



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO

TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
MENCIÓN EN:
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

COMPARACIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA EN
SUELO PRÍSTINO Y SUELO CULTIVADO CON VID (*Vitis spp.*)
MEDIANTE TÉCNICAS DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES
DE CULTIVO MICROBIANO

SAVINA ALEJANDRA GUTIÉRREZ CALLE

TUMBES, PERÚ
2016



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO

TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
MENCIÓN EN:
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

COMPARACIÓN DE LA MICROBIOTA BACTERIANA EN
SUELO PRÍSTINO Y SUELO CULTIVADO CON VID (*Vitis spp.*)
MEDIANTE TÉCNICAS DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES
DE CULTIVO MICROBIANO

SAVINA ALEJANDRA GUTIÉRREZ CALLE

TUMBES, PERÚ
2016

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo Savina Alejandra Gutiérrez Calle declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.

SAVINA ALEJANDRA GUTIÉRREZ CALLE

ACTA DE REVISIÓN Y DEFENSA DE TESIS

RESPONSABLES

Bach. SAVINA ALEJANDRA GUTIÉRREZ CALLE

ALUMNA

Ph. D. D.E. ERIC MIALHE MATONNIER

ASESOR

**JURADO
DICTAMINADOR***

Dr. VICTOR CARRIL FERNÁNDEZ

PRESIDENTE

Dr. AUBERTO HIDALGO MOGOLLÓN

SECRETARIO

Dra. VIRNA CEDEÑO ESCOBAR

VOCAL

* Para optar el Grado Académico de Magíster se consignarán dos miembros además del Presidente. Para optar el Grado Académico de Doctor se consignarán cuatro miembros además del Presidente.

CONTENIDO

RESUMEN	IX
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.....	13
2.1 Antecedentes	13
2.2 Bases teóricas científicas.....	16
2.3 Definición de términos básicos.....	21
3. MATERIAL Y MÉTODOS	27
3.1 Localidad y periodo de ejecución.....	27
3.2 Población, muestreo y muestra	27
3.3 Material y métodos	27
3.4 Procesamiento y análisis de datos.....	31
4. RESULTADOS.....	33
4.1 Caracterización de las microbiotas de suelos basada en técnicas dependientes de cultivo in vitro	33
4.2 Caracterización y comparación de las microbiotas de suelos, prístino y cultivado, basadas en técnicas independientes de cultivo in vitro.....	36
4.3 Caracterización y comparación de las microbiotas de suelos cultivados basadas en técnicas independientes de cultivo in vitro.....	43
4.4 Comparación de las metagenómicas de suelos prístinos y cultivados	52
5. DISCUSIÓN.....	54
6. CONCLUSIONES.....	66
7. RECOMENDACIONES.....	67
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
9. ANEXOS	82

RESUMEN

En el Perú, las producciones agrícolas en la costa están esencialmente relacionadas al uso de suelos de zonas áridas mediante sistemas de irrigación, como por ejemplo el cultivo de la vid en la Región Piura. En el presente trabajo, se analizó la composición microbiana de suelos prístinos y cultivados con vid mediante la metagenómica dirigida al gen ADNr 16S y cultivo bacteriano. En el suelo prístino, las bacterias más abundantes pertenecieron a los géneros *Bacillus*, *Hymenobacter*, *Exyguobacterium*, según el enfoque metagenómico; y los géneros *Cronobacter*, *Bacillus* y *Bordetella*, mediante cultivo. En el suelo cultivado con vid, los principales géneros identificados fueron: *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter* y *Nocardioides*, según el enfoque metagenómico; y los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Aeromonas*, mediante cultivo. La mayoría de géneros identificados poseen características potencialmente benéficas, como: mineralizadoras; promotores de crecimiento y sanidad vegetal, etc. Los cálculos de diversidad mostraron que la riqueza y diversidad alfa fueron menor en suelo prístino. Mientras que en los suelos cultivados con vid se identificaron diferentes poblaciones microbianas en las muestras individuales; entre ellas, se observó que permanece un grupo de bacterias provenientes de suelos prístinos, siendo estos microorganismos nativos potencialmente benéficos en suelos bajo manejo agronómico del cultivo de vid.

Palabras clave: suelo prístino, suelos cultivados, vid, Región de Piura, metagenómica, microbiota

ABSTRACT

In Peru, the agricultural production in the coast is related to use of arid areas through irrigation systems, such as grape cultivation in the region of Piura. In this research, the microbial composition of pristine and cultivated soils was analyzed by 16S rDNA gene targeted metagenome and bacterial culture to determine the changes produced by grapevine agronomic management. In pristine soils, the most abundant genus were *Bacillus*, *Hymenobacter*, *Exyguobacterium* by metagenomic approach; and genus *Cronobacter*, *Bacillus* and *Bordetella* by culture. In cultivated soil with grapevines the principal genus identified were: *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter* and *Nocardioides* according to the metagenomic approach; and genera *Enterobacter*, *Pseudomonas* and *Aeromonas* by culture. Most genera identified have potentially beneficial features such as: mineralizing soil; plant growth and health promoter, etc. Diversity calculations showed that the richness and alpha diversity were lower in pristine soil compared to cultivated soil. While in cultivated soils were identified different bacterial populations in different samples. In addition, it observed that a group of bacteria from pristine soils is kept in cultivated soils; some of them are beneficial native microorganisms to the cultivated soils with grapevine.

Keywords: pristine soils, cultivated soils, grapevine, Piura Region, metagenomics, microbiota

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas la costa del Perú ha sufrido la expansión de la frontera agrícola debido a la habilitación de tierras eriazas mediante el desarrollo de grandes proyectos de irrigación, lo que ha permitido el máximo aprovechamiento de los recursos hidrológicos y, por ende, el incremento de la actividad agronómica del país. Este proceso concierne al Distrito de Castilla (Región Piura, Perú), clasificado como una zona natural de bosque seco y que actualmente es un área prometedora para diversos cultivos de exportación, entre ellos la uva de mesa.

La conversión de suelos prístinos en suelos cultivados trae consigo un cambio en la diversidad, no solo al nivel de animales o plantas, sino también en la diversidad microbiana. La modificación de la diversidad microbiana debido al cambio del uso del suelo no siempre resulta perjudicial, sin embargo, el manejo agronómico convencional afecta generalmente la diversidad microbiana de los suelos debido el excesivo uso de fertilizantes químicos, herbicidas, fungicidas, etc.

La agricultura actual está buscando nuevas prácticas agrícolas sostenibles, globalmente incluidas en la agricultura nombrada ecológica, orgánica o biológica, considerando, en particular, agentes microbianos para desarrollar productos biológicos capaces de mejorar la calidad de los suelos mediante la producción de biofertilizantes, fitoestimuladores y biocontroladores de plagas y patógenos.

Esta nueva gama de productos biológicos, destinados en particular a la agricultura ecológica, orgánica o biológica, incluye cepas microbianas exóticas, más o menos estudiadas a nivel funcional, caracterizadas molecularmente, generalmente patentadas y masivamente comercializadas por grandes compañías internacionales proveedoras del sector agrícola. En la práctica, estos productos biológicos son difícilmente evaluables en los campos agrícolas por falta de tecnologías de monitoreo específico, siendo probable que muchos microorganismos exóticos comercializados no sean capaces de adaptarse a las

condiciones locales de cultivo y a las poblaciones microbianas de los suelos cultivados.

Las tecnologías recientes de caracterización global de las microbiotas de suelos, así como de la rizosfera y filosfera de las plantas, abren la vía, no únicamente al seguimiento y monitoreo de los productos biológicos comerciales luego de su aplicación en los campos agrícolas, sino también a la identificación de microorganismos nativos de suelos prístinos potencialmente utilizables para elaborar productos biológicos realmente adaptados a las condiciones locales.

En el presente trabajo se caracterizó molecularmente, mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo microbiano, la microbiota bacteriana en suelos prístinos y suelos cultivados con vid de la Región de Piura. El objetivo fue identificar cepas nativas capaces de persistir en suelos cultivados y ser potencialmente benéficos para el cultivo de la vid, ya sea como biofertilizantes y/o controladores biológicos de plagas y patógenos.

2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA

2.1 Antecedentes

Los suelos son sistemas vivos, heterogéneos y dinámicos, que incluyen componentes físicos, químicos, biológicos en interacciones complejas que promueven un amplio rango de hábitats (Vallejo-Quintero 2013); que encierran una importante microbiota constituida principalmente de hifas fúngicas y células bacterianas pertenecientes a centenas de miles de especies diferentes (Voroney and Heck 2015).

Berg and Smalla (2009) mencionan lo primordial que son los microorganismos de la microbiota del suelo, debido a que están involucrados diversos de procesos, como: la descomposición de la materia orgánica e inorgánica, en los ciclos naturales del nitrógeno, carbono, fósforo, en la solubilización de compuestos minerales, etc.; siendo beneficiosos para el desarrollo de las plantas nativas como cultivadas.

El estudio de la diversidad microbiana en los suelos se había desarrollado en sus inicios mediante técnicas dependientes del cultivo *in vitro*, basándose en la caracterización morfológica y bioquímica tanto en Dominio *Bacteria* como *Archea*; sin embargo, mediante el uso de técnicas moleculares se dio a conocer que sólo una pequeña fracción de organismos podría crecer en medios de cultivos (Torsvik, Sørheim and Goksøyr 1996; Killham and Prosser 2014).

Las técnicas dependientes de cultivo *in vitro* usadas para la caracterización de la microbiota de suelos fueron complementadas por técnicas independientes del cultivo *in vitro*, entre ellas: tecnologías como FISH “Fluorescent In Situ Hybridization” basadas en el uso de sondas oligonucleotídicas específicas a determinado grupo microbiano que conduce a la detección de un mayor número de microorganismos (Amann and Fuchs 2008).

Posteriormente, se emplearon las tecnologías basadas en la amplificación por PCR de los ADNr de los microorganismos bacterianos o fúngicos con separación de los amplicones por electroforesis en condición desnaturalizante (DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism), las cuales permitieron progresar en la demostración de la complejidad microbiana de los suelos (Muyzer, De Waal and Uitterlinden 1993).

Actualmente, las técnicas de secuenciación de segunda generación (Next Generation Sequencing, NGS) permiten la secuenciación masiva, en paralelo y con alto rendimiento de millares de amplicones, que han convertido a la metagenómica en una herramienta para la caracterización de comunidades microbianas complejas, independientemente del cultivo *in vitro* de los microorganismos (Escalante *et al.* 2014).

Las secuencias son analizadas con herramientas bioinformáticas para identificar los genes y, subsecuentemente, la posición taxonómica en el caso de genes de ADNr, siendo el termino OTU “Operational taxonomic Unit” clásicamente utilizado (Fantini *et al.* 2015). Las técnicas de NGS más comunes son: 454 de Roche (pirosecuenciación); Ion Torrent PGM e Illumina Sequencing (Bragg and Tyson 2014).

Los estudios de metagenómica de suelos son en su mayoría metagenómica dirigida considerando ya sea los genes de ADNr, para la determinación taxonómica de la composición de la microbiota, o algunos genes de interés para la determinación funcional de la microbiota (Hirsch, Mauchline and Clark 2010).

La metagenómica ha sido utilizada para el análisis de la microbiota luego de la conversión de uso de suelos. Algunos investigadores mencionan posibles procesos de homogeneización de las comunidades microbianas con el paso del tiempo después de la conversión de un ecosistema (Olden and Poff 2003); e inclusive, se ha mencionado la pérdida de algunas bacterias nativas (Rodrigues *et al.* 2013).

Mendes *et al.* (2014) mostraron que la microbiota de la rizosfera luego de la conversión de suelo, correspondió a un subgrupo de la comunidad microbiana del suelo prístino, esto se debió a que los cambios en la abundancia de taxones tuvieron un impacto en la funcionalidad del suelo, como en el metabolismo de nitrógeno, fierro, fósforo y potasio, que sirven para la promoción del crecimiento y nutrición de la planta; que ocasionaron que algunas funciones del ecosistema del suelo inicial se mantengan luego de la conversión.

En suelos cultivados con vid, Vega-Avila *et al.* (2015) identificaron que en la rizosfera de vid con manejo agronómico orgánico y convencional abundan los filos: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Cloroflexi*, *Verrucomicrobia* y *Planctomycetes* en diferentes proporciones.

Castañeda and Barbosa (2016) analizaron suelos de viñedos orgánicos de Chile, donde observaron que el filo *Proteobacteria* fue más abundante, tanto en suelos prístinos como en aquellos provenientes de viñedos, seguido de *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Planctomycetes*, éstos sin diferencias significativas en ambos suelos.

Zarraonaindia *et al.* (2015) demostraron que la diversidad bacteriana fue mayor en las muestras provenientes del suelo (suelo no influenciado por raíces, rizosfera y raíces) que en las muestras provenientes de partes aéreas de la vid; asimismo, una buena parte de los microorganismos provenientes del suelo estaban presentes en diversos órganos de la vid (raíz, hoja, flor y fruto).

Holland *et al.* (2016) mediante la metagenómica, mostraron una riqueza y diversidad de la microbiota ligeramente superior en suelos provenientes de viñedos (no rizosfera) que en suelos sin manejo agrícola (suelos prístinos), rechazando los conceptos de alteración de la diversidad bacteriana de los suelos por las actividades agrícolas.

2.2 Bases teóricas científicas

Microbioma del suelo

El microbioma del suelo es un hábitat altamente complejo, contiene un tercio de los organismos vivos y es el responsable del funcionamiento de los ecosistemas, debido a que están involucrados en los ciclos biogeoquímicos de elementos esenciales, entre ellos el carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo y otros metales (Zhou *et al.* 2015; Voroney and Heck 2015; Morris and Blackwood 2015).

- *Rizosfera*

La vida en el suelo se distribuye irregularmente cuya tendencia es agruparse para formar áreas críticas de biodiversidad “hot spots”, entre ellos: la rizosfera (Jones and Hinsinger 2008; Berg and Smalla 2009 citados por Balestrini *et al.* 2015).

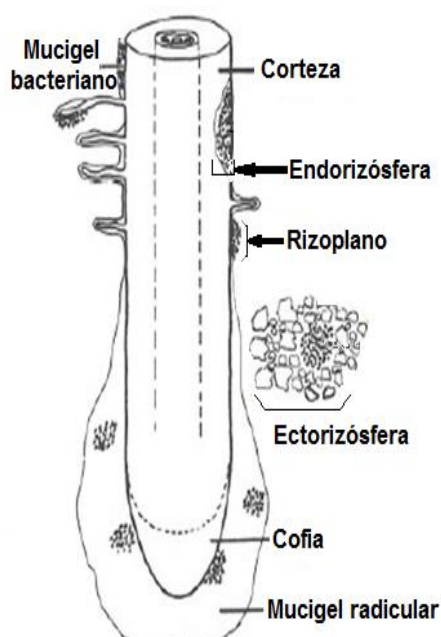
El término rizosfera fue introducido por primera vez por Hiltner (1904) para describir al volumen de suelo que rodea y está influenciado por las partes de tejido radicular, en el cual propiedades físicas, químicas y biológicas han sido cambiadas por el crecimiento y actividad de la raíz (Pinton, Varanini and Nannipieri 2001; Prashar, Kapoor and Sachdeva 2014).

La rizosfera se extiende a pocos milímetros del área abarcada por la raíz, donde habitan un aproximado de 10^{11} células microbianas por gramo de raíces (Berendsen *et al.* 2012). La rizosfera está dividida en:

- a. *Endorizósfera*: conformada por el tejido radicular incluyendo endodermis y capas corticales

- b. *Rizoplano*: es la superficie de la raíz donde partículas del suelo y microorganismos se adhieren; está conformado por la epidermis, corteza y capa de polisacárido mucilaginoso.
- c. *Ectorizósfera*: consiste en el suelo seguidamente adyacente a la raíz (Clark 1949; Lynch 1987; Pinton, Varanini and Nannipieri 2001; Prashar, Kapoor and Sachdeva 2014).

Esquematación de la rizosfera



La planta al liberar compuestos de carbono mediante las raíces al ambiente circundante, junto al exudado de las raíces y el desprendimiento de las células proporciona los recursos necesarios para el desarrollo de diversos microorganismos (Balestrini *et al.* 2015).

De este modo, la planta y su microbioma se considera como un “superorganismo” debido a la dependencia de la microflora del suelo para ciertas funciones y rasgos específicos (Mendes *et al.* 2011; Van der Heijden, Bardgett and Van Straalen 2008), actualmente denominado holobionte (Dessaux, Grandclément and Faure 2016).

Entre las investigaciones realizadas en la rizosfera, se tiene como ejemplo: el estudio de la rizosfera de la remolacha que mediante metagenómica detectó más de 33000 especies de bacterias y arqueas, entre ellas se identificó un grupo que se asocia con la supresión de enfermedades (Mendes *et al.* 2011).

En los trabajos realizados en el microbioma de la raíz de *Arabidopsis*, Bulgarelli *et al.* (2012) y Lundberg *et al.* (2012) han demostrado la relación del microbioma de la raíz de *Arabidopsis* y la comunidad microbiana del suelo. Ellos observaron que la diversidad de la rizosfera es menor a la diversidad de la comunidad del suelo no cultivado; sugiriendo que las raíces de las plantas, de manera directa o indirecta, seleccionan organismos específicos para la interacción con el sistema radicular.

Adicionalmente, diversos trabajos han demostrado que una abundante diversidad microbiana del suelo incrementa la resistencia a plagas (Mendes *et al.* 2015; Balestrini *et al.* 2015); la capacidad de recuperación del proceso microbiano (Girvan *et al.* 2005 citado por Mendes *et al.* 2015); e incluso, se ha confirmado que el microbioma del suelo impacta en la composición del metaboloma de la hoja (Badri *et al.* 2013).

Caracterización del microbioma

Los diversos enfoques moleculares basados en la secuenciación y análisis filogenéticos de los genes ADNr 16S nos han permitido detectar y caracterizar la gran diversidad de los microorganismos del suelo (Thies 2015; Zhou *et al.* 2015). Sin embargo, en recuentos directos de las bacterias del suelo se suele obtener de una mayor cantidad de microorganismos que los identificados molecularmente mediante técnicas dependientes de cultivo (Thies 2015).

Considerando que sólo se identifica alrededor del 1% de la diversidad microbiana mediante cultivo *in vitro*; se han desarrollado diferentes

enfoques de estudios de los microorganismos ambientales, entre ellos: las pruebas sin amplificar mediante el análisis de ácidos nucleicos *in situ* como la hibridación de ácidos nucleicos; y el análisis mediante metagenómica, que implica la secuenciación directa del ADN independiente de cultivo microbiano (Handelsman 2004; Tyson *et al.* 2004; Thies 2015).

- *Hibridación de ácidos nucleicos*

La hibridación de ácidos nucleicos implica la unión de una corta cadena de ácido nucleico complementaria (sonda) a una secuencia diana. La sonda es generalmente etiquetada con un radioisótopo o una molécula fluorescente y la secuencia diana está unido a una membrana de nylon u otra superficie sólida (Thies 2015).

Las sondas de hibridación de ácidos nucleicos se utilizan para detectar grupos filogenéticos específicos de bacterias, arqueas o eucariotas en muestras de suelo preparados adecuadamente mediante el uso de la técnica FISH, "Fluorescent In Situ Hybridization" (Amann and Ludwig 2000 citado por Thies 2015).

La principal ventaja de la técnica FISH es la capacidad de visualizar e identificar organismos en su ambiente natural. Sin embargo, la fluorescencia inespecífica es un problema común en suelos con alto contenido de materia orgánica como la turba u otras partículas (Thies 2015).

- *Metagenómica*

A partir de la década de los 90, surgieron varios métodos moleculares capaces de analizar la comunidad microbiana, tales como: la PCR basada en la amplificación mediante la clonación de genes; la secuenciación de los genes ADNr 16S y genes funcionales; electroforesis en gel desnaturizante en gradiente (DGGE); el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP) (Zhou *et al* 2015).

Sin embargo las actuales tecnologías moleculares de alto rendimiento han desplazado a las técnicas antecesoras en la caracterización de comunidades microbianas, entre ellos: la secuenciación de ADN / ARN de alto rendimiento; PhyloChip; GeoChip; la proteómica basada en espectrometría masiva para análisis de comunidades y el metaboloma (Zhou et al 2015).

El análisis metagenómico se inicia al extraer el ADN directamente de una muestra ambiental, si este es sometido a la amplificación por PCR antes de la secuenciación utilizando los iniciadores para genes específicos se le denomina metagenómica dirigida (Hirsch, Mauchline and Clark 2010).

