TGA TAT GC 3') (Internal Transcribed Space) (Álvarez *et al.*, 2013), ya que la comparación de sus secuencias permite establecer las relaciones filogenéticas para ambos tipos de microorganismos (Villota, 2013).

En esta etapa se contrataron los servicios del Centro de Biología Molecular (CBM) de la Universidad Centroamericana para la extracción de ADN y del centro MACROGEN INC de Corea del Sur para la secuenciación del ADN extraído. Posteriormente se recibieron los electroferogramas con las secuencias de bases (Adenina, Guanina, Citosina y Timina), y se procedió a realizar el análisis de estas 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 describirán a continuación:

- Corrección de las secuencias

El primer paso de la identificación molecular de los microorganismos fue el análisis de las secuencias obtenidas por el centro MACROGEN INC de Corea del Sur, lo cual consistió en la observación del electroferograma debido a que algunas veces ocurren errores, 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 (**Figura 13A**), usando el

programa Bioedit v7.0.9 y una vez corregida la secuencia se guardó en formato FASTA (**Figura 13B**).

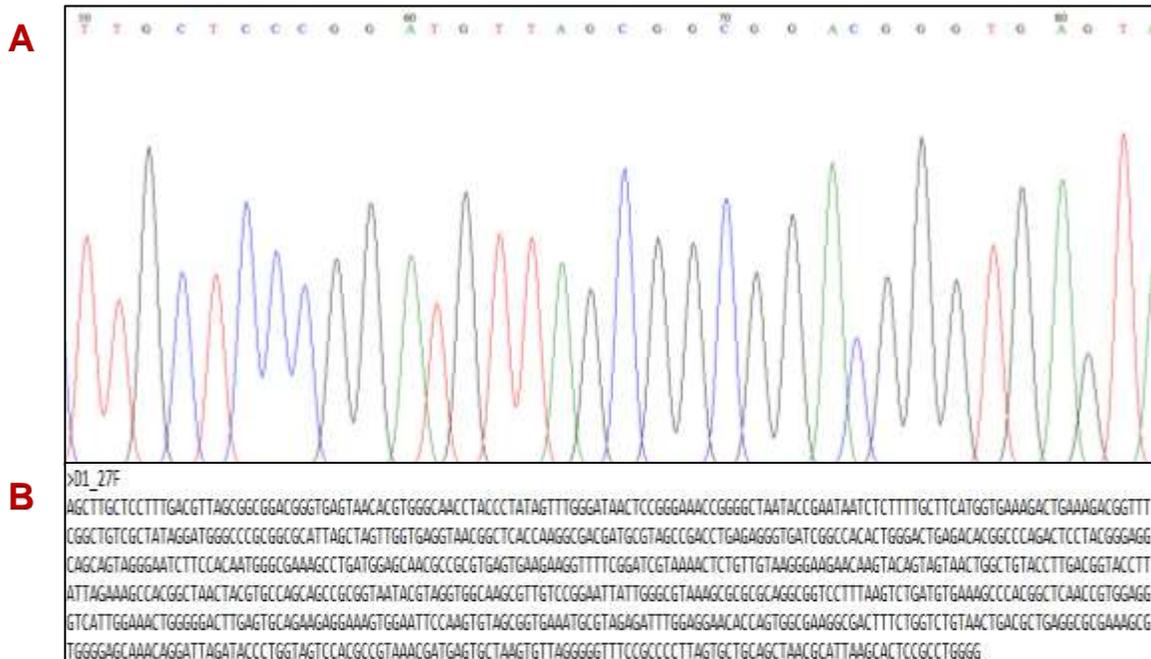


Figura 13. Corrección de errores. A) Electroferograma corregido con el uso de Bioedit v7.0.9.; B) Secuencia corregida guardada en formato FASTA. Fuente: Propia.

- Comparación de las secuencias

Las secuencias corregidas se compararon con las secuencias correspondientes al gen 16S para bacterias e ITS 1-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
Lysinibacillus macroides strain Colony4.T17-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1530	1530	100%	0.0	98.95%	KT074245.1
Bacillus sphaericus isolate NJC-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1530	1530	100%	0.0	98.95%	DQ833758.1
Lysinibacillus sp. strain NT1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1528	1528	100%	0.0	98.95%	MH559828.1
Lysinibacillus sp. YS11 chromosome, complete genome	1528	16739	100%	0.0	98.95%	CP026007.1
Lysinibacillus xylanilyticus strain C4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1528	1528	100%	0.0	98.95%	KX703024.1

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: Propia.

- 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 (Flores y Roque, 2017).

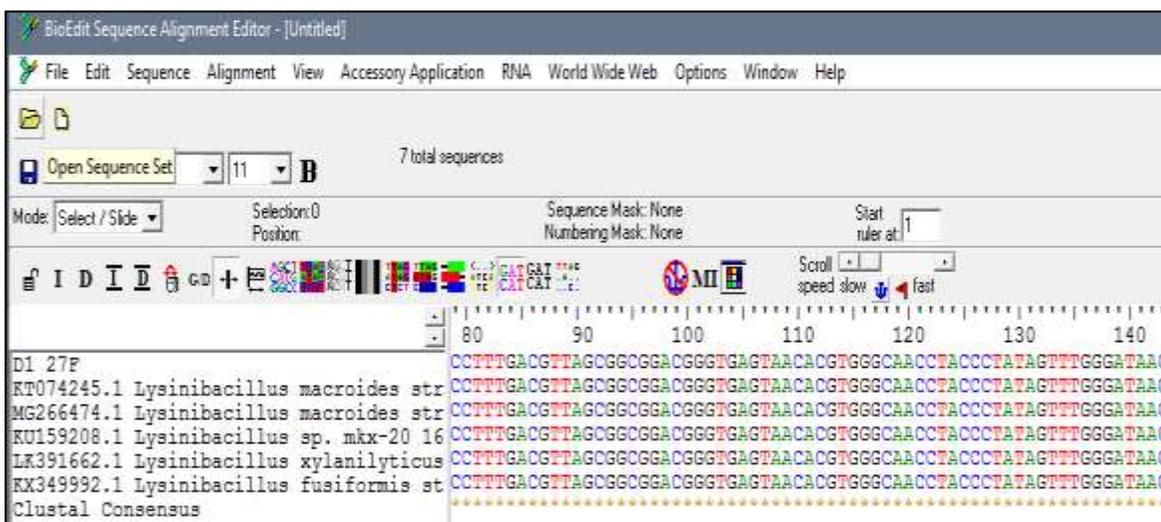


Figura 15. Alineamiento de la secuencia en estudio con las 5 secuencias seleccionadas del GenBank del NCBI, utilizando la aplicación Clustal W Multiple alignment for version 1.4 incluido en el programa BioEdit v7.0.9. Fuente: Propia.

- Construcción de árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos se construyeron con el programa MEGA 7.0.14, usando Neighbor-Joining como método de construcción del árbol 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).

4.3 Pruebas de antagonismo y selección de los microorganismos que conformaron el consorcio microbiano

Una vez finalizada la identificación morfológica y molecular del total de microorganismos con los que se cuenta, se realizó una búsqueda bibliográfica de las aplicaciones biotecnológicas de cada uno de ellos y de acuerdo a sus características se seleccionaron aquellos que sean promotores del crecimiento vegetal conocidos como PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), ya que estos presentan efectos positivos sobre las plantas (Moreno *et al.*, 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 entre ellas 5 aisladas de bioinsumos artesanales, 3 aisladas por Delgado y Fonseca (2019) y 1 por Rios (2019), estas se seleccionaron según las características antes descritas y fueron sometidas a pruebas de antagonismo con el fin de verificar que no existiera inhibición entre ellas y así poder formar el consorcio, también se les asignó un número a cada bacteria seleccionada con la cual se le identificó en el resto de los experimentos. Las pruebas de antagonismo se realizaron en agar Luria-Bertani (LB) mediante el método modificado de pozos de agar.

El primer paso de las pruebas de antagonismo consistió en la preparación de la turbidez estándar de Mcfarland, con el objetivo de ajustar todos los inóculos de las bacterias seleccionadas en un rango de concentración, ya que el 0.5 de la escala de turbidez de Mcfarland con valores de absorbancia entre 0.08-0.1 a una longitud de onda de 625 nm equivale a una concentración de 1×10^8 UFC. Esto consistió en preparar 10 estándares que contenían cloruro de bario dihidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al 1.175% (p/vol) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1% (vol/vol), a los cuales se les midió la absorbancia a la longitud de onda de 625 nm en el espectrofotómetro marca Thermo modelo Genesys 6. La composición de la turbidez estándar de Mcfarland y las correspondientes concentraciones de UFC/mL se muestran en la **Tabla 4** (CDC y OMS, 2009). Posteriormente se procedió a la preparación de los inóculos de cada una de las bacterias que se seleccionaron. Para esto se utilizaron cultivos de 24 horas de cada una de las bacterias, luego 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. Una vez listos los inóculos se les midió la absorbancia a la longitud de onda de 625 nm en el espectrofotómetro marca Thermo modelo Genesys 6, luego se ajustaron según los valores de absorbancia obtenidos en la turbidez estándar de McFarland, equivalentes a las concentraciones de 1×10^8 hasta 9×10^8 UFC/mL.

Tabla 4

Composición de la turbidez estándar de McFarland.

Número de la turbidez estándar	Cloruro de bario dihidratado (1.175%) mL	Ácido sulfúrico (1%) mL	Densidad de bacterias aproximada (UFC/mL)
0.5	0.5	99.5	1×10^8
1	0.1	9.9	3×10^8
2	0.2	9.8	6×10^8
3	0.3	9.7	9×10^8
4	0.4	9.6	1.2×10^9
5	0.5	9.5	1.5×10^9
6	0.6	9.4	1.8×10^9
7	0.7	9.3	2.1×10^9
8	0.8	9.2	2.4×10^9
9	0.9	9.1	2.7×10^9
10	1.0	9.0	3×10^9

Fuente: (CDC y OMS, 2009).

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 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. Después de realizar la siembra masiva para cada uno de los inóculos preparados, las placas se dejaron secar durante 15 minutos. Posteriormente transcurrido este tiempo 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 μ L de los inóculos preparados, en la **Figura 16** se ilustra un ejemplo de la distribución de las bacterias a confrontar en este ensayo siguiendo las combinaciones mostradas en la **Figura 17**, 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). Este paso se realizó

para cada una de las bacterias seleccionadas. El criterio de selección consistió en la observación de la presencia de halos de inhibición.

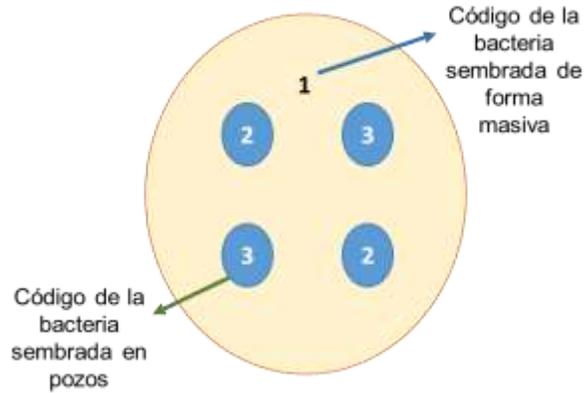


Figura 16. Se muestra la distribución de las bacterias confrontadas, (1): bacteria sembrada de forma masiva; (2 y 3): bacterias sembradas en pozos en los 4 círculos de color azul, donde los números representan los códigos de las bacterias confrontadas. Fuente: Propia.

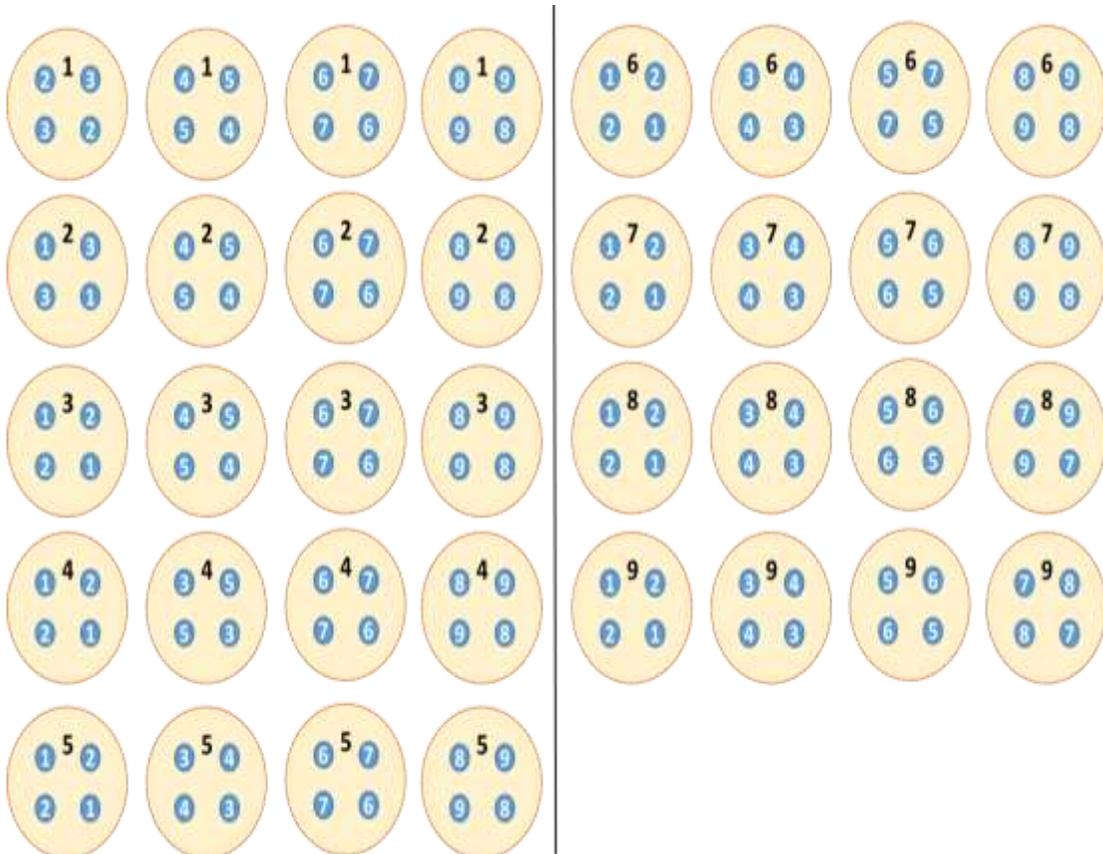


Figura 17. Combinaciones utilizadas en las pruebas de antagonismo para cada una de las cepas seleccionadas. Fuente: Propia.

4.4 Construcción de la curva cinética de crecimiento y evaluación de la estabilidad de los cultivos producidos individualmente que forman parte del consorcio microbiano.

Finalizada la selección de los microorganismos y las pruebas de antagonismo, con las que se determinaron las especies que conforman el consorcio microbiano, se procedió a evaluar la cinética de crecimiento y posteriormente la estabilidad de las bacterias que no mostraron antagonismo entre sí. Con la construcción de la curva cinética de crecimiento se determinaron los tiempos de producción en Shaker de cada bacteria y de esta forma conocer cada una de las fases de crecimiento. Finalmente, a cada una de las cepas seleccionadas se les evaluó la estabilidad mediante la aplicación de la prueba de anaquel o pruebas de estabilidad aceleradas.

4.4.1 Construcción de curva de crecimiento por método turbidimétrico

Como paso previo para la construcción de la curva cinética de crecimiento fue necesario la preparación de inóculos de las cepas seleccionadas como resultado de las pruebas de antagonismo, para ello se utilizaron Erlenmeyers con capacidad de 200 mL para cada una de las bacterias, los cuales contenían 100 mL de medio de cultivo estéril LB Broth líquido y que posteriormente fueron inoculados con las cepas bacterianas seleccionadas (**Figura 18A**). Estos se dejaron en agitación en un Shaker de laboratorio marca SCILOGEX SK-O330-Pro, a una velocidad de 170 rpm durante 16 horas (**Figura 18B**). Una vez transcurrido el tiempo establecido se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UNICO UV-2100, de cada pre-inóculo con el fin de determinar su concentración en términos de UFC (Páramo, 2014a).

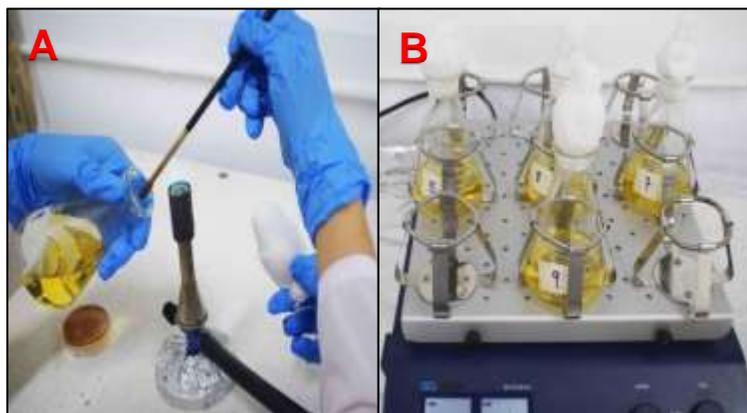


Figura 18. Preparación del pre-inóculo. A) Inoculación de bacterias seleccionadas en medio líquido; B) Crecimiento en Shaker durante 16 horas a 170 rpm. Fuente: Propia.

Para la construcción de la curva de crecimiento de cada una de las bacterias, se preparó un blanco y un control al que se le midió la absorbancia, para esto se utilizaron Erlenmeyers con 90 mL de medio de cultivo estéril LB Broth líquido. Los inóculos previamente preparados se encontraron en condiciones metabólicas aptas para ser inoculados a un volumen mayor, de estos se

tomaron 10 mL y se inocularon en Erlenmeyers que contenían 90mL de medio de cultivo estéril LB Broth líquido (**Figura 19A**) y se dejaron en crecimiento dándole seguimiento en el tiempo para determinar el momento en que la curva desarrollaba cada una de las fases hasta el momento justo en que entraba a su punto máximo de crecimiento en el Shaker de laboratorio marca SCILOGEX SK-O330-Pro en agitación a una velocidad de 170 rpm (**Figura 19B**). Para la construcción de la curva cinética de crecimiento se realizaron mediciones de absorbancia en el espectrofotómetro UNICO UV-2100, a cada uno de los inóculos partiendo del tiempo cero y después cada 15 minutos, tomando 3 mL de las muestras y utilizando una longitud de onda de 540 nm (**Figura 19C**). Una vez finalizado el experimento se graficó la curva de crecimiento bacteriano Absorbancia vs Tiempo (horas) (Páramo, 2014a).

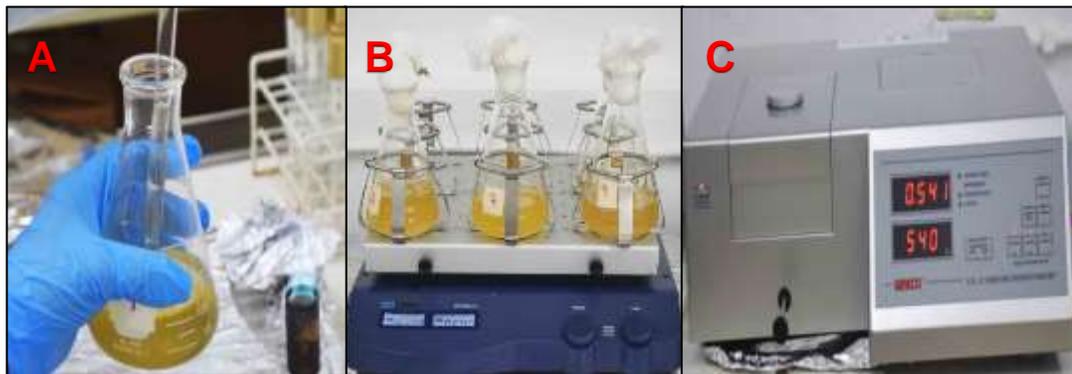


Figura 19. Construcción de la curva de crecimiento. A) Inoculación a un volumen mayor; B) Crecimiento en Shaker durante 6 horas; C) Medición de la absorbancia espectrofotómetro. Fuente: Propia.

También se realizó la construcción de las curvas UFC vs Tiempo (horas) y UFC vs Absorbancia, considerando 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) (Páramo, 2012).

4.4.2 Pruebas de anaquel o de estabilidad acelerada

Una vez finalizada la construcción de la curva de cinética de crecimiento de cada bacteria seleccionada para formar parte del consorcio microbiano, se procedió a realizar las pruebas de anaquel o de estabilidad. Inicialmente se prepararon inóculos de cada una de las bacterias y se dejaron en crecimiento por 16 horas en shaker a una velocidad de 170 rpm, transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a $\lambda=540$ nm y luego se inocularon 15 mL de los inóculos anteriormente preparados en Erlenmeyers que contenían 135 mL medio de cultivo estéril LB Broth líquido y se dejaron en crecimiento en shaker hasta que la curva cinética antes obtenida indicara el tiempo que cada cultivo debía permanecer en crecimiento. Posteriormente se realizaron una serie de diluciones, lo cual consistió en preparar 9 mL de agua destilada estéril en tubos de ensayo previamente marcados desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-6} . Luego con pipetas estériles se tomaron muestras de 1 mL de cada Erlenmeyer y se inocularon en los tubos de

ensayos correspondientes a la dilución de 1×10^{-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 1×10^{-2} , repitiendo el mismo proceso hasta llegar a la dilución de 1×10^{-6} (Páramo, 2014a).

