

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencia e Ingeniería

Identificación por fenotipo, cuantificación y técnicas moleculares de bacterias a dos profundidades en el cultivo "*Hypericum*" antes y después del tratamiento de 1-3 Dicloropropeno y Cloropicrina

Fidel Armando Brito Espinoza

Antonio León, Ph.D., Director de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de

Ingeniero en Agroempresas

Quito, mayo 2014

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias e Ingeniería

Identificación por fenotipo, cuantificación y técnicas moleculares de bacterias a dos profundidades en el cultivo "*Hypericum*" antes y después del tratamiento de 1-3 Dicloropropeno y Cloropicrina

Fidel Armando Brito Espinoza

Antonio León, Ph. D.

Director de Tesis

.....

Mario Caviedes C, Ms. Dr.

Coordinador de Agroempresa

.....

Raúl de la Torre, Ph. D.

Miembro de Comité de Tesis

.....

Carlos Ruales, MSc.

Miembro de Comité de Tesis

.....

Ximena Córdova, Ph.D.

Decana de la Escuela de Ingeniería

Colegio de Ciencias e Ingeniería

.....

Quito, mayo de 2014

©Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído la política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley orgánica de Educación Superior.

Firma:.....

Nombre: Fidel Armando Brito Espinoza

C.I.: 0603567124

Fecha: Quito, mayo de 2014

Agradecimientos:

Mi sincero agradecimiento por la gentileza del personal del laboratorio de Agrobiotecnología de la Universidad San Francisco de Quito y de la florícola Latitud Cero, quienes con gran voluntad, prestaron su tiempo y ayuda para la elaboración de este experimento científico. A mis padres por su comprensión, su tiempo y su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida, por creer en mí y por su paciencia durante el tiempo dedicado a este proyecto. Gracias Antonio León por brindarme la motivación personal para emprender este proyecto, y a toda la gente que colaboró con la elaboración de esta investigación, que sin duda, será un gran aporte al sector agrícola en el Ecuador.

Resumen

Las enfermedades de suelo disminuyen la producción en los cultivos y producen pérdidas económicas en los agricultores. Para el control de dichas enfermedades generalmente se utilizan tratamientos biocidas para disminuir las poblaciones de microorganismos presentes. Con el objetivo de aportar al conocimiento del control de las enfermedades del suelo realizamos la identificación molecular de bacterias en suelo agrícola tratado con el agente químico: 1-3 Dicloropropeno al 45% y Cloropicrina al 55%, y comparamos su efecto versus un suelo sin la aplicación del mismo.

Las muestras de suelo fueron recolectadas en la finca productora de flores “Latitud Cero”. Para este estudio se evaluaron las poblaciones de bacterias del suelo en cultivo de *Hypericum* (familia de Hypericaceae) mediante un muestreo aleatorio en zig zag, a dos tipos de profundidades de 0-20 cm y de 20-40 cm. De las recolecciones de muestras de suelo se obtuvieron 16 ejemplares de las cuales 8 correspondían a suelo sin la aplicación de biocidas y las 8 restantes con la aplicación de dicho agente. Posteriormente se aislaron las bacterias provenientes de estos suelos en 4 medios de cultivo, usando la técnica de dilución seriada para posteriormente proceder a su respectiva identificación fenotípica y cuantificación poblacional de bacterias.

La identificación fenotípica de bacterias se realizó en dos etapas, antes de la aplicación del biocida y después, y al mismo tiempo en las dos profundidades. Con la aplicación del biocida las bacterias crecieron en un 99% solo de color blanco dejando a un lado la biodiversidad de fenotipo por colores sin la aplicación del biocida. De las bacterias identificadas, se realizaron cultivos monospóricos de cada una de ellas en medio Luria Broth “LB” y posteriormente se realizó la identificación molecular mediante el análisis de secuencia de ADN del 16S ribosomal. Como resultado, se observó que el agente químico biocida destruyó gran parte de la biodiversidad de bacterias en el suelo estudiado y a su vez disminuyó la población total. Las bacterias identificadas por medio de técnicas moleculares en el tratamiento antes del biocida no fueron previamente descritas en las bases de datos siendo nuevos descubrimientos que un futuro deberán determinarse y clasificarse, mientras que el tratamiento después del biocida fueron: *Bacillus megatherium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus flexus*, *Bacillus bombysepticus* y *Pseudomonas fluorescens*.

Abstract

The research focused on the molecular identification of bacteria present in agricultural soils that were treated with the biocide: 45% 1-3-Dichloropropene- 55%, Chloropicrin and soils without treatment. Soil samples were collected from the rose plantation "Latitude Cero". For this study we evaluated bacterial populations in the "*Hypericum*" crop. Soil samples were collected by simple random "zig zag" sampling, at two different depths (0-20 cm and 20 -40 cm). A total of 16 samples were gathered, 8 of them were biocide treated soils and the other 8 were non treated soils. These samples were isolated in 4 types of media (King Broth, Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar plus Peptone, and Nutrient Agar). We then proceeded to make serial dilutions for phenotypic identification and for bacterial population count. The phenotypic identification of bacteria was performed before and after the application of the biocide and at the two depths mentioned above. From the isolated bacteria, monocultures were performed in Luria Broth "LB" media. Subsequently molecular species identification through DNA sequencing. As a result it was observed that the biocide agent destroyed much of the bacterial biodiversity in the soil studied. The bacteria identified through DNA analysis were *Bacillus anthracis*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus flexus*, *Bacillus bombysepticus* and *Pseudomonas fluorescens*.

INDICE DE CONTENIDO

1. Introducción.....	10
1.1. Objetivo General.....	13
1.2. Objetivos específicos.....	13
1.3. Hipótesis.....	13
2. Materiales y métodos.....	13
2.1. Localización del experimento.	13
2.2. Toma de muestras.....	14
2.3. Aplicación del biocida.....	14
2.4. Aislamiento de bacterias en medios de cultivo.	14
2.5. Medios usados para el estudio.....	15
2.6. Cuantificación de las poblaciones bacterianas en los suelos analizados.....	15
2.7. Purificación y aislamiento de bacterias.....	16
2.8. Medición de ABS.	16
2.9. Cell-PCR, amplificación de ADN mediante PCR y visualización de gel al 2%.....	16
2.10. Secuenciamiento e identificación de bacterias.....	17
2.11. Análisis de las secuencias.	17
3. Resultados.....	18
3.1. Cuantificación de bacterias por fenotipo antes y después de la aplicación de los biocidas.....	18
3.2. Cuantificación de bacterias entre los tratamiento sin y con biocid.....	22
3.3. Resultados del gel de agarosa al 2% con la aplicación de biocida.....	25
3.4. Identificación de bacterias en BLAST.....	25
3.5. Descripción de las bacterias encontradas.....	28
4. CONCLUSIONES GENERALES.....	32
5. DISCUSION.....	30
6. RECOMENDACIONES.....	33
7. Referencias Bibliográficas.	34

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferencias de fenotipo sin la aplicación de biocida y con la aplicación del biocida.....	18
Figura 2. Cuantificación total de bacterias por fenotipo sin la aplicación de biocida a perfiles de suelo 2a) 0 -20 cm y 2b) 20-40 cm.....	19
Figura 3. Cuantificación total de bacterias por fenotipo con la aplicación de biocida a perfiles de suelo (a) 0 -20 cm y (b) 20-40 cm.....	20
Figura 4. Cuantificación total por fenotipo después de la aplicación del biocida a perfiles de suelo (a) 0 -20 cm y (b) 20-40 cm.....	21
Figura 5. Cuantificación de bacterias sin el tratamiento de biocida en un dilución de $10E^3$ (D3) y a una profundidad de 0-20 y 20 – 40 cm.....	22
Figura 6. Cuantificación de bacterias con el tratamiento de biocida en un dilución de $10E^3$ (D3) y a una profundidad de 0-20 y 20 – 40 cm.....	23
Figura 7. Cuantificación de bacterias total con y sin biocida.....	23

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Master Mix - PCR.....	38
Anexo 2. Termociclador, ciclos de la temperatura de annealing.....	38
Anexo 3. Tabla de la medición de ABS.....	39
Anexo 4. Gel de agarosa al 2% sin la aplicación de biocidas.....	40
Anexo 5. Gel de agarosa al 2% con la aplicación de biocidas.....	42
Anexo 6. Cromatograma de mala calidad.....	43
Anexo 6.1. Cromatograma de buena calidad.....	43
Anexo 6.2. Cromatograma de excelente calidad.....	44
Anexo 7. Muestra número 11, sin la aplicación de biocidas.....	45
Anexo 8. Muestra número 5, con aplicación de biocidas.....	46
Anexo 9. Muestra número 7, con la aplicación de biocidas.....	48
Anexo 10. Muestra número 9, con aplicación de biocidas.....	50
Anexo 11. Muestra número 10, con la aplicación de biocidas.....	52
Anexo 12. Muestra número 11, con la aplicación de biocidas.....	54

1. Introducción.

La floricultura es una importante actividad económica agrícola del Ecuador, la misma que desde hace 20 años ha presentado un constante crecimiento y actualmente se destaca como un de las principales fuentes de empleo en el país y, además, representa un considerable ingreso de divisas provenientes de la exportación gracias a las condiciones climatológicas propicias que se dan en la sierra ecuatoriana. En nuestro país se produce casi todos los tipos de ornamentales que se comercializan a nivel mundial.

El Ecuador es uno de los mejores productores en el cultivo de *Hypericum*, que gracias a sus características especiales y sus diferentes variedades y colores que permiten un amplio mercado de exportación. Esta especie de arbusto tiene una duración de más o menos 30 días en florero, suele tener tallos de hasta 2 metros de largo, pero para su comercialización se corta máximo a los 90 cm de alto. Cabe mencionar que en el país existen alrededor de 3.480 hectáreas (ha) de flores de las cuales 76 ha están cultivadas de *Hypericum*. [1,2]

Entre las causas más frecuentes de las pérdidas económicas en el sector floricultor, se encuentran las enfermedades de origen bacteriano y fúngico del suelo. En un intento por dar solución, los agricultores (sin tener un adecuado conocimiento de los microorganismos nocivos o benéficos existentes), han usado pesticidas y biocidas, los cuales producen desbalances en el suelo y otras consecuencias dentro de la biodiversidad natural de los cultivos.

Las bacterias, son organismos unicelulares menos evolucionados que existen en el planeta desde hace al menos 3.800 a 4.000 millones de años y se estima que existe una población de $10E^8$ a $10E^{10}$ por gramo de suelo. Son muy numerosas dentro de la biomasa, representando un 10% de esta, con 300 a 3.000 kg por hectárea dependiendo del ambiente [3, 4]. Poseen un tamaño entre 0.4 y 5 micrómetros (μm). Los métodos para clasificarlas se basan en técnicas a base de ADN y además se las denomina de acuerdo a su morfología, por ejemplo: *Cocos* (forma esférica), *Bacilos* (forma de bastón), *Espirilos* (forma espiral), entre otros[5]. Entre las enfermedades bacterianas más importantes y comunes de los cultivos se encuentran los siguientes: *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*,

y *Pseudomonas* sp. Estas enfermedades constituyen una pérdida económica del 30 al 40% en los cultivos afectados siendo un limitante para el agricultor [6].

La posibilidad de evaluar la “salud” de un suelo a través de su riqueza y variedad de microorganismos es factible, pero se puede constatar que las técnicas moleculares en Ecuador están en pleno desarrollo y todavía no es posible obtener resultados cuantitativos y cualitativos [7]. Una de las técnicas más utilizadas para el análisis de suelo, es la observación directa de las estructuras y el color de las bacterias cultivadas en los medios *in vitro*. La metodología de medición más aceptada en el recuento de poblaciones bacterianas que se lleva a cabo por medio de diluciones seriadas en la “cuantificación de cajas petri”, ya que arroja el total de células vivas y cultivables en el medio selectivo [8].

Actualmente, existen pocos institutos que se dedican a la identificación de microorganismos. Uno de ellos es el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP), el cual emplea técnicas morfológicas para la identificación de bacterias en la parte aérea y de suelo [9]. Hasta el momento, la manera más exitosa de estudiar la diversidad microbiana ha sido la clonación de los fragmentos amplificados del 16s rDNA para luego determinar las especies presentes en una comunidad microbiana. El marcador molecular 16s rDNA se encuentra en todos los procariotas, su transferencia es vertical, es decir, el gen solo se transfiere entre la misma especie, se puede hacer una identificación rápida a partir de una base de datos pública que contiene un amplio número de secuencias bacterianas [10, 11].