Dentro del grupo de iniciadores específicos utilizados para la identificación una taxa en particular, se emplea los iniciadores de la región V4 de los genes ADNr 16S que sirve para determinar el número relativo de genes ADNr 16S provenientes de bacterianas y arquea; asimismo establecer la diversidad taxonómica general de estos organismos en el suelo (Roesch *et al.* 2007).

Los métodos descritos producen grandes conjuntos de datos, también denominado metada, los cuales son analizados bajo un enfoque computacional que depende del método de secuenciación empleado; el cual permite identificar los OTUS, representar la filogenia de los grupos taxonómicos y la abundancia relativa de la comunidad analizada (Hirsch, Mauchline and Clark 2010).

Con el aumento de los proyectos de metagenómica y bases de datos disponibles públicamente, se han desarrollado servidores libres para el análisis de datos de secuencias de metagenómica; un ejemplo es: MG-RAST (Meyer *et al.* 2008), el servidor metagenómica libre donde se puede clasificar, relacionar filogenéticamente los OTUS y reconstruir la ruta metabólica de la metadata ingresada. Este servidor ha sido

utilizado para identificar microbiomas y perfiles metabólicos en diferentes biomas (Dinsdale *et al.* 2008; Ottesen *et al.* 2013; Chaparro *et al.* 2013; Basak *et al.* 2016).

2.3 Definición de términos básicos

ADN metagenómico: es el ADN que es extraído directamente de una muestra ambiental (Bragg and Tyson 2014).

Análisis de componentes principales: Es una representación gráfica que reduce la dimensionalidad de las comparaciones de múltiples muestras considerando las anotaciones taxonómicas o funcionales. La reducción de la dimensionalidad permite encontrar las variaciones complejas en un gran conjunto de datos (como: valores de abundancia de miles de anotaciones de especies a través de docenas de muestras de metagenómicas, etc.), que al reducirse a un número mucho más pequeño de variables se pueden visualizar como un sencillo gráfico de dispersión de dos o tres dimensiones. Las muestras que exhiben perfiles de abundancia taxonómicas similares (o funcionales) se agrupan, mientras que los que difieren se encuentran más separados. Además, mediante este análisis se puede comparar con otras variables para determinar correlaciones (Wilke *et al.* 2015).

Bacterias promotoras del crecimiento: son las bacterias del suelo que colonizan las raíces de las plantas mediante su inoculación sobre la semilla y que mejoran el crecimiento de plantas, se clasifican en:

- a. **Controladores biológicos:** son los microorganismos que realizan el control de patógenos mediante la producción de metabolitos que reducen la densidad poblacional y/o actividad de microorganismos patógenos. Ejemplo: producción de sideróforos, los cuales fijan los iones de hierro, haciendo que no estén disponibles para los microorganismos patógenos.

- b. **Biofertilizantes:** mejoran la absorción de nutrientes de la planta, aumentando la germinación y emergencia de las plántulas; mejorando así el rendimiento de los cultivos.

- c. **Bioestimulantes:** involucrados en la producción de fitohormonas, como las auxinas, ácido indolacético (AIA), citoquininas, riboflavina y vitaminas (Prashar, Kapoor and Sachdeva 2014).

Base de datos ribosomales: es una colección de informaciones de secuencias de ARN ribosomal, entre ellos se encuentran: RDP (Ribosomal Database Project); SILVA y Greengenes (Wilke *et al.* 2015).

Comunidad: El conjunto de especies que coexisten en un lugar y tiempo (Begon, Harper and Townsend 1996).

Curva de rarefacción: La curva de rarefacción es una representación gráfica de la riqueza de especies; el cual muestra el número total de anotaciones de especies distintas en función del número de secuencias en la muestra. En este gráfico, la pendiente de la parte derecha de la curva está relacionada con la fracción de las especies en la muestra que son poco frecuentes; la pendiente pronunciada a la izquierda indica que una gran fracción de la diversidad de especies que queda por descubrir. Si la curva se aplana hacia la derecha indica que se identificó un número razonable de individuos (Wilke *et al.* 2015).

Electroforesis: es una técnica de separación de una mezcla de ADN, ARN o proteínas acorde a su tamaño molecular y dependiendo de la carga de las moléculas (negativo en caso de ADN y ARN), los cuales son migrados a través de una matriz gelatinosa (gel agarosa o poliacrilamida) en presencia de un campo eléctrico (Scitable 2014).

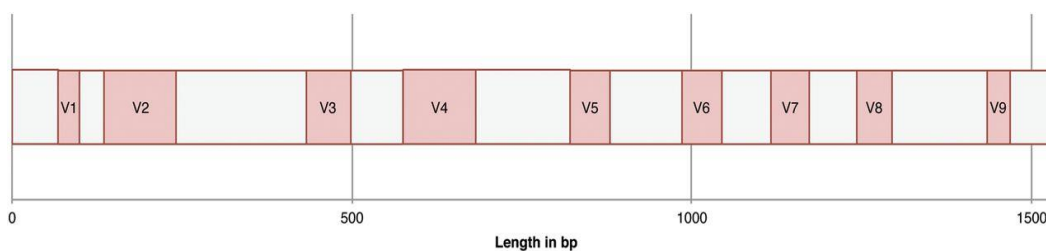
Diversidad alfa: es la diversidad dentro de un área o ecosistema en particular, que se expresa por lo general como el número de taxones y la abundancia de cada taxón dentro de una comunidad (Zhou *et al.* 2015).

Diversidad beta: se refiere a la variabilidad en la composición de taxones entre las comunidades (Zhou *et al.* 2015)

Heatmap: El HeatMap/dendrograma es la representación gráfica de una gran cantidad de información, en el cual los dendrograma indican similitudes entre los vectores de anotación. El heatmap graficado por MG-RAST tiene dos dendrogramas, uno que indica la semejanza/diferencia entre las muestras de metagenómica (dendrograma del eje x) y otro que indica la similitud/diferencia entre las categorías de anotación (dendrograma del eje y). Estos son graficados mediante un algoritmo de agrupamiento que produce los dendrogramas. Además, el gráfico clasifica estas similitudes/distancias basándose en una métrica de perfiles de abundancia de cada muestra (Wilke *et al.* 2015).

Metagenómica dirigida al gen ADNr 16S: Actualmente la identificación microbiana se ha desarrollado mediante el enfoque de secuenciación a gran escala de una región particular del ADN, el gen ADNr 16S, también conocido como el gen ribosomal de la subunidad pequeña (SSU). El gen ADNr 16S es un marcador filogenético ampliamente utilizado para la identificación microbiana y clasificación filogenética. Está presente en todos los organismos procariotas y está compuesto por un intercalado eje homólogo con nueve regiones de hipervariabilidad (bloques rosados) que se han utilizado para la identificación de organismos a nivel de especie o cepa (Breakwell, Tetu and Elbourne 2014).

Regiones hipervariables del gen ADNr 16S



Fuente: Cox, Cookson and Moffatt 2013

OTU: En el enfoque de la ecología microbiana molecular se estima la riqueza de especies en base a las secuencias de genes ADNr 16S; estas secuencias se agrupan como unidades operativas taxonómicas (Operational Taxonomic Unit, OTU) o filotipos; las cuales son analizadas y asignadas a un grupo taxonómico según el porcentaje de identidad que alcancen con un grupo de secuencias de una determinada base de datos (Schloss and Handelsman 2005; Breakwell, Tetu and Elbourne 2014).

PCR: Es la abreviatura en inglés de Polimerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa. Esta técnica que se basa en hacer múltiples copias *in vitro* de una determinada región del ADN a partir de una mezcla de: pares de secuencias cortas (iniciadores oligonucleotídicos) de ADN complementarias a la región blanco, nucleótidos libres y una enzima llamada ADN polimerasa. El proceso de amplificación se realiza en una máquina llamada termociclador que incrementa y disminuye la temperatura programada en pasos: desnaturalización (en este paso la temperatura incrementa para separar las hebras de ADN), hibridación (se enfría hasta una temperatura ideal en la que los oligonucleótidos o iniciadores se hibridan a la región complementaria y el ADN polimerasa empieza a sintetizar la nueva cadena de ADN) y elongación (etapa de culminación de la nueva cadena de ADN). Al término de la síntesis y finalización del primer ciclo, cada hebra del ADN inicial formó una nueva cadena de ADN. Estos pasos se repiten en ciclos, en base a los nuevos segmentos de ADN sintetizados, lo que permite amplificar exponencialmente a millones de veces la región de interés del ADN (Scitable 2014).

Suelo: El suelo es la capa más externa de la corteza terrestre, interface entre la atmósfera y la litósfera; está compuesto por cinco ingredientes principales: minerales, materia orgánica, organismos vivos, gases y agua. Los minerales están divididos en tres tipos: arenas, arcillas y limos. Los porcentajes de estos tres componentes definen la textura del suelo. La materia orgánica está compuesta por restos de microorganismos, animales y plantas en descomposición y es un ingrediente crítico de la composición del suelo (Carbonetto *et al.* 2014).

Técnicas de secuenciación de segunda generación (NGS). Los avances tecnológicos han conducido al desarrollo de la secuenciación de segunda generación (Next Generation Sequencing, NGS), también conocida como secuenciación masiva paralela. Estas nuevas técnicas de secuenciación han permitido secuenciar millones de fragmentos de ADN de forma paralela a un precio mucho más barato por base. Además, la secuenciación masiva tiene el potencial de detectar todos los tipos de variaciones genómicas en un único experimento, incluyendo variaciones de nucleótido un solo nucleótido (Single Nucleotide Polimorfism, SNP) o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones (Escalante *et al.* 2014), entre ellos:

a. **Secuenciación 454.** El ADN es inicialmente fragmentado o amplificado. Los fragmentos (200 a 800bp) son ligados a adaptadores juntos con unas esferas para luego ser amplificados mediante una PCR de emulsión. Los fragmentos amplificados se hibridan con los oligonucleótidos que posee la esfera. cada perla es depositada en un pocillo de una placa picotituladora, aquí es donde empieza la pirosecuenciación, donde se sintetiza la cadena complementaria a la molécula de ADN adherida a la perla. Esta reacción se desarrolla en presencia de dos enzimas, luciferasa y sulfurilasa, que se encuentran acopladas a otras esferas. Estas enzimas reaccionan al incorporarse un nucleótido a la molécula de ADN molde y emiten una luz. La secuenciación 454 puede alcanzar a 1 millón de lecturas por corrida de una longitud aproximada 650 a 800bp. Tiene una tasa de error de 0.1-

1%, el cual puede ser sustituciones o inserciones-delecciones (indels) (Escalante *et al.* 2014, Quail *et al.* 2012 y Glenn 2011).

- b. *Mi-seq*: Fragmentos de ADN de 60 a 300 pb son seleccionados, ligados a adaptadores y luego depositados en una placa donde se unirán a la matriz de secuenciación para ser amplificados mediante la tecnología de PCR en puente; la unión de un nucleótido conduce a la emisión de una determinada fluorescencia específica de cada nucleótido. Esta técnica permite la secuenciación de unos 200 millones de fragmentos de una longitud de 150 a 300 bp. Tiene una tasa de error de 0.8%, el cual puede originar sustituciones (Escalante *et al.* 2014, Quail *et al.* 2012 y Glenn 2011).

- c. *Ion Torrent PGM*: Esta plataforma de secuenciación es semejante a la secuenciación 454 donde el ADN es fragmentado y los fragmentos son ligados a adaptadores permitiendo el apareamiento por complementariedad con los adaptadores fijados sobre perlas depositadas individualmente en pocillos de una placa (165 -600 millones) donde se realizan, en paralelo, las reacciones de PCR en emulsión. Esta placa posee un sensor de iones que registra cambios de voltaje muy pequeños a nivel de cada pocillo, estos cambios de voltaje conducen a la liberación de protón H⁺ durante la incorporación de cada nucleótido en el proceso de síntesis de la amplificación. Este método de secuenciación da más de 5 millones de lecturas por corrida, con una longitud de lectura de aproximadamente 230 bp. Tiene un rango de error de 1.7%, el cual es del tipo de indels (Escalante *et al.* 2014, Quail *et al.* 2012 y Glenn 2011).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Localidad y periodo de ejecución

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de INCABIOTEC SAC, Tumbes, Perú; se desarrolló durante el periodo (agosto – 2014 al diciembre - 2015).

3.2 Población, muestreo y muestra

Las poblaciones consideradas en el presente trabajo fueron el suelo prístino (sin manejo agronómico) y el suelo cultivado con vid de la empresa ECOSAC AGRICOLA S.A.C. ubicada en Castilla (Piura, Perú) (Anexo1). Las muestras de suelo prístino fueron tomadas de 4 puntos diferentes equidistantes de 30 cm de profundidad (Anexo 2A). En el caso del suelo cultivado, se colectó las muestras de suelo pertenecientes a la ectorizósfera (Prashar, Kapoor and Sachdeva 2014) de 4 vides en el parrón #6 de los viñedos de ECOSAC; se tomó el suelo de cuatro puntos equidistantes al tronco (15 cm) a una profundidad de 20 cm de cada vid variedad Sugraone/Freedom (Anexo 2B). Las muestras fueron divididas en dos grupos para los posteriores análisis y conservadas a 4°C hasta su uso.

3.3 Material y métodos

Aislamiento de bacterias de suelo prístino y cultivado e identificación molecular. El primer grupo de muestras de suelo prístino y suelo cultivado se utilizó para el aislamiento de bacterias en ambos tipos de suelo. Para cada muestra se pesó 1 g y se agregó 10 ml de Caldo Soya-Tripticasa; las suspensiones de suelo fueron incubadas a temperatura ambiente en homogenización continua de 1000 rpm/min por toda la noche. A cada muestra se les realizó diluciones seriadas hasta 10^{-6} y fueron sembradas en Agar Soya-Tripticasa. Las placas se incubaron por 48 horas a

temperatura ambiente y se purificaron las bacterias de ambas muestras en Caldo Soya-Trypticasa.

- *Identificación molecular de las cepas aisladas mediante la secuenciación parcial de los amplicones del gen ADNr 16S.* Las bacterias obtenidas se sembraron en duplicado, un grupo para conservarlas en glicerol (12%) a -20°C y al otro grupo se le realizó la extracción de ADN basándose en el protocolo de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) descrito por Ausubel *et al.* (2003) modificado por Jara *et al.* (2008). El ADN de las cepas aisladas fue amplificado con la región 27/1492 del gen ADNr 16S, bajo las siguientes condiciones: buffer 1x; 1.5mM de MgCl₂; 1.25mM dNTPs; 0.36 µM de primers; 0.5U de Taq polimerasa y 10 ng/µl de ADN molde. La programación de la amplificación fue: pre-desnaturalización a 94 °C durante 4 min, seguido por 35 ciclos de: desnaturalización 92 °C por 30s, Alineamiento (Ta) por 1 min, extensión o elongación de la cadena 72 °C por 2 minutos; por último, la elongación Final a 72°C por 7 minutos. Los productos de PCR fueron observados mediante la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X. Los amplicones fueron comparados en tamaño con un control positivo de amplificación al gen ADNr 16S que sirvió como referencia entre las muestras positivas y artefactos de migración. Los amplicones obtenidos fueron purificados y secuenciados por MACROGEN, USA (<https://www.macrogenusa.com/>).

Caracterización molecular de las comunidades bacterianas del suelo prístino y cultivado con vid. La identificación de las comunidades se realizó mediante dos métodos de extracción:

- *Extracción de ADN metagenómico de muestras de suelo basado en Amorim et al. (2008).* Este procedimiento analizó una sola muestra representativa (Gobran and Clegg 1996) de suelo prístino (SP_P) y de suelo cultivado con vid (SC_P). Este protocolo fue desarrollado a partir de 4 g de muestra de suelo previamente tamizada de impurezas

(piedras y/o raíces); la muestra fue incubada en 10 ml de buffer sodio-fosfato (PBS) 1X pH7, conteniendo 0.1% de tween 80 por toda la noche a temperatura ambiente en agitación constante. La suspensión fue transferida a un nuevo tubo, el cual fue centrifugado a 5500 rpm por 10 minutos, el sobrenadante resultante fue descartado. Al pellet obtenido se le agregó 0.1 g de perlas de vidrio y fue macerado por 1 minuto en vortex. Posteriormente se lavó el pellet dos veces, en este paso se agregó 3 ml de buffer TE 50/50 (50 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA) al pellet, se homogenizó fuertemente por 1 minuto y se centrifugó a 5500 rpm por 5 min, el sobrenadante obtenido después de la centrifugación se descartó. Al pellet resultante se le adicionó 2 ml de TE 50 /50; 20 µl de lisozima (50 mg/ml); 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y 2 µl de ARNasa, la muestra se homogenizó e incubó a 37°C por 15 minutos; al finalizar la incubación, se adicionó 200 µl de SDS 10% y se incubó por 1 hora a 65°C. Luego, se realizó un choque térmico para la promover la lisis celular; en este paso la muestra fue congelada por 5 minutos en nitrógeno líquido y luego transferida a agua hirviendo (100 °C) por 15 minutos, este paso se repitió tres veces. Terminado el choque térmico, a la muestra se le adicionó un volumen de fenol:cloroformo:isoamilico (25:24:1) y se centrifugó por 5500 rpm durante 20 minutos; el sobrenadante se recuperó en un microtubo de 1.5 ml estéril, al cual se le adicionó 500 µl de PEG 8000 y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. Culminada la incubación, se centrifugó a 9000 rpm por 20 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se disolvió en 500 µl de TE 10/1 (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA); se añadió 50 µl de acetato de potasio a 5 M y se incubó a 4°C por 15 minutos, luego se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante obtenido fue recuperado en un nuevo microtubo, al cual se le añadió 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamilico (25:24:1) y fue centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. La fase acuosa fue recuperada en un nuevo microtubo, se le añadió 0.7 volumen de isopropanol helado y fue incubado por toda la noche a -20°C. Posteriormente, el ADN fue colectado por centrifugación a 10000 rpm por 10 minutos, el pellet resultante fue lavado con etanol helado 95% y

centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos; adicionalmente, fue lavado con etanol al 70% y centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos. Para culminar, se dejó secar a temperatura ambiente por 15 minutos, y fue resuspendido en 30 µl de buffer TE 10/1 y almacenado a -20°C hasta su uso.

- *Extracción de ADN metagenómico de muestras de suelo mediante kit Power Soil.* Las muestras: SC1; SC2; SC3 y SC₄, se procesaron individualmente; se pesó 0.25 g y se dispensaron en tubos de 2 ml del kit de extracción POWER SOIL de MoBio (Laboratorios MoBio, Carlsbad, CA) y se realizó la extracción bajo las instrucciones del proveedor.

Con la finalidad de comprobar presencia de ADN bacteriano en el proceso de extracción se amplificó el gen ADNr 16S, para esto se trabajó con los primers 27F: 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' y 1492R: GGTTACCTTGTTACGT. Las condiciones de PCR fueron: 1x de Taq DNA Buffer; 200 µM de dNTPs; 0,3 µM de iniciador; 1.5 mM de MgCl₂; 0,3 U de polimerasa y 10 ng de ADN, en un volumen final de 25µl. La programación de la amplificación fue: pre-desnaturalización a 94 °C durante 4 min, seguido por 35 ciclos de: desnaturalización 92 °C por 30s, Alineamiento (Ta) por 1 min, extensión o elongación de la cadena 72 °C por 2 minutos; por último, la elongación Final a 72°C por 7 minutos. Los productos de PCR fueron observados mediante la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X. Los amplicones fueron comparados en tamaño con un control positivo de amplificación al gen ADNr 16S que sirvió como referencia entre las muestras positivas y artefactos de migración.

Secuenciación mediante Ion Torrent PGM. Los ADN con amplificación positiva en las pruebas comprobatorias de la región ADNr 16S fueron seleccionados para continuar los siguientes análisis. La amplificación dirigida a la región V4 y la secuenciación fueron tercerizadas a MR. DNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, EE.UU.). Los iniciadores utilizados para amplificación de la región variable de V4 fueron 515/806 (Caporaso et

al. 2011); la amplificación se desarrolló usando el kit de HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen, EE.UU.) en las siguientes condiciones: 94 °C durante 3 minutos, seguido por 28 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 53 °C durante 40 segundos y 72 °C durante 1 minuto, después de lo cual se realizó una etapa de elongación final a 72 °C durante 5 minutos. La secuenciación se realizó mediante la plataforma de secuenciación Ion Torrent PGM siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4 Procesamiento y análisis de datos

Las secuencias de los amplicones obtenidos a partir de la amplificación del gen ADNr 16S fueron ensambladas manualmente por sobreposición y alineadas con la base de datos GENE BANK mediante el software BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Los datos obtenidos a partir de la metagenómica dirigida al gen ADNr16S fueron procesados mediante el análisis específico de propiedad de MR DNA (Shallowater, TX, EE.UU.), tomando en cuenta las siguientes consideraciones: se descartaron las secuencias con bases ambiguas, con alto ruido y OTUS formados por secuencias quiméricas. Las muestras secuenciadas fueron enviadas en un solo archivo, cada muestra fue separada individualmente mediante el programa Bining.exe (software libre).