Para obtener el número inicial de UFC/mL de cada bacteria se utilizó el método de siembra en profundidad, el cual consistió en depositar con una nueva pipeta 1 mL de la dilución en una placa de Petri marcada con el número de muestra y dilución, luego se vertió medio de cultivo LB previamente fundido y atemperado hasta aproximadamente 45°C y se esparció en toda la superficie de la placa a través de movimientos oscilatorios. Finalmente se dejó solidificar y se incubó en posición invertida durante 24 a 48 horas a 35°C ; este paso se efectuó a partir de las diluciones de 10^{-4} hasta 10^{-6} (Páramo, 2014a); el proceso de dilución seriada se muestra en la **Figura 20**. 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.

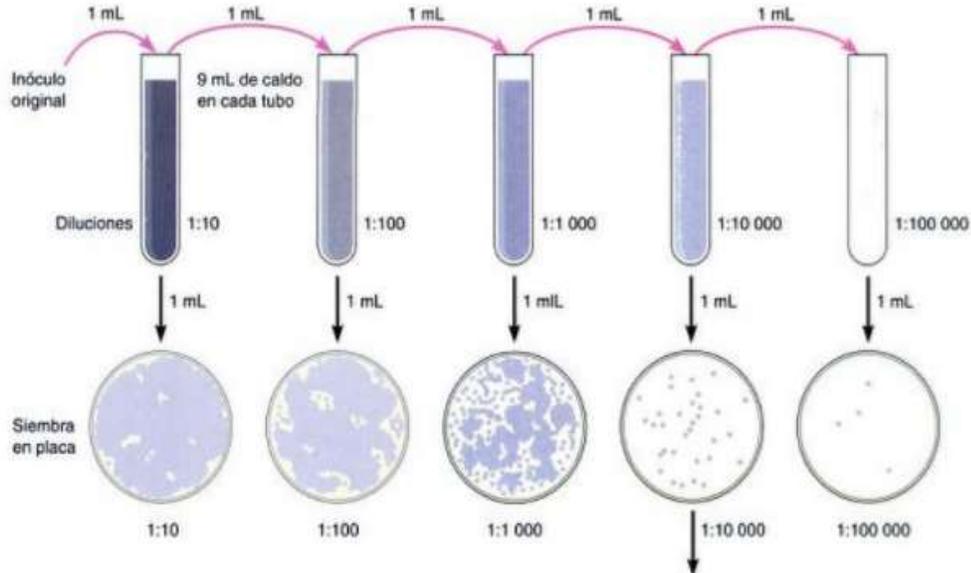


Figura 20. Recuento en placa y diluciones seriadas. Adaptado de (Tortora *et al.*, 2007).

Luego los Erlenmeyers que contenían los cultivos obtenidos del crecimiento en shaker de cada una de las bacterias seleccionadas se almacenaron en refrigeración a 10°C durante un periodo de 2 meses con el fin de determinar la vida útil de estas bacterias. 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). Transcurrido el tiempo establecido se construyeron los gráficos de UFC/mL vs Tiempo de cada una de las bacterias evaluadas.

V. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El desarrollo de esta tesis permitió obtener los siguientes resultados en correspondencia a los objetivos planteados. Se caracterizaron morfológica y molecularmente 29 microorganismos aislados de 4 muestras de bioinsumos artesanales provenientes de dos zonas del país (Occidente y Norte) en presentaciones líquidas y sólidas. Estos microorganismos se conservaron por medio de transferencia periódica en medios de cultivos sólidos específicos con el objetivo de encontrar a través de sus aplicaciones biotecnológicas aquellos que presenten características promotoras del crecimiento vegetal para su aplicación como un consorcio microbiano con propiedades biofertilizantes.

5.1 Caracterización morfológica y molecular de los microorganismos aislados de bioinsumos artesanales

La caracterización morfológica de los 29 microorganismos aislados por Flores y Roque (2017), se realizó mediante observaciones macroscópicas y microscópicas, tanto para bacterias como para hongos, los microorganismos que se caracterizaron fueron 23 aislados bacterianos y 6 hongos filamentosos, el total de microorganismos aislados de cada muestra de bioinsumos artesanales se muestran en la **Tabla 5**. 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 Space) para hongos.

Tabla 5

Se muestra el total de microorganismos aislados de bioinsumos artesanales, según el estado y procedencia de la muestra recolectada.

Muestra		Código de la muestra	No. de bacterias	No. de hongos
Estado	Zona de procedencia			Filamentosos
Sólido	Norte	TS	5	4
Sólido	Norte	LS	6	1
Líquido	Norte	LL	3	1
Líquido	Occidente	DCL	9	
Total			23	6

Fuente: Propia.

5.1.1 Caracterización morfológica de bacterias aisladas de bioinsumos artesanales

Orberá *et al.* (2005) realizaron el aislamiento e identificación de 91 cepas aisladas de la rizósfera de un jardín de plantas ornamentales, para lo cual hicieron una descripción de las características macroscópicas de las colonias aisladas y posteriormente una caracterización morfotintorial (Tinción diferencial de Gram). En el presente trabajo las bacterias fueron caracterizadas por medio de la descripción macroscópica de las características de sus colonias tomando en cuenta la forma, el borde, la superficie, su consistencia y coloración. También se caracterizaron microscópicamente por medio de la prueba de tinción diferencial Gram, lo cual permitió la observación de la morfología, agrupación de las células, clasificación según su respuesta a dicha prueba en Gram Positivas o Gram Negativas, todo esto pudo ser observado al utilizar el microscopio de luz con objetivo de 100X. En la **Tabla 6** se muestra los resultados de estas descripciones.

Tabla 6

Caracterización morfológica realizada mediante la observación macroscópica y microscópica de las bacterias aisladas de bioinsumos artesanales.

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.

Continuación de la Tabla 6

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.
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.

Continuación de la Tabla 6

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.
DCL4-31F	Colonias opacas con coloración blanca, de forma irregular, superficie plana, borde filamentosos 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.

Fuente: Propia.

Como resultado de la caracterización macroscópica mostrada en la **Tabla 6** se observaron 14 tipos de morfología (superficie papilada, bordes ondulados, consistencia seca, etc.), entre las cuales la mayoría presentan una coloración crema, de consistencia cremosa y predominan las colonias con bordes redondeados. De la aplicación de las pruebas de tinción diferencial Gram a los cultivos bacterianos 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 21**, 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 vía molecular.

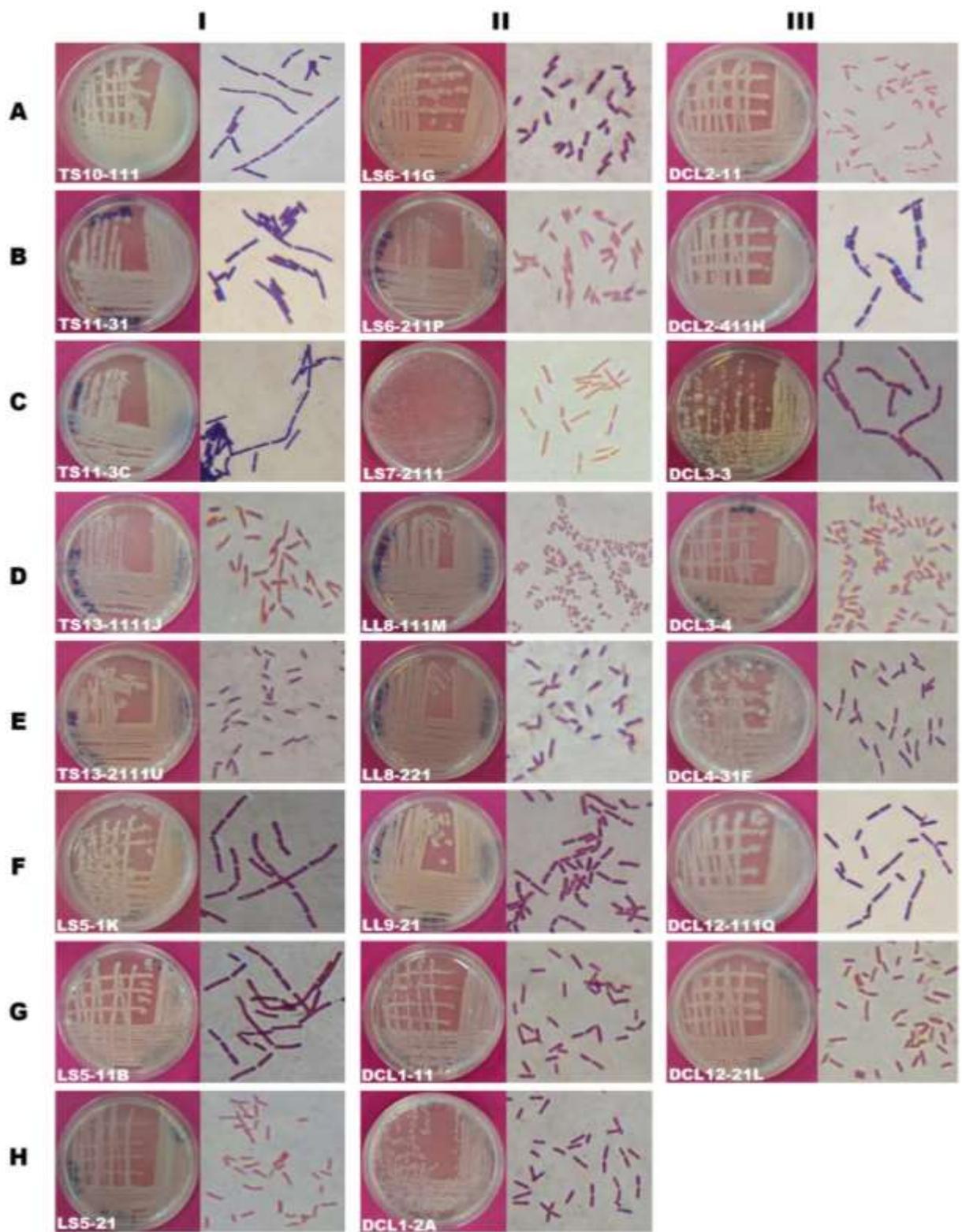


Figura 21. Morfología en placa y tinción de Gram de bacterias aisladas de bioinsumos artesanales. AI-EI: Muestra TS; FI-CII: Muestra LS; DII-FII: Muestra LL; GII-GIII: DCL; Fuente: Propia.

En la **Figura 21** se observa que de los 23 aislados bacterianos, 22 son de forma bacilar y una de forma coccal, predominando la presencia de bacilos Gram Positivos, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Orberá *et al.* (2005) ya que del total de cepas aisladas por estos autores, la mayoría presentaban forma bacilar, donde de un total 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 & 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, realizada por medio de este trabajo, no se observaron coincidencias con las características de las colonias aisladas por Orberá *et al.* (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.

La mayoría de los aislados bacterianos proveniente de los bioinsumos artesanales presentaron forma bacilar y por tanto se trata de bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, debido a que este género posee una abundancia relativa en el suelo.

5.1.2 Caracterización morfológica de hongos filamentosos aislados de bioinsumos artesanales

Masaquiza (2019), obtuvo 27 aislamientos de hongos filamentosos a partir de la rizósfera de plantas de café y los identificó de acuerdo a las características (macroscópicas y microscópicas) que presentaron. La mayoría de estos fueron identificados como *Trichoderma spp.*, además de *Aspergillus spp.* y *Gliocephalotrichum sp.*

De igual forma, para este trabajo, con los hongos filamentosos se realizó una descripción de las características macroscópicas y microscópicas, tomando en cuenta la base de su aspecto morfológico, lo cual incluye las características de las colonias (forma, elevación, margen, superficie, textura, tamaño, color y la presencia de pigmentos difusos) y la observación de las esporas reproductivas mediante el uso del microscopio de luz con un objetivo de 50X. En la **Figura 22** se muestran los 6 hongos filamentosos aislados de bioinsumos artesanales cuyas características se describen en la **Tabla 7**.

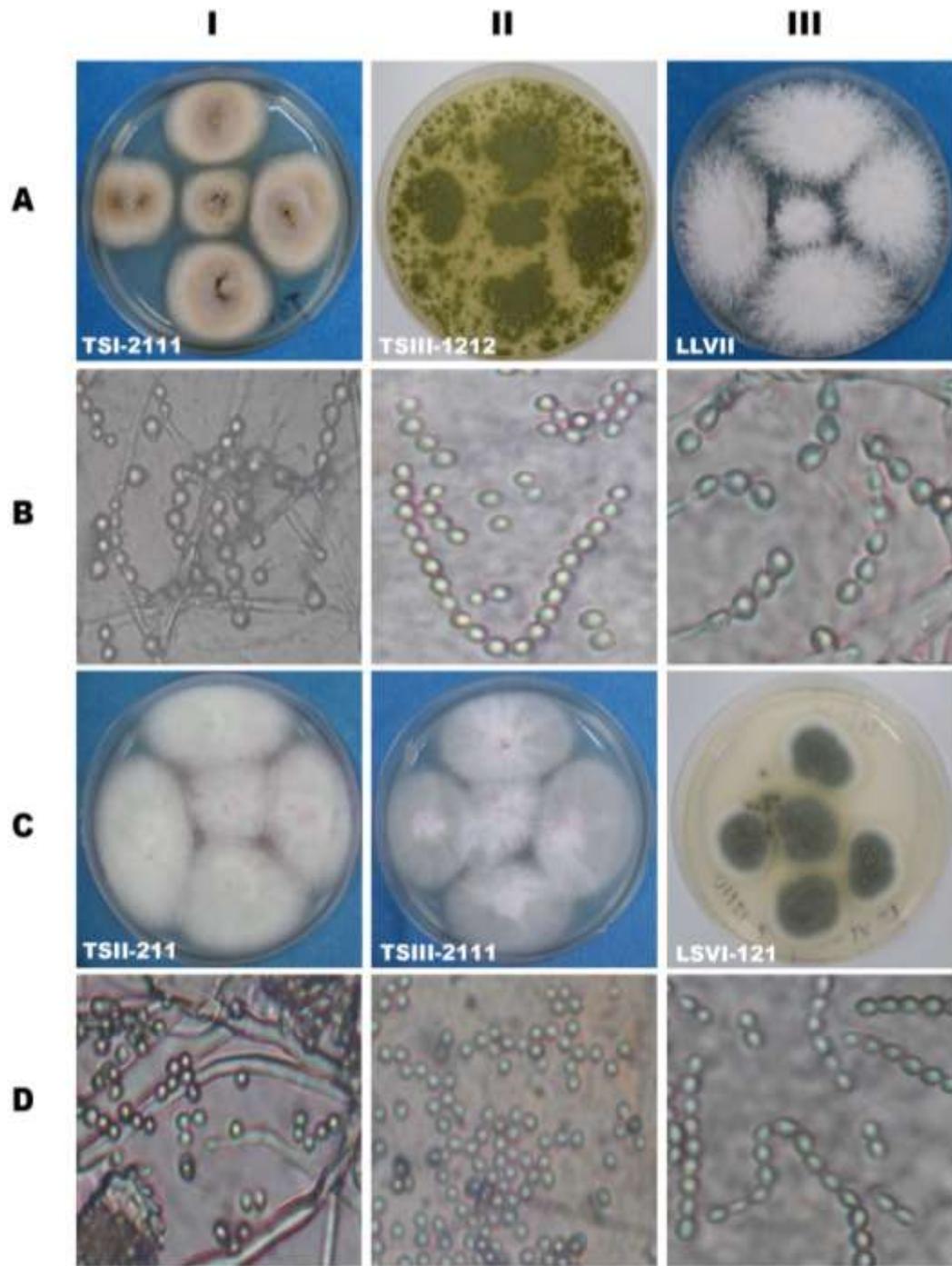


Figura 22. Hongos filamentosos aislados de muestras de bioinsumos artesanales. En las filas A y C se muestran la morfología en placa, mientras que en las filas B y D se muestran las esporas observadas de cada uno de ellos. Fuente: Propia.

Tabla 7

Caracterización morfológica realizada mediante la observación macroscópica y microscópica de los hongos filamentosos aislados de bioinsumos artesanales.

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

Fuente: 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 sugerían que se trate de los géneros *Neosartorya sp.* (**Figura 22AII y 22BII**) y *Aspergillus sp.* (**Figura 22CII y 22DII**) respectivamente, lo cual se pudo comprobar con la identificación molecular. 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.

5.1.3 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; el gen se encuentra ubicado en la subunidad pequeña del ribosoma (30S), asociado a esto, el gen ribosomal 16S es una región híper variable lo cual garantiza una especificidad de especie, esto resulta muy útil para la identificación de especies bacterianas (Castillo *et al.*, 2015). Barquero (2014) aisló e identificó por medio de análisis moleculares del gen ADNr 16S, 122 cepas de rizobacterias asociadas a la rizósfera de pimiento y alubia. Entre las cepas identificadas se encuentran rizobacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Brevibacterium*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Lysinibacillus*, *Ochrobactrum* y *Phyllobacterium*. El objetivo del trabajo de este último autor fue desarrollar biofertilizantes y biocontroladores basados en las bacterias identificadas.

De los 23 aislados bacterianos de bioinsumos artesanales del presente trabajo, se secuenciaron las 17 bacterias restantes de los aislamientos e identificación realizado por Flores y Roque (2017). De estas (del total de los 23 bacterias) 12 se lograron identificar a nivel de especie y 11 hasta nivel de género mediante el análisis de las secuencias obtenidas por MACROGEN INC de Corea del Sur para la elaboración de los árboles filogenéticos. Una sección de dicho árbol se muestra en la **Figura 23** y su versión completa en el **Anexo 1**. Las secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA se muestran en el **Anexo 2**.

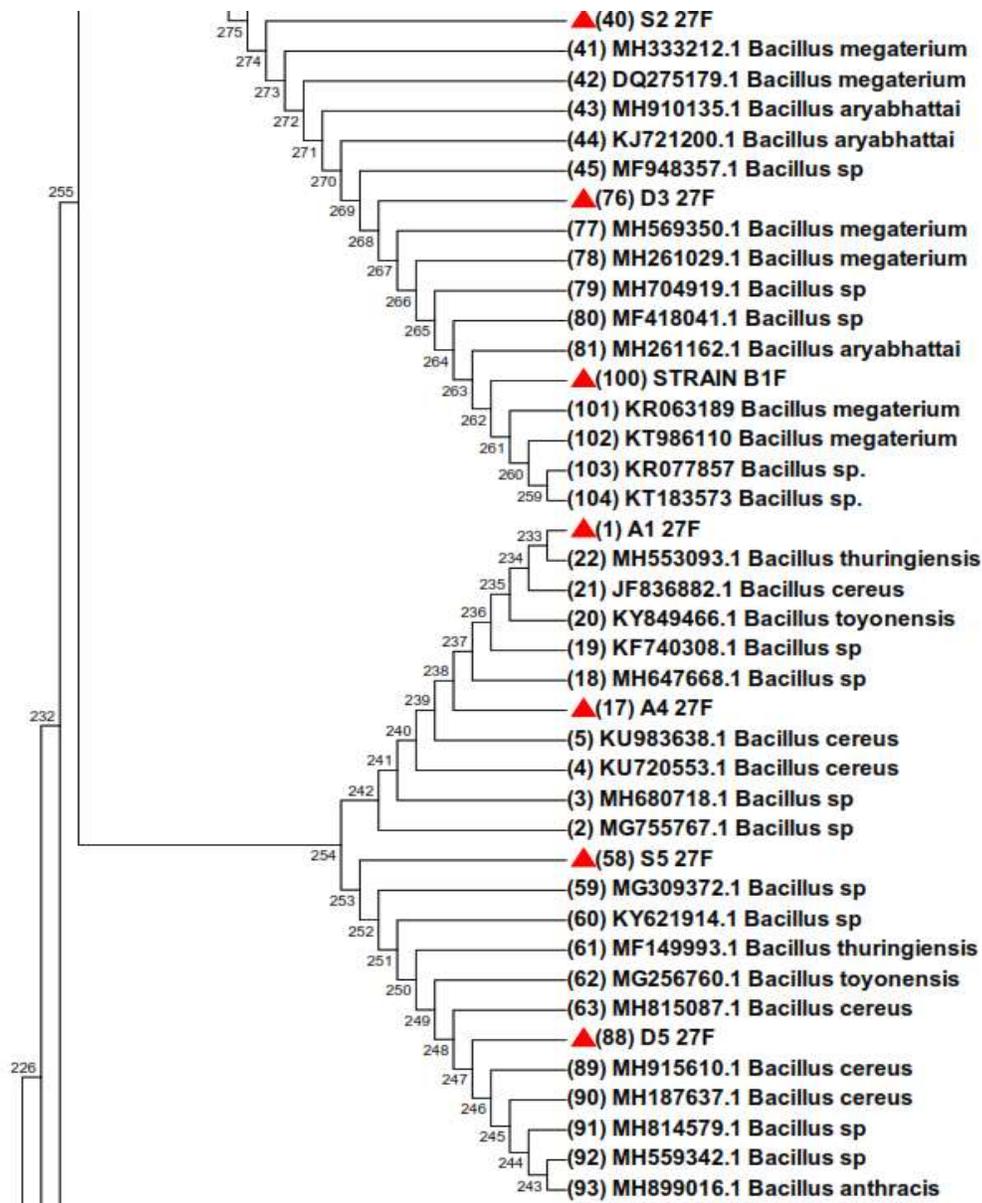


Figura 23. Se muestra una sección del árbol filogenético de aislados bacterianos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado con el programa MEGA 7.0.14, el código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo. Fuente: Propia.