Los biocidas que se aplican en la floricultura pueden ser químicos, sintéticos o de origen natural como microorganismos que pueden destruir, contrarrestar, neutralizar o impedir la acción de control de cualquier otro organismo considerado dañino. Un producto utilizado comúnmente para eliminar las enfermedades de suelo es el bromuro de metilo (CH_3Br). Éste es un gas biocida que elimina insectos, nematodos, ácaros, roedores y también se utilizaba para desinfectar suelos y semillas. En el Protocolo de Montreal en el año de 1992 se prohibió la utilización del bromuro de metilo, ya que se usaba comúnmente en el sector florícola y agrícola del Ecuador, a pesar de ser un agente químico muy tóxico para los

humanos y el medio ambiente. Ahora el gobierno ecuatoriano con el apoyo de la "Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial" (ONUUDI) decretó erradicar el uso del bromuro de metilo en el 2014. Existen alternativas químicas frente al bromuro de metilo con menor toxicidad como son el 1-3 Dicloropropeno y la Cloropicrina.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se planificó esta investigación que se enfoca en el conteo, caracterización fenotípica y estudio molecular de las bacterias, antes y después de la aplicación del agente químico 1-3 Dicloropropeno 45% y Cloropicrina al 55%. Finalmente, de esta investigación científica se obtendrá información valiosa sobre los microorganismos presentes en los suelos agrícolas. Con estos datos, el agricultor podrá tomar las medidas necesarias, antes y después de todo proceso productivo de acuerdo al cultivo. Es importante señalar que este tipo de análisis, no se ha registrado en ningún laboratorio en el Ecuador, por lo que este trabajo es una investigación de carácter innovador y de suma importancia para el futuro de las siguientes investigaciones de este tipo.

1.1. Objetivo General

Identificar y contabilizar las bacterias en el suelo antes y después de la aplicación del biocida a dos profundidades del perfil de suelo

1.2. Objetivos específicos

- Clasificar las bacterias de acuerdo al fenotipo antes y después de la aplicación del biocida
- Contar la población de las bacterias en términos de "Unidades Formadoras de Colonias" (UFC/g) antes y después de la aplicación del biocida.
- Determinar si existe un cambio en la población bacteriana a dos profundidades (0 – 20 cm y 20 – 40 cm) después de la aplicación del biocida.
- Identificar las bacterias con técnicas moleculares que se encontraron en los medios selectivos usando la técnica del secuenciación del 16s rDNA.

1.3. Hipótesis

Existirá cambios en las poblaciones y biodiversidad bacteriana antes y después de la aplicación del gas biocida.

3. Materiales y métodos

3.1. Localización del experimento.

El experimento se realizó en el laboratorio de Agrobiotecnología de la Universidad San Francisco de Quito. Las muestras de suelo fueron tomadas de la florícola "Latitud Cero" en la parroquia de Guayllabamba ubicado a 25 km de la ciudad de Quito – Pichincha, que tiene un clima templado – semi-tropical. Con una altitud de 1.890 m.s.n.m. y se ubica en una latitud: -0.06 S y Longitud: -78.35 W. El experimento se realizó el segundo semestre del año 2012.

3.2. Toma de muestras

En un terreno de 4000 m² se obtuvieron 16 muestras de suelo. Las primeras 8 se recolectaron previa aplicación de biocidas y las 8 restantes posterior a la aplicación de los agentes químicos. Cada muestra se compone de 20 sub – unidades, éstas fueron tomadas en forma aleatoria en zig – zag. De las 8 primeras muestras sin biocidas, 4 se tomaron a una profundidad de 0 – 20 cm y 4 a una profundidad de 20 – 40 cm. Con la misma metodología se recolectaron las 8 restantes posterior a la aplicación de biocida [12].

3.3. Aplicación del biocida

Se utilizaron los siguientes agentes químicos: El 1-3 Dicloropropeno al 45% y la Cloropicrina al 55% en una dosis de 55kg/ha. Esta formula se aplicó sobre el suelo desnudo en presiembra mediante inyección mecánica a una profundidad de 40 cm en toda la parcela. Posteriormente se tapó con láminas de polietileno por 15 días, para evitar la volatilidad del agente químico, luego se quitaron las láminas y se dejó descansar el terreno por 15 días más. Todas las muestras fueron empacadas en fundas transparentes de polietileno y posteriormente transportadas en cajas térmicas al laboratorio e inmediatamente refrigeradas para conservar los organismos.

3.4. Aislamiento de bacterias en medios de cultivo.

De cada muestra se apartaron 10 gramos para mezclarlos con 90 ml de agua destilada estéril durante un minuto. De esta mezcla se recolectó 1 ml y se colocó en un tubo Falcon, el cual contenía 9 ml de agua destilada estéril. Esta dilución fue la 10E⁻¹. De la dilución 10E⁻¹ se tomó 1 ml y se puso en un tubo falcon con otros 9 ml de agua destilada pura. La nueva dilución fue la 10E⁻². Este proceso se repitió de manera consecutiva hasta llegar a la dilución 10E⁻¹¹. De las siguientes diluciones se tomó 100 microlitro (ul) que fueron colocados en los medios de cultivo: 10E⁻³, 10E⁻⁵, 10E⁻⁷, 10E⁻⁹, 10E⁻¹¹.

3.5. Medios usados para el estudio

- Medio, King Broth (siglas en ingles "KB"), [13]: medio selectivo para *Pseudomonas*, que tiene la composición de: peptona 20.0 g/L, glicerol 15.0 ml/L y agar 15.0 g/L.
- Medio, Potato Dextrosa Agar (siglas en ingles "PDA"), [14]: medio común para el cultivo microbiológico. Se prepara a partir de infusión de papa y dextrosa con los siguientes componentes: extracto de papa 4.0 g, glucosa 20.0 g, agar 15.0 g, todo esto en agua destilada en 1000 ml.
- Medio, Potato Dextrosa Peptone Agar (siglas en ingles "PDPA"), [15,16]: contiene los mismos ingredientes del medio PDA el cual fue modificado añadiendo peptona (fuente de nitrógeno en el medio orgánico para el cultivo de bacterias) y un inductor de crecimiento que permite ingresar más C y N, usualmente necesarios para un organismo. Este medio contiene los siguientes componentes: extracto de papa 4.0 g/L, glucosa 20.0 g/L, agar 15.0 g/L y peptona 10.0 g/L.
- Medio, Agar Nutrient (siglas en ingles "AN"), [17,18]: contiene los elementos pluripeptona 5.0 g/L, extracto de carne 3.0 g/L, cloruro de sodio 8.0 g/L, agar 15.0 g/L.

Todo este proceso se llevó acabo en un ambiente estéril y controlado utilizando la cámara de flujo laminar en todos los procedimientos.

3.6. Cuantificación de las poblaciones bacterianas en los suelos analizados.

Cada colonia es llamada "Unidad Formadora de Colonia" (UFC). Se consideró un número limitado de colonias ya que éstas podían sobre poblarse, lo que dificultaría el conteo. El rango sugerido de acuerdo a la "Food and Drug Administration" (siglas en ingles FDA), es de 25-250 colonias por dilución en cada medio selectivo. Este método es preferible porque arroja el total de células vivas [19]. Transcurridas 48 horas desde el momento del cultivo, se procedió a contar y a tipificar cada célula viva en los medios seleccionados.

3.7. Purificación y aislamiento de bacterias.

De cada colonia deseada (de crecimiento no contaminado y exclusivo), y por método de raspado, se procedió a aislar los microorganismos, situándolos en el medio líquido de crecimiento selectivo de bacterias Luria Broth (siglas en ingles, "LB"). Sus ingredientes son: 10 g/L de bacto – tryptone, 5 g/L de yeast extract y 10 g/L de NaCl. Posteriormente se auto-clavó por 30 min [20]. La mezcla se transportó en frascos Erlenmeyer de 60ml a una incubadora de agitación a 28°C por 48 horas para la proliferación de la bacteria selectiva.

3.8. Medición de ABS.

Para la medición de *Absorbancia* (ABS) se tomaron las muestras cultivadas procedentes del medio LB. El rango de ABS es de 100 – 700 nanómetros (nm). Posteriormente se midieron las muestras en un espectrofotómetro. Para que la muestra esté dentro del nivel deseado de absorbancia se realizaron varias diluciones. De la segunda dilución con absorbancia dentro de los rangos, se recolectaron 4ul y se colocaron directamente en el mix de PCR (técnica Cell-PCR).

3.9. Cell-PCR, amplificación de ADN mediante PCR y visualización de gel al 2%.

En este estudio se utilizó la metodología de Cell-PCR, que no requiere extracción de ADN previa para la amplificación del fragmento deseado. Aquí el cultivo bacteriano fue utilizado directamente en la reacción de la "Polimerase Chain Reaction" (siglas en ingles, "PCR") para la amplificación. Se utilizaron los *primers* universales de la región 16s rDNA para bacterias, reportados por White et al (1990) en la identificación de microorganismos a nivel de especie. Los primers 16s rDNA tienen como resultado la amplificación de fragmento de 1500 "Pares de Bases" (pb). Para una mejor amplificación, se controló la concentración de *Taq* polimerasa, magnesio y la temperatura de *annealing* en el termociclador (Anexo 1 y 2). A continuación, se visualizó el producto amplificado en geles de agarosa al 2%, el cual permitió determinar si no hubo contaminación de las muestras amplificadas y si el tamaño del *amplicon* fue el esperado. Posteriormente se realizó la cuantificación de los mismos

usando el "NanoDrop". Éste es un espectrofotómetro de elevada precisión que mide la concentración de pequeñas cantidades de las muestras obtenidas del PCR (Anexo 5).

3.10. Secuenciamiento e identificación de bacterias.

Se purificó el producto amplificado mediante el kit de *Purelink de Invitrogen*, obteniendo 50 ng de muestra pura. Se obtuvo con éxito un total de 14 muestras, 6 sin la aplicación de biocidas y las 8 restantes con la aplicación de biocidas. Todas estas muestras se enviaron a secuenciar en "MACROGEN", empresa localizada en Corea. La secuenciación se realizó mediante la técnica Sanger et al (1977).

3.11. Análisis de las secuencias.

Con las secuencias obtenidas de la compañía MACROGEN, se ensamblaron y analizaron los cromatogramas que registraron los picos uniformes de fluorescencia. Basándose en la cantidad de ADN, calidad del ADN y posible contaminación de la muestra, los cromatogramas fueron calificados como de mala, buena y excelente calidad. Con esta información, se procedió a identificar los resultados en Gen Bank. Esta base de datos contiene millones de secuencias genéticas del gen 16s rDNA. Estos datos se encuentran disponibles en la página web del "National Center for Biotechnology Information" (siglas en inglés, "NCBI"), y adicionalmente posee una herramienta bioinformática para el análisis de las secuencias de ADN, ARN y proteínas llamada "Basic Local Alignment Search Tool" (siglas en inglés, "BLAST"). Las secuencias obtenidas fueron ingresadas en este software para identificar el microorganismo aislado. Esta herramienta, de acceso libre, nos proporcionó información del género y especie.

4. Resultados

4.1. Cuantificación de bacterias por fenotipo antes y después de la aplicación de los biocidas.

En el cuantificación por fenotipo se distinguieron cambios en las poblaciones bacterianas en los 4 medios y se pudieron observar colonias de diferentes colores como: rojas, blancas y naranjas. El tratamiento con biocidas cambió la población bacteriana en su mayoría a bacterias con fenotipo de color blanco. En el cuantificación total por fenotipo, existe un cambio drástico de biodiversidad antes y después de la aplicación del biocida.

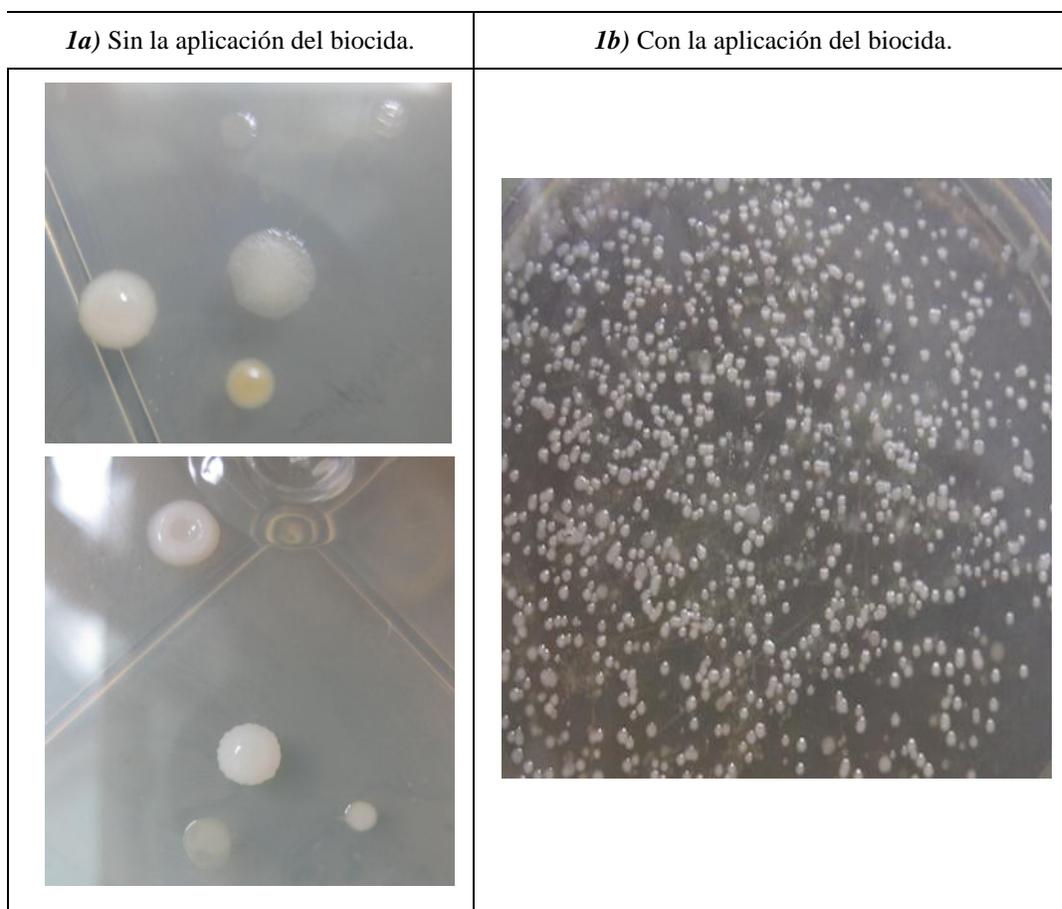


Figura 1. Diferencias de fenotipo entre suelos con y sin la aplicación de biocida.