El análisis de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) de cada muestra fue realizado con el software MG-RAST (<http://metagenomics.anl.gov/>), mediante este software los OTUs fueron clasificados taxonómicamente usando base de datos curada Greengenes, teniendo en cuenta que no se exceda el 3% de divergencia (97% de similitud), con un máximo e value 10^{-30} y una longitud mínima de alineamiento de 50 pb; mediante este software se elaboró: el árbol filogenético de los OTUs; el gráfico del análisis de coordenadas principales (PCoA) fue elaborado en base a la distancia de Bray Curtis y el gráfico

Heatmap fue elaborado en base al método de agrupamiento Ward y a la distancia de Bray Curtis.

Mediante la tabla de abundancia de OTUs de cada metagenómica obtenida por MG-RAST, se calculó: a. la abundancia relativa (a.r.) en relación a la cantidad total de abundancia de cada muestra mediante hoja de cálculo Excel; b. la curva de rarefacción, el índice de riqueza de especies, la diversidad α y β mediante el software PAST V. 3.11.

4. RESULTADOS.

4.1 Caracterización de las microbiotas de suelos basada en técnicas dependientes de cultivo *in vitro*

La caracterización de las microbiotas de suelos estuvo inicialmente basada en técnicas dependientes de cultivo *in vitro*. Se aislaron un total de 66 cepas a partir de un pool de muestras de suelo prístino y un pool de muestras de suelo cultivado. Mediante la secuenciación parcial de los amplicones del gen ADNr 16S (Anexo 3) se identificaron 16 géneros bacterianos en suelo prístino y en suelo cultivado con vid (Figura 1).

En suelo prístino predominaron los géneros: *Cronobacter* (abundancia relativa, a.r.:0.25); *Bacillus* (a.r.:0.21); *Bordetella* (a.r.:0.18) y en menor proporción: *Lactobacillus*; *Streptomyces*; *Pantoea*; *Cupriavidus*; *Inquilinus*; *Escherichia*, todos con 0.04 a.r.; mientras que en suelo cultivado los géneros más predominantes fueron: *Enterobacter* (a.r.0.34); *Pseudomonas* (a.r.:0.32); *Aeromonas* (a.r.:0.29) y en menor proporción: *Bacillus* y *Plesiomonas* (a.r. 0.03)

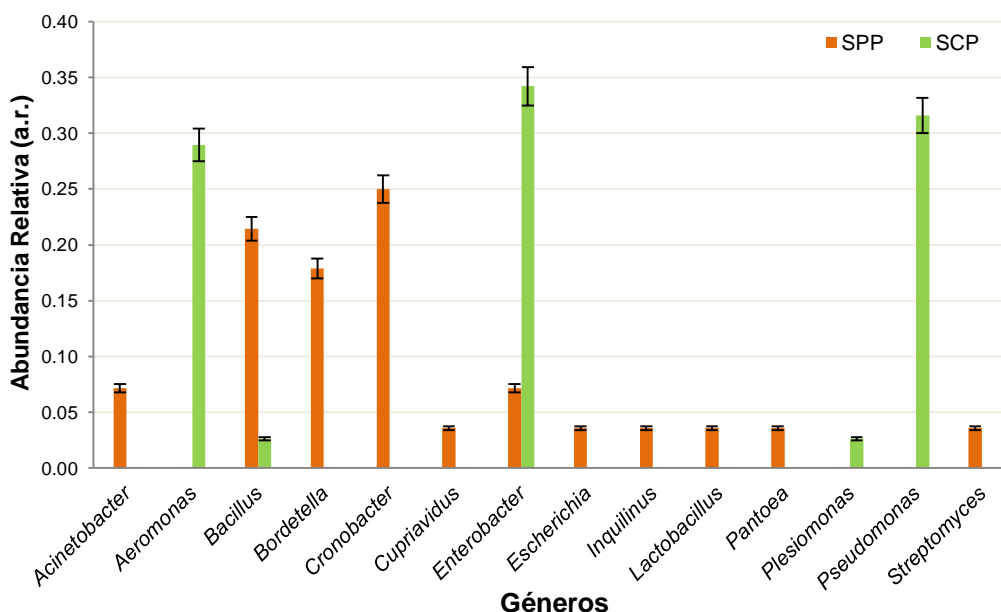


Figura 1. Representación de la abundancia relativa de géneros correspondientes a las cepas aisladas de suelo prístino (SP_p) y suelo cultivado (SC_p). Gráfico elaborado con el programa Excel.

Tabla 1. Asignación taxonómica de las cepas bacterianas aisladas a partir de suelo prístino.

Filo	Clase	Género	N° cepas	Especies (NCBI)	% Identidad				
Actinobacteria	Actinobacteria	Streptomyces	1	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	NR074563.1	99%			
			2	<i>Bacillus endophyticus</i>	KC237279.1 EU221417.1	100% 99%			
Firmicutes	Bacilli	Bacillus	1	<i>Bacillus sp.</i>	DQ416801.1	99%			
			3	<i>Bacillus subtilis</i>	EU257453.1 EU047884.1	99% 99%			
			1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	JN587510.1 CP005942.1	99% 98%			
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	Inquilinus	1	<i>Inquilinus limosus</i>	AY043375.1	99%			
			Betaproteobacteria	Cupriavidus	1	<i>Cupriavidus sp.</i>	HE660045.1	99%	
					Betaproteobacteria	Pantoea	1	<i>Pantoea ananatis</i>	DQ133546.1
	Acinetobacter	Acinetobacter	2	<i>Acinetobacter baumannii</i>			EU883589.1 JX966428.1	99% 99%	
			Bordetella	Bordetella	5	<i>Bordetella sp.</i>	KC195878.1 KC195878.1	99% 99%	
	Gammaproteobacteria	Cronobacter			Cronobacter	7	<i>Cronobacter sakazakii</i>	HQ652590.1 KC195878.1 HQ652590.1 JF330136.1 HQ880403.1	98% 99% 98% 99% 99%
			Enterobacter	Enterobacteriaceae		1	<i>Enterobacter sakazakii</i>	KC818230.1 GU339283.1	99% 99%
						1	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	JQ963900.1 KC818232.1 GU227665.1	99% 99% 99%
	TOTAL			28	<i>Escherichia hermannii</i>	AY803186.1 DQ288160.1 JX968501.1	99% 99% 99%		

Tabla 2. Asignación taxonómica de cepas bacterianas aisladas a partir de suelo cultivado con vid.

Filo	Clase	Género	N° cepas	Especie NCBI	KF048924	% Identidad
<i>Firmicutes</i>				<i>Bacillus sp. MRSE2</i>	KF048924	100%
		<i>Bacillus</i>	1			
			2	<i>Aeromonas caviae</i>	JF920483	99%
			1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	JF920483	99%
			1		KC906257	100%
			5	<i>Aeromonas punctata</i>	GU205197	99%
		<i>Aeromonas</i>			AM184293	99%
					AM184293	99%
					GU205197	99%
			1	<i>Aeromonas sp. MH1</i>	GU205198	99%
			1	<i>Aeromonas sp. SR5.11</i>	EU862316	100%
			1	<i>Aeromonas veronii</i>	JQ912612	99%
			2	<i>Enterobacter aerogenes</i>	JQ013893	99%
					KC990787	99%
					FO203355	99%
					JX495602	99%
					KC990811	99%
					KC990811	99%
			8	<i>Enterobacter cloacae</i>	KC660137	99%
		<i>Enterobacter</i>			JN644526	99%
					CP003678.1	99%
					CP003678.1	99%
					CP003678	99%
			2	<i>Enterobacter sp.</i>	JQ396391	99%
					JN391530	99%
			1	<i>Enterobacter sp. AMAAS2</i>	JN391530	99%
		<i>Plesiomonas</i>	1	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	JN571746	99%
			1	<i>Pseudomonas fulva</i>	KC510008	99%
		<i>Pseudomonas</i>	1	<i>Pseudomonas pavonaceae</i>	AY054374	98%
			9	<i>Pseudomonas putida</i>	GU396283	99%
			1	<i>Pseudomonas sp. MKP 213</i>	KC013979	100%
			38			
				16		
				TOTAL		

Las especies de las cepas aisladas que predominaron en suelo prístino fueron: *Bacillus subtilis* (a.r.:0.11), *Bordetella sp.* (a.r.:0.18) y *Cronobacter sakazakii* (a.r.:0.25) (Tabla 1); y en suelo cultivado fueron: *Aeromonas punctata* (a.r.:0.13), *Enterobacter cloacae* (a.r.:0.21) y *Pseudomonas putida* (a.r.:0.24) (Tabla 2).

4.2 Caracterización y comparación de las microbiotas de suelos, prístino y cultivado, basadas en técnicas independientes de cultivo in vitro

La caracterización de las microbiotas de suelos estuvo adicionalmente basada en técnicas independientes de cultivo *in vitro*. Las muestras de ADN suelo prístino (SP_P) y suelo cultivado con vid (SC_P) que fueron secuenciadas (Anexo 4) se analizaron en MG-RAST, cuyo ID de proyecto fue 15468. Se obtuvo un total de 10880 secuencias con una longitud promedio de 144 bp en las muestras de suelo prístino (SP_P) y 45850 secuencias de con una longitud promedio de 192 pb en suelo cultivado (SC_P).

Estructura de las comunidades microbianas.

Un 98.9% de las lecturas obtenidas a partir de las muestras de suelo prístino y suelo cultivado mediante la metagenómica dirigida al gen ADNr 16S pertenecieron al Dominio *Bacteria* según la base de datos Greengenes y 1.6% a otros Dominios (Tabla 3).

Tabla 3. Descripción de las muestras de metagenómica de suelo prístino y suelo cultivado con vid.

Cód.	Descripción muestra	Código MG- RAST	ID Proy. MG-RAST	Proyecto MG-RAST	Secuencias	Long. Secuencias*	Dominio Bacteria	Otros Dominios
SP _P	Suelo prístino**	4669010.3	15468	Pristine and vineyard soil microbiome, Peru	10880	228 bp	99.5%	0.5%
SC _P	Suelo cultivado***	4669012.3			45850	192 bp	98.3%	1.7%

(*) Promedio; (**) conjunto de muestras de suelo prístino; (***) conjunto de muestras de suelo cultivado.

En cuanto a los análisis taxonómicos, en suelo prístino y cultivado, el filo más abundante fue *Proteobacteria*. A su vez, las comunidades bacterianas de suelo prístino y cultivado con vid, presentaron variaciones en su composición, como es el caso del Filo *Actinobacteria*, el cual presentó una variación importante (20 veces mayor) en suelo cultivado que en suelo prístino; en el caso del Filo *Bacteroidetes* se observó una ligera variación (dos veces mayor) en suelo cultivado; por el contrario el Filo *Proteobacteria* disminuyó (a.r.: 0.52 a 0.35) en suelo cultivado al igual que el Filo *Firmicutes*, que disminuyó ligeramente en suelo cultivado. (Figura 2).

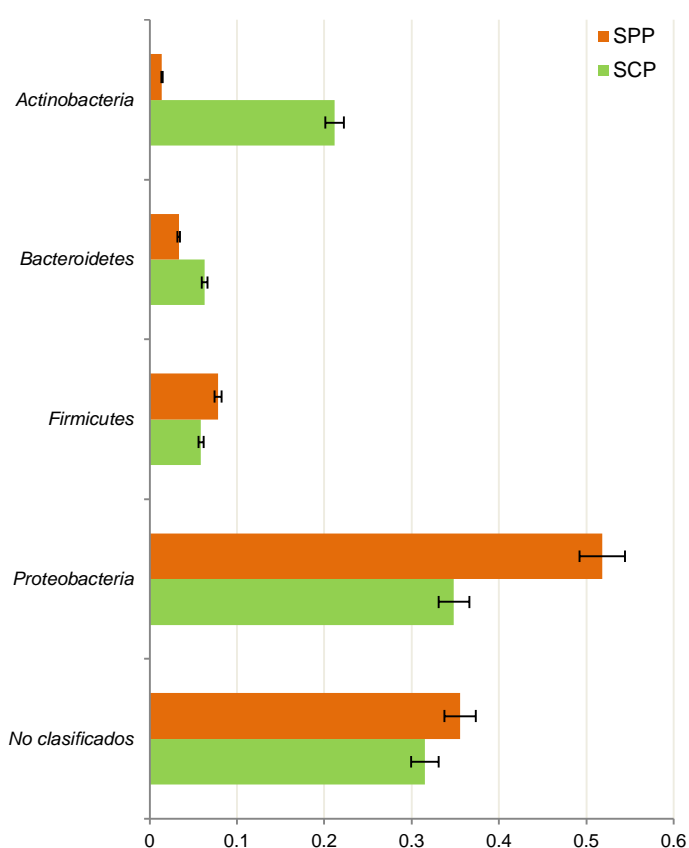


Figura 2. Abundancia relativa (a.r.) de los filos del Dominio *Bacteria* presentes en suelo prístino (SP_P) y suelo cultivado (SC_P). Barras representan error estándar ± 0.05 . Gráfico elaborado con el programa Excel.

A nivel de géneros, fueron identificados en suelo prístino y en suelo cultivado con vid, un total de 136 géneros que están representados en el árbol filogenético en la Figura 3.

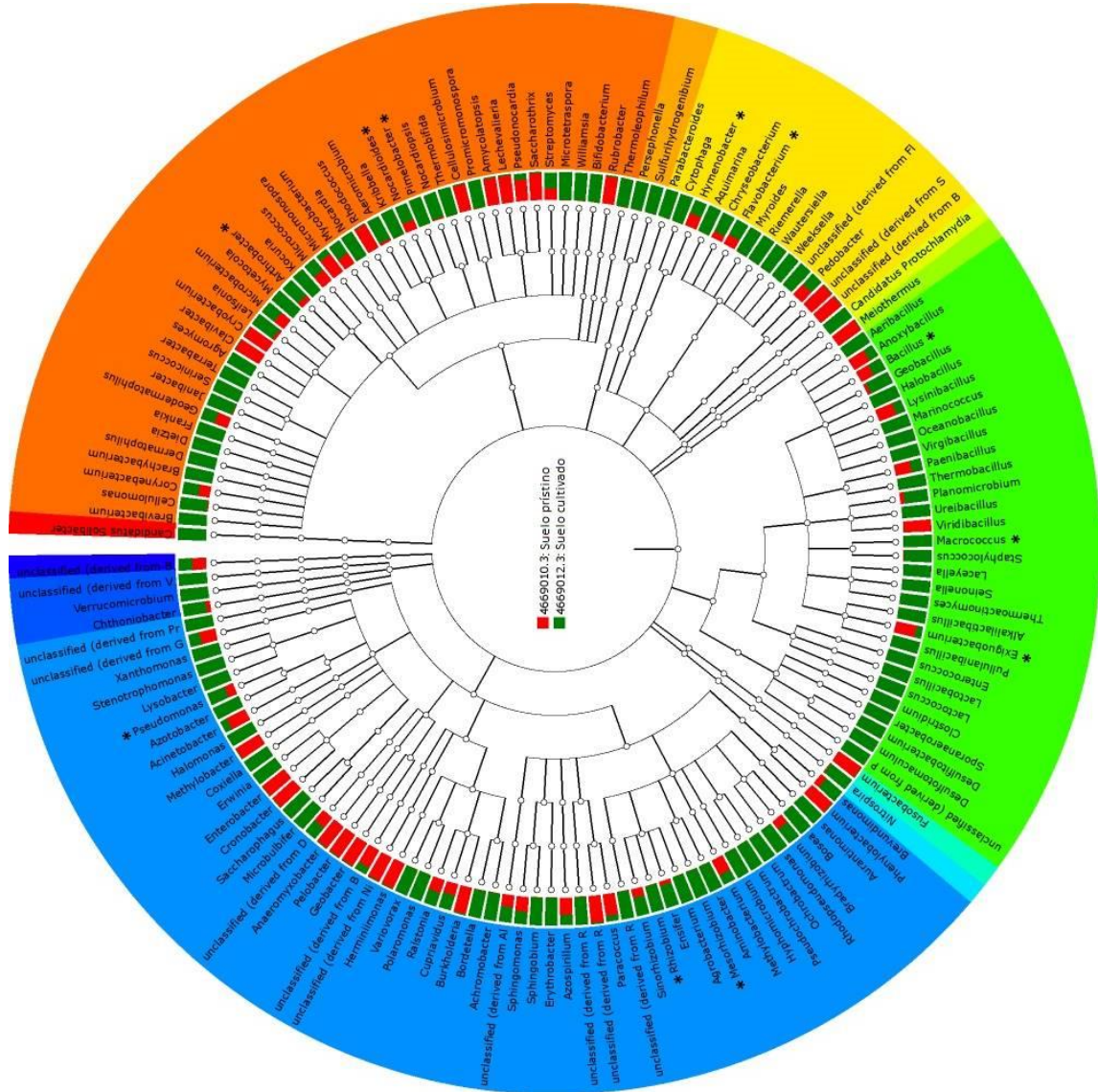


Figura 3. Árbol filogenético de los géneros presentes en suelo pristino y suelo cultivado. Las barras representan la presencia de determinados OTUs según la muestra. (*) Géneros > 0.01 a.r. Cód. MG – RAST: 4669010.3, rojo: Suelo pristino (SPP). Cód. MG – RAST: 4669012.3, verde: Suelo cultivado con vid, (SCP). Gráfico elaborado por el software MG-RAST.

- Filo**
- Acidobacteria
 - Actinobacteria
 - Aquificae
 - Bacteroidetes
 - Chlamydiae
 - Deimonococcus-Thermus
 - Firmicutes
 - Fusobacteria
 - Nitrospirae
 - Proteobacteria
 - Verrucomicrobia
 - unclassified (derived from Bacteria)

Los géneros que tuvieron una abundancia relativa mayor a 0.01, en suelo prístino fueron *Bacillus* (a.r.:0.05); *Hymenobacter* (a.r.:0.02) y *Exiguobacterium* (a.r.:0.01), los cuales disminuyeron en suelo cultivado. Además, en esta muestra se identificaron dos grupos del Filo *Proteobacteria* que agruparon alta cantidad de lecturas de los que sólo llegaron a clasificarse taxonómicamente a nivel de clase: *Betaproteobacteria* (a.r.:0.01) y *Gammaproteobacteria* (a.r.:0.46). Mientras que en suelo cultivado los géneros que tuvieron una abundancia relativa mayor a 0.01, fueron: *Pseudomonas* (a.r.:0.25); *Nocardiales* (a.r.:0.11); *Arthrobacter*, *Pimelobacter*, *Flavobacterium* y *Rhizobium* (a.r.:0.03); *Hymenobacter*, *Bacillus* y *Macrocooccus* (a.r.:0.02); y *Mesorhizobium* (a.r.:0.01). Los géneros *Arthrobacter*, *Nocardioide*s, *Rhizobium* y *Pseudomonas* aumentaron significativamente en suelo cultivado (Figura 4).