La **Tabla 8** obtenida a partir del análisis del árbol filogenético de la **Figura 23**, detalla las 23 bacterias identificadas a partir de las muestras de bioinsumos proveniente de la zona occidente y norte del país. 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* (8 a nivel de especie y 6 a nivel de género sp), 4 *Stenotrophomonas*, 1 *Agrobacterium*, 2 *Lysinibacillus*, 1 *Staphylococcus*, 1 *Paenibacillus*.

Tabla 8

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 obtenida del análisis del árbol filogenético.

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>

Continuación de la Tabla 8

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>
L2	LL8-221	<i>Bacillus sp.</i> (KX817946.1)	1683	100	<i>Bacillus sp.</i>
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>

Continuación de la Tabla 8

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>

Fuente: Propia

Nota: * microorganismos identificados en una primera fase por Flores y Roque (2017).

Las bacterias identificadas hasta nivel de especie fueron: *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.*; mientras que en el 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* (2), *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 sustratos utilizados en la fabricación de estos biofertilizantes artesanales, además de la falta de control y conocimiento de los microorganismos que los conforman y de las funciones que desempeñan dichos microorganismos, siendo esta una de las razones por las que se identificaron un mayor número de microorganismos entre ellos patógenos.

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. De la muestra de la región norte en presentación sólida con código de procedencia TS se logró aislar: *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, 2 *Bacillus sp.* y 1 *Stenotrophomonas sp.*; mientras que de la muestra de la región norte en presentación sólida con código de

procedencia LS se obtuvo: *B. megaterium*, *B. subtilis*, 2 *Stenotrophomonas sp.*, 1 *Paenibacillus sp.* y 1 *Bacillus Sp.*; por otra parte, de la muestra de la región norte en presentación líquida con código de procedencia LL se obtuvo: *B. megaterium*, *Staphylococcus succinus* y 1 *Bacillus sp.* Finalmente de la muestra de la región occidente en presentación líquida con código de procedencia DCL se logró aislar: *B. subtilis*, *B. flexus*, *B. cereus*, 2 *Lysinibacillus macroides*, *Agrobacterium tumefaciens*, 2 *Bacillus sp.* y 1 *Stenotrophomonas sp.*

Los resultados obtenidos en la identificación molecular concuerdan con la caracterización morfológica realizada ya que la mayoría de los aislados bacterianos pertenecen al género *Bacillus*, predominando los bacilos Gram Positivos como por ejemplo *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus*, entre otros. Mientras que los resultados de los aislados caracterizados como bacilos Gram Negativos no pertenecen al género *Bacillus* aunque presenten forma bacilar entre los cuales están, *Stenotrophomonas sp.*, *Paenibacillus sp.* y *Agrobacterium tumefaciens*.

5.1.4 Identificación molecular de hongos filamentosos aislados de bioinsumos artesanales

Según González (2014) para lograr la identificación taxonómica exacta de hongos filamentosos, además del proceso de identificación basado en rasgos morfológicos y fisiológicos, es necesaria la secuenciación de los genes ribosomales (ADNr) y de sus espacios transcritos internos (ITS) u otras regiones de genes conservados, ya que se ha demostrado que las regiones complejas ITS (no codificantes y variables) son útiles para medir relaciones genealógicas cercanas de hongos filamentosos, dado que estas exhiben grandes diferencias interespecíficas.

En esta investigación se identificaron molecularmente a través de la secuenciación de la región ITS1-ITS4 (Internal Transcribed Space) del ADNr, 6 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 24**).

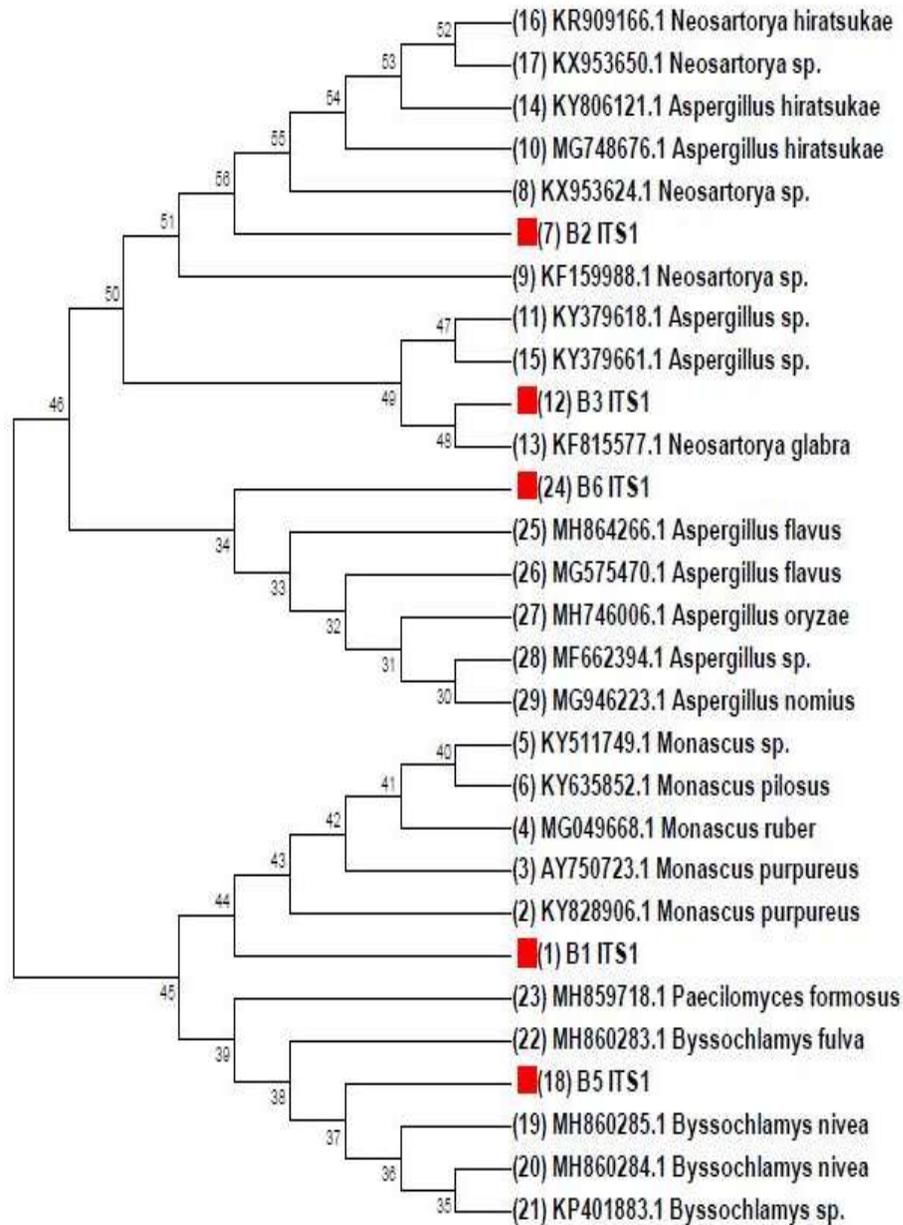


Figura 24. Árbol filogenético de hongos aislados de bioinsumos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado con el programa MEGA 7.0.14, el código de acceso al Gen Bank se especifica al inicio del nombre del microorganismo. Fuente: Propia.

De los 6 hongos filamentosos aislados de los bioinsumos artesanales en estudio, 4 de ellos se lograron identificar a nivel de especie: TSI-2111 como *Monascus purpureus*, TSIII-2111 como *Neosartorya glabra*, LLVI como *Byssochlamys nivea*, TSIII-1212 como *Aspergillus flavus* y 1 a nivel de género: TSII-211 como *Neosartorya sp.* Estos resultados se resumen en la **Tabla 9**. Finalmente, uno de los hongos con código LSVI-121 no se logró identificar debido a resultados no satisfactorios durante el proceso de secuenciación.

Tabla 9

Identificación final de hongos aislados de bioinsumos y otras muestras. 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 obtenido del análisis del árbol filogenético.

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>

Fuente: Propia.

De forma análoga con los aislados bacterianos fue posible conocer los hongos presentes en cada una de las 4 muestras de bioinsumos artesanales recolectadas en la zona norte del país. 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.* y *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 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. Al igual que el planteamiento utilizado para explicar las diferencias encontradas en las especies de bacterias identificadas, las diferencias de las especies de hongos filamentosos identificados puede 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, dando como resultado una gran variedad de especie entre ellos hongos patógenos tanto para las plantas como para seres humanos.

Finalmente se puede comprobar que los dos aislados *Neosartorya sp.* y *Aspergillus sp.*, que se aproximaron al posible género al que pertenecen según la observación de sus características macroscópicas, microscópicas y su comparación con lo descrito en la literatura, coinciden con los resultados obtenidos en la identificación molecular, ya que fueron identificados hasta nivel de especie como *Neosartorya glabra* y *Aspergillus flavus*.

5.2 Pruebas de antagonismo y selección de los microorganismos que conformaron el consorcio microbiano

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 10** y **Tabla 11**) 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 identificados 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 10

Aplicaciones biotecnológicas reportadas de bacterias aisladas de bioinsumos artesanales utilizadas para la selección de los microorganismos que conformaron el consorcio microbiano.

Especie	Aplicaciones biotecnológicas de interés	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)

Continuación de la Tabla 10

<i>Bacillus Pumilus</i>	Promueve el crecimiento de las plantas al aumentar la absorción de nutrientes, la fijación de nitrógeno, la interacción con microorganismos simbióticos y la producción de agentes antimicrobianos contra bacterias y hongos patógenos, así como mediante la reducción de la toxicidad de los metales.	Yuan & Gao (2015)
	Inhibe del crecimiento micelial de <i>Mycosphaerella Fijiensis</i> , patógeno del banano y cultivos de plátano.	Cruz <i>et al.</i> (2015)
	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 <i>et al.</i> (2013)
<i>Bacillus megaterium</i>	Presenta dos propiedades importantes asociadas con el crecimiento de las plantas, la solubilización de fosfato tricálcico y la producción de ácido indol acético (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)
	También se ha reportado que es capaz de fijar nitrógeno, la cepa en estudio se aisló originalmente de la rizósfera del maíz, probando que posee actividad de la enzima nitrogenasa y que el gen <i>nifH</i> amplifica por la reacción en cadena de la polimerasa.	Ding <i>et al.</i> (2005)
	Es un productor biotecnológico de vitamina B12. También produce Polihidroxitirato (PHB) y anticuerpos recombinantes. <i>B. megaterium</i> fue aislada de las hojas de <i>Avicennia marina</i> para la producción extracelular de α -amilasa.	Tortolo & Bell (2015)
<i>Bacillus cereus</i>	Produce dos antibioticos Zwitermicina A y Kanosamina. El primero inhibe a diversos protistas, Oomicetos, hongos y bacterias, además cuando se combina con Kanosamina actúa sinérgicamente contra <i>E. coli</i> y <i>Phytophthora medicaginis</i> , un Oomiceto. El amplio rango de acción de Zwitermicina A, sugiere que las bacterias que lo producen podrían ser útiles para el control de una amplia gama de enfermedades de plantas foliares y transmitidas por el suelo.	Suh <i>et al.</i> (1998)

Continuación de la Tabla 10

<i>Bacillus cereus</i>	Además zwitermicina A potencia la acción insecticida de las toxinas proteicas producidas por <i>B. thuringiensis</i> .	Emmert <i>et al.</i> (2004)
	También se reporta un comportamiento antagonista contra patógenos de plantas como <i>Pseudomonas syringae</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Para probar la aplicación práctica, la cepa se utilizó directamente en el campo agrícola presentando un aumento en la producción en maní y sésamo.	Banerjee <i>et al.</i> (2017)
<i>Bacillus subtilis</i>	Promotor de crecimiento en cultivos de maíz (<i>zea mays</i>) y tomate (<i>solanum lycopersicum</i>).	Pulido (2016)
	Fijador nitrógeno y fosforo.	Orberá <i>et al.</i> (2005)
	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.	Tejera <i>et al.</i> (2011)
<i>Bacillus flexus</i>	Es caracterizado como un microorganismo endófito halotolerante aislado del halófito <i>Limonium sinense</i> . 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).	Wang <i>et al.</i> (2017)
	Se considera como un potencial productor de lipasa termoestable y alcalina que puede ser utilizada en industrias de alimentos, farmacéuticas y de detergentes.	Tambekar <i>et al.</i> (2017)
	Otra aplicación reportada es la biorremediación de aguas residuales alcalinas, al presentar una alta tasa de eliminación de DQO.	Wang & Zhao (2013)
<i>Lysinibacillus macroides</i>	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.	Oladipo <i>et al.</i> (2018)

Continuación de la Tabla 10

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<p>Se ha reportado tiene la capacidad de transferir una parte de su ADN, T-ADN (ADN transferido), al genoma de una planta huésped.</p> <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 función y expresión de genes, y para el desarrollo de plantas con nuevas características.</p>	<p>Sheng & Citovsky (1996)</p> <p>Tzfira & Citovsky (2000)</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>	<p>Delgado <i>et al.</i> (2013)</p>
<i>Bacillus sp.</i>	<p>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.</p>	<p>Orberá <i>et al.</i> (2005)</p>

Continuación de la Tabla 10

<i>Stenotrophomonas sp.</i>	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.	Deng <i>et al.</i> (2015)
	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.	Gargouri <i>et al.</i> (2016)
<i>Paenibacillus sp</i>	Muchas especies de <i>Paenibacillus</i> 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).	Grady <i>et al.</i> (2016)

Fuente: Propia

Con el propósito de entender, la función desempeñada por los diferentes microorganismos que fueron aislados e identificados en el contexto de los bioinsumos artesanales en estudio, se plasmó la información como lo muestra la **Tabla 10**, al analizarla, se puede deducir que empleando estos bioinsumos, 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 megaterium* 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 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 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 (PGPR), como: *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus Sp.* *Paenibacillus sp.* y además de contener a *Stenotrophomonas sp.*; otro bioinsumo que podría ser de utilidad es el proveniente de la región norte en presentación sólida con código TS ya que contiene *Bacillus thuringiensis* caracterizado por ser un bioinsecticida y *Bacillus pumilus* que promueve el crecimiento vegetal y también es biocontrolador, además contiene un *Stenotrophomonas sp.* y dos *Bacillus 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 humanos 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.

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 11**.

Tabla 11

Aplicaciones biotecnológicas de los hongos filamentosos aislados de bioinsumos artesanales utilizadas para la selección de los microorganismos que conformaron el consorcio microbiano.

Especie	Aplicaciones biotecnológicas de interés	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 <i>et al.</i> (1998)
<i>Neosartorya sp.</i>	Se utiliza para biodegradación de petróleo.	Taewoo <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (2017)
<i>Byssochlamys nivea</i>	Es considerada una especie con potencial de control biológico, ya que ha demostrado tener actividades nematocidas. El filtrado de cultivo de esta cepa mostró una forma única de alteración cuticular que precede a la mortalidad de <i>Caenorhabditis elegans</i> y también inhibe la eclosión del huevo. Además se reporta que <i>B. nivea</i> inhibe el crecimiento in vitro de los hongos patógenos de plantas <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Gaeumannomyces graminis var. Tritici</i> , <i>Phytophthora cinnamomi</i> , <i>Pythium irregulare</i> y <i>Rhizoctonia solani</i> .	Park <i>et al.</i> (2001)

Continuación de la Tabla 11

<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 <i>et al.</i> (2015)
	Se ha reportado que <i>Byssochlamys nivea</i> es responsable del deterioro de la fruta pasteurizada y enlatada y de los productos de frutas. Se caracteriza por ser un organismo saprófito en lugar de parásito y generalmente contamina las frutas en el suelo o cerca de él. Puede sobrevivir a los tratamientos térmicos utilizados para el procesamiento de frutas y puede cultivar y estropear los productos durante el almacenamiento a temperatura ambiente, lo que resulta en grandes pérdidas económicas.	Tournas (1994)
<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 también un patógeno animal y humano oportunista que causa enfermedades por aspergilosis.	Amaike & Keller (2011)

Fuente: Propia.

El análisis de los resultados en la **Tabla 11**, mediante la identificación de los hongos aislados de los bioinsumos artesanales, nos muestra que algunos de los aislados identificados presentan utilidad en la industria farmacéutica (*Monascus purpureus* y *Neosartoya glabra*), en procesos de biorremediación (*Neosartorya sp.* y *Byssochlamys nivea*), en la agricultura como controlador biológico (*Byssochlamys nivea*) pero resultar indeseable cuando se desea preservar productos de fruta procesada y algunos patógenos para los seres humanos y los animales como *Aspergillus flavus*. Lo anterior sumado al análisis hecho para las bacterias aisladas e identificadas nos da una idea de cómo algunos de estos bioinsumos podrían estar afectando los cultivos mediante la introducción de hongos y bacterias que no son adecuados para todo tipo de cultivos y suelos, resultando ser el menos recomendado para su utilización en la agricultura 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.

La caracterización morfológica y molecular de los microorganismos aislados de los bioinsumos artesanales permitió conocer el contenido de cada uno de las muestras, así como la función que desempeñan cada uno de los microorganismos por medio de la búsqueda de sus aplicaciones biotecnológica, lo cual llevó a la publicación de dos artículos que se muestran en el **Anexo 5**.

Como resultado del análisis realizado según sus aplicaciones biotecnológicas se seleccionaron 5 bacterias 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). 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* (MIVB-02) fueron aisladas e identificadas por Delgad y Fonseca (2019); y también se seleccionó *Pseudomonas mendocina* (PTLL4g) aislada e identificada por Rios (2019) (**Figura 25**), las cuales aportaban nuevas propiedades de interés al consorcio microbiano, según sus aplicaciones demostradas en la **Tabla 12**.

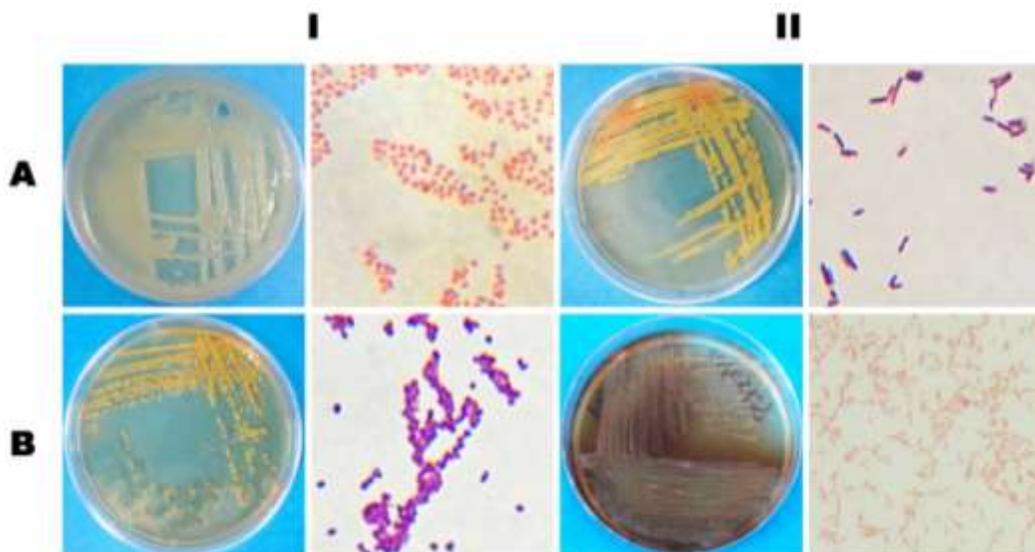


Figura 25. Morfología en placa y Tinción de Gram de bacterias seleccionadas del banco de microorganismos del PIENSA. AI: *Acinetobacter calcoaceticus* (MVIA-01); AII: *Bacillus marisflavi* (MIVB-01); BI: *Exiguobacterium aurantiacum* (MIVB-02); BII: *Pseudomonas mendocina* (PTLL4g). Fuente: Propia.

Tabla 12

Aplicaciones biotecnológicas de las 4 bacterias seleccionadas pertenecientes al banco de microorganismos del PIENSA utilizadas en la formulación del consorcio microbiano.

Especie	Aplicaciones biotecnológicas de interés	Referencia
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	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.	Zhao <i>et al.</i> (2012)
	También se reporta que produce giberelinas (GA) y secreta 10 tipos de GA diferentes en su entorno, incluidas las bioactivas 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-cetoglucónico) sean los responsables de la solubilización del fosfato.	Kang <i>et al.</i> (2009)
<i>Bacillus marisflavi</i>	Presenta la capacidad de fijar nitrógeno y además también se demostró por el método de amplificación por PCR que posee fragmentos del gen <i>nifH</i> , este gen codifica la proteína de hierro y los genes <i>nifDK</i> que codifican la proteína de hierro molibdeno, estas dos proteínas conforman a la enzima nitrogenasa la cual cataliza la fijación de nitrógeno.	Ding <i>et al.</i> (2005)
	También se reporta la producción carotenoides con un máximo de absorción de a 455 nm. 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 <i>Bacillus</i> que no contienen carotenoides.	Khaneja <i>et al.</i> (2010)
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	Produce Acido Indol Acético (AIA) que contribuyó al crecimiento de la cianobacteria de interés <i>Arthrospira platensis</i> .	Gómez <i>et al.</i> (2012)
	Produce un pigmento naranja, cuyo análisis reveló la presencia de carotenoides. Estos carotenoides demostraron actividad antifúngica contra <i>Fusarium sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , y <i>Alternaria sp.</i>	Shatila <i>et al.</i> (2013)

Continuación de la Tabla 12

<i>Pseudomonas mendocina</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	Kohler <i>et al.</i> (2006)
------------------------------	--	--------------------------------

Fuente: Propia.