La Figura 1a, muestra la biodiversidad que existe en el suelo con las distintas formas y colores de bacterias, a diferencia de la Figura 1b en la que se observa el crecimiento de un solo fenotipo bacteriano de color blanco.

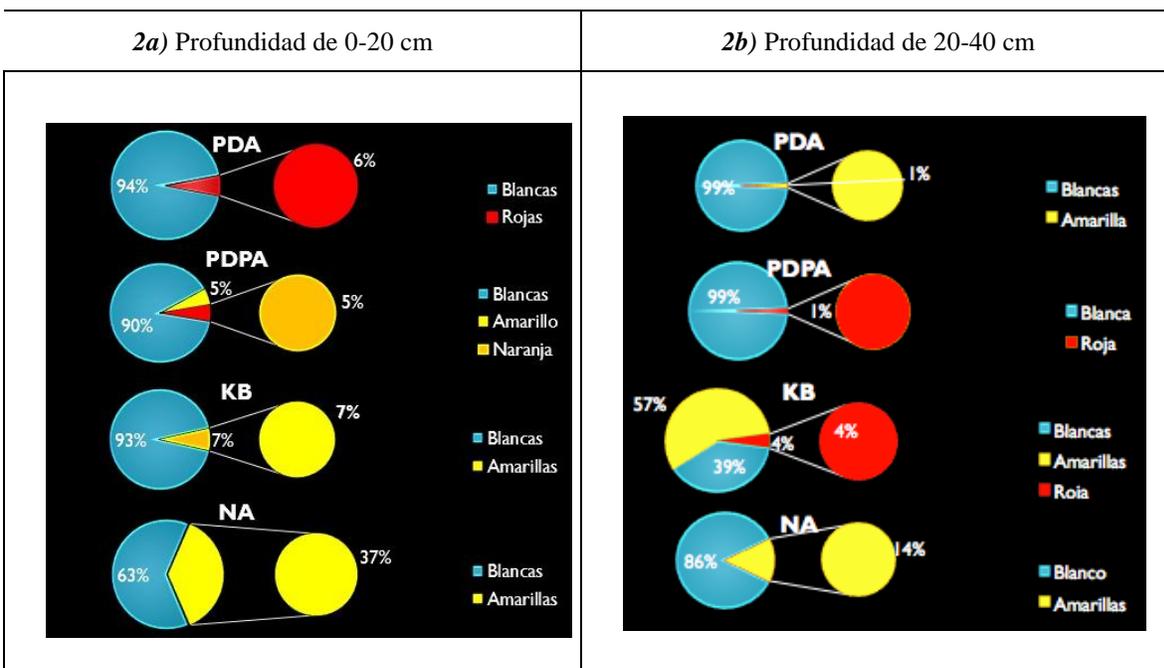


Figura 2. Cuantificación total de bacterias por fenotipo sin la aplicación de biocida a perfiles de suelo 2a) 0-20 cm y 2b) 20-40 cm.

En la figura 2, muestran los resultados de los fenotipos encontrados en los diferentes medios de cultivo. Aquí, se recolectó de la muestra de suelo de 0 – 20 cm de profundidad (Fig. 2a). Se realizó el conteo, entre los medios PDA, PDPA, KB y NA. Todos los medios tienen un crecimiento del 60% al 90% de bacterias de color blanca, las cuales son dominantes. También destacan las bacterias de color amarillo con crecimiento del 37% en medio NA y un 7% en medio KB. En un bajo porcentaje de cuantificación por fenotipo las bacterias del medio PDPA tienen un 5% de color naranja y 5% de color amarillo y el color blanca dominante con un 93% y por último, el medio PDA tiene un 6% de bacterias de color rojo no significativo a diferencia del color blanco dominante con el 94%.

En la figura 2b, se muestra la recolección de tierra de 20 – 40 cm de profundidad en los medios PDA, PDPA, KB y NA. El crecimiento de bacterias blancas es dominante, excepto en el medio NA. El porcentaje de crecimiento de la bacteria de color blanco va desde un

39% hasta un 99%, mostrando un resultado importante para el presente estudio. En el medio KB medio selectivo, se produjo un crecimiento de bacterias amarillas del 57% siendo el único medio a mayor profundidad en el predomina la bacteria de color.

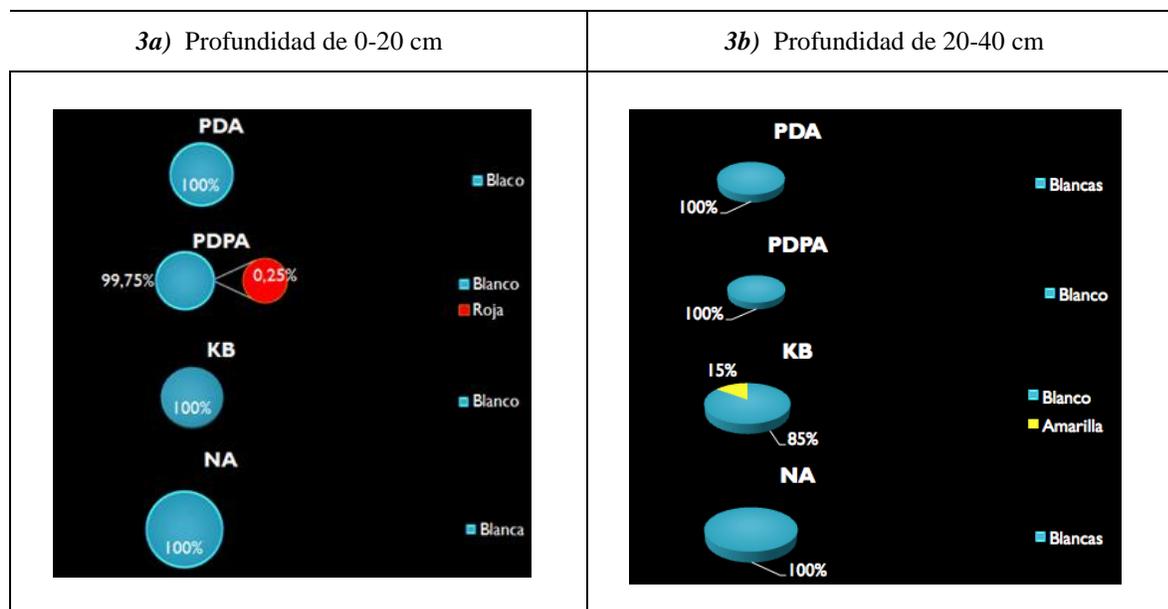


Figura 3. Cuantificación total de bacterias por fenotipo con la aplicación de biocida a perfiles de suelo (a) 0 -20 cm y (b) 20-40 cm.

La figura 3a, corresponde a la recolección de tierra de 0-20 cm de profundidad con la aplicación de biocida. A diferencia de la Figura 1a, descrito anteriormente, en este gráfico se evidencia un alto porcentaje de crecimiento de bacterias de color blanco (99.99% aproximadamente) en todos los medios. Existiendo un pequeño crecimiento del 0.24% de la bacteria de color roja en el medio PDPA.

En la figura 3b, se muestra la recolección de tierra de 20 - 40 cm de profundidad con la aplicación de biocida, donde se observa el crecimiento de un sólo fenotipo de bacterias de color blanca correspondiendo al 100% en los 3 medios (PDA, PDPA, NA). Teniendo como relevancia el medio KB que tuvo un crecimiento fenotipo de color amarillo del 15%, predominando el fenotipo de color blanco con el 85%.

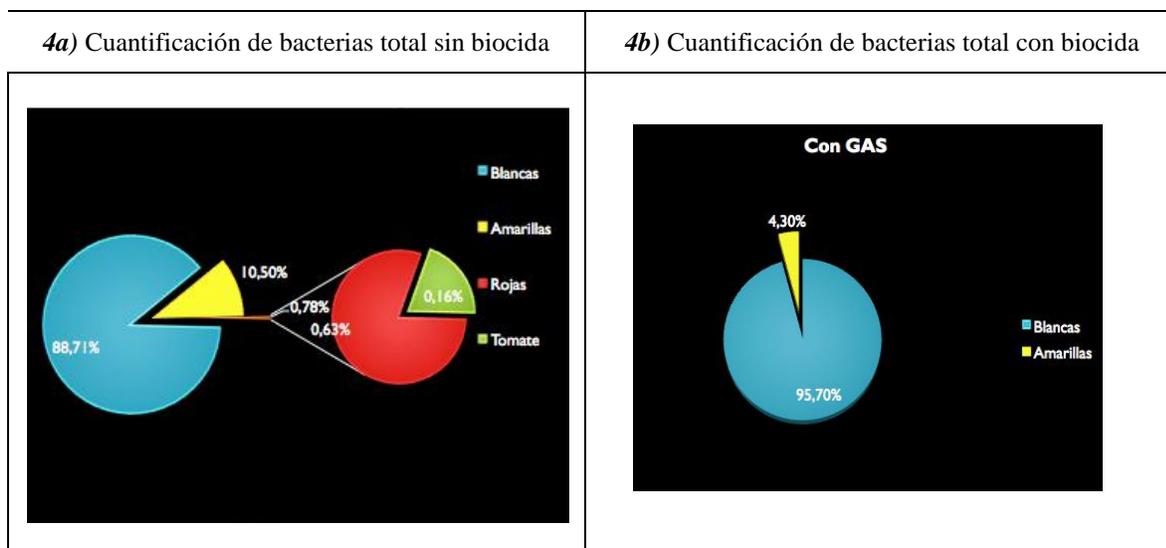


Figura 4. Cuantificación total por fenotipo antes y después de la aplicación del biocida a perfiles de suelo 4a) 0 -20 cm y 4b) 20-40 cm.

En la figura 4a, se presenta en la cuantificación total por fenotipos sin la aplicación de biocida en los cuatro medios de cultivos. Se obtuvo un crecimiento del 88.71% de las bacterias de color blanco y un 10.50% de color amarillo, siendo estos dos tipos de bacterias las predominantes en la cuantificación total de los 4 medios que se utilizó en esta investigación. Mientras que se obtuvo un porcentaje de 0.78% en dos tipos de fenotipos, uno fue de color rojo que tiene un 0.63% y el fenotipo de color tomate con un 0.16%. Por otro lado la figura 4b, presenta en la cuantificación total por fenotipos con la aplicación de biocida en los cuatro medios de cultivos, obteniéndose principalmente un crecimiento del 95.70% del fenotípico de color blanco y un 4.30% correspondiente a bacterias de color amarillas, las cuales no son abundantes.

4.2. Cuantificación de bacterias entre los tratamiento sin y con biocida

Para el análisis de la cuantificación de bacterias por UFC (Unidad Formadora de Colonia), se evaluó el número de las colonias que crecieron en los medios estudiados anteriormente. Aquí se contabilizó el número de colonias encontradas sin y con la aplicación de biocida en los perfiles 0-20 y 20-40 cm de profundidad respectivamente. Estos resultados se muestra en las (figuras 5, 6 y 7)

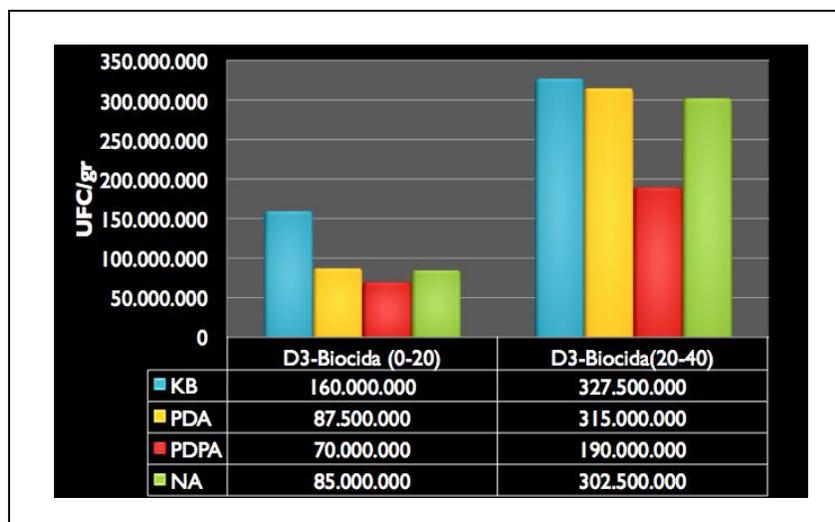


Figura 5. Cuantificación de bacterias sin el tratamiento de biocida en un dilución de $10E^3$ (D3) y a una profundidad de 0-20 y 20 – 40 cm

La Figura 5 presenta cuantificación de bacterias sin la aplicación del biocida en las dos profundidades, dando como resultado una clara variabilidad de crecimiento en la "Dilución 3" (D3) sin la aplicación de biocida a una profundidad de 0-20 cm, obteniendo un total 160 millones UFC por gramo de suelo, a comparación de la muestra a profundidad de 20-40 cm que muestra un crecimiento bacteriano de 327.5500 millones de UFC.