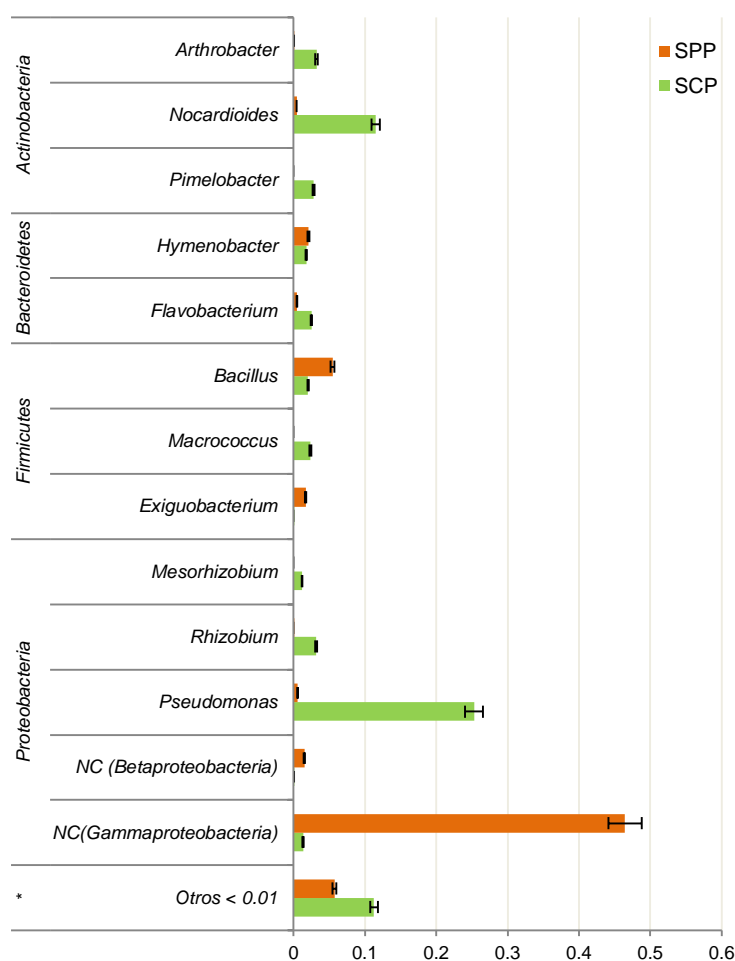


Figura 4. Abundancia relativa (a.r.) de los géneros del Dominio *Bacteria* presentes en suelo prístino (SP_p) y suelo cultivado (SC_p). NC: no cultivado. Barras representan error estándar ± 0.05 . Gráfico elaborado con el programa Excel.

La composición bacteriana a nivel especie de ambas muestras se analizó bajo un valor límite de 97% de identidad de las secuencias, por lo cual se identificó un total de 311 especies en ambas muestras (111 especies para SP_P y 250 especies para SC_P) bajo los parámetros mencionados en la metodología. A partir de ello, se obtuvieron unos 186 OTUS (66 en SP_P y 140 en SC_P) con secuencias \geq 100bp que fueron identificados con las especies reportadas en la base de datos Greengenes con una identidad al 99%.

Entre las especies con 99% de identidad, las que presentaron una a.r. \geq 0.01 en SP_P fueron: *Bacillus aquimaris*, *Exiguobacterium aurantiacum* y *Bacillus niacini*. En suelo cultivado las más abundantes fueron: *Pseudomonas sp.* RW10S2, *Nocardiodes sp.*, *Nocardiodes sp.* IC177. Además, se observaron variaciones entre las especies mencionadas según el tipo de suelo (prístino y cultivado); como es el caso de *Bacillus aquimaris*, cuya abundancia en suelo prístino fue el doble que en suelo cultivado. Además, *Exiguobacterium aurantiacum* y *Bacillus niacini* sólo se presentó en suelo prístino. Las especies *Pseudomonas sp.* RW10S2, *Nocardiodes sp.* IC77 y *Macrococcus carouselicus* sólo se presentaron en suelo cultivado; mientras que *Nocardiodes sp.*, *P. pseudoalcaligenes* y *Arthrobacter arilaitensis* fueron más abundantes en SC_P (100 a 1000 veces) que en suelo prístino (Tabla 4).

Tabla 4. Las especies identificadas en suelo prístino y suelo cultivado con vid.

Filo	Género	Especie	Muestra	Abundancia	e Value promedio	% identidad promedio	Long. de alineamiento promedio
Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	SCP	637	-69.94	99.96	132.56
	<i>Nocardioides</i>	<i>Nocardioides</i> sp.	SCP	1898	-67.12	99.73	129.8
		<i>Nocardioides</i> sp. IC177	SCP	1358	-108.11	98	223.92
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus aquimaris</i>	SPP	252	-101.43	97.15	207.87
			SCP	123	-136.88	98.73	258.7
	<i>Bacillus niacini</i>		SPP	132	-110.66	99.12	207.26
		<i>Macroccoccus carouzelicus</i>	SCP	878	-46.72	99.99	93.88
	<i>Exiguobacterium</i>	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	SPP	209	-112.33	100	204.92
	Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	SCP	662	-125.64	99.99
<i>Pseudomonas</i> sp. RW10S2			SCP	3833	-85.97	100	159.96

*Las especies > 0.01 de abundancia relativa en ambas muestras. SPP: Suelo prístino. SCP: Suelo cultivado

Estimación de la riqueza y diversidad.

La riqueza de especies graficada mediante la curva de rarefacción (Figura 5), mostró la diferencia entre la cantidad de lecturas obtenidas y especies identificadas en ambos suelos.

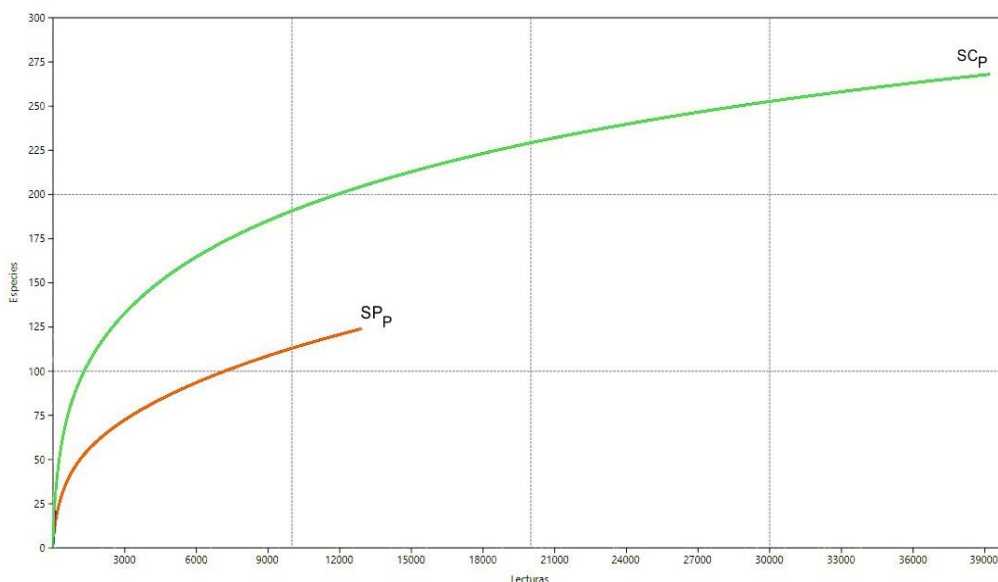


Figura 5. Curva de rarefacción del Dominio Bacteria. Esta figura grafica la riqueza de especies en la muestra de Suelo prístino (SP_p) y Suelo cultivado (SC_p) en relación al número de secuencias obtenidas. Gráfico elaborado con el programa PAST V 3.11.

La riqueza (calculada mediante el Índice CHAO) y la diversidad α (calculada mediante el Índice SHANON) indicaron que ambas incrementan en suelo cultivado (319.5 y 3.03 respectivamente), en comparación a un suelo prístino (185.9 y 0.25, respectivamente); y la diversidad β (Índice Harrison=0.25) indicó que entre ambas muestras comparten algunas de especies (Tabla 5).

Tabla 5. Estimación de la riqueza e índices de diversidad en suelos.

Muestra	Riqueza		Diversidad	
	Observada	Chao	α	β
SP _p	124	185.9	1.67	0.25
SC _p	268	319.5	3.03	

SP_p: suelo prístino; SC_p: suelo cultivado.

4.3 Caracterización y comparación de las microbiotas de suelos cultivados basadas en técnicas independientes de cultivo *in vitro*

Las muestras provenientes de suelos cultivados con vid (Anexo 4) fueron subidas a MG-RAST, cuyo ID de proyecto fue 14730. De las 4 muestras (0.25 g) procesadas con el kit comercial de extracción de ADN se obtuvo un promedio de 26330 secuencias con tamaño promedio de 253 pb. Hay que recordar que en el análisis anterior de la muestra de suelo cultivado (4 g) procesada con un protocolo no comercial de extracción de ADN se obtuvieron 45850 secuencias con tamaño promedio de 192 pb (Tabla 6).

Estructura de las comunidades microbianas

Un 95.98 % de las lecturas obtenidas de las muestras de suelo cultivado mediante la metagenómica dirigida al gen ADNr 16S pertenecieron al Dominio *Bacteria* según la base de datos Greengenes y 4.02 % a otros Dominios (Tabla 6).

Tabla 6. Descripción de las muestras de metagenómica suelo cultivado con vid.

Cód.	Descripción muestra	Código MG-RAST	ID Proyecto	Proyecto MG- RAST	Secuencias	Long. Secuencias*	Dominio Bacteria	Otros Dominios
SC _P	Suelo cultivado***	4669012.3	15468	Pristine and vineyard soil microbiome, Peru	45850	192 bp	98.3%	1.7%
SC ₁	S. cultivado VID #1	4661047.3	14730	Meta-rizósfera uva	23386	253 bp	95.8%	4.2%
SC ₂	S. cultivado VID #2	4661045.3			24945	253 bp	96.6%	3.4%
SC ₃	S. cultivado VID #3	4661050.3			27017	253 bp	95.6%	4.4%
SC ₄	S. cultivado VID #4	4661051.3			29972	254 bp	96.2%	3.8%

(*) Promedio; (***) conjunto de muestras de suelo cultivado.

En el análisis de la composición taxonómica en las muestras de suelo cultivado con vid, se observaron variaciones en la abundancia de los Filos.

El Filo *Actinobacteria* se mantuvo con 0.2 a.r. en la mayoría de muestras, sólo en SC₁ se observó menor proporción (a.r.:0.06); mientras que el Filo *Bacteroidetes* mostró mayor abundancia en SC₁ (a.r.:0.51) en comparación a SC₂ y SC_P. El Filo *Firmicutes* fue más abundante (a.r.:0.62) en SC₃ en relación a las demás muestras. El Filo *Proteobacteria* predominó en SC₄ y SC₂ (a.r.:0.61 y 0.46 respectivamente) y en SC₁; SC₃ y SC_P no bajó de 0.30 de abundancia relativa (Figura 6).

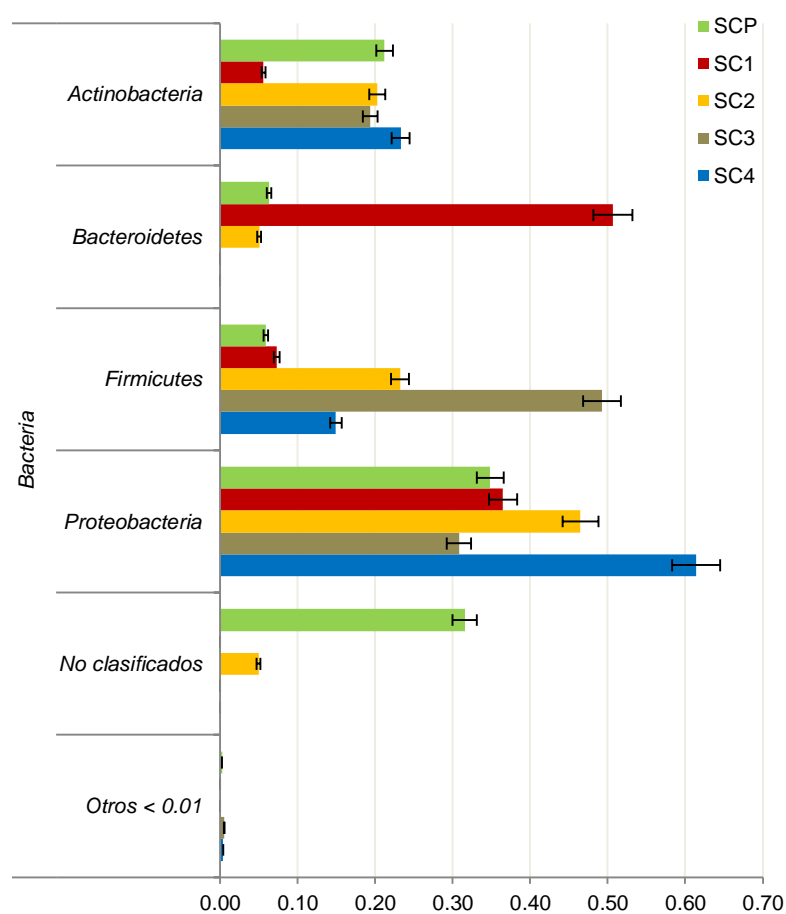
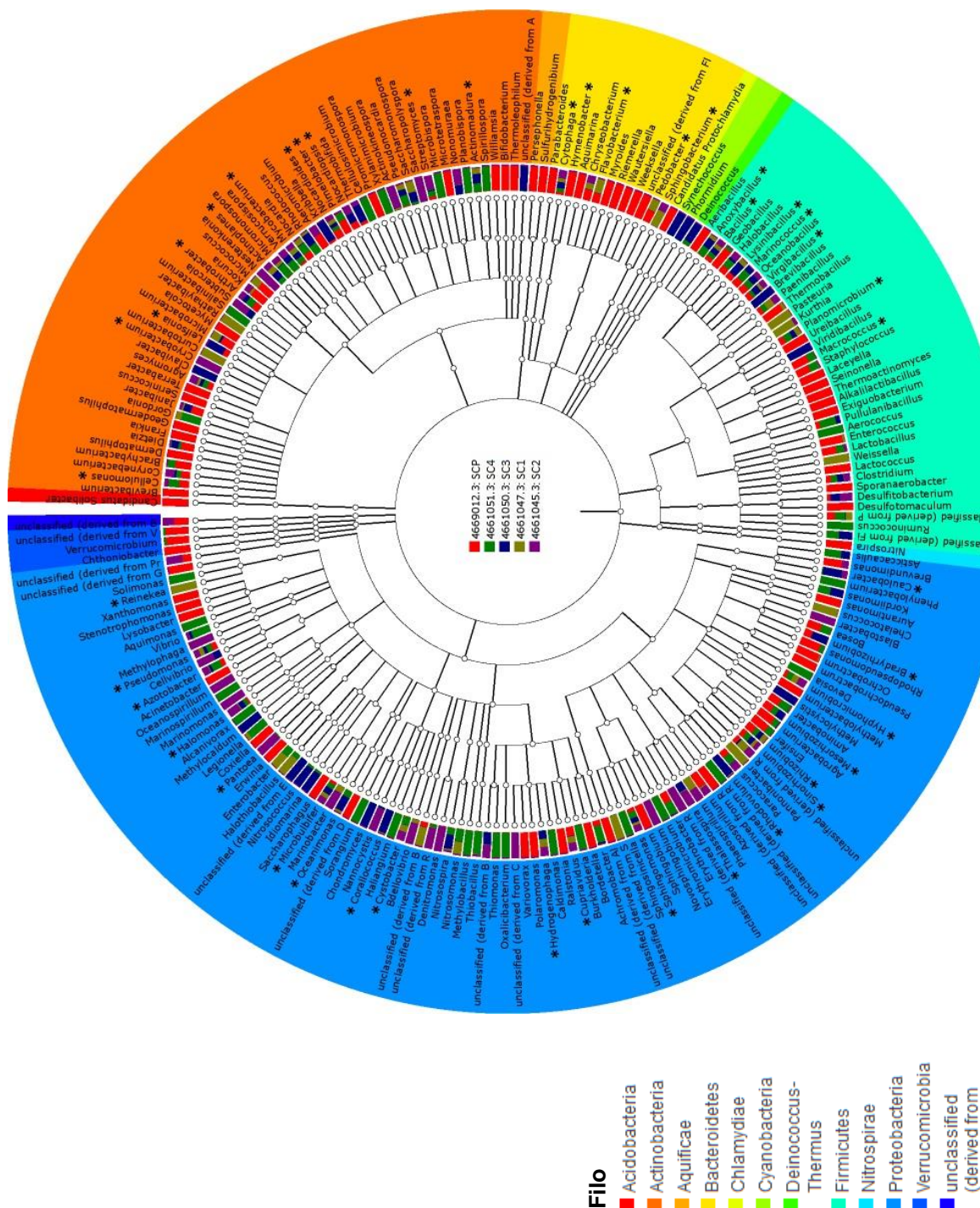


Figura 6. Abundancia relativa (a.r.) de los filos en las diferentes muestras de suelo cultivado. Representación de los filos mayores a 0.01 a.r. Barras representan error estándar ± 0.05 . Gráfico elaborado con el programa Excel.

Entre las cinco muestras de suelo cultivado se identificaron un total de 200 géneros representados en el árbol filogenético en la Figura 7.

Figura 7. Árbol filogenético de los géneros presentes en diferentes muestras de suelo cultivado con vid. Las barras representan la presencia de determinados OTUS según la muestra. (*) Géneros > 0.01 a.f. Cód. MG – RAST: 4669012.3, rojo: Suelo cultivado con vid, (SCP). Cód. MG – RAST: 4661051.3, verde: Suelo cultivado vic#4 (SC4). Cód. MG – RAST: 4661050.3, azul: Suelo cultivado vic#3 (SC3). Cód. MG – RAST: 4661047.3, marrón: Suelo cultivado vic#1 (SC1). Cód. MG – RAST: 4661045.3, morado: Suelo cultivado vic#2 (SC2). Gráfico elaborado por el software MG-RAST.



Entre los géneros pertenecientes al Filo *Actinobacteria* predominó *Arthrobacter*, siendo más abundante en la muestra SC₄ (a.r.:0.15) y en menor proporción en SC₁, SC₂, SC_P. Otros de los géneros de mayor abundancia fueron *Nocardioides* (a.r.:0.11) en SC_P y en SC₂; SC₃ con una a.r. de 0.01. En SC₃ abundó el género *Streptomyces* (a.r.:0.07) (Figura 8).

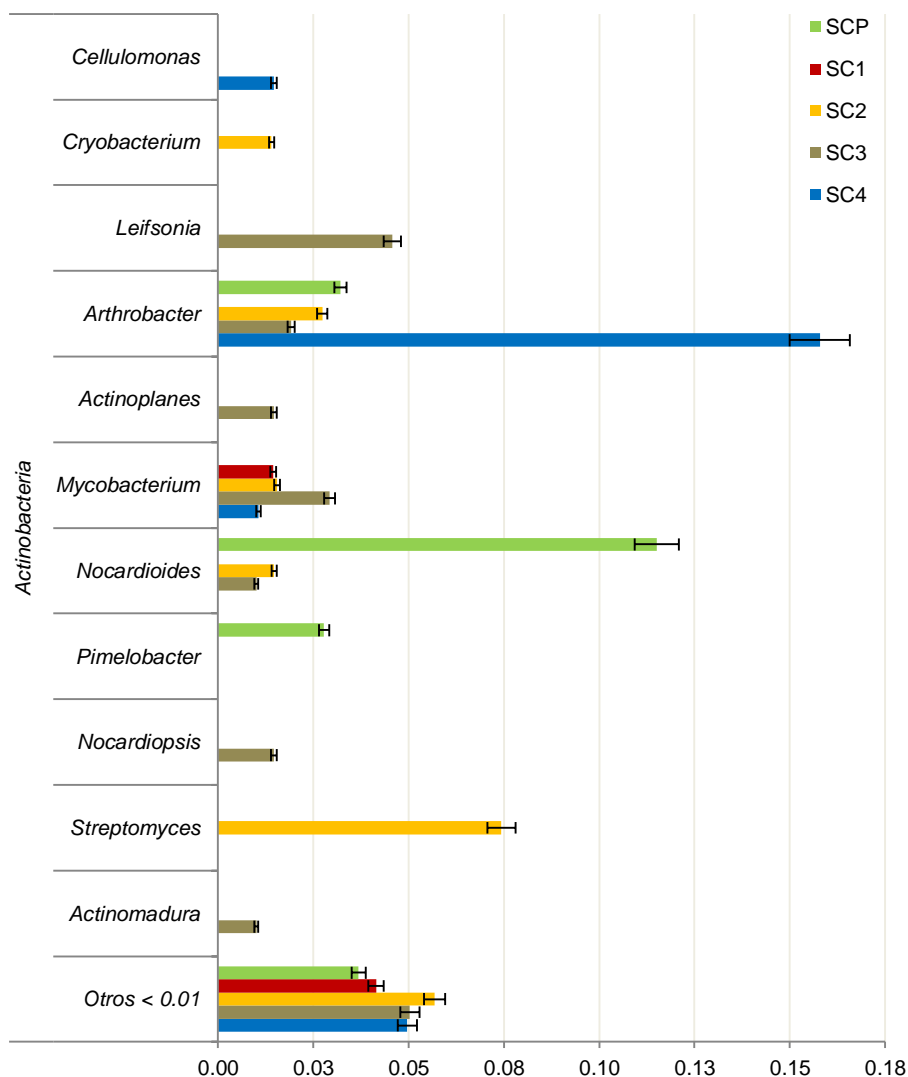


Figura 8. Abundancia relativa (a.r.) de los géneros del Filo *Actinobacteria* en las diferentes muestras de suelo cultivado. Representación de los géneros mayores a 0.01 a.r. Barras representan error estándar ± 0.05 . Gráfico elaborado con el programa Excel.