Como resultado de la caracterización bibliográfica se seleccionó un total de 9 bacterias (DCL4-31F, LS5-11B, TS13-111u, LS6-11G, LL9-21, MVIA-01, MIVB-01, MVIB-02 y PTLL4G) las cuales se sometieron a pruebas de antagonismo con el fin de verificar que no se produce inhibición entre ellas y así realizar la selección final de bacterias que conformaron el consorcio microbiano. Antes de realizar las pruebas de antagonismo las 9 bacterias seleccionadas se identificaron con un nuevo código, estos se muestran en la siguiente **Tabla 13**.

Tabla 13

Asignación de nuevos códigos de las bacterias seleccionadas a confrontar en las pruebas de antagonismo, mostrando el código de laboratorio y especie de las bacterias seleccionadas.

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

Fuente: Propia.

El primer paso que se realizó en las pruebas de antagonismo fue la preparación de la escala de turbidez estándar de Mcfarland, obteniendo valores de

absorbancia que corresponden a una determinada concentración de UFC/mL y a un número de la turbidez estándar, los cuales se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14

Valores de absorbancia obtenidos en la preparación de la escala de Mcfarland.

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

Fuente: Propia

Posteriormente se prepararon los inóculos de los cultivos de la bacterias seleccionadas y 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, los resultados se muestran en la **Tabla 15**.

Tabla 15

Valores de absorbancia de los inóculos ajustados.

Código de las cepas seleccionadas	Absorbancia de los inóculos ajustados
1	0.163
2	0.230

Continuación de la Tabla 15

3	0.190
4	0.513
5	0.200
6	0.190
7	0.299
8	0.160
9	0.192

Fuente: Propia.

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 in vitro. 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 plantearon la posibilidad de establecer un consorcio microbiano para lo cual se llevaron a cabo pruebas de antagonismo.

La evaluación del efecto antagónico entre las bacterias seleccionadas se realizó al aplicar el método modificado de pozos de agar (Sánchez *et al.*, 2016). Obteniendo como resultado la observación de tres comportamientos: la presencia de crecimiento de las bacterias sembradas en pozos sobre las bacterias sembradas de forma masiva, lo cual indicaba que no había antagonismo entre ellas. Para comprobar esto se realizaron Tinciones Gram con el fin de verificar la presencia de dos tipos de morfología bacteriana, generalizando este resultado al resto de casos que presentaron el mismo comportamiento. Los otros dos comportamientos observados fueron la presencia de halos de inhibición o la ausencia de crecimiento de las bacterias sembradas en pozos sobre las bacterias sembradas de forma masiva, lo cual indicaba que había antagonismo entre ellas. Al igual que en el primer comportamiento, para este último caso, se realizaron Tinciones Gram con el fin de verificar la presencia de un tipo de morfología bacteriana generalizando este resultado al resto de casos que presentaron el mismo comportamiento. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 16** donde se resumen los

comportamientos observados indicando con un signo (+) los casos en que hubo antagonismo y con signo (-) los casos en que no se observó antagonismo entre las bacterias confrontadas y con signo (+/-) donde se presenta duda de antagonismo.

Tabla 16

Resultados de pruebas de antagonismos de las cepas seleccionadas, donde se indica con signo (+) los casos en que hubo antagonismo, con signo (-) los casos en que no se observó antagonismo entre las bacterias confrontadas y con signo (+/-) donde se presenta duda de antagonismo.

Cepas sembradas de forma masiva	Cepas sembradas en pozos								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		+	+	+	+	+	+	+	-
2	+		+	+	-	-	-	+	-
3	+	+		+	+	-	+	+	-
4	+	+	+		+	+	+	+	-
5	+	-	+	+		-	-	+/-	-
6	+	-	-	+	+/-		-	-	+
7	+	+/-	+	+	+/-	-		+/-	-
8	+	+	+	+	+/-	-	-		-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Propia.

En las pruebas realizadas se observó 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. En la **Figura 26** se exponen una parte de los resultados en donde se evidencian dichos comportamientos y en el **Anexo 4** se muestran todos los resultados obtenidos en la prueba de antagonismo.

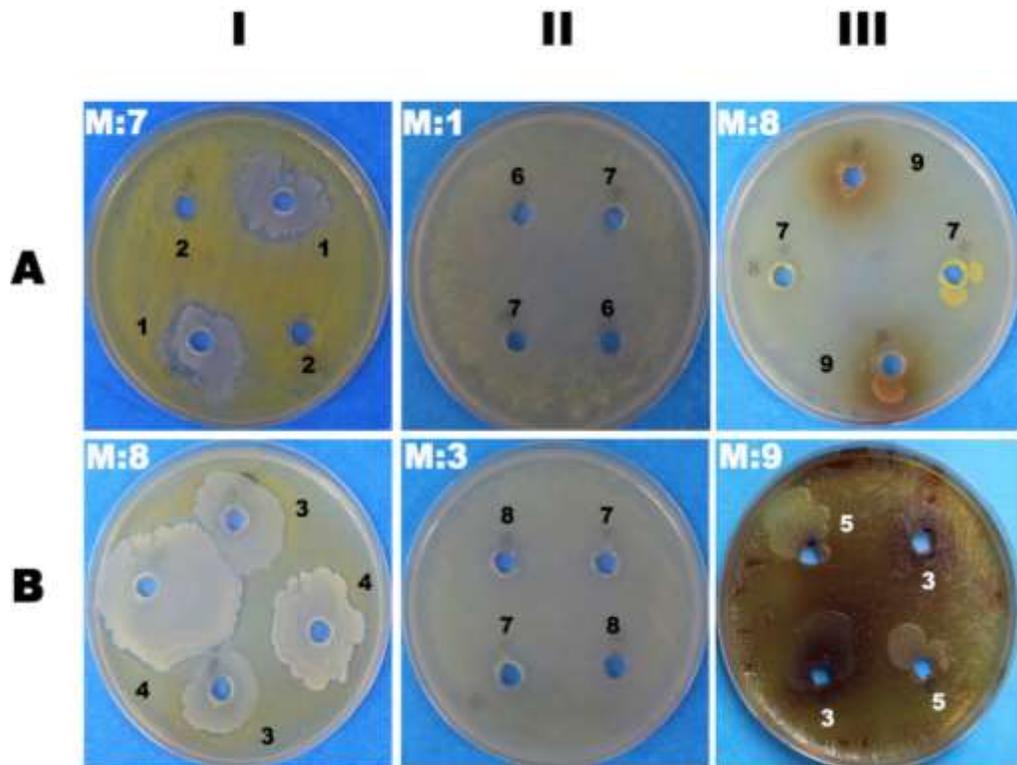


Figura 26. Resultados de las pruebas de antagonismo. AI, AII, BI y BII: casos en los que se observó antagonismo, AI: bacteria 7 sembrada de forma masiva con bacterias 1 y 2 sembradas en pozos, AII: bacteria 1 sembrada de forma masiva con bacterias 7 y 6 sembradas en pozos, BI: bacteria 8 sembrada de forma masiva con bacterias 3 y 4 sembradas en pozos y BII: bacteria 3 sembrada de forma masiva con bacterias 7 y 8 sembradas en pozos; AIII y BIII: casos en los que no hay antagonismo, AIII: bacteria 8 sembrada de forma masiva con bacterias 7 y 9 sembradas en pozos y BIII: Bacteria 9 sembrada de forma masiva con bacterias 3 y 5 sembradas en pozos. Fuente: propia.

En la **Figura 27** se observa una parte de los tres comportamientos mencionados anteriormente, en donde se especifica la tinción de Gram realizada a los pozos que fueron seleccionados para verificar la morfología de las dos bacterias confrontadas. Como resultado se observó el crecimiento de la bacteria 5 sembrada en pozos sobre la bacteria 9 sembrada de forma masiva mostrando que no existe antagonismo entre ellas (**Figura 27 AI-IV**). La bacteria 1 sembrada en pozos formó un halo de inhibición sobre la bacteria 7 sembrada de forma masiva mostrando antagonismo entre ellas (**Figura 27 BI-IV**). Finalmente, en la **Figura 27 CI-IV** se muestra que no hay crecimiento de la bacteria 6 sembradas en pozos sobre la bacteria 1 sembrada de forma masiva, observando también la presencia de antagonismo. En el **Anexo 4** se muestra las tinciones Gram realizadas al resto de pozos seleccionados.

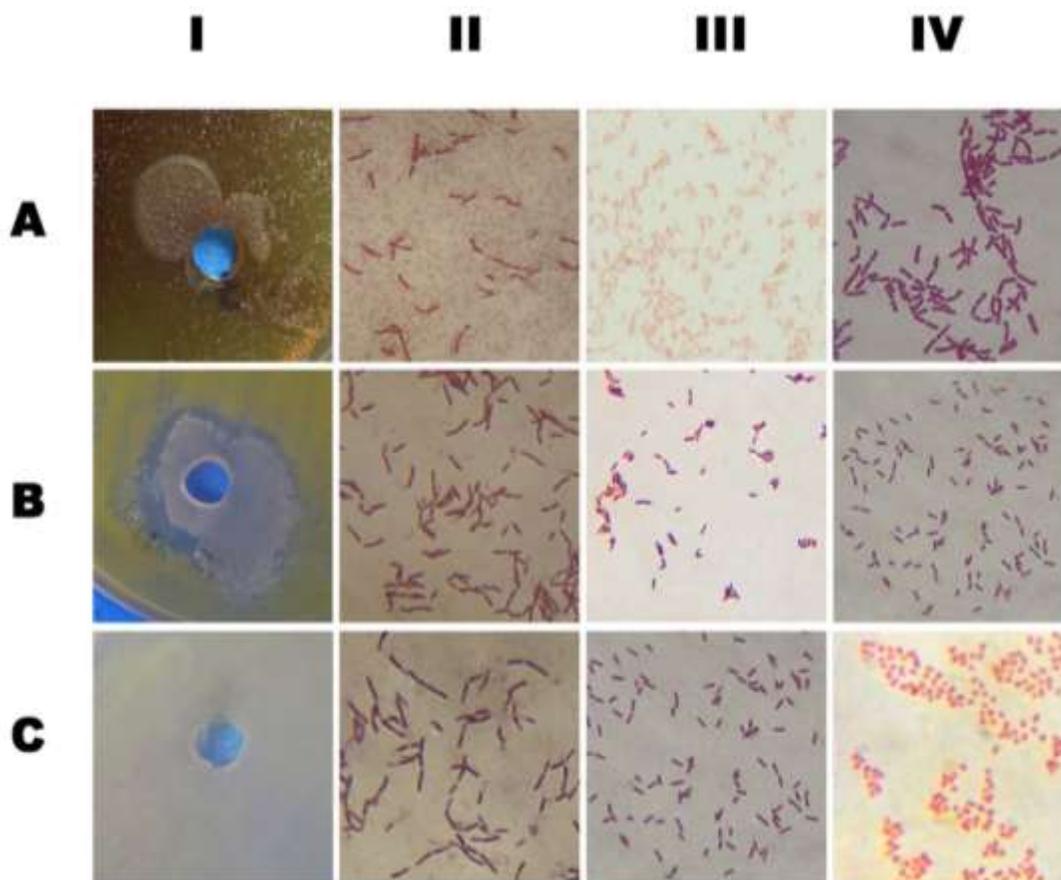


Figura 27. Tinciones Gram realizadas para evidenciar los comportamientos observados en las pruebas de antagonismo. En la columna I se muestra la foto de los pozos, en la columna II la tinción de Gram realizada alrededor de los pozos, columna III morfología microscópica de las bacterias sembradas en forma masiva y en la columna IV morfología microscópica de las bacterias sembradas en pozos. AI-IV: bacteria 9 sembrada de forma masiva y bacteria 2 sembrada en pozos, observando que no hay antagonismo; BI-IV: bacteria sembrada de forma masiva 7 y bacteria 1 sembrada en pozos y CI-IV: bacteria 1 sembrada de forma masiva y bacteria 6 sembrada en pozos, en ambos casos se observa antagonismo. Fuente: Propia.

De los resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo se observó que *Pseudomonas mendocina* (bacteria 9) fue la bacteria que mejor comportamiento presentó con las bacterias confrontadas, además de poseer propiedades promotoras del crecimiento vegetal, ya que aumenta la biomasa de brotes y raíces de lechuga y los niveles de P y Fe (Kohler *et al.*, 2006); razón por la cual se seleccionaron las bacterias que mejor interactuaron con ella y las cuales aportaban otras propiedades de interés, siendo estas: *Bacillus megaterium* (bacteria 5) caracterizada por solubilizar fosfatos, producir ácido indol acético y es capaz de fijar nitrógeno (Trivedy & Pandey, 2008; Ding *et al.*, 2005), *Bacillus marisflavis* (bacteria 7) tiene la propiedad de fijar nitrógeno (Ding *et al.*, 2005), *Exiguobacterium aurantiacum* (bacteria 8) produce ácido indol acético (Gómez *et*

al., 2012). A continuación en la **Figura 28** se muestra el comportamiento de algunas de las bacterias seleccionadas durante todo el ensayo de la prueba de antagonismo.

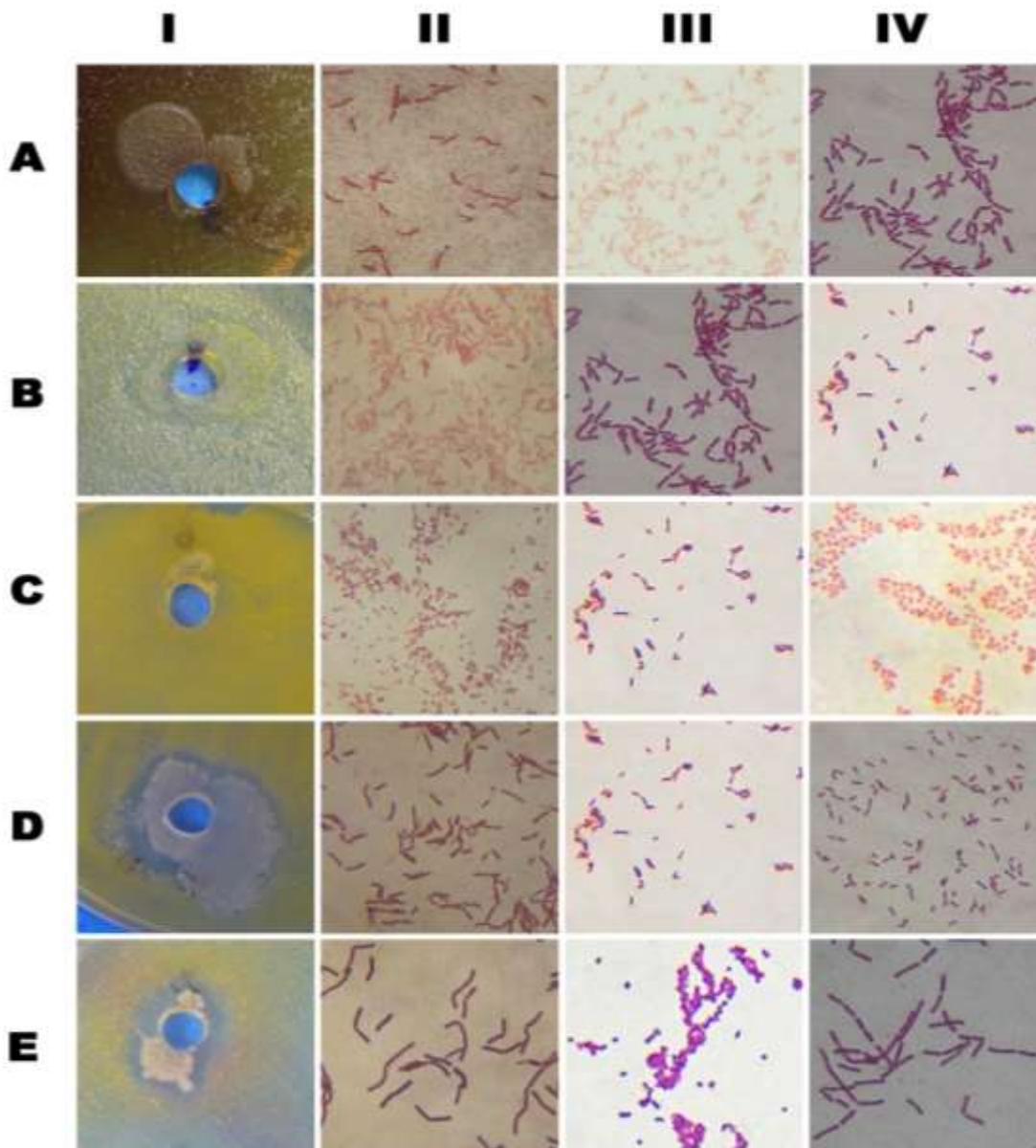


Figura 28. Tinciones de Gram realizadas para evidenciar los comportamientos observados de 4 las bacterias seleccionadas en las pruebas de antagonismo. En la columna I se muestra la foto de los pozos, en la columna II la tinción de Gram realizada alrededor de los pozos, columna III morfología microscópica de las bacterias sembradas en forma masiva y en la columna IV morfología microscópica de las bacterias sembradas en pozos. AI-IV: bacteria 9 sembrada de forma masiva y bacteria 2 sembrada en pozos (No hay antagonismo); BI-IV: bacteria 5 sembrada de forma masiva y bacteria 7 sembrada en pozos (No hay antagonismo); CI-IV: bacteria 7 sembrada de forma masiva y bacteria 6 en pozos (No hay antagonismo); DI-IV: bacteria 7 sembrada de forma masiva y

bacteria 1 sembrada en pozos (Hay antagonismo); EI-IV: bacteria 8 sembrada de forma masiva y bacteria 2 sembrada en pozos (Hay antagonismo). Fuente: Propia.

En estas bacterias seleccionadas al realizar las pruebas de antagonismo se observó que en ciertos casos como el de la bacteria 8 sembrada en pozos no creció sobre la bacteria 5 sembrada de forma masiva, pero al confrontar la bacteria 8 sembrada de forma masiva y la bacteria 5 sembrada en pozos si se observó el crecimiento de la bacteria 5. Otro de ellos fue que la bacteria 5 no presentó crecimiento cuando se encontraba sembrada en pozos sobre la bacteria 7 sembrada de forma masiva, mientras que la bacteria 7 crecía cuando estaba sembrada en pozos sobre la bacteria 5 sembrada de forma masiva. También se observó que la bacteria 8 no presentaba crecimiento cuando estaba sembrada en pozos sobre la bacteria 7 sembrada de forma masiva, pero cuando la bacteria 7 se encontraba sembrada en pozos se observó crecimiento de esta sobre la bacteria 8 sembrada de forma masiva. Lo antes planteado, podría estar indicando diversas situaciones como: que no exista antagonismo entre estas bacterias, sino que lo observado podría deberse a una competencia por la desigualdad de proporciones a las que estaban inoculadas (en un momento en pozo y en otro masivo), ya que cuando una de las bacterias estaba sembrada de forma masiva esta se encontraba en mayor proporción que la otra bacteria sembrada en pozos. Que en realidad el tipo de competencia que se esté produciendo, sea de un tipo debido a espacio. Cualesquiera de las situaciones que esté produciendo, beneficia en el desarrollo del consorcio microbiano, porque en el consorcio tendrán iguales oportunidades de crecimiento y estarán siendo inoculadas en la misma proporción, por tanto no deberá esperarse ningún problema en su actuar en el consorcio. No obstante, todo esto, son elementos que deberán seguirse investigando a futuro para el mejoramiento del producto.

5.3 Construcción de la curva cinética de crecimiento y evaluación de la estabilidad de los cultivos producidos individualmente que forman parte del consorcio microbiano.

Finalizada la prueba de antagonismo y seleccionadas las 4 bacterias: *Bacillus megaterium* (bacteria 5), *Bacillus marisflavis* (bacteria 7), *Exiguobacterium aurantiacum* (bacteria 8) y *Pseudomonas mendocina* (bacteria 9) 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.

5.3.1 Construcción de curva de crecimiento por método turbidimétrico

El crecimiento de una población bacteriana tiene lugar en forma exponencial, en el cual una célula se divide en dos células hijas y luego éstas se dividen a su vez en dos nuevas células, lo cual corresponde a una progresión geométrica (Apella y Araujo, 2005), razón por la cual el crecimiento de una población microbiana se estudia analizando la curva de crecimiento de un cultivo microbiano, en donde la curva resultante tiene cuatro fases diferentes (fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte) (Prescott, 2004). El crecimiento microbiano radica en un complejo número de reacciones equilibradas que determinan su

metabolismo. Estas reacciones están sujetas a variables ambientales que influyen en las condiciones y tasas de crecimiento celular (Álvarez y Sánchez, 2016).

Contreras *et al.* (2011) realizaron un estudio de la cinética de crecimiento celular de *Bacillus megaterium* evaluando un medio de cultivo líquido definido y suministrando diferentes caudales de aire (VVM) con el fin de determinar la velocidad específica de crecimiento (μ) y la concentración celular en máxima fase exponencial. Se determinó que *B. megaterium* presentó una fase de adaptación de 4 h y una fase exponencial de máximo 24 h, donde alcanzó una concentración celular de 1.41 E+10 UFC/mL. Por otro lado Vargas (2002) evaluó la cinética de crecimiento de *B. Megaterium* en matraz de 1 L utilizando caldo de almidón modificado a una temperatura de 45°C, pH de 7.5, agitación constante de 150 rpm y una relación de inóculo de 3% (v/v), obteniendo una fase de adaptación de 8 horas con un valor de 62 E+6 de UFC/mL y alcanzando un punto máximo de crecimiento a las 28 horas con un valor de 42 E+10 UFC/mL.