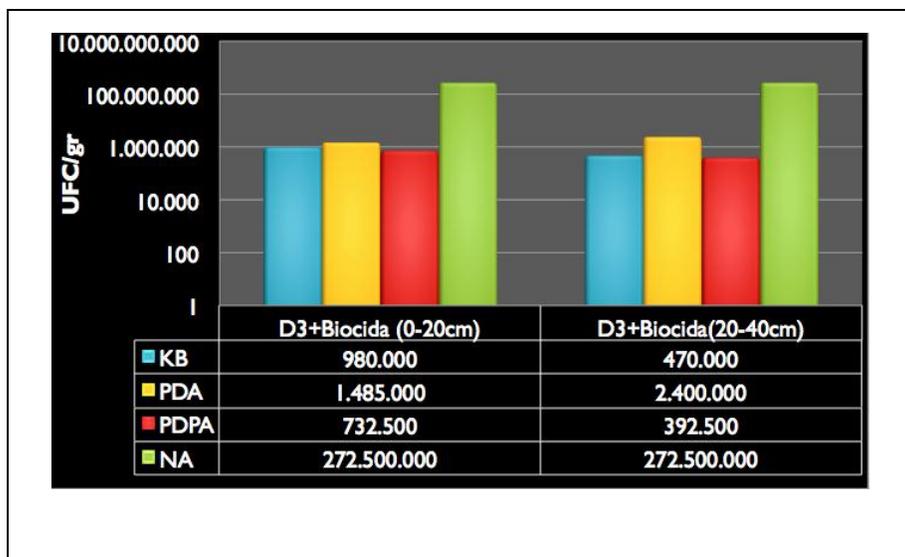


Figura 6. Cuantificación de bacterias con el tratamiento de biocida en un dilución de $10E^3$ (D3) y a una profundidad de 0-20 y 20 – 40 cm.

En la Figura 6, se puede observar que el crecimiento de acuerdo a la variación de profundidad de D3 + Biocida (0 – 20 cm) y D3 + Biocida (20 – 40 cm) es similar en el medio NA con el número de bacterias a diferencia del resto de medios en los que varía el crecimiento.

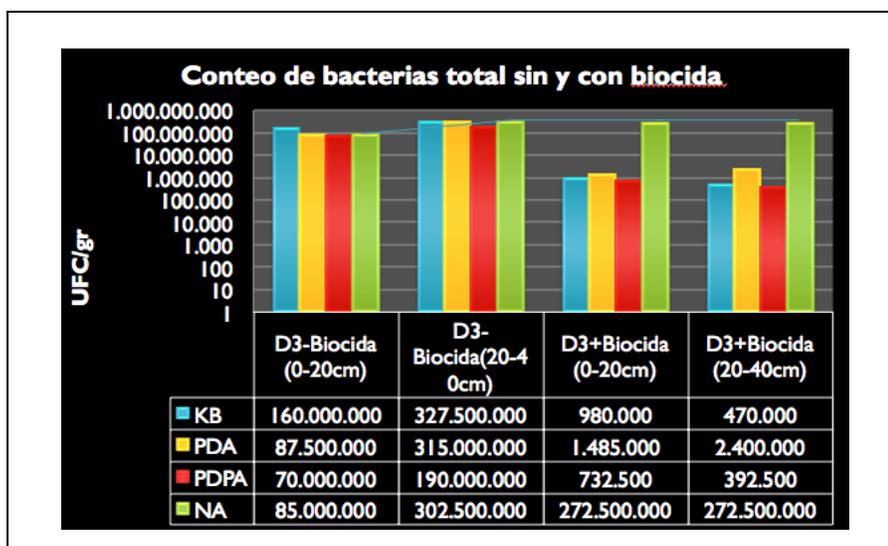


Figura 7. Cuantificación de bacterias total con y sin el tratamiento de biocida.¹

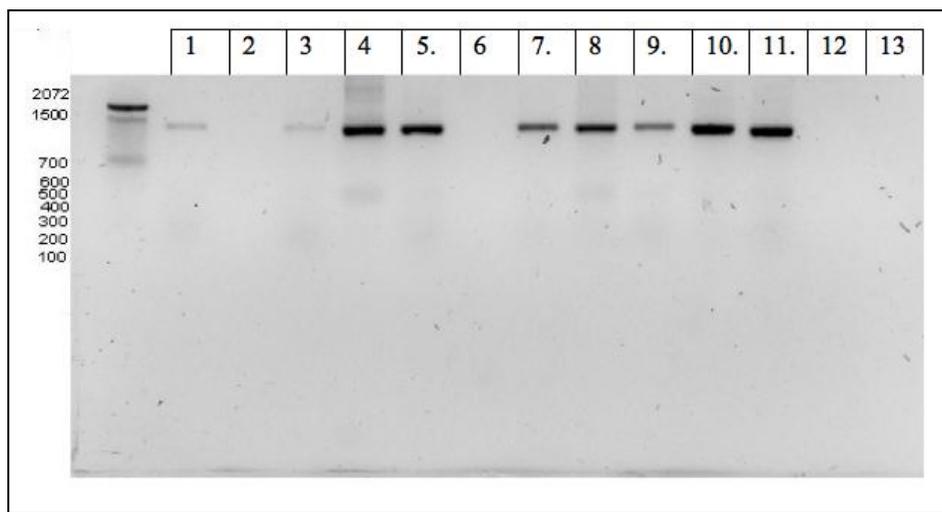
¹ Se describe como: D3 – Biocida (0-20 cm) profundidad uno y D3 – Biocida (20-40 cm) profundidad dos es decir: D3 es; dilución $10E^3$ y el signo (-) significa sin la aplicación del biocida. Y como: D3 + Biocida (0-20 cm) profundidad uno y D3 + Biocida (20-40 cm) a profundidad dos, es decir: D3; dilución $10E^3$ y el signo (+) significa con la aplicación del biocida.

Se puede observar que existe una notable diferencia en el número de colonias antes y después de la aplicación del biocida en la Figura 7. Sin la aplicación del agente químico hay una clara superioridad de crecimiento de bacterias. En la dilución, D3 - Biocida (0-20 cm) en el medio KB existe un crecimiento de 160 millones de bacterias y con la aplicación del biocida hay un decrecimiento en la población de 980 mil bacterias en la dilución D3 + Biocida (0 – 20 cm). Este mismo efecto se obtiene en los medios PDA y PDPA, observándose un decrecimiento de millones de bacterias sin la aplicación de biocida a miles de bacterias con la aplicación del biocida. El medio NA en la dilución, D3 – Biocida (0 – 20 cm) tiene menos población de bacterias a diferencia con la dilución, D3 + Biocida (0 – 20 cm) que tiene un aumento poblacional. Mientras que en las diluciones, D3 – Biocida (0 – 20 cm) y D3 + Biocida (0 – 20 cm) existe un efecto contrario que tiene menos población con la aplicación del biocida. En general el medio NA representa un crecimiento poblacional estable, ya que no repercute mucho la aplicación del biocida, una de las causas de esto puede ser un enriquecimiento de elementos químicos nutricionales mayor al resto de medios.

4.3. Resultados del gel de agarosa al 2% con la aplicación de biocida

Los resultados del gel de agarosa al 2% con la aplicación de biocida se observa en la Figura 8. Se amplificaron 11 muestras, en las columna 2 y 6 no hubo productos de amplificación mientras que en el resto se obtuvo el patrón de amplificación esperado. La banda de la columna 5 corresponde a *Bacillus megaterium*, la columna 7 a *Bacillus cereus*, la columna 9 a *Bacillus flexus*, la columna 10 a *Bacillus bombysepticus* y por ultimo la columna 11 corresponde a *Pseudomonas fluorescens*, todos estas muestras presentaron un buen rendimiento y con peso molecular de 1500 bp. (Anexos 4, 4.1, 5 y 5.1).

Figura 8. Visualización de los productos amplificados por medio de la PCR.



Gel de agarosa al 2% con la aplicación de biocida.

Fuente: Laboratorio de Agrobiotecnología USFQ. Elaborado por; Fidel Brito E.

4.4. Identificación de bacterias en BLAST

En el Cuadro 1, se identificó el resultado de la secuenciación realizado a partir de los productos de amplificación. Las primeras son secuenciaciones sin la aplicación del agente químico, las muestras 8 y 11 fueron de buena calidad, pero en ambos casos no se encontró similitud con bacterias encontradas en la base de datos BLAST. En la muestra ocho y once no se logró identificar en la base de datos BLAST, a pesar de que la cromatografía fue excelente. En el resto de muestras la calidad no fue buena, ya que presentaba ruido excesivo al momento de realizar la cromatografía, por lo tanto se descartaron (Anexos 7 y 8).

Tabla 1. Características de las bacterias obtenida en BLAST sin la aplicación del biocida.

Número de secuencia	Dirección	Calidad	Identificación	Similitud	Probabilidad	Descripción
7	Adelante	Mala	-----	-----	-----	-----
	Reverso	Mala				
8	Adelante	Bueno	Desconocida	Desconocida	Desconocida	Desconocida
	Reverso	Bueno				
11	Adelante	Excelente	Desconocida	Desconocida		
	Reverso	Bueno				
21	Adelante	Mala	-----	-----	-----	-----
	Reverso	Mala				
25	Adelante	Mala	-----	-----	-----	-----
	Reverso	Mala				
27	Adelante	Mala	-----	-----	-----	-----
	Reverso	Mala				

Fuente: Herramienta BLAST. Elaborado por; Fidel Brito E.

Tabla 1.2. Características de las bacterias obtenida en BLAST con el biocida.

Número de secuencia	Dirección	Calidad	Identificación	Similaridad	Probabilidad	Descripción
1	Adelante	Mala	-----	-----	-----	-----
	Reverso	Mala				
3	Adelante	Mala				
	Reverso	Mala				
5	Adelante	Excelente	<i>Bacillus megatherium</i>	100%	0.0	Gram-positivas, producción de proteína recombinante, control biológico de enfermedades, industrialización se usa para producir la penicilina sintética también para la producción de la vitamina B12 entre otras.
	Reverso	Excelente				
7	Adelante	Excelente	<i>Bacillus cereus</i>	100%	0.0	Gram positivo, esporulado, aerobio o anaerobio facultativo, móvil. Produce un grado de tóxico para el organismo humano
	Reverso	Bueno			1E-154	
8	Adelante	Mala	-----	-----	-----	-----
	Reverso	Mala				
9	Adelante	Bueno	<i>Bacillus flexus</i>	100%	3E-99	Bacteria que degrada la microcistina (toxina producida por la cianobacterias tóxicas en aguas superficiales) y podría contribuir a la autopurificación de ecosistema.
	Reverso	Bueno		99%	3E-89	
10	Adelante	Excelente	<i>Bacillus bombysepticus str.</i>	100%	0.0	Gram-positiva, produce esporas y cristales infecta a gusanos de seda y las mata.
	Reverso	Excelente				
11	Adelante	Bueno	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100%	6E-127	Gram-negativo, alta capacidad de solubilización de fósforo, produce sustancias estimuladoras de crecimiento en las plantas como auxinas, giberlinas y citoquininas, sobretodo a temprana edad.
	Reverso	Bueno		100%	6E-137	

Fuente: Herramienta BLAST. Elaborado por; Fidel Brito E.

En las secuenciaciones con la aplicación del biocida se identificaron cinco diferentes tipos de bacterias. En la muestra 5, se identificó *Bacillus megaterium* con un 100% de similaridad, presentando una excelente calidad en el análisis cromatográfico. En la muestra 7 se logró obtener la bacteria *Bacillus cereus* con un 100% de similaridad. En el análisis de cromatografía la dirección fue buena. En la muestra 9 se identificó a *Bacillus flexus* con una similaridad del 100% con un buen análisis cromatográfico. En la muestra Número10 se identificó al *Bacillus bombysepticus* con una cromatografía excelente obteniendo un 100% de similaridad. En la última secuenciación (muestra 11) la bacteria identificada fue *Pseudomonas fluorescens* con una calidad buena a nivel cromatográfico en sus dos direcciones y un 100% de similaridad (Anexos 9, 10, 11, 12 y 13).

4.5. Descripción de las bacterias encontradas

En general, los *Bacillus* spp son bacterias en forma de bastón y gram positivas. Son aerobios anaerobios resistentes a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos. Viven en el suelo, agua del mar y ríos, y además son móviles [21]. Como dato importante y filogenéticamente, *Bacillus megaterium* está fuertemente vinculado con *Bacillus flexus*, este último se diferencia de *Bacillus megaterium* hace un siglo, pero sólo recientemente confirmado como una especie diferente. *Bacillus megaterium* tiene algunas similitudes fenotípicas con *Bacillus anthracis* y *Bacillus cereus* [22].