En el Filo *Bacteroidetes* pocos géneros fueron identificados; entre ellos estuvo el género *Flavobacterium* que abundó en SC₁ (a.r.:0.46). Adicionalmente en esta muestra también fueron identificados *Pedobacter*

y *Sphingobacterium* (a.r.: 0.01). El género *Cytophaga* tuvo una mayor cantidad de representantes en SC₂. Este grupo estuvo presente en las demás muestras, sin embargo, llegaron al 0.01 de a.r. En SC_P se presentó *Hymenobacter* también *Flavobacterium* con una abundancia relativa de 0.01 y 0.02 respectivamente (Figura 9A).

Dentro de los géneros pertenecientes al Filo *Firmicutes*, en todas las muestras se identificó representantes del género *Bacillus* y *Virgibacillus*. En SC₃, SC₄ y SC_P se identificaron una mayor cantidad de géneros pertenecientes al Filo *Firmicutes* entre ellos *Anoxybaillus*, *Lysinibacillus*, *Marinococcus*, *Virginibacillus* y *Planomicrobium* (a.r.> 0.01). En adición, SC₁ con pocos representantes con más de 0.01, se identificó el género *Planomicrobium* (a.r.: 0.01) (Figura 9B).

El Filo *Proteobacteria* ha sido un grupo con mayor abundancia entre las muestras analizadas, esto se evidenció con la cantidad de géneros identificados (Figura 10). El género *Pseudomonas* fue el más abundante entre todos los géneros en las muestras SC₄ y SC_P; seguidas de las muestras SC₂ y SC₁. Si bien tiene una alta abundancia relativa (a.r.) no fue el género con mayor abundancia en estas muestras. Adicionalmente, se identificaron un grupo de géneros considerados como promotores de crecimiento, entre ellos: *Pantoea*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Hypomicrobium* y *Bradyrhizobium*, sin embargo, estos no fueron muy abundantes (< 0.03 a.r.).

A nivel especie, un total de 509 especies (250 en SC_P; 104 en SC₁; 123 en SC₂ y SC₃; 144 en SC₄) fueron identificadas en las muestras de suelo cultivado con vid bajo los parámetros de análisis mencionados en la metodología; entre ellos, 243 OTUS (140 en SC_P; 33 en SC₁; 48 en SC₂; 36 en SC₃ y 63 en SC₄) con secuencias >100 bp fueron identificados con las especies reportadas en la base de datos Greengenes con una identidad al 99%. Las especies con una a.r. ≥ 0.01 están representadas en la Tabla 7.

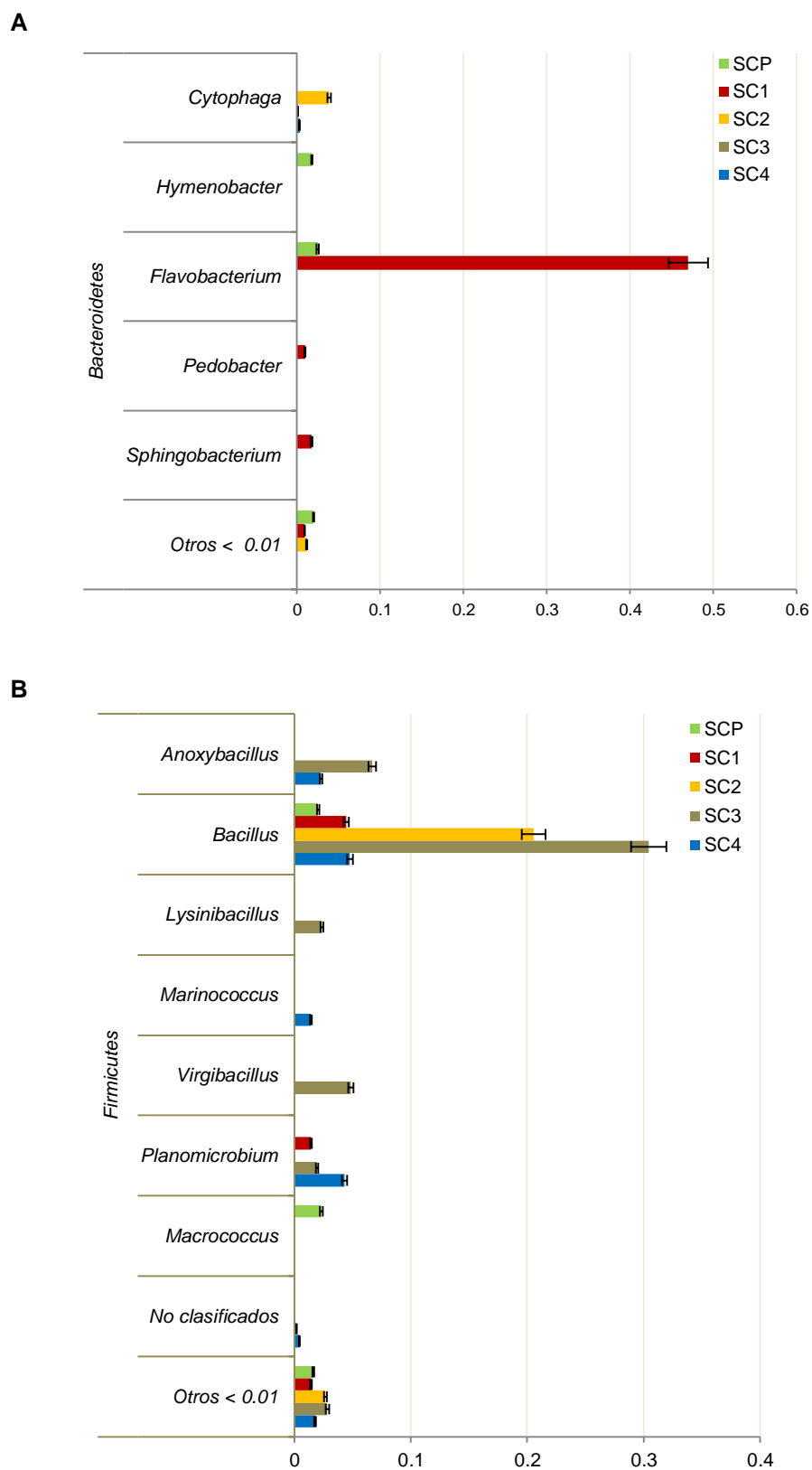


Figura 9. Abundancia relativa (a.r.) de los géneros del Filo *Bacteroidetes* (A) y de los géneros del Filo *Firmicutes* (B) en las muestras de suelo cultivado. Representación de los géneros mayores a 0.01 a.r. Barras representan error estándar ± 0.05 . Gráfico elaborado con el programa Excel.

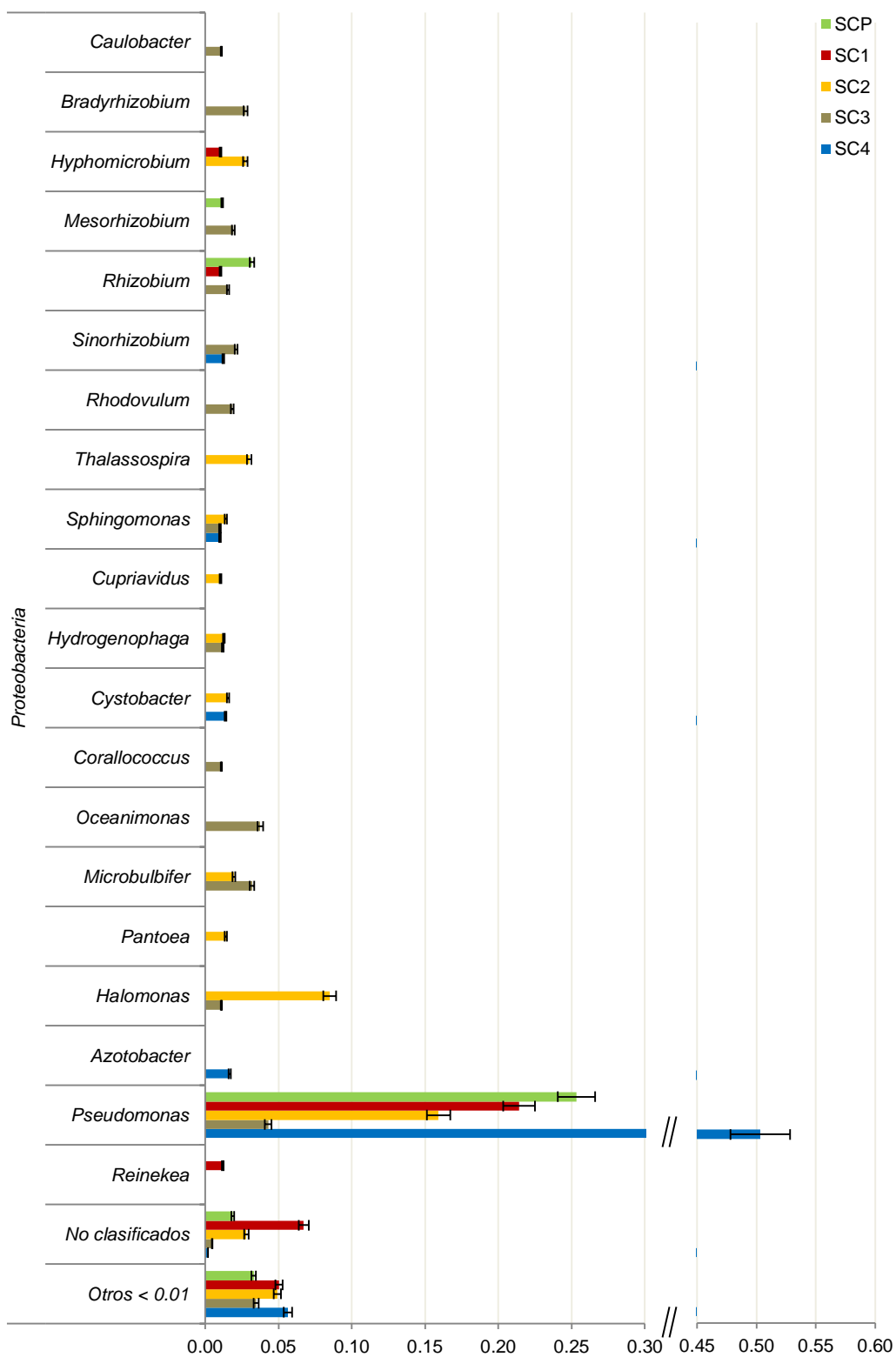


Figura 10. Abundancia relativa (a.r.) de los géneros del Filo *Proteobacteria* en las muestras de suelo cultivado. Representación de los géneros mayores a 0.01 a.r. Barras representan error estándar ± 5 . Gráfico elaborado con el programa Excel.

Tabla 7. Las especies identificadas en las diferentes muestras de suelo cultivado con vid.

Filo	Género	Especie	Muestra	Abundancia	e Value promedio	% identidad promedio	Long. de alineamiento promedio
Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	SC _P	637	-69.94	100	132.56
	<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium duvalii</i>	SC ₂	19	-148	99	274
	<i>Nocardioides</i>	<i>Nocardioides</i> sp.	SC _P	1898	-67.12	100	129.8
Bacteroidetes	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	SC ₁	44	-80.36	100	153.14
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	SC ₂	18	-145.16	99	269.42
		<i>Bacillus</i> sp. JL-39	SC ₄	54	-147	99	274
	<i>Marinococcus</i>	<i>Marinococcus halophilus</i>	SC ₄	62	-122.19	100	222.41
	<i>Planomicrobium</i>	<i>Planomicrobium okeanokoites</i>	SC ₁	35	-148	99	275
Proteobacteria	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Sinorhizobium</i> sp. CCBAU 65682	SC ₃	11	-144	99	275
		<i>Sinorhizobium</i> sp. CCBAU 65682	SC ₄	55	-145.64	99	274.96
	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas</i> sp. M30-VN10-1W	SC ₂	19	-148.37	99	272.42
	<i>Microbulbifer</i>	<i>Microbulbifer elongatus</i>	SC ₂	28	-146	99	275
	<i>Halomonas</i>	<i>Halomonas ventosae</i>	SC ₂	121	-96.31	100	181.62
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	SC _P	662	-125.64	100	227.72
	<i>Pseudomonas</i> sp. D3-26	SC ₄	405	-146	99	275	
	<i>Pseudomonas</i> sp. RW10S2	SC _P	3833	-85.97	100	159.96	

Estimación de la riqueza y diversidad y comparación entre metagenómicas

La riqueza de especies graficada en la curva de rarefacción (Figura 11), demostró que en SC_P se obtuvo una mayor cantidad de especies identificadas y una mayor cantidad de lecturas en contraste a las muestras individuales de suelo cultivado con vid; entre ellas, la muestra SC₁ fue la muestra con menos lecturas y especies identificadas.

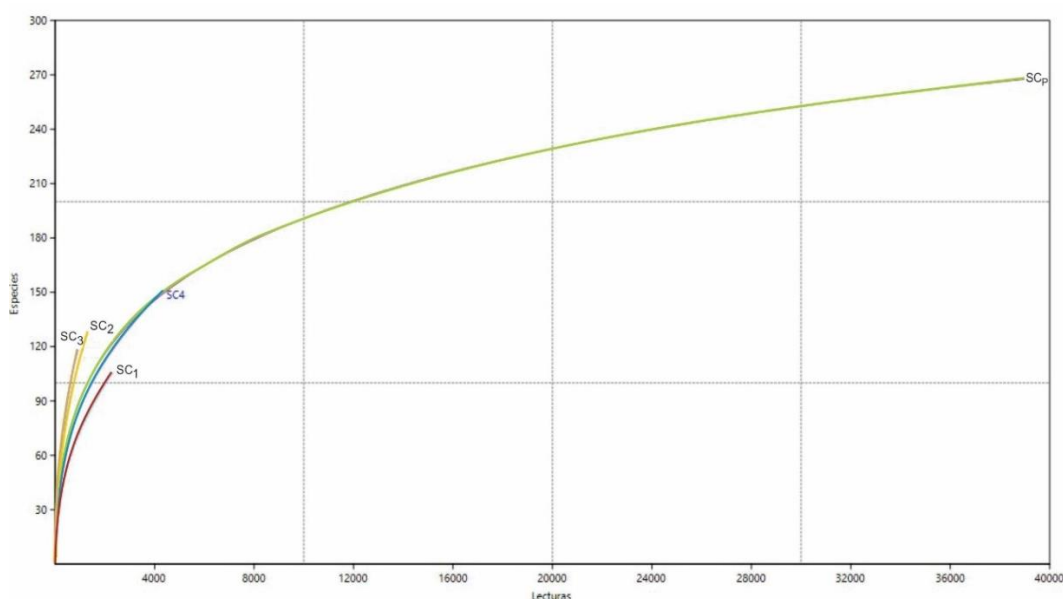


Figura 11. Curva de rarefacción del Dominio Bacteria. Esta figura grafica la riqueza de especies en cada suelo cultivado con vid (SC_P; SC₁ SC₂; SC₃ y SC₄) en relación al número secuencias de cada muestra. Gráfico elaborado con el programa PAST v 3.11.

La riqueza calculada mediante el Índice de CHAO mostró valores proporcionales a la riqueza observada de las muestras; sin embargo, la diversidad α en promedio fue 3.07, siendo el de mayor diversidad el SC₂ y el de menor diversidad SC₁ (Tabla 8); mientras que la diversidad β (Índice Harrison = 0.60) indicó que existe un grupo de especies que comparten las diferentes muestras de suelo cultivado con vid (Tabla 8).

Tabla 8. Estimación de la riqueza e índices de diversidad de las muestras de suelo cultivado con vid

Muestra	Riqueza		Diversidad	
	Observada	Chao	α	β
SC _P	268	319.5	3.03	
SC ₁	109	189.6	2.37	
SC ₂	133	230.2	3.53	0.60
SC ₃	125	185.7	3.76	
SC ₄	152	237.6	2.65	

SC_P: suelo cultivado; SC₁: suelo cultivado VID #1; SC₂: suelo cultivado VID #2; SC₃: suelo cultivado VID #3; SC₄: suelo cultivado VID #4;

4.4 Comparación de las metagenómicas de suelos prístinos y cultivados

La comparación de las metagenómicas (SC₁, SC₂, SC₃; SC₄) se realizó mediante el cálculo la distancia de Bray Curtis, del cual se obtuvieron los gráficos Heatmap y Componente principales.

El gráfico Heatmap (Anexo 5) agrupó las muestras de suelo cultivado y suelo prístino según la similitud de la abundancia a nivel de géneros, lo cual indicó que entre todas las muestras analizadas se identificaron un total de 250 géneros; de los cuales, 49 géneros del suelo prístino permanecen en el suelo cultivado con vid (enmarcado con recuadro amarillo; anexo 5A, 5B, 5C y 5D), algunos disminuyeron en suelo cultivado (*Ralstonia*; *Methylobacterium*; *Exiguobacterium*; *Acinetobacter*; *Azospirillum*, etc.) y otros géneros aumentaron (*Enterobacterium*; *Geobacillus*; *Bradyrhizobium*; *Flavobacterium*; *Pseudomonas*; *Arthobacter*; *Nocardiodes*; *Rhizobium*; *Streptomyces*, etc.); también se observó que 13 géneros se encuentran solamente en la muestra de suelo prístino (enmarcado con un recuadro azul; anexo 5B).

El gráfico de componentes principales, PCoA (Figura 12) nos muestra la disimilitud entre las muestras, resaltando la distancia entre las muestras

SC₁, SC₂, SC₃; SC₄ (agrupación amarilla) con SC_P y una ligera similitud de SP_P con la muestra SC₁ (agrupación rojo).

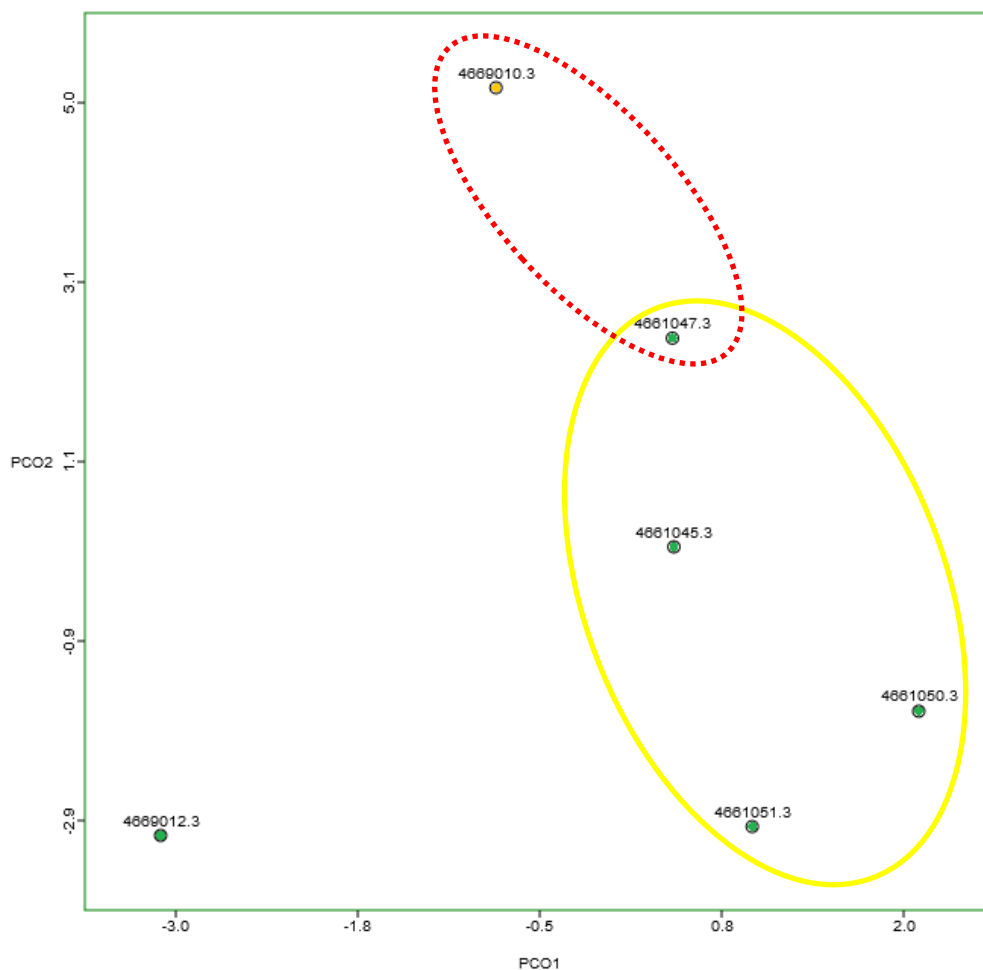


Figura 12. Comparación de las metagenómicas dirigida al gen ADNr 16S de las muestras SP_P y SC_P. La gráfica de componentes principales (sus siglas en inglés, PCoA) de las metagenómicas analizadas mostró la agrupación entre SC₁-SC₄ (agrupación amarilla); a su vez se observa la distancia de este grupo con SC_P. Además, en la parte superior se evidenció una ligera similitud entre SC₁ con SP_P (agrupación rojo). Suelo prístino (SP_P, Cód.: 4669010.3; anaranjado) y los suelos cultivados (SC_P, Cód.: 4669012.3; SC₁, cód.: 4661047.3; SC₂, cód.: 4661045.3; SC₃, cod.:4661050.3; SC₄, cód.: 4661051.3; verde). El gráfico se elaboró mediante la distancia Bray-Curtis a partir de la abundancia normalizada. Gráfico elaborado por el software MG-RAST.