Orozco (2001) determinó la cinética de crecimiento de dos cepas de *Exiguobacterium aurantiacum* en matraces de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo marino 2216 líquido, a una temperatura de 30°C y con agitación constante de 100 rpm. Este experimento se llevó a cabo tomando 6 muestras cada 4 horas realizando conteo directo al microscopio utilizando una cámara Petroff-Hausser y determinando la densidad óptica midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm, los resultados mostraron un aumento en la densidad óptica sin que se observara fase estacionaria en un lapso de 20 horas; el conteo máximo de bacterias/mL se observó a las 8 horas y se determinó que el tiempo necesario para que la población se duplicara fue de 1.9 a 3 horas.

Álvarez y Sánchez (2016) determinaron las curvas de crecimiento de *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Pumilus*, *Bacillus Cereus* y *Bacillus Licheniformis* por método turbidimétrico con una longitud de onda de 300 nm, tomando muestras en intervalos de 1 hora hasta completar 25 observaciones a una temperatura de 37 °C. Observando que el crecimiento bacteriano de cada cepa fue diferente. En donde la fase Lag fue más corta en especies como *B. cereus* y *B. pumilus* y mucho más larga en especies como *B. licheniformis* y *B. subtilis*, donde alcanza hasta 4 horas. La fase exponencial, demuestra la replicación acelerada de cada una de las cepas, entre un lapso no mayor a 5 horas posterior a la fase Lag. Además, se evidencia el aumento en UFC/mL durante ésta fase de crecimiento en comparación con el resto de la curva de crecimiento. Posterior a ello, aparece la fase de latencia y muerte, determinada por la disminución de nutrientes, factores esenciales para la respiración; aumento en la cantidad de otros metabolitos que pueden ser sustancias tóxicas y variación del pH hacia la acidez. *B. subtilis* demuestra ser una de las especies con mayor velocidad de crecimiento y muerte; mientras que *B. pumilus*, marca una prolongada fase de latencia.

Acosta (2018) estableció los parámetros de crecimiento de diversas bacterias promotoras de crecimiento vegetal entre ellas *Pseudomonas protegens* y

Pseudomonas veronii utilizando medio de cultivo sintético (King B líquido y 3 medios de cultivos alternativos), el experimento se realizó por el método de turbidimetría tomando muestras cada 2 horas y midiendo su absorbancia en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 600 nm durante 24 horas en agitación constante de 150 rpm a 26 °C.

En el presente trabajo la obtención de la curva de crecimiento microbiano de las 4 bacterias seleccionadas se realizó según lo explicado en la metodología, inicialmente se prepararon inóculos de las bacterias seleccionadas, obteniendo los siguientes valores de absorbancia 0.55 para la bacteria 5 (*Bacillus megaterium*), 3.01 para la bacteria 7 (*Bacillus marisflavis*), 1.16 para la bacteria 8 (*Exiguobacterium aurantiacum*) y 3.01 para la bacteria 9 (*Pseudomonas mendocina*), después de un crecimiento en Shaker a 170 rpm durante 16 horas.

Después de la inoculación a un volumen mayor se dio seguimiento al crecimiento microbiano midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm de cada uno los inóculos de las bacterias seleccionadas durante 6 horas aproximadamente. En esta prueba se 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) (Páramo, 2012). A continuación se muestra la **Tabla 17** con los valores de absorbancia y las UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias) correspondientes a las 4 bacterias seleccionadas. En las **Figuras 29, 30 y 31** se muestran los tres tipos de gráficos construidos a partir de los datos obtenidos de la tabla antes mencionada, correspondiente a las bacterias 5, 7, 8 y 9, estos gráficos son Absorbancia vs Tiempo, UFC/mL vs tiempo y UFC/mL vs absorbancia.

Tabla 17

Valores de absorbancia a 540 nm y valores de UFC/mL a partir de los cuales se construyen las curvas de crecimiento de la bacteria 5, 7, 8 y 9.

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
		1.932	1.93E+9	1.1	1.10E+9	1.14	1.14E+9

Continuación de la Tabla 17

1.19 1.19E+9 1.39 1.39E+9

1.635 1.64E+9

*: Absorbancia
Fuente: Propia

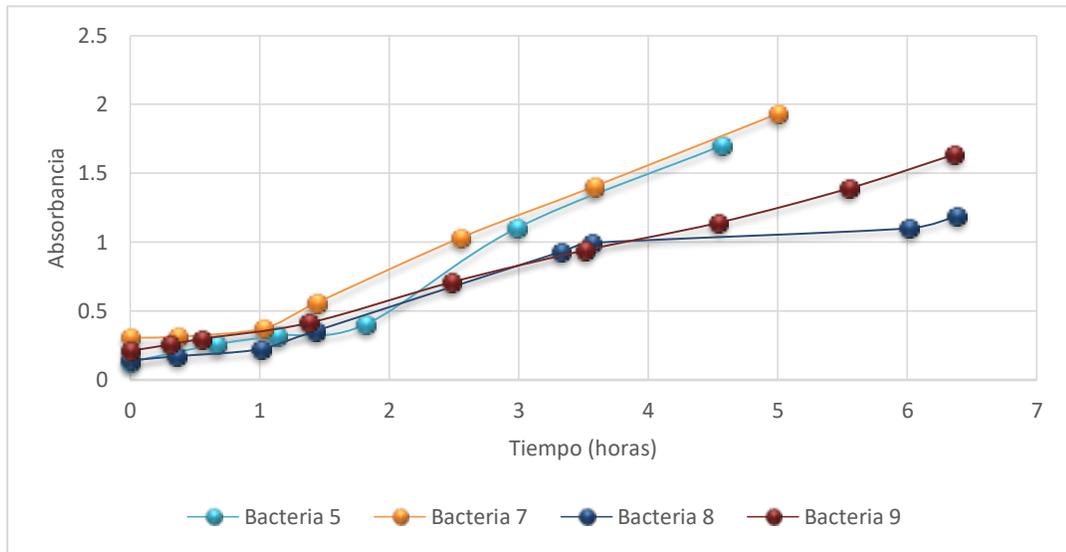


Figura 29. Curvas cinéticas de crecimiento de las bacterias 5,7, 8 y 9. Curva de Absorbancia vs tiempo. Fuente: Propia.

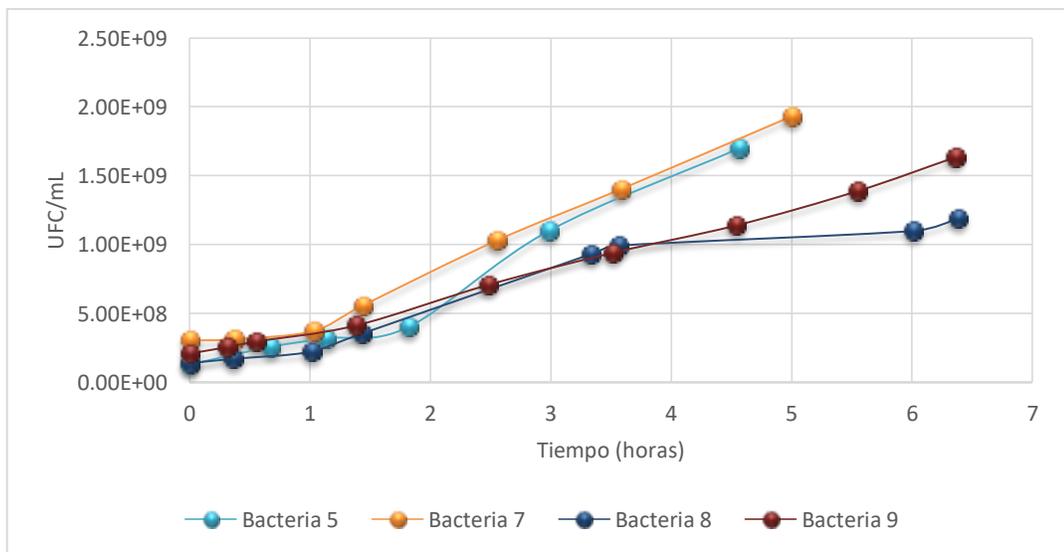


Figura 30. Curvas cinéticas de crecimiento de las bacterias 5, 7, 8 y 9. Curva de crecimiento UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias) vs tiempo. Fuente: Propia.

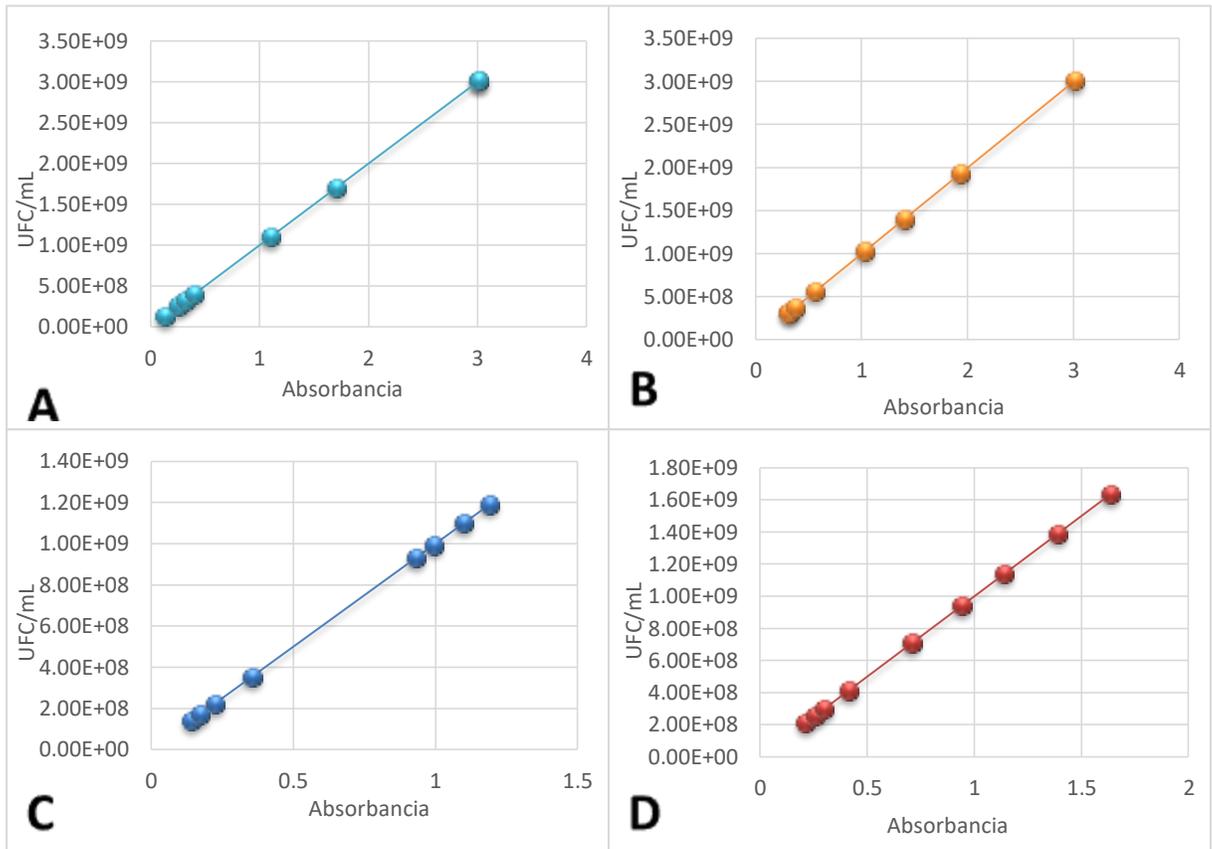


Figura 31. Curva de calibración UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias) vs Absorbancia. Fuente: Propia.

Una vez construidas las curvas cinéticas correspondientes a la bacteria 5 (*Bacillus megaterium*) se observó que 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 $1.70E+9$ 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 $1.41 E+10$ UFC/mL por otra parte Vargas (2002) mostró que el crecimiento máximo de *B. megaterium* fue a las 28 horas con un valor de $42 E+10$ UFC/mL y una fase de adaptación de 4 horas. Se observa que en este estudio se obtuvo un menor valor de UFC/mL con respecto de los resultados reportados por Contreras *et al.* (2011) y Vargas (2002), estas diferencias se pudieron haber dado por las diferentes condiciones en las que realizaron estos experimentos como la utilización de medios con diferentes sustratos, crecimiento a temperaturas y un pH establecidos, suministro de diferentes caudales de aire y la realización de conteo celular. Un aspecto fundamental que contribuye a reducir los tiempos de la fase Lag o fase de adaptación es la aproximación al máximo del microorganismo a las condiciones metabólicas a las que va a ser inoculado.

Mientras que la bacteria 7 (*Bacillus marisflavis*) 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 $1.93E+9$ UFC/mL; a pesar de que no se encontró literatura sobre la cinética de estas bacterias 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 asemejándose al comportamiento observado en *Bacillus marisflavis* que presentó una fase lag de 37 minutos. La fase exponencial también concuerda con lo descrito por Álvarez y Sánchez, (2016) 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 $1.19E+9$ 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.

Por último con la bacteria 9 (*Pseudomonas mendocina*) se observó una fase de adaptación de aproximadamente 1 hora y alcanzó su punto de crecimiento máximo a las 6.36 horas presentando una absorbancia de 1.635 equivalente a $1.64E+9$ UFC/mL. Acosta (2018) estableció la cinética de crecimiento de 2 especies de bacterias del género *Pseudomonas*: *Pseudomonas protegens* alcanzó el máximo crecimiento a las 6 horas aproximadamente mostrando una fase estacionaria muy inestable; mientras que *Pseudomonas veronii* alcanzó su máximo crecimiento a las 10 horas aproximadamente.

Al observar el comportamiento de las bacterias con las cuales se trabajó es posible establecer que las bacterias 7 (*Bacillus marisflavis*) y 9 (*Pseudomonas mendocina*) mostraron ser más rápidas en su crecimiento y productoras de abundante biomasa, esto se deduce por su mayor absorbancia en el tiempo 0 que fue de 0.307 y 0.21 respectivamente, lo cual podría indicar una buena adaptación de las bacterias a las condiciones de trabajo.

Es posible que las diferencias entre los comportamientos de las bacterias 5, 7, 8 y 9 con respecto a las fuentes comparadas, 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). El pH también es un parámetro crítico en el crecimiento de microorganismos ya que por lo general los microorganismos que toleran pH ácidos no toleran pH alcalinos y viceversa; independientemente del pH que pueda soportar un microorganismo, es importante conocer cuál es el pH óptimo para su crecimiento (Páramo, 2014b). Otro factor es el agotamiento de nutrientes o del sustrato limitante ya que según Álvarez y Sánchez, (2016) en la fase exponencial la tasa máxima de crecimiento, está limitada únicamente por la capacidad de las bacterias de procesar los nutrientes. Frecuentemente los medios de cultivo, incluyen macroelementos como el Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K), la limitación

de estos dos últimos inducen el desacoplamiento de procesos catabólicos y anabólicos que consecuentemente disminuyen el rendimiento de la biomasa, esto explicaría que las bacterias evaluadas en este trabajo alcancen rápidamente la fase exponencial ya que probablemente su desarrollo sea muy bueno en condiciones de un medio rico como el LB que se usó para su reproducción en este trabajo (Páramo, 2012). Otros factores importantes que inciden directamente en la cinética de crecimiento bacteriano son la agitación y aireación (Álvarez y Sánchez, 2016).

5.3.2 Pruebas de anaquel o de estabilidad acelerada

Según Camelo (2010) las pruebas de estabilidad de biofertilizantes ayudan a determinar la vida útil de los mismos, así como, el comportamiento de la actividad biológica a través del tiempo. Este autor, evaluó durante 105 días a tres temperaturas 4° C, 20° C y 32° C la viabilidad y la actividad biológica (fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos y producción de sustancias indólicas) 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.

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 este trabajo se realizaron pruebas de estabilidad con el objetivo de verificar el mantenimiento o disminución del número inicial de UFC/mL en los cultivos de cada una de las bacterias que conforman el consorcio microbiano durante el tiempo de análisis de la estabilidad. Para realizar las pruebas de estabilidad se llevó a cabo la producción en Shaker, como se describe en la metodología, de cada bacteria seleccionada. Durante el periodo de crecimiento se midió la absorbancia de cada bacteria según los tiempos definidos en la curva cinética. Una vez llegado al punto de máximo crecimiento se tomaron muestras de 1 mL de cada Erlenmeyer para realizar diluciones seriadas y posteriormente siembras en profundidad con el objetivo de cuantificar las UFC (Unidades Formadoras de Colonias) y así conocer el valor inicial de las pruebas de estabilidad, obteniendo valores de 2.51×10^6 UFC/mL para la bacteria 5 (*Bacillus megaterium*), 8.60×10^5 UFC/mL para la bacteria 7 (*Bacillus marisflavis*), 3.95×10^6 UFC/mL (*Exiguobacterium aurantiacum*) y 2.74×10^8 UFC/mL (*Pseudomonas mendocina*). Cabe aclarar que los valores de UFC/mL antes mencionados reflejan únicamente células vivas ya que fueron hechas por el conteo directo en

placa. En la **Tabla 18** se muestran los resultados de la cuantificación de UFC (Unidades formadoras de Colonias) que se hizo a las 4 bacterias cada 15 días durante los 2 meses de evaluación establecidos en la metodología, además se muestran las gráficas obtenidas a partir de estos datos en las cuales se refleja el comportamiento de cada una de las bacterias en el tiempo establecido (**Figura 33**).

Tabla 18

Resultados de pruebas de estabilidad realizada durante dos meses a las bacterias 5, 7, 8 y 9. Se muestran los intervalos de tiempo (días) y los conteos de UFC/mL correspondientes.

Tiempo (días)	Conteo de UFC/mL de las bacterias			
	5	7	8	9
0	2.51E+06	8.60E+05	3.95E+06	2.74E+08
15	1.78E+06	4.34E+05	3.74E+06	7.69E+08
30	3.61E+05	2.22E+05	2.44E+06	7.55E+08
45	7.32E+05	2.23E+05	3.55E+06	7.50E+08
60	7.63E+05	4.37E+05	2.50E+06	8.00E+08

Fuente: Propia.

En la **Tabla 18** y en la **Figura 32** se refleja el comportamiento de la estabilidad de las bacterias 5 (*Bacillus megaterium*), bacteria 7 (*Bacillus marisflavis*), bacteria 8 (*Exiguobacterium aurantiacum*) y bacteria 9 (*Pseudomonas mendocina*), en donde fue posible observar que el número de UFC/mL de la bacteria 5 disminuyó en un 17.4%, sin embargo se observó que la bacteria 7 se mantuvo en un mismo rango con orden de 10^5 equivalente a 4.23% de disminución de UFC/mL, para la bacteria 8 se mantuvo en 10^6 , representando un 14.5% de disminución de UFC/mL, mientras que la bacteria 9 se mantuvo constante en un rango de 10^8 con un 0.31% de disminución de UFC/mL durante los 60 días de evaluación mostrándose prácticamente constantes en su viabilidad en el tiempo, lo cual concuerda con lo descrito por Camelo (2010) y Rojas *et al.* (2009) quienes reportaron que a temperaturas de refrigeración las UFC/mL se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo establecido. 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).

Los resultados obtenidos en esta etapa nos indican que se deberá tener cuidado con las bacterias 5 y 8 porque son las que más rápidamente disminuyen su viabilidad en el tiempo y las bacterias 7 y 9, en correspondencia con los resultados obtenidos muestran ser más estables en su viabilidad con el tiempo, lo cual da la posibilidad de conservarlas en refrigeración por más tiempo.