El *Bacillus megaterium*, según los estudios de Vos et al. (2009), es considerada como un agente potencial para el control biológico de enfermedades de las plantas. Ciertas cepas de *B. megaterium* se han demostrado que fijan nitrógeno. Dentro de la industria farmacéutica tiene una gran importancia, según los estudios que realizó Vary et al. (2007), ya que expone la producción de penicilina amidasa, enzimas empleadas durante la generación de penicilina semisintética. Esta enzima también es utilizada en la panificación ya que ayuda en el proceso de la fermentación. En la medicina se lo utiliza en la producción de piruvato (precursor activo de vitamina B12).

Bacillus cereus es una bacteria que causa intoxicación alimentaria en humanos y produce dolores abdominales, diarrea y vómito. En los estudios científicos de Lereclus et al. (1996), se describe que *B. cereus* es un patógeno de insectos, debido a la habilidad de desarrollar una alta cantidad de fosfolipasas (recursos energéticos dentro del organismo). De la misma forma Barth et al.

(2004), descubrieron que estas bacterias producen proteínas para la elaboración de un insecticida natural letal para los gusanos que viven en las raíces. De esta forma, *B. cereus* cuenta con propiedades potencialmente benéficas en el ámbito agrícola, por lo que se recomienda la realización de nuevos estudios para un mejor entendimiento de este organismo.

Según estudios recientes de Saad et al. (2012), el *Bacillus flexus* es una bacteria degradativa que posee un gen que codifica la enzima MLRA, importante para la degradación de microcistina. La microcistina tiene la capacidad de generar toxinas que perjudican la vida acuática, plantas y bacterias. En futuras investigaciones se podría identificar el uso de esta bacteria en la degradación de los derrames de petróleo en la Amazonia, o en la degradación del polipropileno que afecta tanto a nuestro planeta tierra.

Los estudios que se han realizado de *Bacillus bombysepticus* son pocos. Uno de los documentos con gran importancia es el de Huang et al. (2009), donde se estudió la infección de *B. bombysepticus* en el gusano de seda, provocando en éste una infección aguda en todo su organismo y la muerte dentro de un día en un clima templado.

La *Pseudomonas fluorescens* es un promotor de crecimiento vegetativo, produce pioverdin, pigmento soluble en agua y fluorescente bajo la luz ultravioleta. Estudios realizados por Echeverria et al. (2012), demostraron el desarrollo de la planta de tomate en los primeros cuatro meses posterior a la aplicación *P. fluorescens*, demostrando un aumento de microelementos como: cobre, zinc, y boro. [23].

6. DISCUSION

En este estudio se analizó el impacto de la fumigación a base del biocida 1,3 Dicloropropeno y Cloropicrina sobre la población de bacterias en suelos cultivados por ornamentales. Encontramos que la aplicación del biocida produce cambios en la población de bacterias tanto en el fenotipo como en la población total. Según Doran et al. (1994), la aplicación repetida de desinfectantes químicos en los suelos puede modificar la biodiversidad microbiana. En estudios comparativos como los de Smelt et al. (1989) y Ou et al. (1995), revelan que la aplicación de 1,3-Dicloropropeno es efectiva en la disminución de las enfermedades del suelo. En el estudio de Ibekwe et al. (2004) se expone que la aplicación de abonos orgánicos induce a la aceleración de la degradación de Cloropicrina a partir del primer día de uso y aún más si su aplicación es repetitiva. Del mismo modo, tiene un efecto positivo en la disminución de enfermedades causadas por nemátodos entre otros organismos patógenos del suelo.

Los resultados de nuestro estudio demostraron (al igual que en los estudios previamente mencionados) que existe menor biodiversidad y una disminución considerable en las poblaciones bacterianas con la aplicación del biocida. Cabe recalcar que sería de gran utilidad la realización de estudios que demuestren la relación entre la biodiversidad versus el tiempo de degradación de la materia orgánica con la aplicación del biocida.

En general, los cuatro medios de cultivo sin la aplicación de biocida en la cuantificación por fenotipo, presentaron una clara variabilidad de bacterias de distintos colores en las dos profundidades de 0-20 y 20-40 cm, mientras que con la aplicación del biocida, se promueve el crecimiento de bacterias de color blanco, siendo un agente seleccionador de bacterias benéficas o no benéficas para los cultivos. Sabiendo que el perfil arable del suelo tiene diez veces más CO_2 y menos O_2 debido a la actividad biológica, no es razonable que existan mas organismos biológicos a mayor profundidad del suelo [24, 25]. El estudio de Alexander et al. (1890) expone que la distribución de microorganismos en el suelo varía según las profundidades. En este estudio se demostró que a una profundidad de 0-10 cm existen 7.800 bacterias aerobias por gramo de tierra, mientras que a 20-25 cm de profundidad existen 1.800 bacterias aerobias por

gramo de tierra, datos que evidencian que a mayor profundidad existe menor cantidad de microorganismos. El estudio de Angulo (2006), expone que la raíz de *Hypericum* puede alcanzar una longitud mayor a 80 cm de profundidad y según Algeo, et al. (1995), a medida que las raíces alcanzan cierta profundidad, se obtienen nuevos hábitats para su nutrición [26]. Al parecer, las raíces extensas del cultivo de *Hypericum* promueven la biodiversidad de microorganismos a gran profundidad. Los datos revelados en nuestro estudio se correlacionan con los hallazgos obtenidos en los trabajos investigativos antes propuestos, afirmando que en las profundidades estudiadas existen bacterias de distintas características. Por ejemplo, en el caso de *Pseudomonas fluorescens*, encontradas a una profundidad de 20-40 cm, siendo, en éste caso, una bacteria estrictamente benéfica para el crecimiento vegetativo.

De algunas muestras no se pudo obtener información por medio de la amplificación en base de la PCR debido a que existen algunos tipos de bacterias que podrían necesitar más concentración de ADN para la reacción de PCR, por tanto un rango más alto de ABS. Para prevenir este problema se podría aumentar la cantidad de ADN en el mix y/o aumentar el nivel de absorbancia. También la variación en la *temperatura de aneling* (Ta) es un factor importante, motivo por el cual en este estudio evaluamos la Ta de 40 °C a 43 °C y finalmente a 45 °C después de varias pruebas realizadas. Un aumento de la Ta mejora la unión de los primers 16s rDNA por lo cual mejora la especificidad de la amplificación. Para las muestras sin amplificación, la Ta se pudo variar para encontrar expresión.

El método molecular utilizado fue viable para la identificación de bacterias. Esta técnica consiste en la fusión de dos procesos moleculares llamados Colony PCR y el Direct PCR descritos por Murrin et al. (1997) y Reynolds et al. (1997) . La ventaja de este método es la ausencia de la extracción de ADN con métodos de maceración que retrasan el proceso. El Cell - PCR ahorra tiempo cuando se tienen grandes cantidades de cultivos microbianos en análisis. La desventaja podría ser la concentración no estandarizada de ADN usada en cada reacción de PCR.

En el secuenciamiento de los fragmentos seleccionados, tuvimos algunas muestras sin resultado, posiblemente debido a problemas en la purificación de la muestra antes del envío. La medición de la absorbancia en el Nanodrop no se realizó en un ambiente estrictamente controlado, pudiendo contaminarse por algún tipo de bacteria del medio ambiente. En la secuenciación

después de la aplicación del biocida se obtuvo un 90% de bacterias del genero *Bacillus* spp., corroborando estos resultados los estudios de Mocali et al. (2007), afirman que con la aplicación del agente químico biocida prolifera el crecimiento de bacterias del género *Bacillus* en un 85% del resto de bacterias, debido al aumento de la biomasa microbiana y la disminución del carbono orgánico en el suelo.

Como una gran incógnita, en la secuencia número ocho y once, no se encontraron resultados en la base de datos BLAST a pesar de que se obtuvo una cromatografía excelente. Esta bacteria es un potencial descubrimiento para futuros estudios científicos. A medida que los recursos técnicos aumenten se podrá realizar la identificación de esta bacteria con métodos moleculares avanzados. De esta forma el agricultor podrá saber si la bacteria que habita en su cultivo es benéfica o patógena y así tomar medidas de control y prevención necesarias, siendo más técnico en el manejo de la agricultura.

7. CONCLUSION

- El uso de biocida disminuye considerablemente el fenotipo determinado por color, excepto el color blanco con el tratamiento del biocida
- El medio KB con la aplicación del biocida a una profundidad de 20 a 40 cm tuvo un ligero crecimiento de la bacteria de fenotipo de color amarilla.
- El cuantificación global sin la aplicación del biocida existe mayor población bacteriana a una profundidad de 20-40 cm en relación a la profundidad de 0-20 cm.
- El biocida disminuyo el cuantificación global de UFC por gramos en el suelo, excepto en el medio NA en la dilución y profundidad D3+(0-20 cm) que tuvo un efecto contrario.
- En el medio NA con la aplicación del agente químico en la dilución y profundidad D3+(0-20 cm) se encontró un mayor número de bacterias en mayor profundidad que en la dilución y profundidad de D3-(0-20 cm) que tiene menor población de bacterias.
- Las bacterias identificadas en el suelo estudiado fueron las siguientes: *Bacillus anthracis*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus flexus*, *Bacillus bombysepticus* y *Pseudomonas fluorescens*.

- En las muestras estudiadas sin la aplicación del biocida, la secuencia ocho y once no se reveló el género ni la especie de la bacteria en el sistema informático BLAST.

8. RECOMENDACIÓN

- Realizar este tipo de análisis en un periodo de tiempo más largo, es decir realizar en varios ciclos de producción con el mismo tratamiento químico y cultivo.
- Evaluar nuevamente el proceso de identificación de bacterias antes de la aplicación del biocida, dado que en este paso no se logró identificar la cantidad de bacterias deseadas.
- Realizar este mismo estudio con análisis estadístico y analizar la eficiencia de los tratamientos (agentes químicos) a nivel de tres o cuatro distintas profundidades de suelo, distintos medios *in-vitro* y cultivos agrícolas, dado que este estudio fue enfocado solamente a la identificación de bacterias en el cultivo de *Hypericum*.
- Evaluar la funcionalidad de las bacterias identificadas en este estudio.
- Realizar estudios para la identificación de la bacteria no encontrada en el sistema bioinformático BLAST, dado que podría ser un nuevo descubrimiento.

9. Referencias Bibliográficas.

1. Alexander M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. México, AGT Editor, pp. 163-218, 270-291.
2. Archivo Expoflores 2004.
3. C.M. Bernal. 1993. "Fertilidad y contaminación de suelos agrícolas". Aplicación al cultivo de la vida. Departamento de Conservación de Suelos y Agua y Manejo de Residuos Orgánicos Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Murcia. Acceso: 11 de septiembre del 2012. from: www.haro.org
4. Jaramillo J, Daniel F. 2011. "El Suelo: Origen, Propiedades, Especialidad". Medellín; Universidad Nacional de Colombia, Febrero, 372-373
5. Alexander M. 1980. "Introducción a la microbiología del suelo"; libros y editoriales S.A. México. 79-80.
6. E.J. Russell. 1989. "Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell". Madrid, Edición Mundi-Prensa.
7. Suarez, C. 2011. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Retrieved 11 20, 2011, from INIAP Wep site: www.iniap.gob.ec
8. León, A. 2011-07-22. Identificación de Bacterias en el Ecuador. (F. Brito , Interviewer)
9. Benson. 2001. "Microbiological Application"; The MacGraw-Hill Company - España, Ñ:239-240.
10. Maxam AM. y Gilbert W. 1977. "A new method for sequencing DNA". Proc Natl Acad Sci USA 2 (74). PMID 265521
11. Multhart C. 2007. "Molecular Biology and Genomics", San Diego; California, 2007: 31
12. Luna G, M.L, Vega Jarquín C, Franco Hernández, M.O, Vásquez, S, Trujillo Tapia, N, Ramírez, E, Dendooden L. 2002. Actividad microbiana en suelos. Avance y Perspectiva vol. 21. Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería, Septiembre - Octubre. P. 328, 331.

13. King EO, Ward WK, Raney De. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44:301-307.
14. Echandi Eddi. 1967. "Manual de Laboratorio de Fitopatología General". Editorial IICA. Lima-Perú. Pp. 41
15. Cultimed. Manual básico de Microbiología. Acceso: 17 de septiembre del 2013. from: www.cosela.es
16. Sagardoy y Mandolesi, Marcelo A. Maria E. 2004. "Biología del Suelo Guía del Estudio". Bahía Blanca-Argentina, Febrero, 36-37
17. Carderon F, Pavlova, Muyzer. 1999. 'Dr.Carderon Labs'. Acceso: 12 de Agosto del 2013. from www.drcarderonlabs.com
18. Tortora. Gerard J. 2004. "Microbiology An Introduction" (8va edición). Pearson Prentice Hall.
19. Multhart C. 2007. "Molecular Biology and Genomics", San Diego; California, 2007: 31
20. Negroni, M. 2009. Microbiología Estomatológica: Fundamentos y guía practica. 2 ed. Buenos Aires, Argentina. Edit. Médica Panamericana. S.A. pp. 383
21. De Vos, P. et al. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer
22. Palleroni, N. J. 2005. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer,; 323-370.
23. Dommergues Y, Mangenot F. 1970. *Écologie microbienne du sol*. Paris. Masson et Cie. pp 92-154.
24. Fenchel T, King GM, Blackburn TH. 2000. *Bacterial Biogeochemistry: The Ecophysiology of Mineral Cycling*. 2°ed. Academic Press, San Diego. pp. 43-59, 117-161.
25. Algeo T, Scheckler J, S.E. 1998. Terrestrial-marine teleconnections in the Devonian: links between the evolution of land plants, weathering processes, and marine anoxic events. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 353 (1365): pp. 113–130.