5. DISCUSIÓN

Las nuevas técnicas moleculares han permitido la identificación de comunidades microbianas en una muestra sin necesidad de realizar un cultivo previo. Sin embargo, los métodos tradicionales de aislamiento de microorganismos, junto a las herramientas moleculares, son básicos para que en su posterioridad las cepas obtenidas sean estudiadas y/o utilizadas según sus características, como microorganismos promotores de crecimiento, agentes controladores, etc.

En lo que concierne las cepas aisladas de suelo prístino abundaron las especies *Cronobacter sakazakii* (7 cepas aisladas) y *Bordetella sp.* (5 cepas aisladas). Jha, Gontia and Hartmann (2012) han reportado la asociación de *C. sakazakii* con una planta halófila (*Salicornia*) en una zona árida en India; además demostraron la capacidad de fijación de nitrógeno, producción de ácido indol acético (AIA), actividad solubilizadora de fosfatos y producción de sideróforos, con una poca tolerancia a la salinidad del aislado. Asimismo, *Bordetella sp.* e *Inquilius limosus* fueron aislados de la rizosfera de *Lasiurus indicus* (grass endémico de la India), relacionándolos por primera vez dentro del grupo de bacterias asociadas con una planta (Chowdhury *et al.* 2007). En ambas referencias está mencionada la asociación de estas bacterias con plantas de hábitats áridos, lo cual es muy semejante a la muestra de suelo prístino analizada en el presente trabajo con suelos semiáridos de los bosques secos de Piura.

Entre las demás especies presentes solamente en suelo prístino, la cepa *Cupriavidus sp.* perteneciente a un género con un rol importante dentro de la mineralización del suelo, ha sido reportada como fijadora de nitrógeno mediante genes Nod que son similares a los del género *Rhizobia* (Willems 2006; Araujo *et al.* 2012). Ciertas especies de *Cupriavidus* están ganando importancia debido a su resistencia a metales pesados con miras biotecnológicas a ser usado en la desintoxicación de ambientes contaminados con metales pesados (Goris *et al.* 2001; Estrada-de Los Santos *et al.* 2011). Cabe resaltar que entre las cepas de suelo prístino también se encuentren

potenciales especies patógenas, como es el caso de *Pantoea ananatis* que causa enfermedades en un amplio rango de cultivos de importancia económica (Coutinho and Venter 2009, referenciado por Octavia and Lan 2014).

En el caso de la cepa *Lactobacillus plantarum*, existen trabajos que la vinculan al suelo y a superficies vegetales. Yanagida, Chen and Shinoha (2005) aislaron este microorganismo en suelos de viñedos y enfatizaron la importancia de esta bacteria como fuente de bacteriocina, un importante preservante de alimentos, (Wen, Philip and Ajam 2016). En nuestro trabajo, esta cepa ha sido aislada de suelo prístino con la presencia de plantas nativas que también están asociadas a este microorganismo.

Adicionalmente, en suelo prístino se identificó la cepa *Streptomyces hygroscopicus* la cual se caracteriza, por una parte, por ser una especie que habita en el suelo y, por otra parte, porque diferentes cepas pertenecientes a esta especie producen numerosos compuestos alelopáticos, como: geldanamicina, nigericin e hydantocidin (fitotoxinas) (Carver, Nikulin and Kao-Kniffin 2016), útiles para el descubrimiento de herbicidas naturales como el producto comercial Bialaphos, producido a partir de una cepa *S. hygroscopicus* (Barazani and Friedman 2001).

Finalmente, entre las cepas aisladas de suelo prístino, la cepa *Escherichia hermannii* ha sido rara vez referenciada por su presencia en el suelo (Hernández, Mellado and Martínez 1998), ya que en su mayor parte ha estado involucrada en infecciones humanas (Octavia and Lan 2014).

En cuanto a las cepas aisladas a partir del suelo cultivado con vid, predominó el género *Pseudomonas*, con la especie más predominante *Pseudomonas putida* y en menor proporción *P. fulva* y *P. pannonica*. El género *Pseudomonas* es ampliamente reportado por estar involucrado en la estimulación del crecimiento de la planta (Tian, Yang and Zhang 2007; Prashar, Kapoor and Sachdeva 2014). Las investigaciones con diferentes cepas de *P. putida* remarcan la característica de colonizar la rizosfera de las plantas (Molina *et al.* 2000; Weyens *et al.* 2010; Li *et al.* 2013; Roca *et al.* 2013), el rol de promotoras del

crecimiento por la habilidad de solubilizar el fosfato (Matilla *et al.* 2011; Pizarro-Tobías *et al.* 2014), la producción de ácido indol-acético u otras fitohormonas y el control biológico mediante la inhibición de crecimiento de hongos debido a la producción de sideróforos (Udaondo *et al.* 2015) y una actividad nematicida (Paiva *et al.* 2013). Basándose en estas características, las 9 cepas disponibles serán utilizadas para futuros trabajos como controladores biológicos y promotores del crecimiento. Adicionalmente, se ha identificado cepas de *P. putida* con la capacidad de degradar compuestos contaminantes (van Dillewijn *et al.* 2009; Segura and Ramos 2013; citado por Udaondo *et al.* 2015). La cepa *P. fulva* aislada en el presente trabajo puede estar relacionada con representantes de especies encontradas en la rizosfera como, por ejemplo: la cepa *P. fulva* SMA24 aislada de la rizosfera de *Aloe vera* e involucrada en la disposición de fosfatos en suelos alcalinos (Saharan *et al.* 2014). También existen cepas con actividad antagonista contra bacterias y hongos que causan enfermedades en arroz (Liu *et al.* 2015). La cepa identificada como *P. pavonaceae* ha sido reportada como un microorganismo de importancia ambiental, porque cuenta con el gen de la enzima haloalcano desalogenasa (*dhaA*), hidrolaza capaz de degradar haloalcanos (químicos potencialmente contaminantes) (Anandarajah *et al.* 2000; Janssen, Oppentocht and Poelarends 2001; Jha, Jain and Sharma 2015). Además, algunas cepas han sido mostradas como solubilizadoras de fósforo (Reddy *et al.* 2013).

El género *Aeromonas* corresponde a uno o de los grupos más abundantes dentro las cepas aisladas de suelo cultivado con vid. Este género está ampliamente reportado por pertenecer a hábitats acuáticos con especies como *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. veronii* (Janda and Abbott 2010), siendo algunas especies capaces de permanecer en el suelo hasta seis meses (Brandi *et al.* 1996). Algunas especies, como *A. hydrophila* y *A. caviae* poseen una alta actividad quitinolítica (SeurKee, HyoYeon and KiChung 1995) y *A. vaga* una actividad solubilizadora de fósforo (Jha, Saxena and Sharma 2013).

La especie *Plesiomonas shigella*, con una sola cepa aislada del suelo cultivado, ha sido reportada usualmente por ser patógena humana. Existen algunos reportes que mencionan su capacidad de degradación de pesticidas

organofosforados (Gorla 2015), su aislamiento desde la rizosfera de la herbácea *Sonchus sp.* y su falta de actividad promotora de crecimiento sobre tomate *in vitro* (Sturz *et al.* 2001).

En ambos tipos de suelos se encuentran las cepas pertenecientes a los géneros *Enterobacter* y *Bacillus*. El género *Enterobacter* ha sido reportado como un microorganismo de suelo semiárido en España con la capacidad de tolerar las condiciones de sequía (Armada, Roldán and Azcon 2014) y como promovedores del crecimiento en plantas (de Melo Pereira *et al.* 2012; Pawlicki-Jullian *et al.* 2010, referenciados por Octavia and Lan 2014).

El género *Bacillus*, es grupo taxonómico ampliamente reportado por los numerosos mecanismos para promover el crecimiento vegetal, entre ellos: la fijación del nitrógeno; producción de fitohormonas; producción de sideróforos; solubilización del fosfato; producción de antibióticos para inhibir fitopatógenos; producción de enzimas líticas extracelulares; producción de enzima deaminasa ACC; producción de ácido salicílico y ácidos orgánicos necesarios para las plantas (Almaghrabi, Massoud and Abdelmoneim 2013; Prashar, Kapoor and Sachdeva 2014). La especie *B. subtilis* ha sido particularmente bien estudiada en relación a la producción de péptidos antibióticos contra *Fusarium oxysporum* (Reddy 2016), producción de rizotocina fosfono-oligopéptida que tiene actividad antifúngica y nematocida (Borisova *et al.* 2010), etc. Se han formulado numerosos productos a base de *B. subtilis* y otros *Bacillus spp.*, en particular una veintena de productos para el control biológico de nematodos, entre ellos *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Pratylenchus brachyurus* y *Pratylenchus coffeae* (Cawoy *et al.* 2011).

Según lo mencionado, la mayoría de cepas que obtuvimos a partir de ambos tipos de suelos son recursos genéticos de suma importancia para la agricultura local debido a su potencial para mejorar la calidad del suelo a través de la mineralización, así como también para mejorar el crecimiento y la salud vegetal. Estas cepas nativas pueden ser utilizadas individualmente o en forma de consorcios bacterianos debido a que poseen una aclimatación natural al

clima y suelo de la región, facilitando el desarrollo de proyectos forestales, agroforestales o agrícolas.

Las investigaciones del microbioma del suelo se han incrementado recientemente gracias al nuevo método de caracterización independiente del cultivo que se basa, no más en las tecnologías FISH, DGGE o SSCP, sino en la tecnología NGS que permiten la secuenciación masiva en paralelo de fragmentos de ADN amplificados a partir de los ADN genómicos de los microorganismos presentes en las muestras. Este nuevo método, conocido como metagenómica, ha sido implementado dentro del marco del presente trabajo considerando la variante metagenómica dirigida a la región V4 del gen ADNr 16S bacteriano. Dos estudios independientes han sido realizados: el primero para caracterizar y comparar las microbiotas de suelos, uno prístino y el otro cultivado con vid; el segundo para caracterizar y comparar varios suelos, todos cultivados con vid.

La extracción de los ADN genómicos bacterianos, es decir el ADN metagenómico, fue realizado directamente a partir de las muestras de suelos mediante dos métodos: uno basado en el protocolo desarrollado por Amorim *et al.* (2008) y el otro basado en el Kit comercial "Power Soil", a partir de 4 g y 0,25 g de muestras, respectivamente. Se observó al final de los análisis metagenómicos una diferencia no explicable de longitud promedio de las secuencias obtenidas según el método de extracción, respectivamente de 210 ± 100 bp y 253 ± 20 bp.

El método de extracción de ADN a partir de muestras de suelo, basado en el protocolo desarrollado por Amorim *et al.* (2008), ha sido evaluado y estandarizado en el laboratorio de INCABIOTEC para varios tipos de suelos, incluidos suelos acuáticos como suelos de manglar, mostrando mejores resultados en comparación con otros protocolos clásicos establecidos por Verma and Satyanarayana (2011) y por Roh *et al.* (2006). El protocolo desarrollado por Amorim *et al.* ha sido usado también en suelos provenientes de la selva de Brasil (Amorim *et al.* 2008) y en sedimentos de aguas termales en la India (Gupta *et al.* 2016), permitiendo la preparación de ADN

metagenómico de buena calidad y sin inconvenientes en términos de secuenciación ulterior.

Por otro lado, el kit “Power Soil” es el más utilizado en la actualidad para la extracción de ADN metagenómico sin inhibidores de PCR, con aplicaciones tanto en suelos prístinos como en suelos cultivados entre ellos, viñedos (Mendes *et al.* 2015; Castañeda and Barbosa 2016; Zarraonaindia *et al.* 2015; Vega-Avila *et al.* 2015; Holland *et al.* 2016).

Existen varias tecnologías y equipos comerciales de secuenciación de segunda generación (NGS) que han sido utilizados en estudios de metagenómica dirigida al gen ADNr 16S para generar secuencias que luego son analizadas con varios programas de bioinformática permitiendo la asignación taxonómica de los OTUs presentes en una determinada muestra.

En el presente trabajo, la caracterización de las comunidades bacterianas, de las muestras de suelos prístinos y cultivados, ha sido realizada mediante la secuenciación por Ion Torrent PGM. Esta plataforma de secuenciación, por ser rápida, rentable, escalable y altamente replicable, es conveniente para estudios básicos de metagenómica en ecología microbiana (Whiteley *et al.* 2012). Esta tecnología de secuenciación masiva por Ion Torrent PGM ha sido reportada en una amplia variedad de análisis de diversidad microbiana, entre ellos: en minas de uranio; en sedimentos de ríos influenciados por actividad petrolera; en la rizosfera de sauces; en suelos forestales devastados por incendios (Brown *et al.* 2013; Sanschagrin and Yergeau. 2014) así como para el análisis de las comunidades bacterianas en la rizosfera de vid cultivados en Argentina bajo diferentes prácticas agrícolas, orgánico y convencional (Vega-Avila *et al.* 2015).

En términos de resultados, los análisis de metagenómica dirigida condujeron a identificar una abundancia relativa elevada de representantes del Filo *Proteobacteria* en las muestras de suelo cultivado SC₂ (a.r. 0.47), SC₄ (a.r. 0.61) y suelo prístino SP_P (a.r. 0.52). Los Filos *Proteobacteria* y *Firmicutes* estuvieron presentes en todas las muestras al igual que los Filos *Actinobacteria*

y *Bacteroidetes*, solamente que los últimos fueron más variables en términos de representación.

En un trabajo similar de metagenómica realizado en viñedos, Castañeda and Barbosa (2016) identificaron la comunidad microbiana de suelos provenientes de viñedo orgánico y suelo prístino cercano a los viñedos, resaltando que el Filo *Proteobacteria* fue más abundante tanto en suelo prístino así como en el suelo del viñedo. Los filos menores *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Planctomycetes* no mostraron diferencias significativas en ambos suelos.

En los viñedos orgánicos estudiados por Vega-Avila *et al.* (2015) los filos *Firmicutes* y *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* fueron los más abundantes, mientras que los filos *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* fueron predominantes en viñedos bajo manejo convencional. Burns *et al.* (2015) y Zorraonaindia *et al.* (2015) identificaron a estos filos mencionados en muestras de suelo no influenciado por raíces y rizosfera.

Burns *et al.* (2015) mencionan que la composición a un nivel de filos de las comunidades bacterianas en suelos con manejo agronómico de cultivos perennes y anuales son más similares entre sí que con las comunidades bacterianas encontradas en los ecosistemas naturales.

Las diferencias de abundancia relativa a nivel de los Filos podrían estar relacionadas con las diversas funciones o características respectivas. El Filo *Proteobacteria* está involucrado en el ciclo de carbono y la producción de metabolitos secundarios (Castañeda and Barbosa 2016), siendo algunos representantes de este filo reportados como indicadores de proporciones C:N (Kuramae *et al.* 2012). Por otra parte, los representantes del Filo *Actinobacteria*, que se encuentran distribuidos especialmente en el suelo, juegan un rol importante en las descomposición y formación del humus, dos procesos fundamentales para el reciclaje de biomateriales (Gao and Gupta 2005). El Filo *Bacteroidetes*, más abundante en los ecosistemas agrícolas en comparación con los suelos de los bosques de hoja caduca, está relacionado con la capacidad de incrementar la fertilización de los suelos. (Kuramae *et al.*

2012). Los *Firmicutes*, reportados como abundantes en suelo agrícola, actúan como antagonistas hacia fitopatógenos (Köberl *et al.* 2011)

Además, en SP_P se identificaron dos grupos del Filo *Proteobacteria* que agruparon alta cantidad de lecturas de los que sólo llegaron a clasificarse a nivel de clase: *Betaproteobacteria* (a.r.:0.01) y *Gammaproteobacteria* (a.r.: 0.46). Vega-Avila *et al.* (2015) también mencionaron que un grupo de afiliaciones taxonómicas de las secuencias de su trabajo reveló una alta proporción bacterias no clasificadas. Esto podría estar relacionado a que aún falta mayor información acerca de la diversidad bacteriana de suelos.

El estudio metagenómico analizado a nivel genérico ha conducido a identificar 62 géneros en suelo prístino, siendo *Bacillus*, *Hymenobacter* y *Exiguobacterium* aquellos con las más altas abundancias relativas: 0.05; 0.02 y 0.01, respectivamente.

En las muestras de suelo cultivado se identificaron 200 géneros, siendo los más representados con abundancia relativa superior a 0.01: *Arthrobacter*, *Nocardioides* y *Streptomyces* (**Filo *Actinobacteria***); *Flavobacterium*, *Pedobacter* y *Sphingobacterium*, *Cytophaga* y *Hymenobacter* (**Filo *Bacteroidetes***); *Bacillus*, *Virginibacillus*, *Anoxybacillus*, *Lysinibacillus*, *Marinococcus*, y *Planomicrobium* (**Filo *Firmicutes***); *Pseudomonas*, *Caulobacter*, *Bradyrhizobium*, *Hyphomicrobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhodovulum*, *Thalassospira*, *Sphingomonas*, *Cupriavidus*, *Hydrogenophaga*, *Cystobacter*, *Pantoea* y *Azotobacter* (**Filo *Proteobacteria***).

En el estudio realizado en viñedos chilenos, Castañeda and Barbosa (2016) identificaron también *Bradyrhizobium* y *Candidatus Solibacter* pero otros géneros como los más abundantes.

En el estudio realizado en viñedos de Canadá, Holland *et al.* (2016) reportaron a *Nitrosococcus*, *Sphingopyxis*, *Micrococcineae* y *Thiobacillus* como géneros más abundantes en suelo cultivado y a *Bradyrhizobium* como el género de mayor abundancia en suelo prístino mientras que en nuestro estudio el género

Bacillus y los asignados al grupo *Gammaproteobacteria* fueron los más abundantes.

Los géneros identificados en este trabajo han sido reportados en diversas investigaciones describiendo su importancia según sus características observadas. Entre ellos tenemos a los microorganismos presentes en suelos de condiciones extremas, como es el caso de *Nocardioides*, *Hydrogenophaga*, *Thalassospira* que han sido reportados como potenciales degradadores de hidrocarburos (Hou *et al.* 2015; Rocha *et al.* 2016). Además, los *Nocardioides* tienen representantes que suelen encontrarse en ambientes acuáticos, algunos con la capacidad de reducir nitratos y ser tolerantes a la salinidad. (Quisehuatl-Tepexicuapan *et al.* 2014). Adicionalmente, representantes de *Virgibacillus*, *Marinococcus*, *Cystobacter* han sido reportadas como bacterias halotolerantes asociadas a la raíz (Mapelli *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2013). Por último, algunos representantes del género *Lysinibacillus* y *Planomicrobium* han sido aislados en ambientes extremos, como desiertos (Rao 2012) y suelos contaminados por metales pesados (Chan *et al.* 2015).

Adicionalmente, también se encuentran microorganismos con actividad mineralizadora y promotora de crecimiento, como: *Lysinibacillus*, que es considerado promotor de crecimiento vegetal por ser solubilizador de fosfato; *Azotobacter*, promotor de crecimiento vegetal por ser solubilizador de fosfato y, además, productor del ácido indolacético (Sharma and Saharan 2015) y fijador de nitrógeno al igual que *Pantoea* (Gopalakrishnan *et al.* 2015).