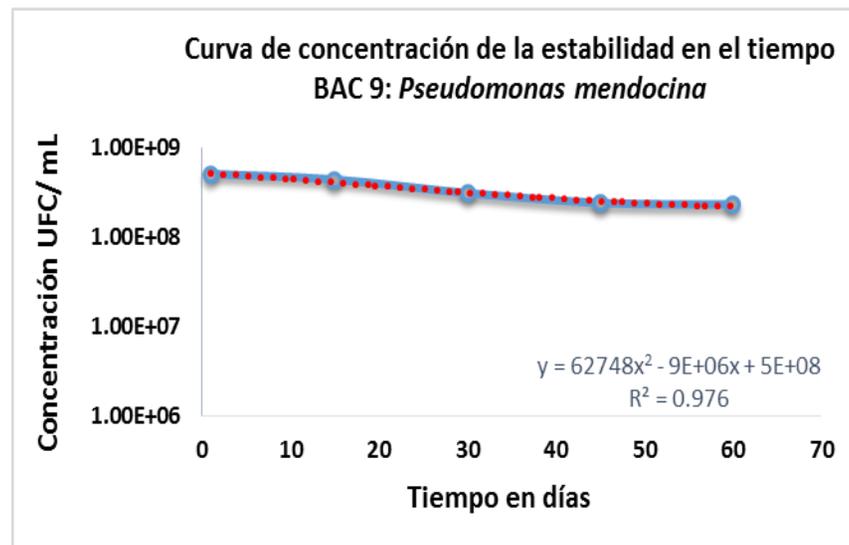
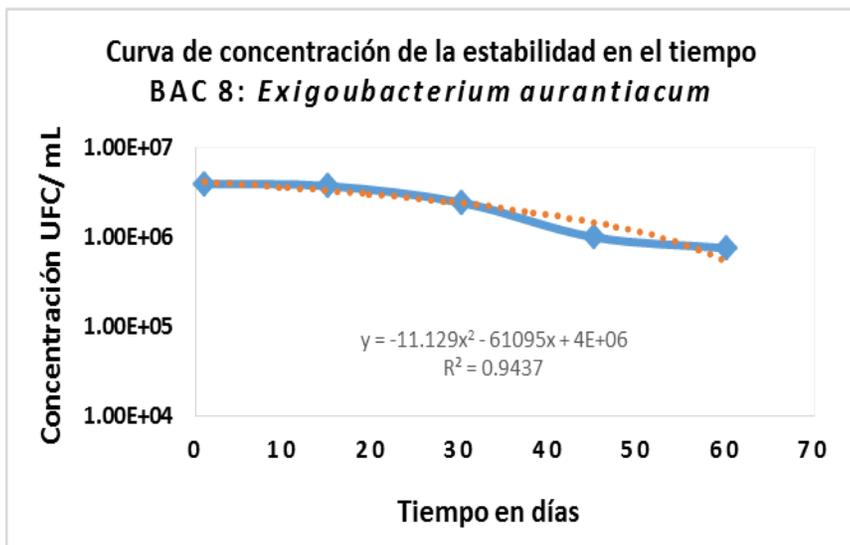
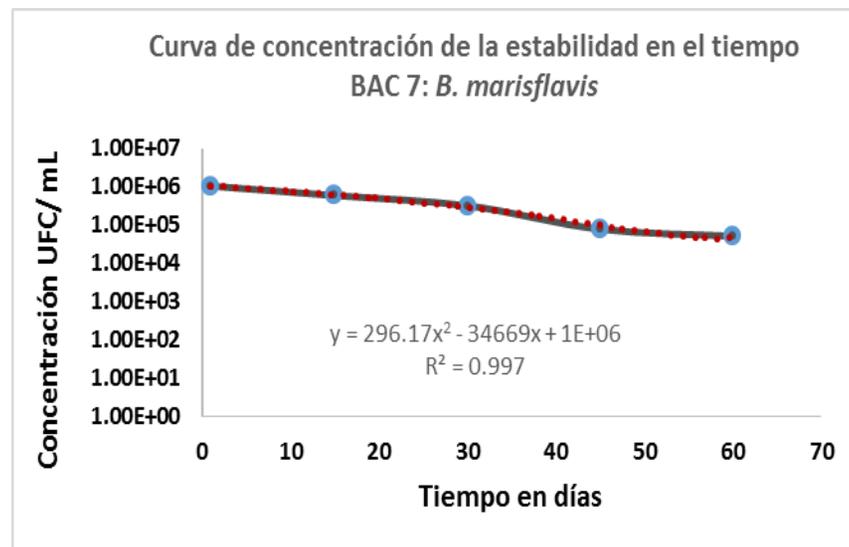
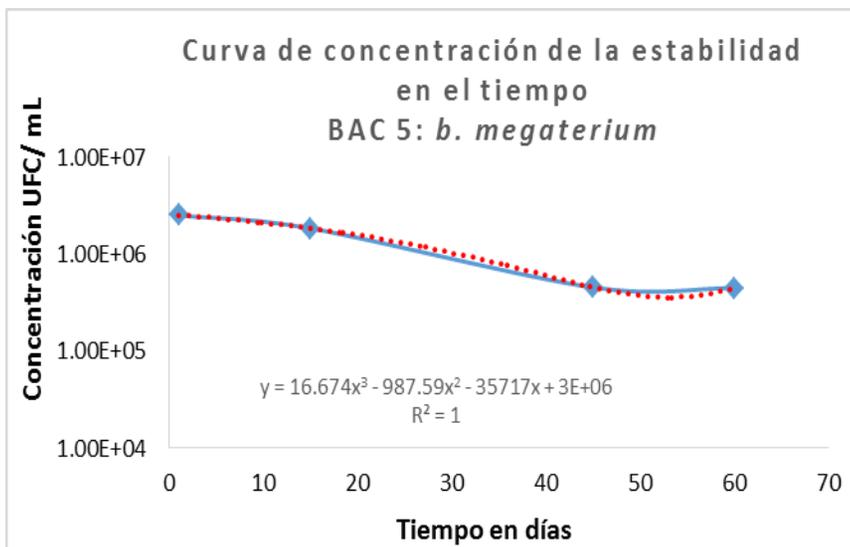


Figura 32. Resultados de la prueba de estabilidad realizada por dos meses. A: Conteo de UFC/mL de la bacteria 5; B: Conteo de UFC/mL de la bacteria 7; C: Conteo de UFC/mL de la bacteria 8; D: Conteo de UFC/mL de la bacteria 9. Fuente: Propia.

VI. CONCLUSIONES

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

1. Con respecto a la caracterización morfológica y molecular de los microorganismos aislados de bioinsumos artesanales se obtuvo lo siguiente:
 - De las 23 bacterias aisladas se observaron 14 tipos de morfología macroscópica de las colonias (Color crema, consistencia cremosa y bordes redondeados) y microscópicamente mediante la tinción Gram se obtuvo que 22 presentan forma bacilar (15 Gram positivas y 7 Gram negativas) y 1 una de forma cocal Gram positiva.
 - De los 6 hongos filamentosos aislados se obtuvo una variedad de caracteres de la morfología de sus colonias. Microscópicamente, se observó que 5 hongos filamentosos presentaron esporas esféricas y 1 con forma ovalada.
 - La identificación bacteriana por vía molecular de los 23 aislados permitió identificar 12 bacterias hasta el nivel de especie (*B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. megaterium* (2), *B. cereus*, *B. subtilis* (2), *B. Flexus*, *Lysinibacillus macroides* (2), *Agrobacterium tumefaciens* y *Staphylococcus succinus*) y 11 hasta nivel de género (*Bacillus sp.* (6), *Stenotrophomonas sp.* (4) y *Paenibacillus sp.*).
 - La identificación molecular de hongos filamentosos permitió identificarlos como: *Monascus purpureus*, *Neosartorya glabra*, *Byssochlamys nivea*, *Aspergillus flavus* y 1 a nivel de género *Neosartorya sp.*
2. En lo que respecta a la obtención del consorcio microbiano se obtuvo:
 - De la realización de las pruebas de antagonismo se seleccionaron las siguientes bacterias para integrar el consorcio microbiano: *B. megaterium*, bacteria 5 (solubiliza fosfatos, produce ácido indol acético y fija nitrógeno), *B. marisflavis*, bacteria 7 (fija nitrógeno), *Exigobacterium aurantiacum*, bacteria 8 (productora de ácido indol acético) y *Pseudomonas mendocina* bacteria 9 (promotora del crecimiento vegetal, aumenta la biomasa de brotes y raíces, y los niveles de P y Fe).

3. Para la cinética microbiana y la estabilidad del consorcio se llegó a:
- Para todas las bacterias seleccionadas se obtienen índices máximos de crecimiento que rondan los 10^9 UFC/mL en producciones desarrolladas a nivel de shaker, con tiempos para alcanzar su punto máximo de crecimiento que oscilan entre 4.57 a 6.38 horas.
 - La evaluación de la estabilidad de cada una de las bacterias que conformaron el consorcio microbiano almacenadas a temperaturas de refrigeración de 10° C durante 60 días, arrojó que *B. megaterium* y *Exiguobacterium aurantiacum*, redujeron su viabilidad entre el 14 al 17 % aproximadamente; mientras que *B. marisflavis* y *Pseudomonas mendocina* permanecen con índices de viabilidad prácticamente constantes durante el periodo en estudio.
4. Otros resultados que destacan de este trabajo son los siguientes:
- Para cada bioinsumo en estudio se determinó que contenían: **muestra TS**: 5 bacterias (*B. thuringiensis*, *B. pumilus*, 2 *Bacillus* sp. y *Stenotrophomonas* sp.) y 4 hongos filamentosos (*Monascus purpureus*, *Neosartorya glabra*, *Neosartorya* sp. y *Aspergillus flavus* – reportado como patógeno para cultivos); **muestra LS**: 6 bacterias (*B. megaterium*, *B. subtilis*, 2 *Stenotrophomonas* sp., 1 *Paenibacillus* sp. y 1 *Bacillus* sp.) y 1 hongo filamentosos no secuenciado; **muestra LL**: 3 bacterias (*B. megaterium*, *Staphylococcus succinus* y *Bacillus* sp.) y 1 hongo filamentosos (*Byssochlamys nivea*). **Muestra DCL**: 9 bacterias (*B. subtilis*, *B. flexus*, *B. cereus* – patógeno para el ser humano, 2 *Lysinibacillus macroides*, *Agrobacterium tumefaciens*, 2 *Bacillus* sp. y *Stenotrophomonas* sp).
 - Del análisis de las aplicaciones biotecnológicas de las bacterias se logró identificar que algunos de los bioinsumos presentan bacterias patógenas al ser humano como *B. cereus* (**muestra DCL**) y otras bacterias que pudiesen estar desarrollando actividades no útiles agrónomicamente, como *Agrobacterium tumefaciens*, *B. flexus* (**muestra DCL**), y *Staphylococcus succinus* (**muestra LL**); así como algunas que poseen importantes aplicaciones industriales y ambientales como *B. flexus* y *Lysinibacillus macroides* (**muestra DCL**), además de *Stenotrophomonas* sp. (**muestras DCL y LS**).
 - En cuanto a los hongos filamentosos, se encontró que la **muestra TS**, contiene *Aspergillus flavus* (patógeno para el ser humano y los animales), *Monascus purpureus* y *Neosartorya glabra* (beneficiosos a la industria farmacéutica), *Neosartorya* sp (utilizado en procesos de biorremediación). La **muestra LL** contiene *Byssochlamys nivea* (Beneficioso para la agricultura como controlador biológico, indeseable en procesos de preservación de fruta).

VII. RECOMENDACIONES

Al concluir el presente trabajo, se han abierto nuevas interrogantes que permitirán continuar investigando para mejorar el producto obtenido hasta llegar a su aplicación comercial y que sea de utilización agrícola en beneficio de los productores, por ello se recomienda lo siguiente:

1. Aplicar el consorcio microbiano producido a escala de laboratorio en cultivos de interés agrícola para su estudio en condiciones semi-controladas en invernadero y no controladas en campo abierto.
2. Analizar la posibilidad de conformar el consorcio únicamente con *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas mendocina*, dado que estas dos presentan en sí todas las propiedades que aporta el consorcio formado por las 4 antes propuestas y podría estar eliminando el problema de la duda de antagonismo.
3. Evaluar la cinética de crecimiento en conjunto de las bacterias que conformen finalmente el consorcio microbiano, pero considerando los resultados obtenidos de la estabilidad de cada bacteria por separado.
4. Realizar estudios de vida de anaquel (Viabilidad del consorcio en el tiempo), para el consorcio o consorcios que se definan en un futuro por rangos de tiempo mayores al acá presentados.
5. Finalmente, se recomienda valorar la producción masiva del consorcio con un medio de cultivo alternativo que contenga fuentes nutricionales de bajo costo y fácil disponibilidad en la región, para su posterior producción a escala piloto.

VIII. 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 está 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.

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

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.

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.

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.

Tinción: efecto de teñir o dar color.

IX. ABREVIATURAS

Abs: absorbancia

ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosomal.

AIA: Ácido Indol Acético

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal.

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.

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.

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)

TS: Tisey sólido.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

X. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, E., Gómez, E., Romero, M., Cadavid, G., y Moreno, C. (2009). Identificación molecular de poblaciones bacterianas asociadas al caracol pala (*Strombus gigas*) del caribe colombiano. *Acta Biológica Colombiana*, 14(2), 83-96. Recuperado de: <https://www.semanticscholar.org/>
- Acosta, J. (2018). *Evaluación de la cinética de crecimiento de PGPR y su actividad antagonista hacia Meloidogyne incognita "in vitro"* (Trabajo de Grado). Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Ecuador.
- Afanador, L. (2017). Biofertilizantes conceptos, beneficios y su aplicación en Colombia. *Ingeciencia*, 2(1), 65-79. Recuperado de: http://editorial.ucentral.edu.co/ojs_uc/index.php/Ingeciencia/article/view/2353
- Ahmed, E., & Holmström, S. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*, 7(3), 196-208. doi:10.1111/1751-7915.12117
- 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.
- Álvarez, C., Osorio, N., y Montoya, M. (2013). Identificación molecular de microorganismos asociados a la rizósfera de plantas de vainilla en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(2), 293-306. ISSN 0120-548X
- Álvarez, 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., & Keller, N. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 107-133. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095221
- Apella, M. y Araujo, P. (2005). Microbiología de agua: Conceptos básicos. En M.A. Blesa y J. Blanco. (Ed.), *Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua* (Cap. 2, pp. 33-50). San Martín, Argentina: Escuela de Posgrado de Universidad Nacional de San Martín.
- Aquihuatl, M., y Pérez, M. (2004). *Manual de Prácticas del Laboratorio de Microbiología General*. Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Cap. 1-8, pp. 22-68, ISBN: 970-31-0141-0

- Armenta, A., García, C., Camacho, J., Apodaca, M., Montoya, L., & Nava, E. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*, 6(1), 51-56. ISSN: 1665-0441
- 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., & Chattopadhyay, P. (2017). Beneficial effects of biocontrolling 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
- 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.
- Benjumeda, D. (2017). *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: mecanismos y aplicaciones* (Trabajo de Grado). Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
- Berendsen, R., Pieterse, C., & Bakker, P. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478-486. doi:10.1016/j.tplants.2012.04.001
- 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. doi: 10.11144/javeriana.SC14-1.pdub
- 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, A., García, C., Sáez, 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
- Brenner, K., You, L., & Arnold, F. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Cell Press*, 26(9), 483-489. doi:10.1016/j.tibtech.2008.05.004

- 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.
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 15-31. ISSN 0123-4226
- 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
- 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>
- 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
- Cruz, M., Mena, E., Acosta, M., Tzec, M., Roque, B., Leiva, M, Pichardo T., Canto B., y Alvarado, Y. (2015). Potencial de *Bacillus pumilus* (CCIBP-C5) contra *Mycosphaerella fijiensis*. *Revista de Protección Vegetal*, 30(1), 93. ISSN: 2224-4697
- 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). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Delgado, H., y Fonseca, E. (2019). *Bioprospección microbiana dirigida a identificar microbiológica y molecularmente microorganismos de utilidad agrícola e industrial en Nicaragua* (Trabajo de Grado). Universidad Nacional de Ingeniería, Managua, Nicaragua.
- Delgado, M., Rodríguez, I., Cruz, A., Balagurusamy, N., & Aguilar, C. (2013). Characterization and selection of halophilic microorganisms isolated from Mexican soils. *ARPJ 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

- 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
- Emmert, E., Klimowicz, A., & Thomas, M. (2004). Genetics of zwittermicin A production by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 104-113. doi: 10.1128/AEM.70.1.104-113.2004
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C., y Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter spp.* y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 2(1), 39-49. ISSN: 2306-6741
- Farfán, D. (2017). *Microorganismos promisorios fijadores de nitrógeno, movilizadores de fosforo y potasio para la formulación de un bioinsumo de uso agrícola* (Informe de pasantía). Facultad de medio ambiente y recursos naturales. Universidad distrital Francisco José de Caldas, Bogotá.
- Fisher, S., y Jofré, E. (2009) El futuro de los inoculantes: hacia el desarrollo de consorcios microbianos para una agricultura sustentable. En M. Puente, J. García y A. Peticari. (Eds.), *Uso actual y potencial de microorganismos para mejorar la nutrición y el desarrollo en trigo y maíz* (Cap. 6, pp.67-75). Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Flores, M., y Roque, E. (2017). *Aislamiento y caracterización microbiana (microbiológica y molecular) en la búsqueda de Bacillus subtilis a partir de bioinsumos comerciales y pruebas de antagonismo frente a hongos fitopatógenos* (Trabajo de Grado). Universidad Nacional de Ingeniería, Managua, Nicaragua.
- 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., & 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/mnbr.67.1.16-37.2003

- Gómez, L., Valero, N., & Dario, E. (2012). Bacterias halotolerantes/alcalofilas productoras de ácido indol acético (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
- 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.
- 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>
- 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.
- Jamalizadeh, M., Etebarian, H. R., Aminian, H., & Alizadeh, A. (2011). A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. *EPPO Bulletin*, 41(1), 65-71. doi:10.1111/j.1365-2338.2011.02438.x
- 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
- Jha, C., & Saraf, M. (2015). Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. *Journal of Agricultural Research and Development*, 5(2), 108-119. doi:10.13140/RG.2.1.5171.2164.

- 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
- 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., & 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
- Labra, D., Guerrero, L., Rodríguez, A., Montes, S., Pérez, S., & Rodríguez, A. (2012). Respuesta de crecimiento y tolerancia a metales pesados de *Cyperus elegans* y *Echinochloa polystachya* inoculadas con una rizobacteria aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 28(1), 7-16. ISSN: 0188-4999
- Lara, C., y Negrete, J. (2015). Efecto de un bioinoculante a partir de consorcios microbianos nativos fosfato solubilizadores, en el desarrollo de pastos Angleton (*Dichanthium aristatum*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 122-130. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50741
- 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., Sigeo, 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
- Liébana, J. (2002). *Microbiología Oral*. Madrid, España: McGRAW-HILL-INTERAMERICANA. Cap. 3-22, pp. 18-225. ISBN: 84-486-0460-1
- Llorens, V., Martín, M. P., y Hidalgo, E. (1997). PCR: una nueva herramienta para el estudio de hongos ectomicorrícicos. *Revista Catalana de Micología*, 20, 187-198. ISSN: 1135-1225
- Malusá, E., Pinzari, F., & Canfora, L. (2016). Efficacy of biofertilizers: challenges to improve crop production. *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity: functional applications*, 2, 17-40. doi: 10.1007/978-81-322-2644-4_2

- 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.
- 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.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., y Pfaller, M. A. (2013). *Microbiología Médica*. Barcelona, España: ELSEVIER. Cap. 12-65, pp. 109-605. ISBN: 978-84-9022-420-5
- NTON 11 048-16. Diario oficial La GACETA, Managua, Nicaragua, 19 de Diciembre de 2017.
- Ochei, J., & Kolhatkar, A. (2000). *Medical Laboratory Science: Theory and Practice*. New Delhi, India: Tata McGraw-Hill Education. Cap. 3, pp. 1067. ISBN: 0-07-463223-X
- Ochoa, D., y Montoya, A. (2010). Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. *Revista Facultad de Ciencias Económicas*, 18(2), 55-74. doi:10.18359/rfce.2272
- Oladipo, O., Ezeokoli, O., Maboeta, M., Bezuidenhout, J., Tiedt, L., Jordaan, A., & 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., Pérez, I., Ferrer, D., Cortés, N. y González, Z. (2005). Aislamiento de cepas del genero *Bacillus* sp. con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal. *Revista Cubana de Química*, 17(1), 2005, pp. 189-195. ISSN: 0258-5995
- 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. (2014a). *Práctica de Laboratorio, Temas I Y II: Cinética Enzimática y Cinética Microbiana*. Maestría Interinstitucional en Biotecnología, Managua, Nicaragua.
- Páramo, L. (2014b). *Conferencia, Módulo IV: Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. Maestría Interinstitucional en Biotecnología, Managua, Nicaragua.
- Park, J., Hargreaves, J., Cole, A., Ghisalberti, E., Gams, W., & Sivasithamparam, K. (2001). Cuticular disruption and mortality of *Caenorhabditis elegans* exposed to culture filtrate 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
- Paulitz, T., & Bélanger, R. (2001). Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*, 39(1), 103-133. doi: 10.1146/annurev.phyto.39.1.103
- Pereg, L., & McMillan, M. (2015). Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 80, 349-358. doi: 10.1016/j.soilbio.2014.10.020
- Pereira, S., & Castro, P. (2014). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils. *Ecological Engineering*, 73(1), 526-535. doi: 10.1016/j.ecoleng.2014.09.060
- Pérez, R., Gonzales, T. S., y Muñoz, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(3), 53-60. ISSN: 2334-2501
- 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* (Cap. 1, pp. 23-42). Montevideo, Uruguay: Oficina del libro FEFMUR. ISBN: 9974-31-194-2

- Prescott, L. M., Harley, J. P., y Klein. D. A. (2004). *Microbiología*. Madrid, España: McGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA. Cap. 5-6 pp. 109-119. ISBN: 0-07-232041-9
- 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 invernadero* (Trabajo de Grado). Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.
- Pumarola, A., Rodríguez, A., García, J. A., y Piedrola, G. (1991). *Microbiología y Parasitología Médica*. Barcelona, España: SALVAT. Cap. 6-69, pp. 57-748. ISBN: 8434526972
- Rasheva, T., Hallet, J.-N., & Kujū, A. (1998). Taxonomic Investigation Of Monascus Pupureus 94-25 strain. *Journal of Culture Collections*, 2(1), 51-59. ISSN: 1310-8360
- 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.
- Rios, C., (2019). *Bioprospección microbiana para el desarrollo de aplicaciones ambientales* (Trabajo de Grado). Universidad Nacional de Ingeniería, Managua, Nicaragua.
- Rodicio, M., y Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245. doi: 10.1157/13059055.
- Rojas, D., Garrido, M., & 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
- Roselló, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology*, 25(1), 39-67. doi: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00571.x
- 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 inhibidor de los probióticos: Lactobacillus Acidophilus, Lacobcillus Casei y Lactibacillus Reuteri, sobre el crecimiento in vitro de Porphyromona Gingivalis, microorganismo predominante en la enfermedad peridontal destructiva crónica* (Trabajo de Grado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