26. White T, Bruns, S., & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315-322. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sminsky, and T.J. White (eds.). PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, Inc., New York, USA.
27. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA "Sequencing with chain-terminating inhibitors, Proc Natl Acad Sci U S A. December. 74 (12):5463-7.
28. Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg N.R, Ludwig W, Rainey F.A, Schleifer K-H, Whitman, W.B. 2009. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ". Volume 3: The Firmicutes. Springer.
29. Vary Patricia S, Rebekka Biedendieck, Tobias Fuerch, Friedhelm Meinhardt, Manfred Rohde, Wolf-Dieter Deckwer, Dieter Jahn. 2007. "Bacillus megaterium— from simple soil bacterium to industrial protein production host". Appl Microbial Biotechnol 76:957–967.
30. Lereclus D, Agaisse H, Gominet M, Salamiou S, Sanchis V. 1996. Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. J Microbiol.;178:2749-56.
31. Barth H, Aktories K, Popoff MR, Stiles BG. 2004. Binary bacterial toxins: Biochemistry, biology and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. Microbiol Molec Biol Rev.171:5702-6.
32. Saad A. Alamri. 2012. Biodegradation of microcystin-RR by *Bacillus flexus* isolated from a Saudi freshwater lake. Saudi Journal of Biological Sciences.
33. Huang L., Cheng T., Xu P., Cheng D., Fang T., Xia Q. A. 2009. genome-wide survey for host response of silkworm, *Bombyx mori* during pathogen *Bacillus bombysepticus* infection. PLoS ONE., 4:E8098.
34. Echeverria E. 2012. Efecto de la interacción de hongos micorrízicos arbusculares y *Pseudomonas fluorescens* sobre el desarrollo y la nutrición de plántulas de tomate de árbol durante las primeras fases de crecimiento. pg. 66-67.
35. Doran JW, Parkin TB. 1994. Defining and assessing soil quality. In: Doran JW, Coleman DC, Bezdicek DF, Stewart BA (eds) Defining soil quality for a sustainable environment. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp

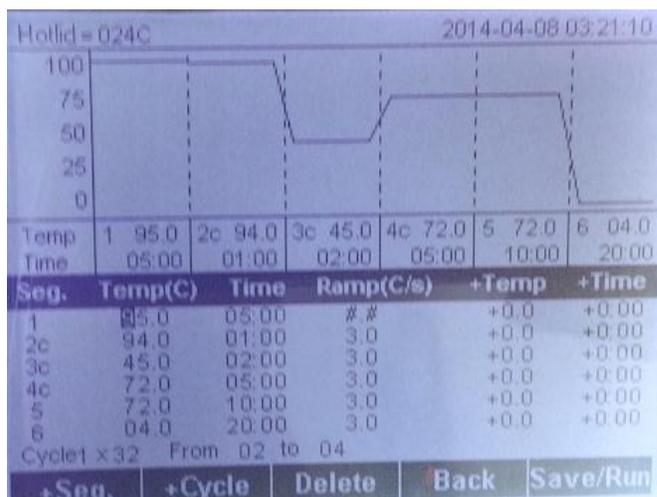
- 3–22 (Special Publication no.35 SSSA)
36. Smelt JH, Teunissen W, Crum SJH, Leistra M. 1989. Accelerated transformation of 1,3-dichloropropene in loamy soils. *Neth J Agric Sci* 37:173–183.
 37. Ou LT, Chung KY, Thomas JE, Obreza TA, Dickson DW. 1995. Degradation of 1,3-dichloropropene (1,3-D) in soils with different histories of field applications of 1,3-D. *J Nematol* 27:127–242.
 38. Ibekwe A Mark, Sharon K, Papiernik, Ching-Hong Yang. 2004. "Enrichment and molecular characterization of chloropicrin- and metam-sodium-degrading microbial communities". Springer-Verlag 2004. Published online: 7 August.
 39. Angulo J. 2006. Estudio de prefactividad para la producción y comercialización de *Hypericum androsaemum* con fines de exportación en Pifo – Pichincha", Universidad San Francisco de Quito. pp. 26-31. Acceso: viernes 2 mayo del 2014. www.repositorio.usfq.edu.ec
 40. Algeo, T.J.; Berner, R.A.; Maynard, J.B.; Scheckler, S.E.; Archives, G.S.A.T. 1995. Late Devonian Oceanic Anoxic Events and Biotic Crises: "Rooted" in the Evolution of Vascular Land Plants. *GSA Today* 5.
 41. Murrin, K. and Slade, J. 1997. Rapid detection of viable enteroviruses in water by tissue culture and semi-nested polymerase chain reaction. *Water Science and Technology* 35, 429–432.
 42. Reynolds, K.A, Gerba C.P, and Pepper, I.L. 1997. Rapid PCR-based monitoring of infectious enteroviruses in drinking water. *Water Science and Technology* 35, 423–427.
 43. Mocali S, Paffetti D, Emiliani G, Benedetti A, Fani R. 2007. "Diversity of heterotrophic aerobic cultivable microbial communities of soils treated with fumigants and dynamics of metabolic, microbial, and mineralization quotients". Springer – Verlag. Published online: 6 September

Anexos

- **Anexo 1. Master Mix - PCR**

Reactivos	Concentración
ADN	4ul
Buffer 10X	6ul
dNTPs	1.5ul
MgCl ₂	6ul
16s rDNA - Forwar	2.5ul
16s rDNA - Reverse	2.5ul
Taq Polimerase	1.5ul
H ₂ O - PCR	26ul
Total	50ul

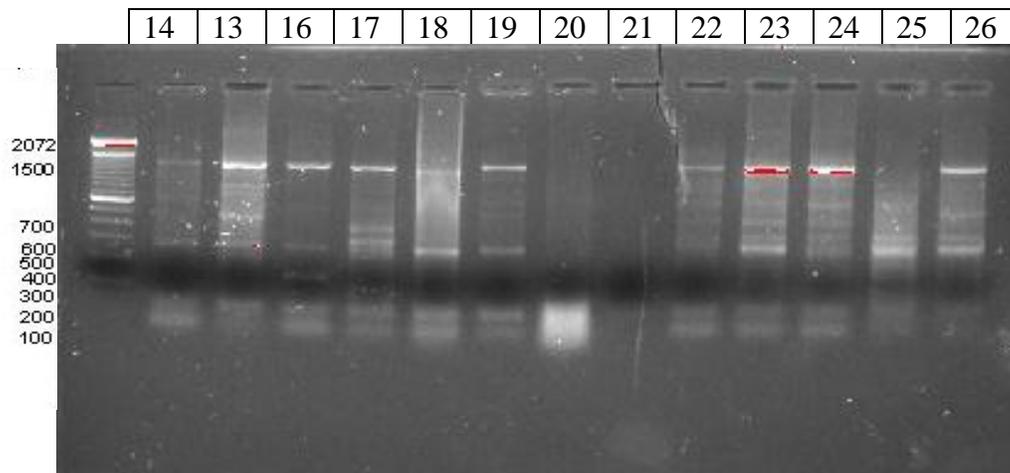
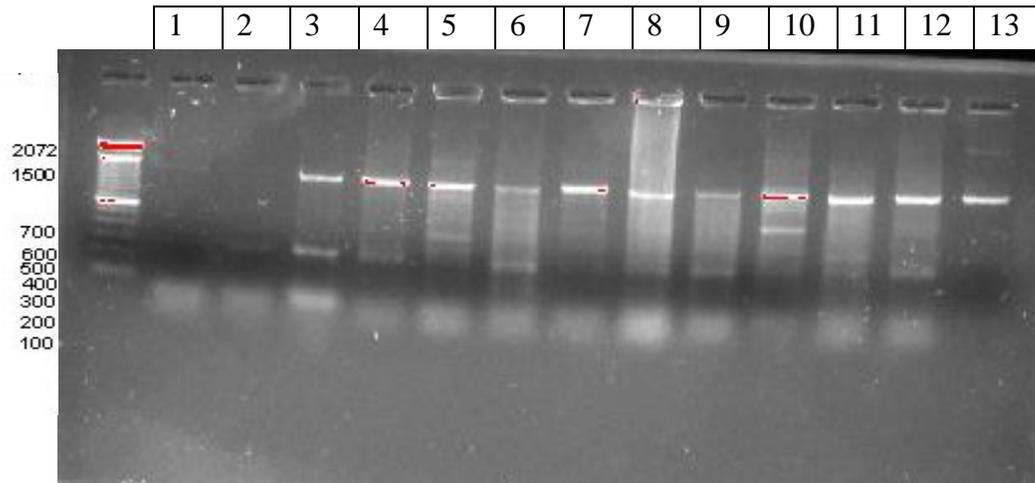
- **Anexo 2. Termociclador, ciclos de la temperatura de annealing.**



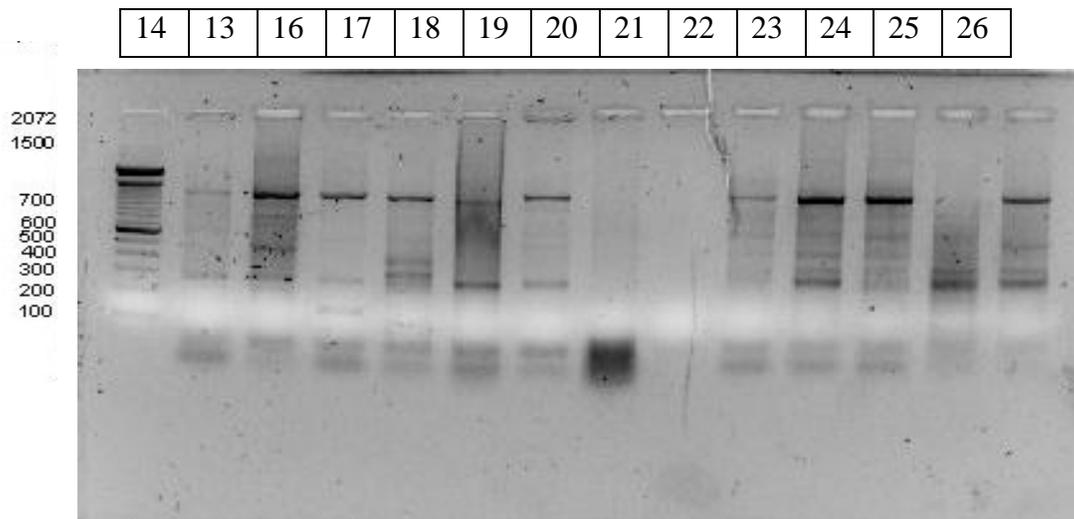
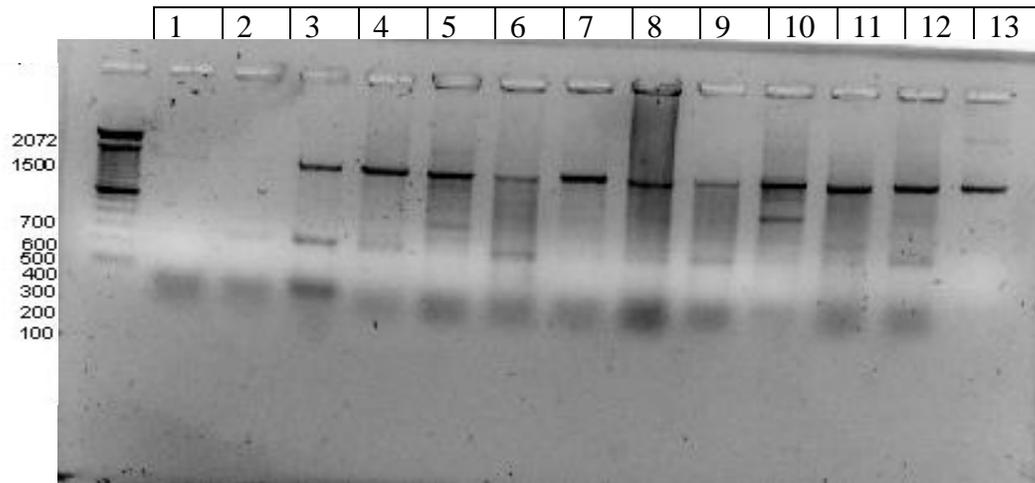
- **Anexo 3. Tabla de la medición de ABS**

Númerode muestra	Color	Medio	Profundi dad	Dilución		ABS
7	Blanca	KB	20-40 cm	5	SIN BIOCIDAS	86,1
8	Blanca	PDA	20-40 cm	9		104,2
11	Roja	PDPA	20-40 cm	3		38,8
21	Blanca	KB	0-20 cm	2		49,2
25	Blanca	PDA	0-20 cm	5		31,1
27	Blanca	NA	0-20 cm	9		22,7
Númerode muestra	Color	Medio	Profundi dad	Dilución		
1	Blanca	PDA	20-40 cm	3	CON BIOCIDAS	35,4
3	Blanca	KB	20-40 cm	9		76,7
5	B. Rojiza	PDA	20-40 cm	5		96
7	Blanca	KB	20-40 cm	7		39,7
8	Blanca	PDA	20-40 cm	11		110,2
9	Blanca	PDPA	20-40 cm	5		58,1
10	Blanca	PDPA	20-40 cm	5		87,7
11	Blanca	PDA	20-40 cm	7		111,6