El género *Caulobacter* está ampliamente reportado por formar parte del rizoplasma en diversas plantas. Además, algunos representantes poseen la característica de producir biofilms (Tsuboi *et al.* 2015) y ácido indolacético (Wang *et al.* 2016). El género *Sphingobacterium*, con capacidad de solubilizar el fósforo mineral, está ampliamente distribuido en diversos tipos de suelos, compost y también en rizosfera de *Vigna mungo* (Ahmed *et al.* 2014). Los miembros de *Arthrobacter*, *Bradyrhizobium*, *Flavobacterium* están involucrados en la producción de ácido giberélico secretado en la rizosfera (Frankenberger and Arshad 1995; Rademacher 1994). El género *Cytophaga*, reportado en la

rizosfera de *Trifolium repens* y *Lolium perenne* (Fang *et al.* 2013), interviene en la degradación de los compuestos orgánicos de carbono (Mayrberger 2011).

En lo que concierne las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, integradas por una variedad de géneros colonizadores del rizoplasma y de la rizosfera, se han identificado *Hyphomicrobium* y los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* simbióticos fijadores de nitrógeno y ampliamente reportados en diversos cultivos (Gopalakrishnan *et al.* 2015)

También se identificaron géneros que ayudan a la sanidad vegetal como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Sphingobacterium* y *Pedobacter* con actividad fungicida y antagonistas hacia otras bacterias (Chapelle *et al.* 2016). El género *Anoxybacillus* ha sido reportado como parte de un consorcio bacteriano biofertilizante que permitió el control de *Fusarium* (Shen *et al.* 2015);

Es importante mencionar que el grupo *Pseudomonas*, no sólo corresponde a bacterias benéficas como se mencionó líneas arriba, sino que también tiene representantes patógenos como *P. savastanoi* pv. *savastanoi* causando la tuberculosis en el olivo con nódulos muy semejantes al *Agrobacterium tumefaciens*. Buonauro *et al.* (2015) realizaron la metagenómica en nódulos ocasionados por *P. savastanoi* y encontraron la presencia de representantes de los géneros *Pantoea* e *Hymenobacter*.

En términos de riqueza y diversidad de las microbiotas, se ha estimado que la riqueza de la mayoría de suelos cultivados superó la riqueza microbiana del suelo prístino, siendo notoria la diferencia en diversidad alfa (diversidad intra microbiota) entre las muestras de suelos cultivados y prístino, SC (3.07) y SP (1.67), respectivamente. Este resultado también fue semejante en el trabajo de Holland *et al.* (2016) donde tanto la riqueza de especies de bacterias, como la diversidad fue ligeramente superior en suelo proveniente de viñedos que en sitios sin manejo agrícola (prístino). Además, estos resultados refutan los informes que muestran que la agricultura afecta negativamente a la diversidad bacteriana del suelo. Además, Holland *et al.* (2016) mencionan que la

aplicación de fertilizantes nitrogenados y otros productos en los viñedos pueden ser responsables del incremento de taxones en el suelo cultivado.

El índice de diversidad beta, es decir entre microbiotas, de suelos prístino SP_P y cultivados SC_P fue 0.25, lo cual indicó que los dos tipos de suelos comparten una proporción significativa de especies; mostrando que aunque la composición bacteriana varíe cuando cambia el uso de la tierra (bosque seco a área agrícola), un grupo de microorganismos nativos permanece. Este proceso puede ser visualizado comparando todas las metagenómicas mediante el programa de agrupación PCoA (Figura 12) y Heatmap (Anexo 5).

Es particularmente interesante analizar los resultados de composición de microbiotas caracterizadas basándose en técnicas dependientes e independientes de cultivo, es decir considerando, por una parte, las cepas identificadas luego de ser aisladas por cultivo *in vitro* y, por otra parte, las cepas identificadas directamente por metagenómica. Los resultados indican que el aislamiento corresponde, lógicamente, a la composición de las microbiotas caracterizadas por metagenómica, pero que solamente una muy pequeña fracción de bacterias puede ser efectivamente aislada. Esta observación es generalizable en realidad a prácticamente todas las microbiotas vegetales, animales y ambientales recientemente caracterizadas por metagenómica, siendo generalmente menos de 1% de las bacterias presentes que pueden ser cultivables individualmente en los medios de cultivos clásicos (Killham and Prosser 2014; Pham and Kim 2012; Conn 1918; Jensen 1968; Skinner, Jones and Mollison 1952; Davis, Joseph and Janssen 2005).

Los resultados de diversidad beta, es decir entre microbiotas, son también muy interesantes considerando que los suelos cultivados y el suelo prístino corresponden a una zona agrícola de cultivo de vid establecida después una decena de años en Castilla (Región de Piura). La permanencia de bacterias nativas de suelo prístino dentro la microbiota de suelo cultivado indica su capacidad de adaptación a cambios, lo que es similar a los resultados de Castañeda and Barbosa (2016), que trabajaron con suelo de viñedos orgánicos en Chile. Sin embargo, la diversidad beta, claramente graficada por agrupación

diferencial según PCoA de los dos tipos de microbiotas, conduce a distinguir los dos tipos de suelos, es decir que los cambios resultantes del cultivo son importantes. La diversidad β de todas las muestras de suelos cultivados, estimada a 0.60 demostró que existe un grupo considerable de especies compartidas, sin embargo, cada una mantiene su propia microbiota. Vega-Avila *et al.* (2015), atribuyen que las diferencias de las comunidades bacterianas en el viñedo podrían estar relacionadas a la selección según el metabolismo de cada planta.

Los cambios de microbiotas, evidenciados por el valor de diversidad β , provienen directa y esencialmente de la introducción de varios tipos de compost, altamente contaminados en términos microbiológicos, y de plántulas provenientes de viveros con microbiotas aleatorias, así como de una multitud de productos biofertilizantes y biocontroladores comercializados y utilizados empíricamente sin consideración para los riesgos microbiológicos. Por ello, es necesario el desarrollo de una apropiada estrategia de manejo del suelo que pueda evitar un efecto negativo en el cambio de uso de la tierra, permitiendo el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles.

6. CONCLUSIONES

Cronobacter sakazakii y *Bordetella sp.* fueron las especies con un elevado número de representantes en el cepario de suelo prístino, ambas implicadas en la tolerancia a la salinidad.

En suelo cultivado predominaron las especies *Pseudomonas vulva* y *P. pavonaceae*, la primera de importancia agrícola por ser promotora de crecimiento, controlador biológico y solubilizador de fosfatos; y la segunda caracterizada por degradar compuestos químicos altamente contaminantes.

En la comunidad bacteriana del suelo prístino abundaron las secuencias asignadas a los Filos *Proteobacteria* y *Firmicutes*; mientras que en suelo cultivado fueron *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteriodetes*.

Los géneros *Arthrobacter*, *Nocardioides*, *Flavobacterium*, *Bacillus* y *Pseudomonas*; identificados en la comunidad bacteriana de los suelos cultivados con vid están involucrados con la tolerancia a ambientes salinos, actividad mineralizadora de los suelos, promotores de crecimiento y sanidad vegetal.

La abundancia y diversidad alfa de las especies bacterianas del suelo prístino fueron menores en relación a las muestras de suelo cultivado debido a que ha sido significativamente modificado por el cultivo de vid y el manejo agronómico.

En las muestras de suelo cultivado permanecen un grupo de 49 géneros identificados en suelo prístino, entre ellos microorganismos potencialmente benéficos para el cultivo de vid.

7. RECOMENDACIONES.

Utilizar desde el inicio de nuevos cultivos estas nuevas técnicas de caracterización molecular de la microbiota de suelos, dependiente e independiente de cultivo, ya que permiten el seguimiento de la comunidad microbiana, la identificación de organismos potencialmente benéficos.

Desarrollar nuevas técnicas de cultivo *in vitro* (co-cultivo) y nuevos medios de cultivo para poder aislar y producir microorganismos nativos actualmente no cultivables, por ejemplo, la bacteria *Pasteuria sp.*, identificada con una abundancia relativa menor a 0.01, no cultivable pero importante controlador biológico específico de nematodos fitopatógenos del género *Meloidogyne*.

Considerar el concepto de Hologenoma en los estudios a los cultivos debido a que permite integrar las características genéticas de un cultivar con la globalidad de las características genéticas de la microbiota.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, I., M. Ehsan, Y. Sin, J. Paek, N. Khalid, R. Hayat and Y.H. Chang. 2014. *Sphingobacterium pakistanensis* sp. nov., a novel plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizosphere of *Vigna mungo*. *Antonie van Leeuwenhoek* 105(2): 325-333.
- Almaghrabi, O.A., S.I. Massoud and T.S. Abdelmoneim. 2013. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. *Saudi journal of biological sciences* 20(1): 57-61.
- Amann, R. I. and B. M. Fuchs. 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 329–348.
- Amann, R. I. and W. Ludwig. 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 555–565.
- Amorim, J.H., T.N.S. Macena, G.V. Lacerda-Junior, R.P. Rezende, J.C.T. Dias, M. Brendel and J.C.M. Cascardo. 2008. An improved extraction protocol for metagenomic DNA from a soil of the Brazilian Atlantic Rainforest. *Genet Mol Res* 7(4): 1226-1232.
- Anandarajah, K., P.M. Kiefer, B.S. Donohoe and S.D. Copley. 2000. Recruitment of a double bond isomerase to serve as a reductive dehalogenase during biodegradation of pentachlorophenol. *Biochemistry* 39(18): 5303-5311.
- Araujo, A.S.F., L.F.C. Leite, B. de Freitas Iwata, M. de Andrade Lira Jr, G. R. Xavier and M. d. V. B. Figueiredo. 2012. Microbiological process in agroforestry systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32(1): 215-226.
- Armada, E., A. Roldán and R. Azcon. 2014. Differential activity of autochthonous bacteria in controlling drought stress in native lavender and salvia plants species under drought conditions in natural arid soil. *Microbial ecology* 67(2): 410-420.

- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Seidman, J. G. Smith and K. Struhl. 2003. *Current protocols in molecular biology*. Unit 2.4. NY, United States of America: John Wiley & Sons, 197-201.
- Badri, D.V., G. Zolla, M. G. Bakker, D. K. Manter, J. M. Vivanco. 2013. Potential impact of soil microbiomes on the leaf metabolome and on herbivore feeding behavior. *New Phytologist* 198 (1), 264–273.
- Balestrini, R., E. Lumini, R. Borriello and V. Bianciotto, *Plant-Soil Biota Interactions. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (Fourth Edition). Boston, United States of America. Eldor A. Paul, *Academic Press*, 311-338.
- Barazani, O. and J. Friedman. 2001. Allelopathic bacteria and their impact on higher plants. *Critical Reviews in Microbiology* 27(1): 41-55.
- Basak, P., A. Pramanik, S. Sengupta, S. Nag, A. Bhattacharyya, D. Roy, R. Pattanayak, A. Ghosh, D. Chattopadhyay, and M. Bhattacharyya. 2016. Bacterial diversity assessment of pristine mangrove microbial community from Dhulibhashani, Sundarbans using 16S rRNA gene tag sequencing. *Genomics data* 7: 76-78.
- Begon, M., J.L. Harper and C.R. Townsend. 1996. *Ecology: Individuals, Populations and Communities*. 3rd. Oxford, UK: Blackwell Science oxford.
- Berendsen, R. L., C. M. Pieterse, P.A. Bakker. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Science*, 17, 478–486.
- Berg, G. and K. Smalla. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS microbiology ecology*, 68, 1 : 1-13
- Borisova, S. A., B.T. Circello, J.K. Zhang, W.A. van der Donk and W.W. Metcalf. 2010. Biosynthesis of rhizotocins, antifungal phosphonate oligopeptides produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633. *Chemistry & biology* 17(1): 28-37.
- Bragg, L., and G.W. Tyson. 2014. Metagenomics using next-generation sequencing. *Environmental Microbiology: Methods and Protocols*: 183-201.
- Brandi, G., M. Sisti, G.F. Schiavano, L. Salvaggio and A. Albano. 1996. Survival of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas sobria* in soil. *Journal of applied bacteriology* 81(4): 439-444.

- Breakwell, K., S.G. Tetu and L.D.H. Elbourne. 2014. Next generation barcode tagged sequencing for monitoring microbial community dynamics. *Environmental Microbiology: Methods and Protocols*: 101-110.
- Brown, S. P., M. A. Callaham, A. K. Oliver and A. Jumpponen. 2013. Deep Ion Torrent sequencing identifies soil fungal community shifts after frequent prescribed fires in a southeastern US forest ecosystem. *FEMS microbiology ecology* 86(3): 557-566.
- Bulgarelli, D., M. Rott, K. Schlaeppi, E. V. L. van Themaat, N. Ahmadinejad, F. Assenza, P. Rauf, *et al.* 2012. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488, 91–95
- Buonaurio, R., C. Moretti, D.P. da Silva, C. Cortese, C. Ramos and V. Venturi. 2015. The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease. *Frontiers in plant science* 6.
- Burns, K.N., D.A. Kluepfel, S.L. Strauss, N.A. Bokulich, D. Cantu and K.L. Steenwerth. 2015. Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: differentiation by geographic features. *Soil Biology and Biochemistry* 91: 232-247.
- Caporaso, J.G., C.L. Lauber, W.A. Walters, D. Berg-Lyons, C. A. Lozupone, P.J. Turnbaugh, N. Fierer and R. Knight. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(1): 4516-4522.
- Carbonetto, B., N. Rascovan, R. Álvarez, A. Mentaberry and M.P. Vázquez. 2014. Structure, composition and metagenomic profile of soil microbiomes associated to agricultural land use and tillage systems in Argentine Pampas. *PloS one* 9(6): e99949.
- Carver, S.M., N. Nikulin and J. Kao-Kniffin. 2016. Uncovering Plant Growth-Mediating Allelochemicals Produced by Soil Microorganisms. *Weed Science* 64(1): 119-128.
- Castañeda, L.E. and O. Barbosa. 2016. Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forests. *PeerJ PrePrints* 4:e1661v1.
- Cawoy, H., W. Bettioli, P. Fickers and M. Ongena. 2011. *Bacillus*-based biological control of plant diseases. *Pesticides in the modern world—pesticides use and management. InTech, Rijeka*: 273-302.

- Chan, K.G., J.W. Chen, C.Y. Chang, W.F. Yin and X.Y. Chan. 2015. Draft genome sequence of *Lysinibacillus* sp. strain A1, isolated from Malaysian tropical soil. *Genome announcements* 3(2): e00095-15.
- Chapelle, E., R. Mendes, P.A. HM Bakker and J.M. Raaijmakers. 2016. Fungal invasion of the rhizosphere microbiome. *The ISME journal* 10(1): 265-268.
- Chaparro JM, D.V. Badri, M. G. Bakker, A. Sugiyama, D. K. Manter, J. M. Vivanco. 2013. Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS ONE* 8(2):e55731.
- Chowdhury, S.P., M. Schmid, A. Hartmann and A.K. Tripathi. 2007. Identification of diazotrophs in the culturable bacterial community associated with roots of *Lasiurus indicus*, a perennial grass of Thar Desert, India. *Microbial ecology* 54(1): 82-90.
- Clark, F.E. 1949. Soil microorganisms and plant roots. *Adv Agron* 1:241–288
- Conn, H. J. 1918. The microscopic study of bacteria and fungi in soil. *New York Agr. Exp. Sta., B.il. Tech.* 64.
- Coutinho, T.A. and S.N. Venter. 2009. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular plant pathology* 10(3): 325-335.
- Cox, M.J., W.O. Cookson and M.F. Moffatt. 2013. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Human molecular genetics*: ddt398.
- Davis, K.E.R., S.J. Joseph and P.H. Janssen. 2005. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied and environmental microbiology* 71(2): 826-834.
- de Melo Pereira, G.V., K.T. Magalhães, E.R. Lorenzetii, T.P. Souza and R.F. Schwan. 2012. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. *Microbial ecology* 63(2): 405-417.
- Dessaux, Y., C. Grandclément, and D. Faure. 2016. Engineering the Rhizosphere. *Trends in plant science* 21, 3: 266-278.
- Dinsdale, E.A., R.A. Edwards, D. Hall, F. Angly, M. Breitbart, J.M. Brulc, M. Furlan, *et al.* 2008. Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature* 452, 629-632.

- Escalante, A.E., L. J. Barbolla, S. Ramírez-Barahona and L.E. Eguiarte. 2014. The study of biodiversity in the era of massive sequencing. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85(4): 1249-1264.
- Estrada-de Los Santos, P., N.B. Vacaseydel-Aceves, L. Martínez-Aguilar, M.A. Cruz-Hernández, A. Mendoza-Herrera and J. Caballero-Mellado. 2011. Cupriavidus and Burkholderia species associated with agricultural plants that grow in alkaline soils. *The Journal of Microbiology* 49(6): 867-876.
- Fang, S., D. Liu, Y. Tian, S. Deng and X. Shang. 2013. Tree species composition influences enzyme activities and microbial biomass in the rhizosphere: a rhizobox approach. *PloS one* 8(4): e61461.
- Fantini, E., G. Gianese, G. Giuliano and A. Fiore. 2015. Bacterial metabarcoding by 16S rRNA gene ion torrent amplicon sequencing. *Bacterial Pangenomics: Methods and Protocols*: 77-90.
- Frankenberger Jr, W.T. and M. Arshad. 1995. Phytohormones in soils: microbial production and function. NY, United States of America: Marcel Dekker Inc.
- Gao, B. and R.S. Gupta. 2005. Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55(6): 2401-2412.
- Glenn, T. C. 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources* 11: 759-769.
- Girvan M.S., C. D. Campbell, K. Kilham, J.I. Prosser, L.A. Glover. 2005 Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environmental Microbiology* 7:301–313.
- Gobran, G.R. and S. Clegg. 1996. A conceptual model for nutrient availability in the mineral soil-root system. *Canadian Journal of Soil Science* 76(2): 125-131.
- Gopalakrishnan, S., V. Srinivas, B. Prakash, A. Sathya and R. Vijayabharathi. 2015. Plant growth-promoting traits of *Pseudomonas geniculata* isolated from chickpea nodules. *3 Biotech*5(5): 653-661.
- Goris, J., P. De Vos, T. Coenye, B. Hoste, D. Janssens, H. Brim, L. Diels, M. Mergeay, K. Kersters and P. Vandamme. 2001. Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle et

- al. 1998 emend. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(5): 1773-1782.
- Gorla, P. 2015. *Molecular phylogeny of organophosphorus pesticide degrading soil bacterium isolated from the agricultural soils of Anantapur district*. Master diss., SK University.
- Gupta, P., A. Manjula, J. Rajendhran, P. Gunasekaran and J. Vakhlu. 2016. Comparison of metagenomic DNA extraction methods for soil sediments of high elevation Puga hot spring in Ladakh, India to explore bacterial diversity. *Geomicrobiology Journal* 1: 00-00.
- Hammer, Ø., D. A. T. Harper and P. D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1):9pp.
- Handelsman J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68:669 – 685.
- Hernández, A., R.P. Mellado and J.L. Martínez. 1998. Metal Accumulation and Vanadium-Induced Multidrug Resistance by Environmental Isolates of *Escherichia hermannii* and *Enterobacter cloacae*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(11): 4317-4320.
- Hirsch, P. R., T. H. Mauchline and I. M. Clark. 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 6:878-887.
- Holland, T.C., P.A. Bowen, C.P. Bogdanoff, T.D. Lowery, O. Shaposhnikova, S. Smith and M.M. Hart. 2016. Evaluating the diversity of soil microbial communities in vineyards relative to adjacent native ecosystems. *Applied Soil Ecology*, 100: 91-103.
- Hou, J., W. Liu, B. Wang, Q. Wang, Y. Luo and A. E. Franks. 2015. PGPR enhanced phytoremediation of petroleum contaminated soil and rhizosphere microbial community response. *Chemosphere* 138: 592-598.
- Janda, J.M. and S.L. Abbott. 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical microbiology reviews* 23(1): 35-73.
- Janssen, D.B., J.E. Oppentocht and G.J. Poelarends. 2001. Microbial dehalogenation. *Current Opinion in Biotechnology* 12(3): 254-258.