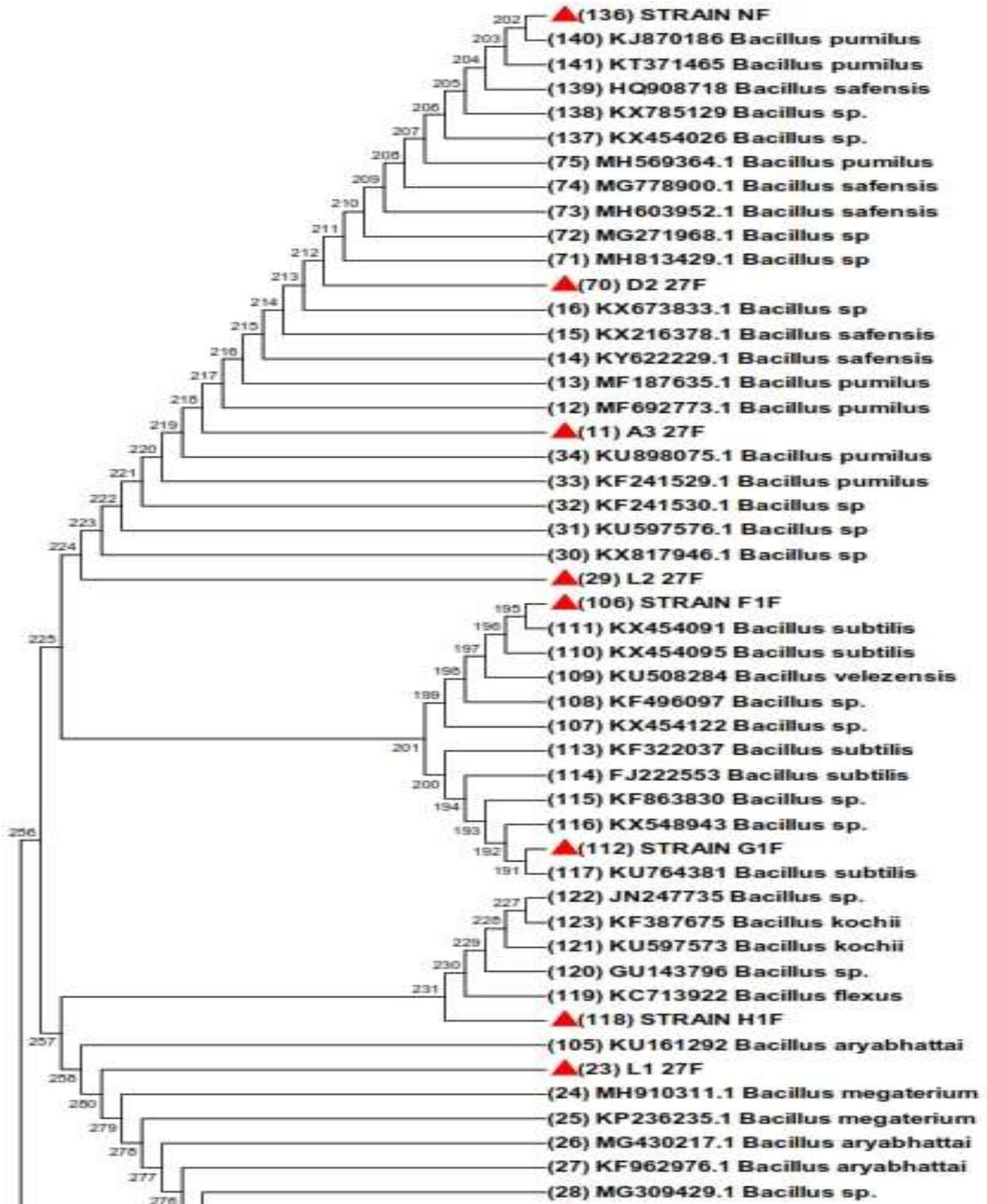
- Sánchez, E., Castillo, S., y García, P. (2016). Actividad antimicrobiana. En C. Rivas-Morales, M.A. Oranday-Cardenas y M.J. Verde-Star. (Eds.), *Investigación en plantas de importancia médica* (Cap. 3, pp. 77-100). Barcelona, España: OmniaScience. doi: 10.3926/oms.334
- Sandria, J. (2003). *Aplicaciones 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*. Logroño, España: Universidad de La Rioja. Cap.1, pp. 13-21. 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
- Scragg, A. (1996). *Biotecnología para Ingenieros: Sistemas Biológicos en Procesos Biotecnológicos*. México: LIMUSA. Cap. 10, pp. 191-195. ISBN: 968-18-4708-3
- 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. & 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
- 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
- Subashchandrabose, S., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2011). Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnology Advances*, 29(6), 896-907. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.07.009
- Suh, L., Stabb, E., Raffel, S., & Handelsman, J. (1998). Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. *Current Microbiology*, 37(1), 6-11. doi: 10.1007/s002849900328

- 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., y Mayra, H. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138. ISSN: 0253-5688
- Tortolo, K., y 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*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. Cap. 10-12, pp. 176-346. ISBN: 978-950-06-0740-7
- Tournas, V. (1994). Heat-Resistant Fungi of Importance to the Food and Beverage Industry. *Critical Reviews in Microbiology*, 20(4), 243–263. doi: 10.3109/10408419409113558
- Trivedi, P., & 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. Recuperado de: <http://revistas.sena.edu.co/index.php/agroeccyt/article/view/847>
- 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.x
- Varga, J., Frisvad, J., & 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

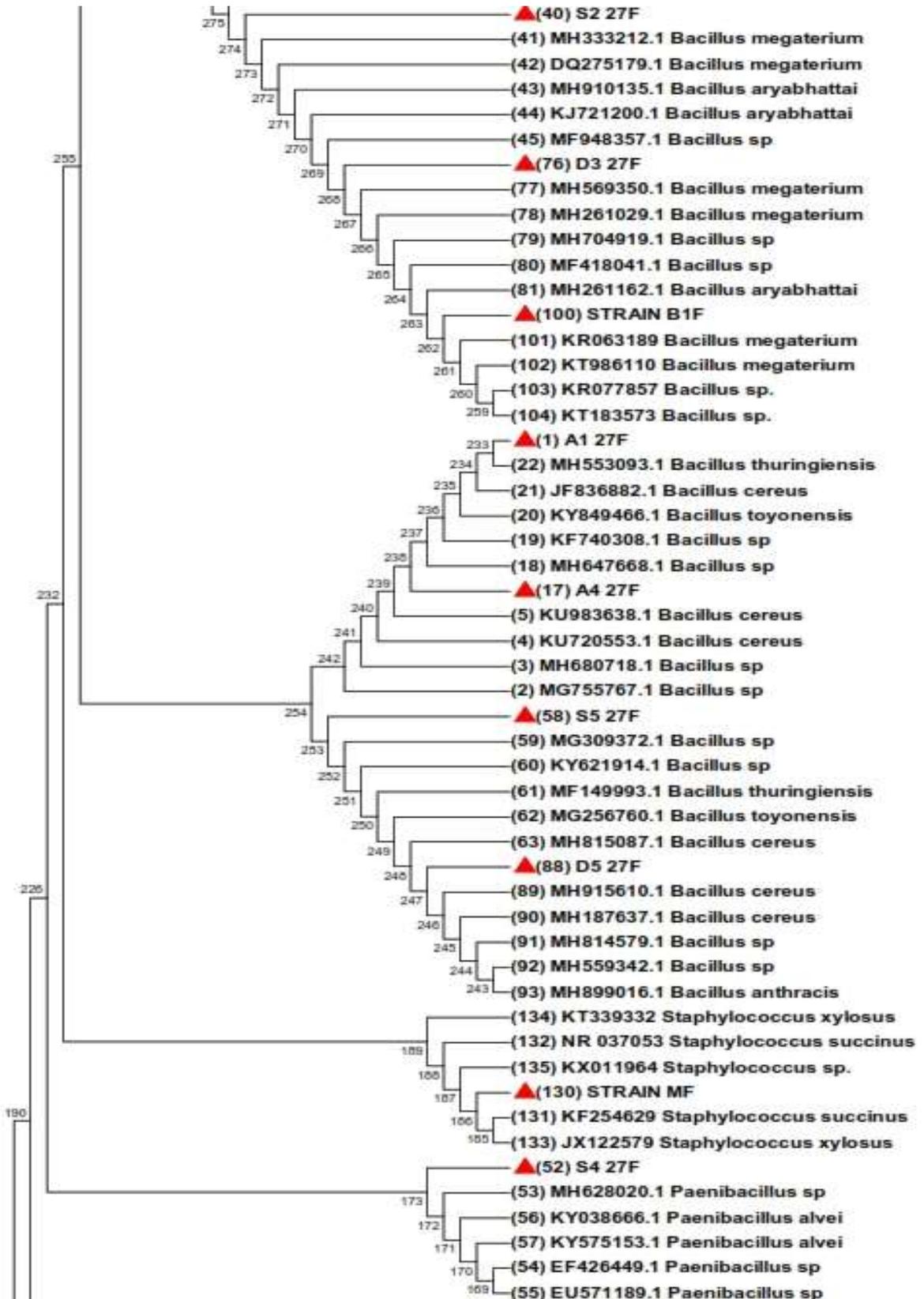
- Vargas, S. (2002). *Selección y evaluación de bacterias del género Bacillus productoras de amilasa en cultivo sumergido* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Villota, C. P. (2013). *Evaluación del potencial de promoción del crecimiento vegetal de microorganismos 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., & 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
- Xu, X., Jeffries, P., Pautasso, M., & Jeger, M. (2011). A Numerical Study of Combined Use of Two Biocontrol Agents with Different Biocontrol Mechanisms in Controlling Foliar Pathogens. *Analytical and Theoretical Plant Pathology*, 101(9), 1032-1044. doi:10.1094/PHYTO-10-10-0267
- 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
- Zeballos, M. (2017). *Caracterización de microorganismos de montaña (MM) en biofertilizantes artesanales* (Trabajo de Grado). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
- Zhao, L., Wang, F., & Zhao, J. (2012). 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

XI. ANEXOS

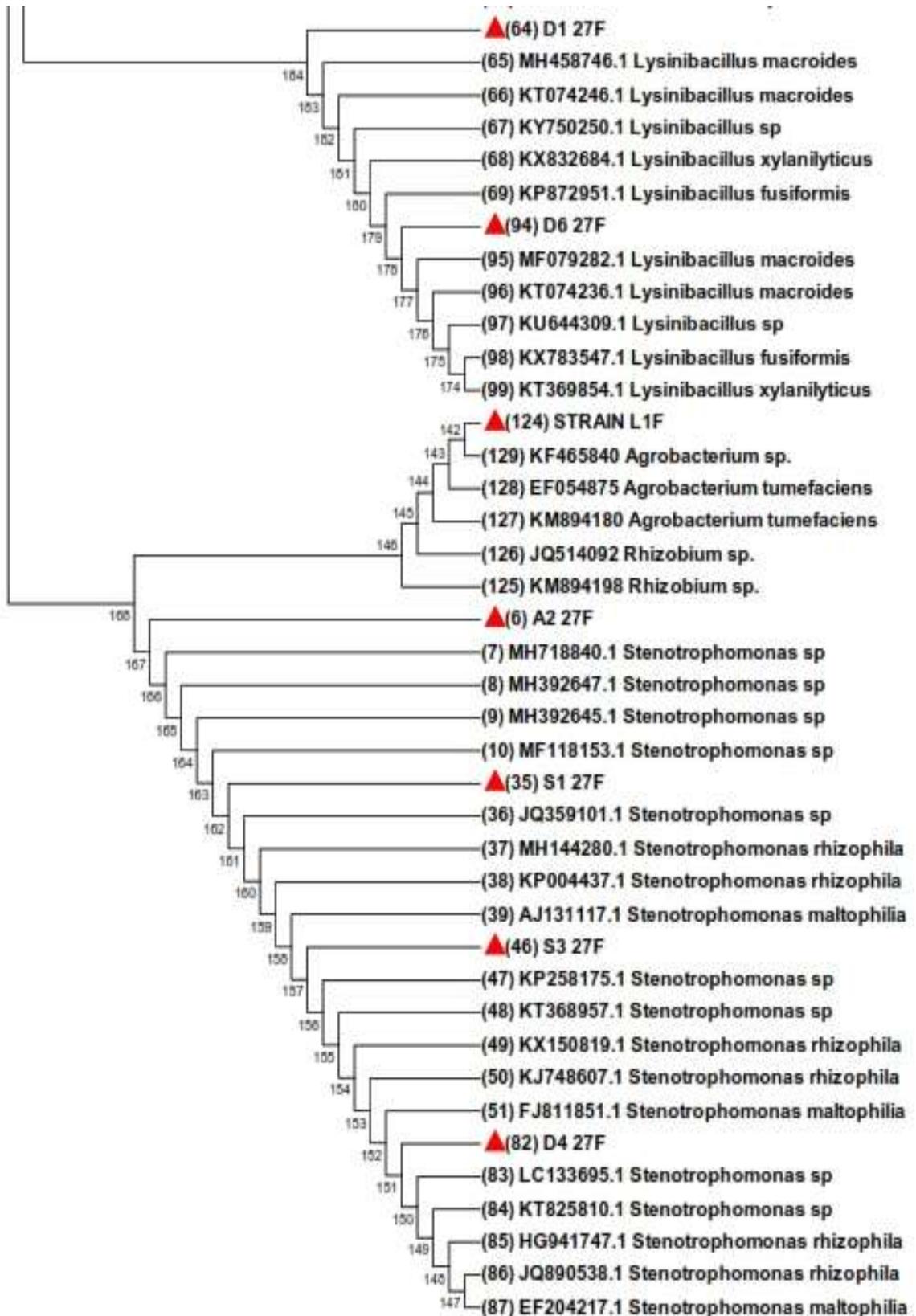
Anexo 1. Árbol filogenético de bacterias utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA 5.0, el código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo. Fuente: Propia.



Continuación de Anexo 1



Continuación de Anexo 1



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

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

GCAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAAGACTGGGATAACTCCGG
GAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTGAACTGCATGGTTCGAAATTGA
AAGGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCAATAGCTAGT
TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG
GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAAC
AAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTAT
CCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGT
GAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGA
GTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA
TATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACT
GAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCT
GAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCAACGCG

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

CAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAG
GAATACATCGGAATCTACCTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACG
CTAATACCGCATACGACCTTCGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGC
GCGGATAGATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCC
ACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGG
AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
GACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCC
TTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCGGCTAATACC
CGGTTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTACTCGGAATTACTGGGCGTA
AAGCGTGCGTAGGTGGTTGTTTAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAAC
CTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGTG
GAATTCCCGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCCATG
GCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAA
CTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAAC

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

ACATGCAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCG
GGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGAT

GAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGGCGCATTAGCTA
GTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGA
GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC
CGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGA
ACAAGTGCAGAGTAAGTCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCC
ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT
GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTAC
GCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGT
GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGAC
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACA
ACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGAT
GTTGTCGTCAGCTCGTG

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

ATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAAC
TCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATTTTTGAACTGCATGGTTCGA
AATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCT
GAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCA
ACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAAGTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGA
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGT
CTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGA
GACTTGAGTGCAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAC
TGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
TAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTT
TAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG
TGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG
AAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTG
ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATAAGTTGGGCACTCTAAGGTGAC
TGCCGGTG

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

AGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
CCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATA

ATCTCTTTTGCTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTGCTAT
AGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAA
TGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGG
ATCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACTGGCTGTA
CCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
GCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGG
AGGGTCATTGGAAACTGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTC
CAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAA
GGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG
TGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC
GCCTGGGG

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

AGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAG
TTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTAC
AGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGA
TCGTAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTAACCTGCTCGCA
CCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGC
TCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGA
GGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTC
ACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAG
GCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCG
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGT
GTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCG
CCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAG

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

CGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTT
CGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGA
TTGAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGC
TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCCGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAG
AACAGTACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCC
ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT

ATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTT
GAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAACCTGACG
CTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTG
CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACT
GAAACTCAAAGGAATTGAC

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

CTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAAT
CTACCTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATA
GACCTTCGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGGATAGATGAG
CCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGA
TCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGT
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAA
GCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAG
CCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCGGCTAATACCCGGTTGTTCTGACG
GTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGAAGGGTGAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGG
TGGTTGTTAAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGT
GGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGTGAATTCCCGGTGTA
GCAGTGAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTA
CCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGT
GCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGG
AGTACGGTTCGCAAGACTG

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

AGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
CTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAA
CATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTAT
GGATGGACCCGCGTTCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTCACCAAG
GCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCCGGG
TCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA
CCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
GCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGA
GGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTC
ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAG
GCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCA
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGT
GTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGC
CTGGGGAGTAC

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

GCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAAC
CTACCCTATAGTTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAA
TCTCTTTTGCTTCATGGTCAAAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTATA
GGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAAT
GGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGA
TCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAGTGGCTGTAC
CTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCG
CGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGA
GGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTC
CAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAA
GGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG
TGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTC

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

GTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGG
TGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAAC
CGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGAT
GGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA
GTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAATACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTA
CAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACTTGAGTGCA
GAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAG
CTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC
GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTCTAG
AGATAGAGCGTTCCCTTCGGGGGACAG

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

GGCTAAACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTT
AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGA
TAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCTTGAACCGCAGGTT
CAAGGATGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGC

ATAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGA
CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA
GGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGCACCTTGACGGTACCTAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGG
GAACTTGAGTGCAAGAAGAGAGTGGAAATTCCACGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGT
AACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCC
CCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCCG
CAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT
CTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTG
GTGCATGGTTGTTCGTGAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAA
GGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAGGGGGGGGATGACGTCAAATC
ATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACCACGTGCTACATG

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

GGTTGCTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTAT
GGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACCTTTTCG
TGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTTCGGGT
GAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGGATAGATGAGCCGATGTCGGA
TTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGG
TCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAG
CCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCCCTTTTGTGG
GAAAGAAAAGCAGTCGGCTAATACCCGGTTGTTCTGACGGTACCCAAAGAA
TAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCA
AGCGTTACTCGGAATACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTTGTTAAG
TCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGC
GACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGTGGAAATCCCGGTGTAGCAGTGAATGC
GTAGAGATCGGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACA
CTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTG
GTAGTCCACGCCCTAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCAC
GCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGC
AAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGTAT
GTGGTTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATGTCGA
GAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCTG
CATGGCTGTTCGTGAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGG
AGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCA
TGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTACTACAATGG

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

GCTAAACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTA
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGAT
AACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGA
GATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCA
TTAGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGAC
CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAG
GGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCG
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAG
TCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAAAGTGGG
GAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGAGATGTGGAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAC
TGACGCTGAGGCGCGAAACGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTT
AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCCGAA
GACTGAAAAGTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATG
TGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG
ACAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGT
TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAG
GTGACTGCCGTGACAAC

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

ATGCAGTCGACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTG
GCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACCTTTTTCGTGGGGGATAACGT
AGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTTCGGGTGAAAGCAGGGGAC
CTTCGGGCCTTGCGCGGATAGATGAGCCGATGTCCGATTAGCTAGTTGGCG
GGGTAAAGGCCCAACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAT
CAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGG
GTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTTGTTGGGAAAGAAAAGCAG
TCGGCTAATACCGGTTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTA
ACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTACTCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTTGTTTAAGTCTGTTGTGAAAG
CCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTG
GTAGAGGGTAGTGGAATTCGGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCGG
GAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACACTGACACTGAG
GCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAA
GCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGACTGAAAAGT
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTC
GATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATGTGAGAACTTTCCAG
AGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTGCG

TCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT
TGTCCTTAGTTGCCAGC

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

GGCTAAACATGCAGTCGAGCGGACTTGATGGAGTGCTTGCACTCCTGATGG
TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTACCTGCCATAAGACTGGG
ATAACCCACGGAAACGTGAGCTAATACCAGATAGGCATTTTCCTCGCATGA
GGGAAATGAGAAAGGCGGAGCAATCTGTCACTTATGGATGGACCTGCGGC
GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTG
CCAGGGAAGAACGCCTAGGAGAGTAACTGCTCTTAGGGTGACGGTACCTG
AGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
GGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCAA
TGTAAGTTGGGTGTTTAAACCTAGGGCTCAACCTTGGGTGCGATCCAAAAC
GCATAGCTTGAGTACAGAAGAGGAAAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCT
GTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTTCGAT
ACCCTTGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGT
CGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGA
GTATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC
TGAATGACCGTCCTAGAGATAGGGCTTTCTTCCGGGACATCAAGAC

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

GAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
TAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGG
ATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCAC
TTATGGATGGACCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC
AAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTC
GGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCT
GGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCG
TGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAAGAGGAAAGTGGA
ATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCT
AAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACT
CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGAC

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

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

CACCCGTGATTATTGTACCTCCTGTTGCTTCGGCGCGGCCCCCGGGGCC
CGCCGGAGACATCTTCTCGAACGCTGTCTTTGAAAAGGATTGCTGTCTGAG
TAAACATACCAAATCGGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA
GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGG
GCATGCCTGTCCGAGCGTCATTACTGCCCTCAAGCGCGGCTTGTGTGTTG
GGCCGCCGTCCCCTGCGCCTCCGGGCAAGGGGGACGGGCCCGAAAGGCA
GTGGCGGCGCCGCGTCCGGTCCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCT
CAGTAGGTCGGGCCGGGGCCTTTGCCCTCTCCAACCTTTTTTTCCTTAGGT
GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA

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

CACCTCCCACCCGTGTCTATTGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTT
TTCGAACGGCCGCCGGGGAGGCCTCGCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCG
AAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTTGATTAT
CATAATCAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCT
GTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGT
CCCCGTTCTCCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGT
CCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCG
GCGCCAGCCGACACCCCAACTTTATTTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGT
AGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGC

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

GTGTCTATTGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTTTTCGAACGGCCG
CCGGGGAGGCCTCGCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACA
TGAATCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTTGATTACCATAATCAGTTAA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA
ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC
ATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCGTTCTC
CCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGA
GCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGA
CACCCCAACTTTATTTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCC
GCTG