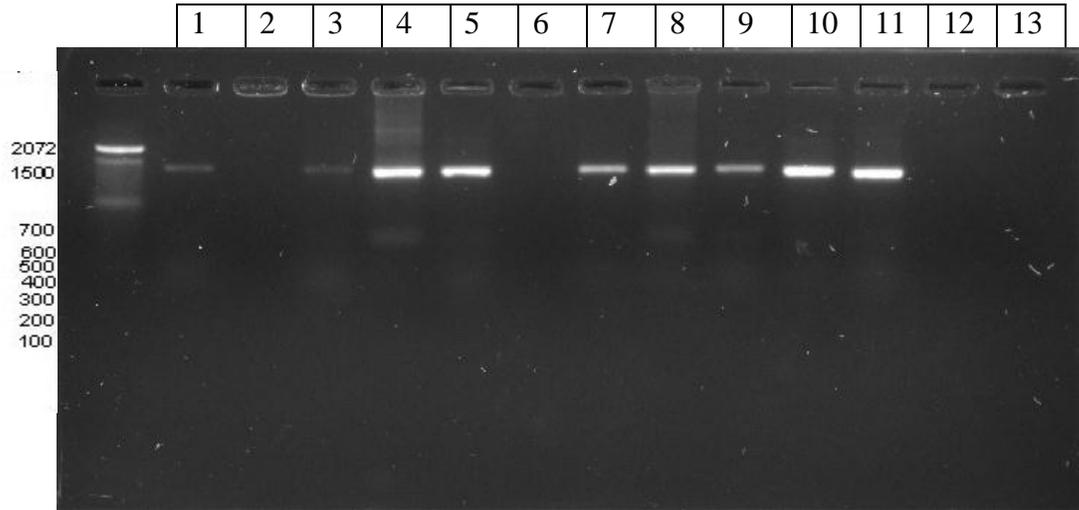
- Anexo 4. Gel de agarosa al 2% sin la aplicación de biocidas.



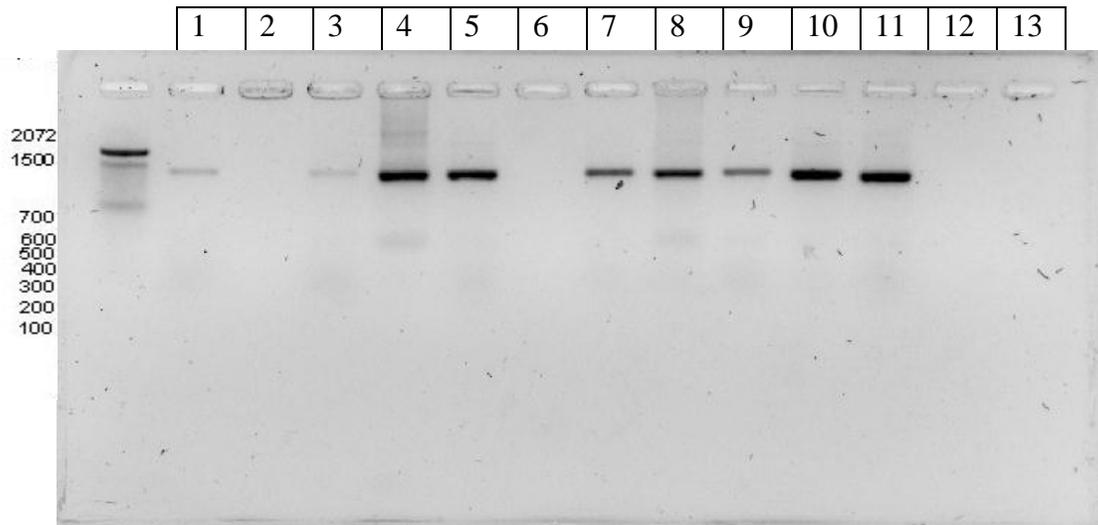
- **Anexo 4.1 Gel de agarosa al 2%, sin la aplicación de biocidas fotos en negativo.**



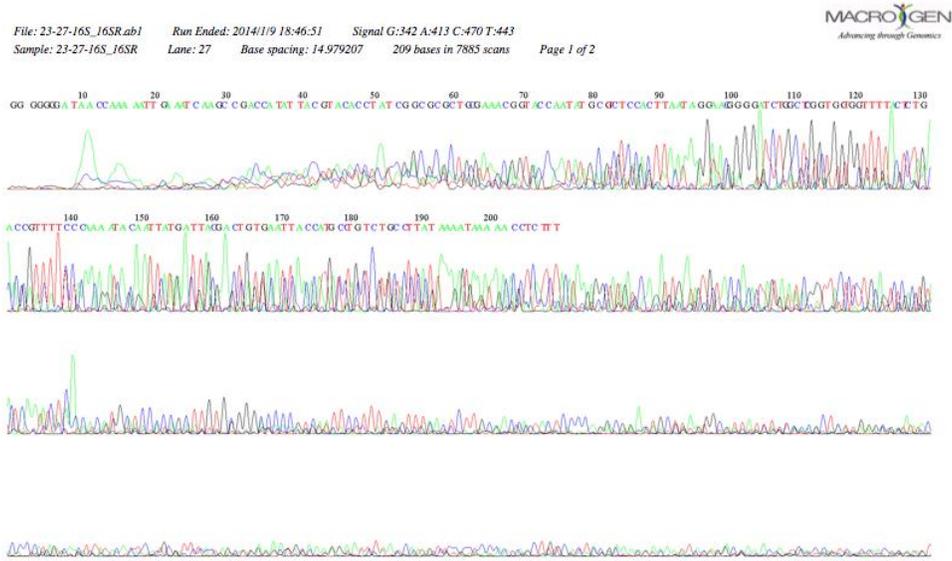
- **Anexo 5. Gel de agarosa al 2% con la aplicación de biocidas.**



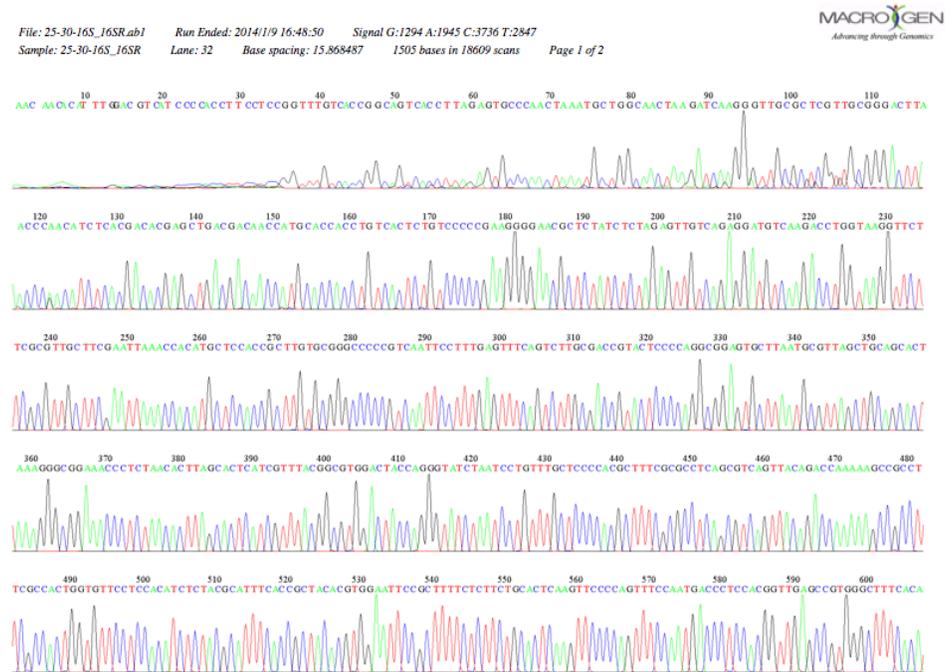
- **Anexo 5.1 Gel de agarosa al 2% con la aplicación de biocidas foto en negativo.**



- **Anexo 6. Cromatograma de mala calidad**



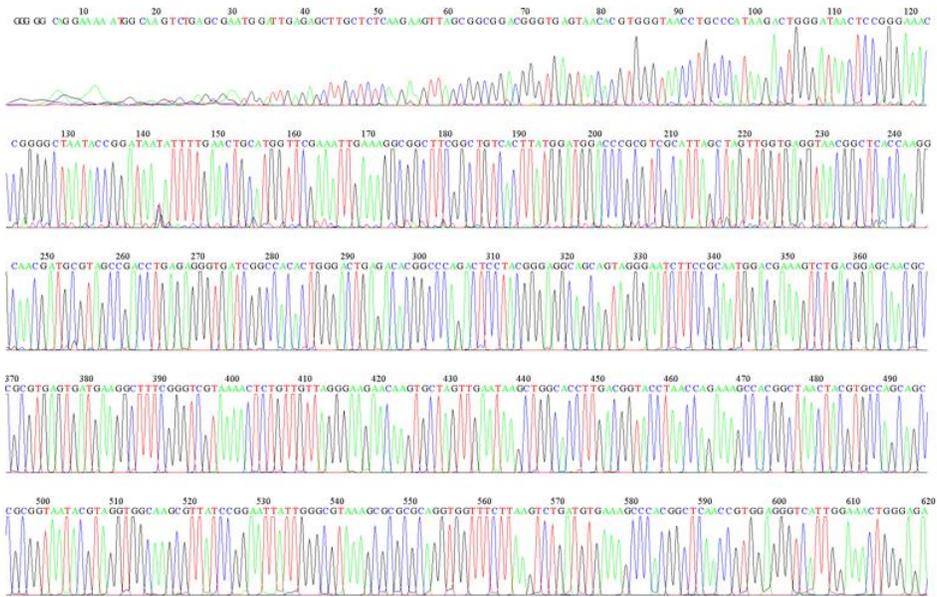
- **Anexo 6.1 Cromatograma de buena calidad**



- Anexo 6.2 Cromatograma de excelente calidad

File: 26-31-16S_16SF.ab1 Run Ended: 2014/1/9 20:45:16 Signal G:1742 A:1963 C:2361 T:1948
Sample: 26-31-16S_16SF Lane: 30 Base spacing: 15.183289 1386 bases in 16859 scans Page 1 of 2

MACROGEN
Advancing through Genomics



- Anexo 7. Muestra número 11, sin la aplicación de biocidas.

► NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - NH01SB27015

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [▶ Formatting options](#) [▶ Download](#) [YouTube](#) [How to read this page](#) [Blast report description](#)

140109-05_F05_19-21-16S_16SF.ab1#1982

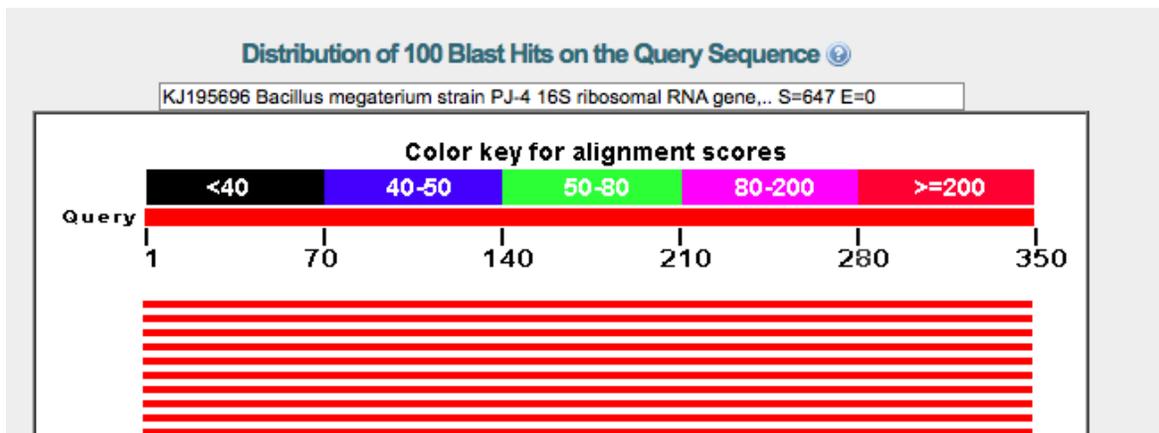
RID	NH01SB27015 (Expires on 04-25 11:08 am)		
Query ID	Icl 32181	Database Name	nr
Description	140109-05_F05_19-21-16S_16SF.ab1	Description	Nucleotide collection (nt)
Molecule type	nucleic acid	Program	BLASTN 2.2.29+ ▶ Citation
Query Length	350		

ⓘ No significant similarity found. For reasons why, [click here](#)

Other reports: [▶ Search Summary](#)

Nota: Esta secuencia no se encontró en la base de datos BLAST. Posiblemente es una secuencia nueva, es decir un tipo de bacteria no identificada.

- **Anexo 8. Muestra número 5, con aplicación de biocidas.**
- Distribución de la secuencia



- Descripción

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	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Bacillus sp. CZBSN1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	647	647	100%	0.0	100%	KJ184902.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus megaterium strain PJ-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	647	647	100%	0.0	100%	KJ195696.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus flexus strain TR11T1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	647	647	100%	0.0	100%	KJ206916.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus flexus strain M_Sw_HS_06/10_3_1(1) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	647	647	100%	0.0	100%	KJ187481.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus megaterium strain K3-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	647	647	100%	0.0	100%	KJ161406.1

- Secuencia parcial del gen identificado

Bacillus megaterium strain PJ-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KJ195696.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gb|KJ195696.1) Length: 1476 Number of Matches: 1

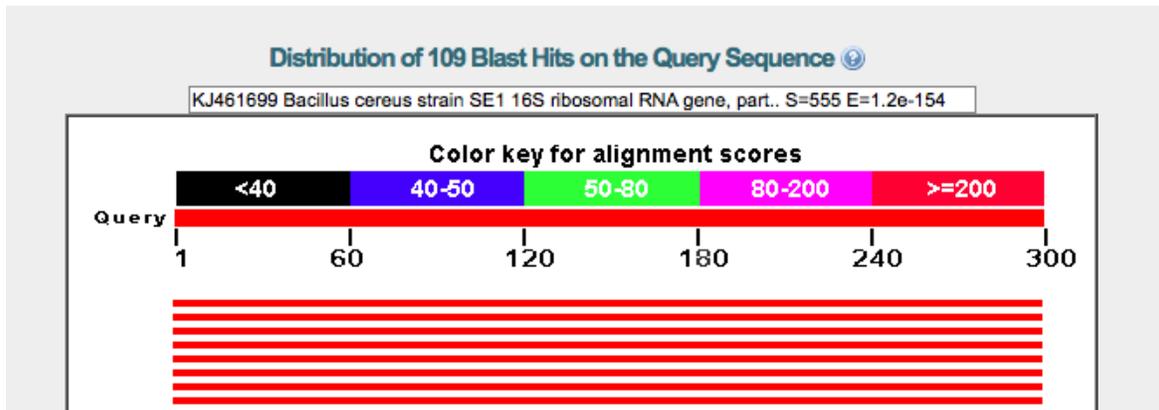
Range 1: 321 to 670 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
647 bits(350)	0.0	350/350(100%)	0/350(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC			60
Sbjct 321	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC			380
Query 61	GCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTA			120
Sbjct 381	GCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTA			440
Query 121	CAAGAGTAAC TGCTTGACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC			180
Sbjct 441	CAAGAGTAAC TGCTTGACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC			500
Query 181	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC			240
Sbjct 501	CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC			560
Query 241	GCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTG			300
Sbjct 561	GCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTG			620
Query 301	GAAACTGGGGAAC TTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAG			350
Sbjct 621	GAAACTGGGGAAC TTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCACGTGTAG			670

- **Anexo 9. Muestra número 7, con la aplicación de biocidas**

- Distribución de la secuencia



- Descripción

Sequences producing significant alignments:

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

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Bacillus cereus strain SE1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	555	555	100%	1e-154	100%	KJ461699.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus cereus strain CAB 1112 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	555	555	100%	1e-154	100%	KJ194589.1
<input type="checkbox"/>	Enterobacter cloacae strain TR20T2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	555	555	100%	1e-154	100%	KJ206932.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus mycoides strain TR79T1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	555	555	100%	1e-154	100%	KJ206929.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus cereus strain TR1T1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	555	555	100%	1e-154	100%	KJ206911.1

- Secuencia parcial del gen identificado

Bacillus cereus strain SE1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KJ461699.1](#) Length: 1447 Number of Matches: 1

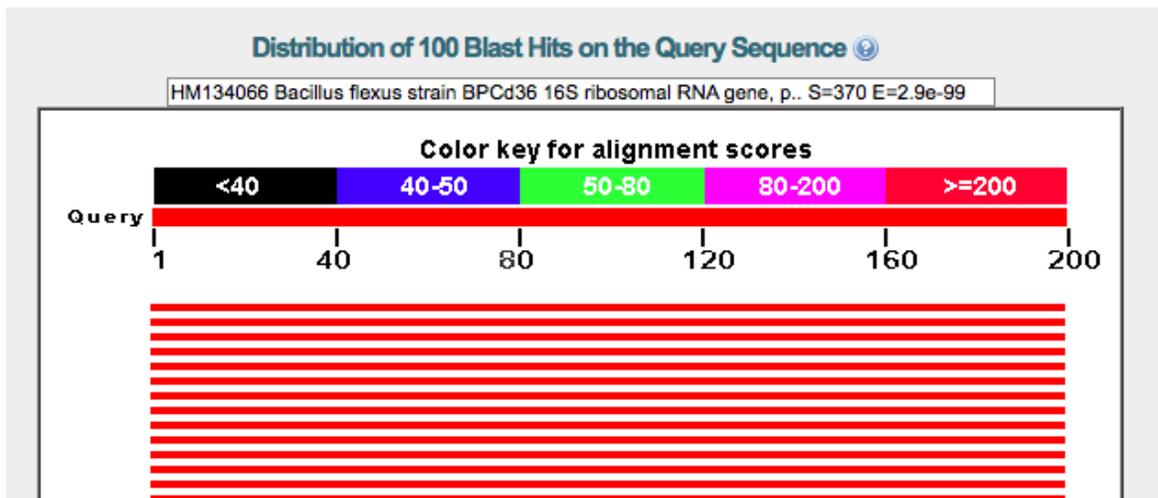
Range 1: 251 to 550 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
555 bits(300)	1e-154	300/300(100%)	0/300(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC			60
Sbjct 251	ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC			310
Query 61	CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC			120
Sbjct 311	CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC			370
Query 121	GCGTGAGTGATGAAGGCTTFCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTA			180
Sbjct 371	GCGTGAGTGATGAAGGCTTFCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTA			430
Query 181	GTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA			240
Sbjct 431	GTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA			490
Query 241	GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGC			300
Sbjct 491	GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGC			550

- **Anexo 10. Muestra número 9, con aplicación de biocidas**

- Distribución de la secuencia



- Descripción

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	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Bacillus megaterium strain DY14-63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	370	370	100%	3e-99	100%	KC494006.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus megaterium strain B1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	370	370	100%	3e-99	100%	KC310817.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus flexus strain BPCd36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	370	370	100%	3e-99	100%	HM134066.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus sp. A-BT-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	370	370	100%	3e-99	100%	JF901708.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus megaterium strain IPNR61 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	370	370	100%	3e-99	100%	HM146203.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus flexus strain 766 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	370	370	100%	3e-99	100%	EU430092.1

- Secuencia parcial del gen identificado

Bacillus flexus strain BPCd36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|HM134066.1](#) Length: 650 Number of Matches: 1

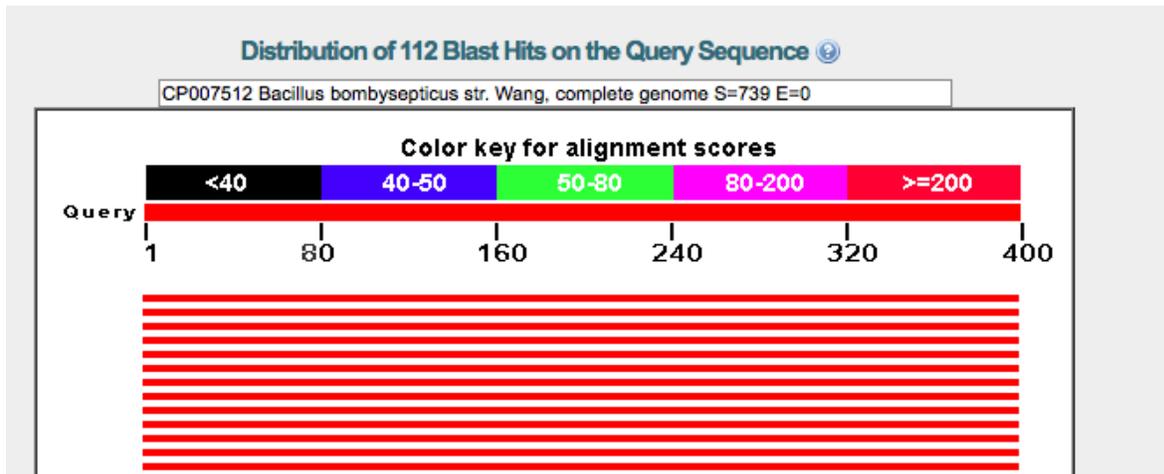
Range 1: 66 to 265 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
370 bits(200)	3e-99	200/200(100%)	0/200(0%)	Plus/Minus
Query 1	TCTATCTCTAGAGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAA	60		
Sbjct 265	TCTATCTCTAGAGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAA	206		
Query 61	ATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCT	120		
Sbjct 205	ATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCT	146		
Query 121	TGCGACCGTACTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAA	180		
Sbjct 145	TGCGACCGTACTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAA	86		
Query 181	ACCCTCTAACACTTAGCACT	200		
Sbjct 85	ACCCTCTAACACTTAGCACT	66		

- **Anexo 11. Muestra número 10, con la aplicación de biocidas.**

- Distribución de la secuencia



- Descripción

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	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Bacillus bombysepticus str. Wang, complete genome	739	9617	100%	0.0	100%	CP007512.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis strain HC18a2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	739	739	100%	0.0	100%	KJ206079.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus cereus strain HC18a1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	739	739	100%	0.0	100%	KJ206078.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis strain HC12a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	739	739	100%	0.0	100%	KJ206077.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus cereus strain HC8a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	739	739	100%	0.0	100%	KJ206076.1

- Secuencia parcial del gen identificado

Bacillus bombysepticus str. Wang, complete genome

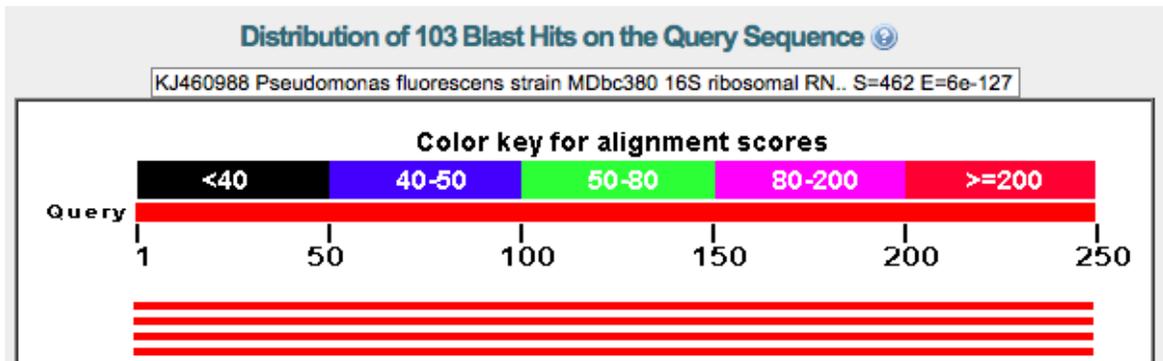
Sequence ID: [gb|CP007512.1](#) Length: 5295783 Number of Matches: 13

Range 1: 90502 to 90901 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
739 bits(400)	0.0	400/400(100%)	0/400(0%)	Plus/Minus
Query 1	CCATGCACCACCTGTCACCTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAG	60		
Sbjct 90901	CCATGCACCACCTGTCACCTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAG	90842		
Query 61	GATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGC	120		
Sbjct 90841	GATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGC	90782		
Query 121	TTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGG	180		
Sbjct 90781	TTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGG	90722		
Query 181	AGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCA	240		
Sbjct 90721	AGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCA	90662		
Query 241	TCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCC	300		
Sbjct 90661	TCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCC	90602		
Query 301	TCAGTGTCAAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCATATCTCTAC	360		
Sbjct 90601	TCAGTGTCAAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCATATCTCTAC	90542		
Query 361	GCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCT	400		
Sbjct 90541	GCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCT	90502		

- Anexo 12. Muestra número 11, con la aplicación de biocidas.

- Distribución de la secuencia



- Descripción

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	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas fluorescens strain MDbc380 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	462	462	100%	6e-127	100%	KJ460988.1
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas sp. FSBRY17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	462	462	100%	6e-127	100%	KJ200400.1
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas sp. FSBSA9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	462	462	100%	6e-127	100%	KJ185013.1
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas sp. FSBRY15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	462	462	100%	6e-127	100%	KJ185008.1
<input type="checkbox"/>	Pseudomonas sp. FSGSY10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	462	462	100%	6e-127	100%	KJ185000.1

- Secuencia parcial del gen identificado

Pseudomonas fluorescens strain MDbc380 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KJ460988.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/gb|KJ460988.1) Length: 1537 Number of Matches: 1

Range 1: 165 to 414 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
462 bits(250)	6e-127	250/250(100%)	0/250(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCG			60
Sbjct 165	ACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCG			224
Query 61	GGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCAC			120
Sbjct 225	GGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCAC			284
Query 121	CAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACG			180
Sbjct 285	CAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACG			344
Query 181	GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATC			240
Sbjct 345	GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATC			404
Query 241	CAGCCATGCC	250		
Sbjct 405	CAGCCATGCC	414		