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

TGTTGACCGACACCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAGGGCTCCCGCCCGG
CCGCCGGGGGGCCTCGTCGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCT
CGAACGCTGCCTTGAAGGTTGCCGTCTGAGTATAAAATCAATCGTTAAACT
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG

CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTG
CTAACCCCTCCAGCCCGGCTGGTGTGTTGGGCCGCCGTCCCCTCCGGGGGA
CGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGG
GGCTTTGTCACACGCTCTGGTAGGCCCGGCCGGCTTGCTGGCCAACGACC
TCACGGTCACCTAACTTCTCTCTTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAC
CCGCTGAACTTAAGCATATCAAT

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

GTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCG
GGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTG
TCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAACTTTCAA
CAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
ACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATT
GCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC
CATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCCCTCTCCGGGGGGGAC
GGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGG
GCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATC
AATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA
GCATATCAA

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

Cepas Masivas

Cepas Sembradas en Pozos

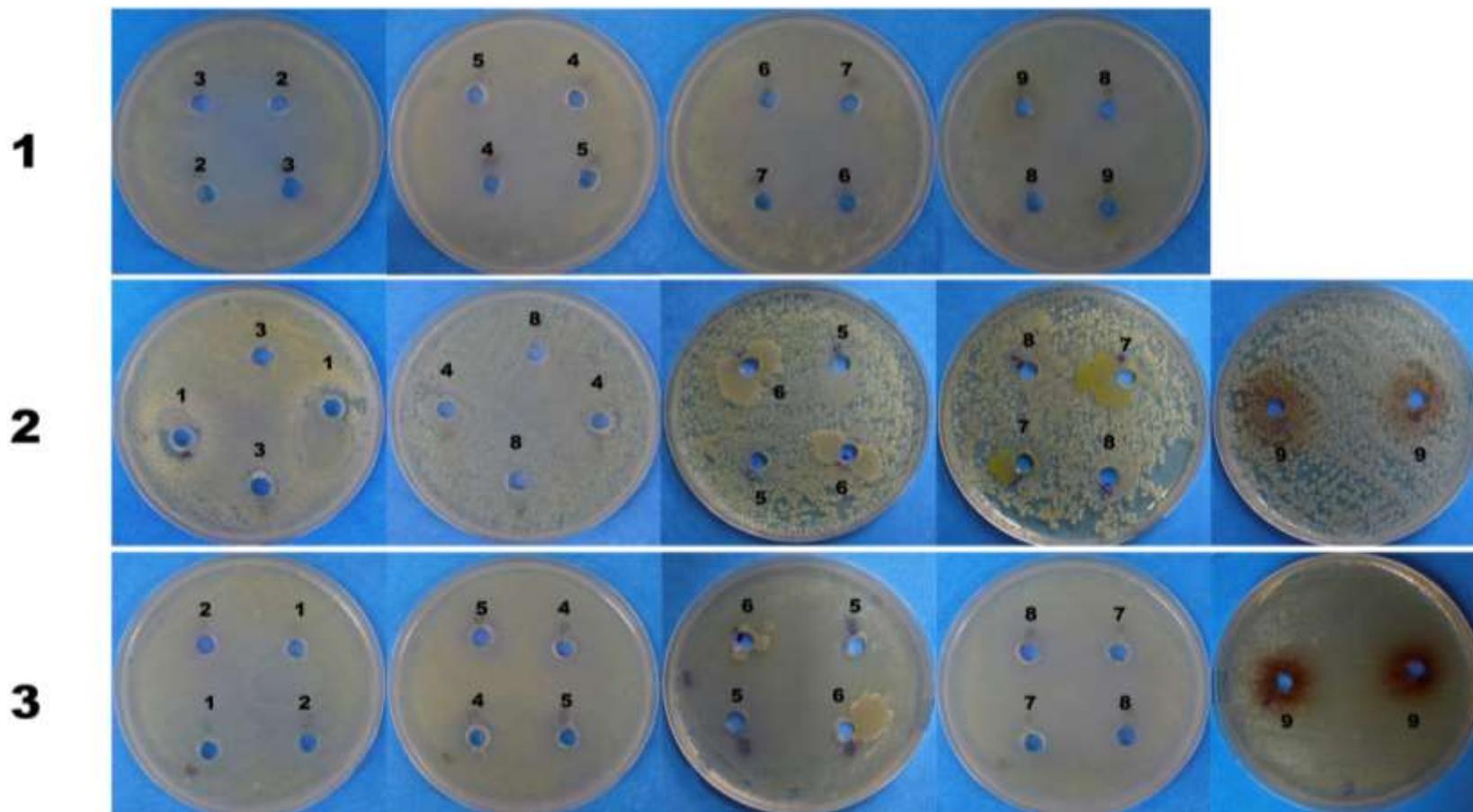


Figura 33. Confrontación de la **bacteria 1** (*B. subtilis* DCL4-31F), **bacteria 2** (*B. megaterium* LS5-11B) y **bacteria 3** (*B. pumilus* TS13-2111u) frente al resto de las bacterias seleccionadas. Fuente: Propia.

Cepas Masivas

Cepas Sembradas en Pozos

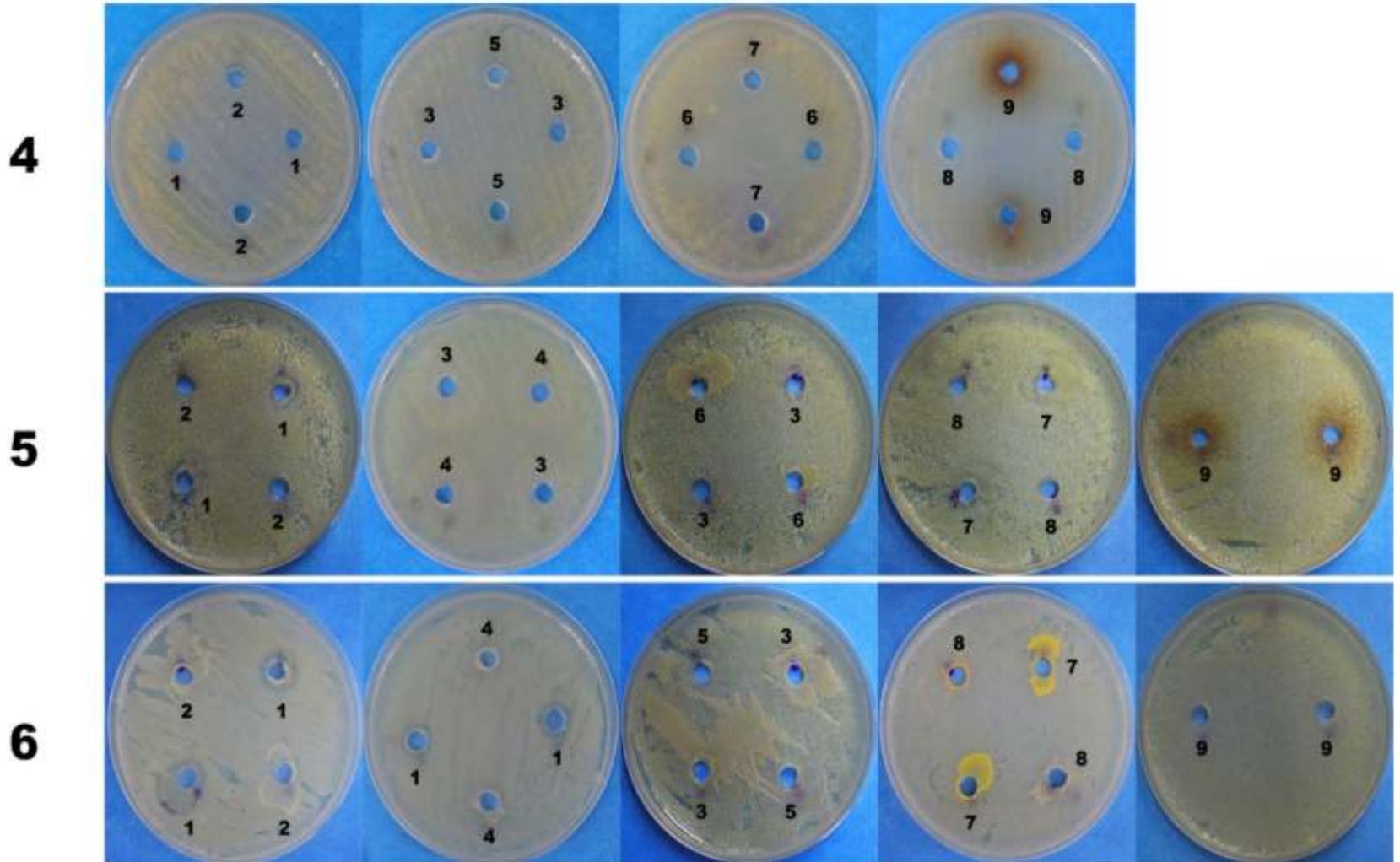


Figura 34. Confrontación de la **bacteria 4** (*B. subtilis* LS6-11G), **bacteria 5** (*B. megaterium* LL9-21) y **bacteria 6** (*Acinetobacter calcoaceticus* MIVA-01) frente al resto de las bacterias seleccionadas. Fuente: Propia.

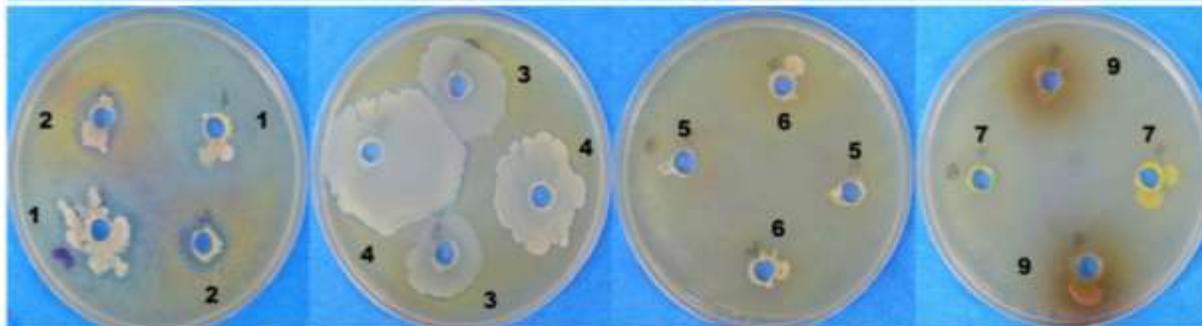
Cepas Masivas

Cepas Sembradas en Pozos

7



8



9

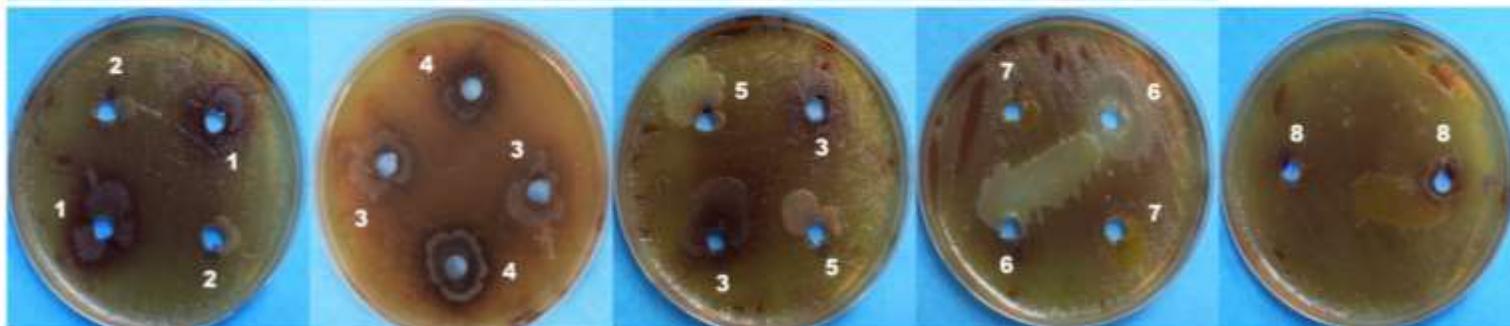


Figura 35. Confrontación de la **bacteria 7** (*B. marisflavi* MIVB-01), **bacteria 8** (*Exiguobacterium aurantiacum* MVIB-02) y **bacteria 9** (*Pseudomonas mendocina* PTL4g) frente al resto de las cepas seleccionadas. Fuente: Propia.

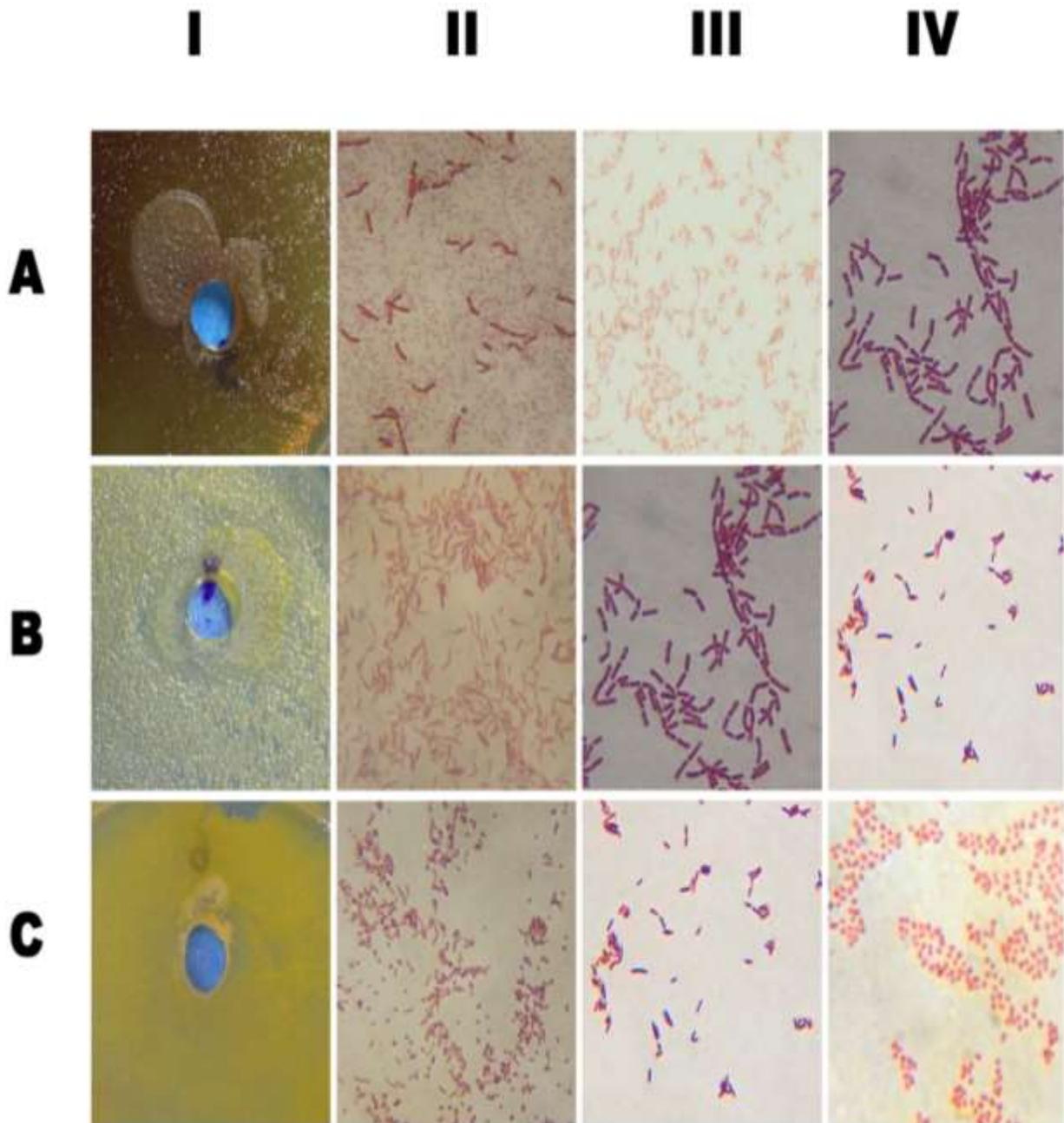


Figura 36. Tinciones de Gram realizadas para evidenciar los comportamientos observados en las pruebas de antagonismo. En la columna I se muestra la foto de los pozos, en la columna II la tinción de Gram realizada alrededor de los pozos, columna III morfología microscópica de las bacterias sembradas en forma masiva y en la columna IV morfología microscópica de las bacterias sembradas en pozos. AI-IV: bacteria 9 sembrada de forma masiva y bacteria 2 sembrada en pozos; BI-IV: bacteria 5 sembrada de forma masiva y bacteria 7 sembrada en pozos; CI-IV: bacteria 7 sembrada de forma masiva y bacteria 6 en pozos, observando en los 3 casos que no hay antagonismo. Fuente: Propia.

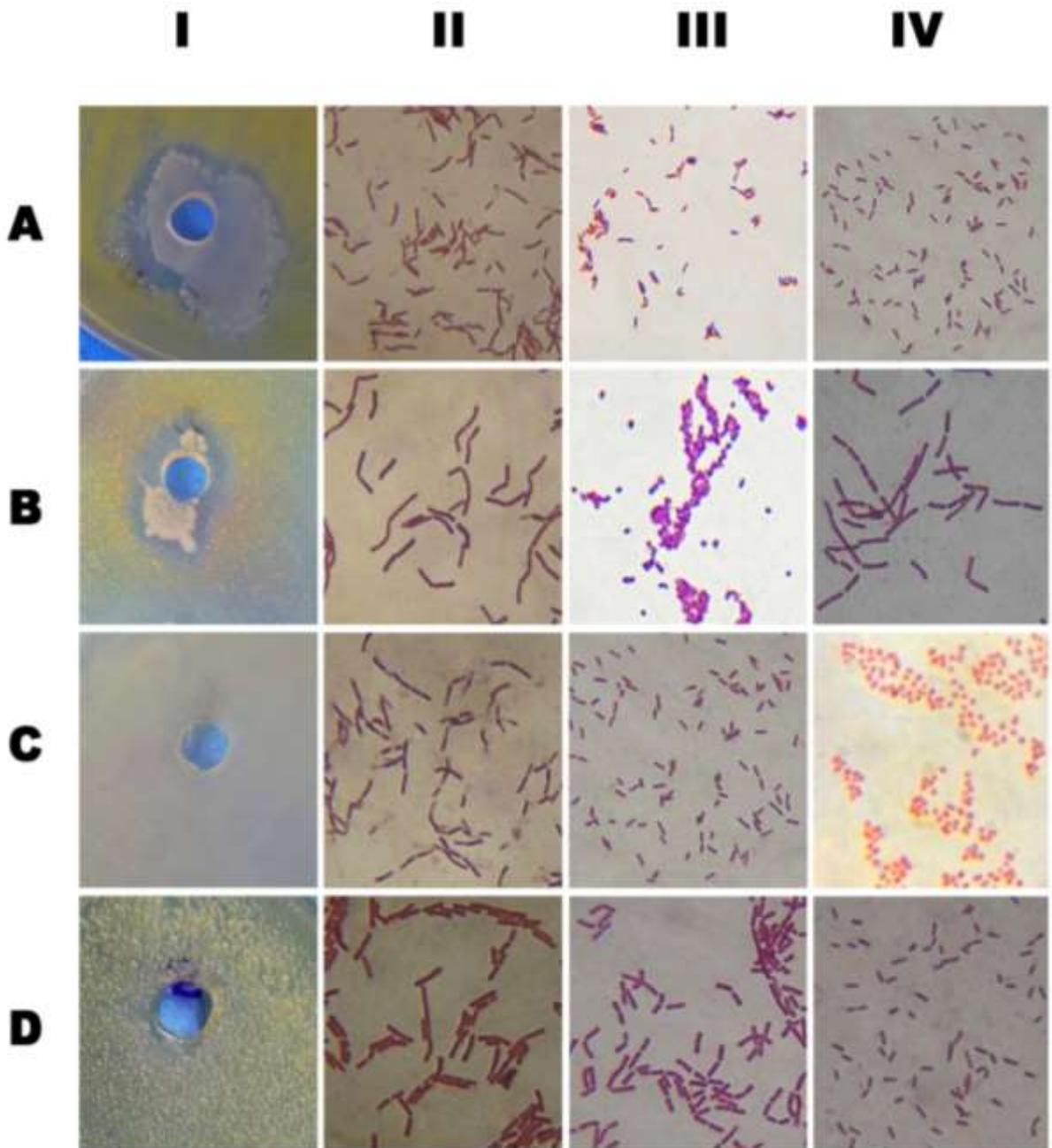


Figura 37. Tinciones de Gram realizadas para evidenciar los comportamientos observados en las pruebas de antagonismo. En la columna I se muestra la foto de los pozos, en la columna II la tinción de Gram realizada alrededor de los pozos, columna III morfología microscópica de las bacterias sembradas en forma masiva y en la columna IV morfología microscópica de las bacterias sembradas en pozos. AI-IV: bacteria 7 sembrada de forma masiva y bacteria 1 sembrada en pozos; BI-IV: bacteria 8 sembrada de forma masiva y bacteria 2 sembrada en pozos; CI-IV: bacteria 1 sembrada de forma masiva y bacteria 6 sembrada en pozos; DI-IV: bacteria 5 sembrada de forma masiva y bacteria 3 sembrada en pozos; observando en los 4 casos antagonismo. Fuente: propia.

Anexo 5. Publicaciones realizadas.

Anexo 5.1 Identificación molecular de microorganismos aislados a partir de Bioinsumos producidos artesanalmente en Nicaragua

Anexo 5.2 Descifrando el contenido microbiano de los bioinsumos artesanales producidos en Nicaragua y su utilidad agrícola