- Jara, C., E. Mateo, J.M. Guillamón, M.J. Torija and A. Mas. 2008. Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods. *International journal of food microbiology* 128(2): 336-341.
- Jensen, V. 1962. Studies on the microflora of Danish beech forest soils. I. The dilution plate count technique for the enumeration of bacteria and fungi in soil. *Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd. Abt 2*(116): 13-32.
- Jha, B., I. Gontia and A. Hartmann. 2012. The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. *Plant and Soil* 356(1-2): 265-277.
- Jha, A., J. Saxena and V. Sharma. 2013. Investigation on Phosphate Solubilization Potential of Agricultural Soil Bacteria as Affected by Different Phosphorus Sources, Temperature, Salt, and pH. *Communications in soil science and plant analysis* 44(16): 2443-2458.
- Jha, S.K., P. Jain and H.P. Sharma. 2015. Xenobiotic Degradation by Bacterial Enzymes. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 4(6): 48-62.
- Jones, D.L. and P. Hinsinger. 2008. The rhizosphere: complex by design. *Plant Soil* 312, 1–6.
- Killham, K. and J.I. Prosser. 2014. The bacteria and Archaea. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*: 41.
- Köberl, M., H. Müller, E.M. Ramadan and G. Berg. 2011. Desert farming benefits from microbial potential in arid soils and promotes diversity and plant health. *PLoS One* 6(9): e24452
- Kuramae, E.E., E. Yergeau, L.C. Wong, A.S. Pijl, J.A. Veen and G.A. Kowalchuk. 2012. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiology Ecology* 79(1): 12-24
- Li, J., B.J. McConkey, Z. Cheng, S. Guo and B.R. Glick. 2013. Identification of plant growthpromoting bacteria-responsive proteins in cucumber roots under hypoxic stress using a proteomic approach. *Journal of Proteomics* 84: 119–131
- Liu, Q., Y. Zhang, N. Yu, Z. Bi, A. Zhu, X. Zhan, W. Wu, *et al.* 2015. Genome sequence of *Pseudomonas parafulva* CRS01-1, an antagonistic bacterium isolated from rice field. *Journal of biotechnology*(206): 89-90.

- Lundberg, D.S., S.L. Lebeis, S.H. Paredes, S. Yourstone, J. Gehring, S. Malfatti, J. Tremblay, *et al.* 2012. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488, 86–90.
- Lynch, J.M. 1987. *The rhizosphere*. Chichester, England: Wiley Interscience
- Mapelli, F., R. Marasco, E. Rolli, M. Barbato, H. Cherif, A. Guesmi, I. Ouzari, D. Daffonchio and S. Borin. 2013. Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with *Salicornia* growing in Tunisian hypersaline soils. *BioMed research international* 2013.
- Matilla, M.A., P. Pizarro-Tobias, A. Roca, M. Fernández, E. Duque, L. Molina, X. Wu, *et al.* 2011. Complete genome of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* BIRD-1. *Journal of bacteriology* 193(5): 1290-1290.
- Mayrberger, J.M. 2011. Studies of genera cytophaga-flavobacterium in context of the soil carbon cycle. *Dissertation Abstracts International* 73(01).
- Mendes, R., M. Kruijt, I. de Bruijn, E. Dekkers, M. van der Voort, J.H.M. Schneider, Y. M. Piceno, *et al.* 2011. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* 332, 1097–1100.
- Mendes, L.W., E.E. Kuramae, A.A. Navarrete, J.A.V. Veen and S.M. Tsai. 2014. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. *The ISME journal* 8(8): 1577-1587.
- Mendes, L.W., S.M. Tsai, A.A. Navarrete, M. De Hollander, J.A. van Veen and Eiko E. Kuramae. 2015. Soil-borne microbiome: linking diversity to function. *Microbial ecology* 70(1): 255-265.
- Molina, L., C. Ramos, E. Duque, M.C. Ronchel, J.M. García, L. Wyke and J.L. Ramos. 2000. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 32(3): 315-321.
- Morris S.J. and C. B. Blackwood. 2015. *The Ecology of the Soil Biota and their Function. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (Fourth Edition). Boston, United States of America. Eldor A. Paul, *Academic Press*, 273-309.
- Muyzer, G., E. C. De Waal and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis

- of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* 59, no. 3: 695-700.
- Octavia, S. and R. Lan. 2014. The Family Enterobacteriaceae. *The Prokaryotes: gammaproteobacteria*: 225-286.
- Olden, J.D. and N. LeRoy Poff. 2003. Toward a mechanistic understanding and prediction of biotic homogenization. *The American Naturalist* 162(4): 442-460.
- Ottesen, A. R., A. González, J. R. White, J. B. Pettengill, C. Li, S. Allard, S. Rideout, *et al.* 2013. Baseline survey of the anatomical microbial ecology of an important food plant: *Solanum lycopersicum* (tomato). *BMC microbiology* 13, no. 1: 1.
- Paiva, G., D.N. Proença, R. Francisco, P. Verissimo, S.S. Santos, L. Fonseca, I.M.O. Abrantes and P.V. Morais. 2013. Nematicidal bacteria associated to pinewood nematode produce extracellular proteases. *PloS one* 8,(11): e79705.
- Pawlicki-Jullian, N., B. Courtois, M. Pillon, D. Lesur, A. Le Flèche-Mateos, J.C. Laberche, N. Goncharova and J. Courtois. 2010. Exopolysaccharide production by nitrogen-fixing bacteria within nodules of *Medicago* plants exposed to chronic radiation in the Chernobyl exclusion zone. *Research in microbiology* 161(2): 101-108.
- Pham, V.H.T., and J. Kim. 2012. Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in biotechnology* 30(9): 475-484.
- Pinton R., Z. Varanini and P. Nannipieri. 2001. *The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants and microorganisms, The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. New York, United States of America: Marcel Dekker, 1–17
- Pizarro-Tobías, P., M. Fernández, J.L. Niqui, J. Solano, E. Duque, J.L. Ramos and A. Roca. 2015. Restoration of a Mediterranean forest after a fire: bioremediation and rhizoremediation field-scale trial. *Microbial biotechnology* 8(1): 77-92.
- Prashar, P., N. Kapoor and S. Sachdeva. 2014. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 13(1): 63-77.

- Quail, M.A., M. Smith, P. Coupland, T.D. Otto, S.R. Harris, T.R. Connor, A. Bertoni, H.P. Swerdlow and Y. Gu. 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 13:341.
- Quisehuatl-Tepexicuapan, E., R. Ferrera-Cerrato, H.V. Silva-Rojas, S. Rodriguez-Zaragoza, A. Alarcón and J.J. Almaraz-Suárez. 2014. Free-living culturable bacteria and protozoa from the rhizoplanes of three floating aquatic plant species. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*: 1-11.
- Rao, S. 2012. Microbial ecology of hot and cold desert soils. Ph.D. diss. The University of Hong Kong.
- Rademacher W. 1994. Gibberellin formation in microorganisms. *Plant Growth Reg* 5:303–314.
- Reddy, M. S., R. I. Ilao, P. S. Faylon, W. D. Dar, R. Sayyed, H. Sudini, K. V. K. Kumar and A. Armanda. 2013. Recent advances in biofertilizers and biofungicides (PGPR) for sustainable agriculture. Proceedings of 3rd Asian Conference on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and other Microbials, Manila, Philippines, 21-24 April. In Recent advances in biofertilizers and biofungicides (PGPR) for sustainable agriculture. Proceedings of 3rd Asian Conference on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and other Microbials, Manila, Philippines, 21-24 April, 2013. *Asian PGPR Society for Sustainable Agriculture*.
- Reddy, P.P. 2016. *Sustainable Crop Protection Under Protected Cultivation*. Singapore: Springer.
- Roca, A., P. Pizarro-Tobías, Z. Udaondo, M. Fernández, M.A. Matilla, M.A. Molina-Henares, L. Molina, A. Segura, E. Duque and J.L. Ramos. 2013. Analysis of the plant growth-promoting properties encoded by the genome of the rhizobacterium *Pseudomonas putida* BIRD-1. *Environmental microbiology* 15(3): 780-794.
- Rocha, L.L., G. B. Colares, V.L.R. Nogueira, F.A. Paes and V.M.M. Melo. 2016. Distinct Habitats Select Particular Bacterial Communities in Mangrove Sediments. *International Journal of Microbiology* Feb,2016:1-6
- Rodrigues, J.L.M., V.H. Pellizari, R. Mueller, K. Baek, E.d.C. Jesus, F.S. Paula, B. Mirza, *et al.* 2013. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture

- results in biotic homogenization of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(3): 988-993.
- Roesch, L.F.W., R.R. Fulthorpe, A. Riva, G. Casella, A. K. M. Hadwin, A. D. Kent, S. Daroub, F.A.O. Camargo, W. G. Farmerie, E. W. Triplett. 2007. Pyrosequencing of 16S rRNA reveals contrasts in microbial diversity of four soils. *The ISME Journal* 1, 283e290.
- Roh, C., F. Villatte, B.G. Kim and R.D. Schmid. 2006. Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from soil and sludge samples. *Applied biochemistry and biotechnology* 134(2): 97-112.
- Saharan, B.S. 2014. Optimization of cultural conditions of *Pseudomonas fulva* SMA 24 from *Aloe vera* rhizosphere for phosphate solubilization. *Annals of Biology* 30(4): 608-612.
- Sanschagrin, S. and E. Yergeau. 2014. Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 90: e51709-e51709.
- Schloss, P.D. and J. Handelsman. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and environmental microbiology* 71(3): 1501-1506.
- Scitable, Definitions. 2014. United States of America: *Nature education*.
- Segura, A. and J.L. Ramos. 2013. Plant–bacteria interactions in the removal of pollutants. *Current opinion in biotechnology* 24(3): 467-473.
- SeurKee, P., L. HyoYeon and K. KiChung. 1995. Antagonistic effect of chitinolytic bacteria on soilborne plant pathogens. *Korean Journal of Plant Pathology* 11(1): 47-52.
- Sharma, N., and B. S. Saharan. 2015. Role of *Lysinibacillus sphaericus* SNCh5 Bacterial Strain as Bio-inoculant for Agriculture Practice. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 4(12): 484-499.
- Shen, Z., Y. Ruan, B. Wang, S. Zhong, L. Su, R. Li and Q. Shen. 2015. Effect of biofertilizer for suppressing *Fusarium* wilt disease of banana as well as enhancing microbial and chemical properties of soil under greenhouse trial. *Applied Soil Ecology* 93: 111-119.
- Skinner, F.A., P.C.T. Jones and J.E. Mollison. 1952. A comparison of a direct- and a plate-counting technique for the quantitative estimation of soil microorganisms. *Microbiology* 6(3-4): 261-271.

- Sturz, A.V., B.G. Matheson, W. Arsenault, J. Kimpinski and B. R. Christie. 2001. Weeds as a source of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural soils. *Canadian journal of microbiology* 47(11): 1013-1024.
- Thies, J. E. 2015. *Molecular Approaches to Studying the Soil Biota. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (Fourth Edition). Boston, United States of America. Eldor A. Paul, *Academic Press*, 151-185
- Tian, B., J. Yang and K.Q. Zhang. 2007. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS microbiology ecology* 61(2): 197-213.
- Torsvik, V., R. Sørheim and J. Goksøyr. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities- A review. *Journal of Industrial Microbiology* 17(3-4): 170-178.
- Tsuboi, S., S. Yamamura, T. Nakajima-Kambe and K. Iwasaki. 2015. Diversity of alkane hydroxylase genes on the rhizoplane of grasses planted in petroleum-contaminated soils. *SpringerPlus* 4(1): 1-10.
- Tyson G.W., J. Chapman, P. Hugenholtz, E.E. Allen, R.J. Ram, P.M. Richardson, V.V.Solovyev, E.M. Rubin, D.S. Rokhsar, J.F. Banfield. 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428:37–43.
- Udaondo, Z., L. Molina, A. Segura, E. Duque and J.L. Ramos. 2015. Analysis of the core genome and pangenome of *Pseudomonas putida*. *Environmental microbiology* Oct, 2015.
- Van der Heijden, M.G.A., R.D. Bardgett., N.M. Van Straalen. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letter* 11, 296–310.
- Vallejo-Quintero, V. E. 2013. Importancia y utilidad de la evaluación de la calidad de suelos mediante el componente microbiano: Experiencias en sistemas silvopastoriles. *Colombia Forestal* 16(1): 83-99.
- Van Dillewijn, P., H. Nojiri, V.D. Meer, J. Roelof and T.K. Wood. 2009. Bioremediation, a broad perspective. *Microbial biotechnology* 2(2): 125-127.
- Vega-Avila, A.D., T. Gumiere, P.A.M. Andrade, J.E. Lima-Perim, A. Durrer, M. Baigori, F. Vazquez and F.D. Andreote. 2015. Bacterial communities in the

- rhizosphere of *Vitis vinifera* L. cultivated under distinct agricultural practices in Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek* 107(2): 575-588.
- Verma, D., and T. Satyanarayana. 2011. An improved protocol for DNA extraction from alkaline soil and sediment samples for constructing metagenomic libraries. *Applied biochemistry and biotechnology* 165(2): 454-464.
- Voroney, R.P. 2007. The soil habitat. Soil microbiology, ecology and biochemistry. Eldor A. Paul (Ed.), *Elsevier, Oxford*.
- Voroney, R.P. and R.J. Heck. 2015. The Soil Habitat. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition). Boston, United States of America. Eldor A. Paul, *Academic Press*, 15-39.
- Wang, Y., Y. Qin, W. Kot, F. Zhang, S. Zheng, G. Wang, L. H. Hansen, and C. Rensing. 2016. Genome sequence of selenium-solubilizing bacterium *Caulobacter vibrioides* T5M6. *Genome announcements* 4(1): e01721-15.
- Wen, L.S., K. Philip, and N. Ajam. 2016. Purification, characterization and mode of action of plantaricin K25 produced by *Lactobacillus plantarum*. *Food Control* 60: 430-439.
- Weyens, N., S. Truyens, J. Dupae, L. Newman, S. Taghavi, D.V.D. Lelie, R. Carleer and J. Vangronsveld. 2010. Potential of the TCE-degrading endophyte *Pseudomonas putida* W619-TCE to improve plant growth and reduce TCE phytotoxicity and evapotranspiration in poplar cuttings. *Environmental Pollution* 158(9): 2915-2919.
- Whiteley, A.S., S. Jenkins, I. Waite, N. Kresoje, H. Payne, B. Mullan, R. Allcock and A. O'Donnell. 2012. Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. *Journal of microbiological methods* 91(1): 80-88.
- Wilke, A., E.M. Glass, J. Bischof, D. Braithwaite, M. D'Souza, W. Gerlach, T. Harrison, et al. 2015. *MG-RAST Manual*, Version 3.6, revision 3.
- Willems, A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil* 287(1-2): 3-14.
- Yanagida, F., Y.S. Chen and T. Shinohara. 2005. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from soils in vineyards. *The Journal of general and applied microbiology* 51(5): 313-318.

- Zarraonaindia, I., S.M. Owens, P. Weisenhorn, K. West, J. Hampton-Marcell, S. Lax, N. A. Bokulich, *et al.* 2015. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio* 6(2): e02527-14.
- Zhang, X., Q. Yao, Z. Cai, X. Xie and H. Zhu. 2013. Isolation and Identification of Myxobacteria from Saline-Alkaline Soils in Xinjiang, China. *PloS one* 8(8): e70466.
- Zhou, J., Z. He, Y. Yang, Y. Deng, S.G. Tringe and L. Alvarez-Cohen. 2015. High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: open and closed formats. *MBio* 6(1): e02288-14.

9. ANEXOS

Anexo 1. Ubicación geográfica del área de muestreo de suelos prístinos y cultivados con vid en ECOSAC AGRICOLA S.A.C, Castilla – Piura, Perú.



Anexo 2. Zonas de muestreos realizados en ECOSAC AGRICOLA S.A.C.

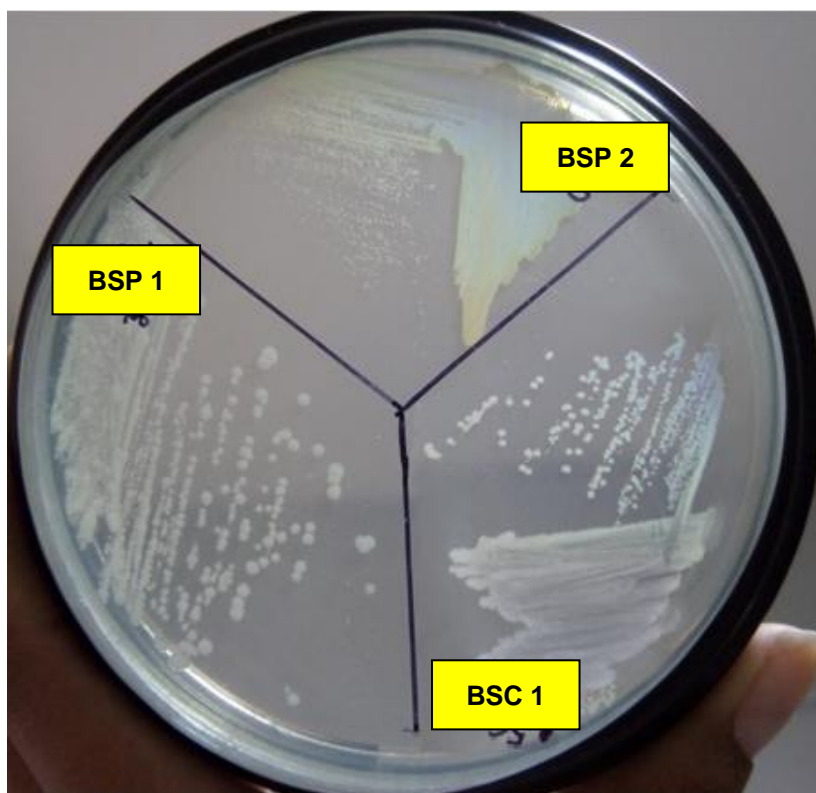


Área de muestreo: Suelo prístino.

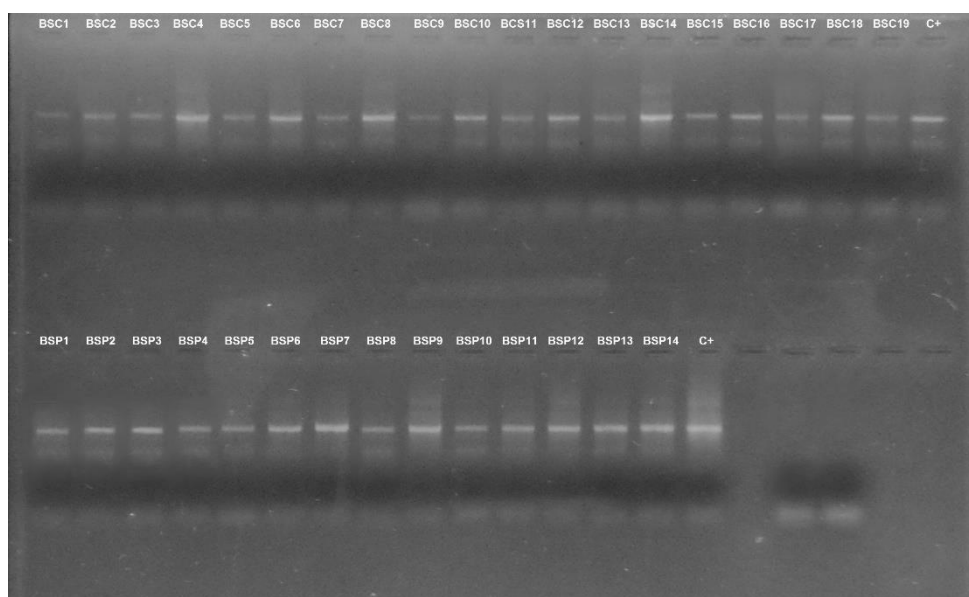


Área de muestreo: Suelo cultivado con Vid

Anexo 3. Aislamiento y migración electroforética del ADN de las cepas obtenidas de las muestras de suelo prístino y cultivado con vid.



A. Crecimiento en placa de cepas aisladas de suelo prístino (Bacterias Suelo Prístino, BSP) y de suelo cultivado (Bacterias Suelo Cultivado, BSC)

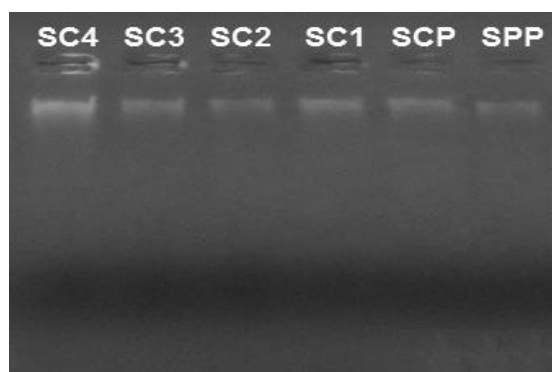


B. Gel de electroforesis del gen ADNr 16S de las bacterias aisladas de Suelo Prístino (BSP) y suelo cultivado (BSC). C+: control positivo; CRx: control de reacción; CE: control de extracción.

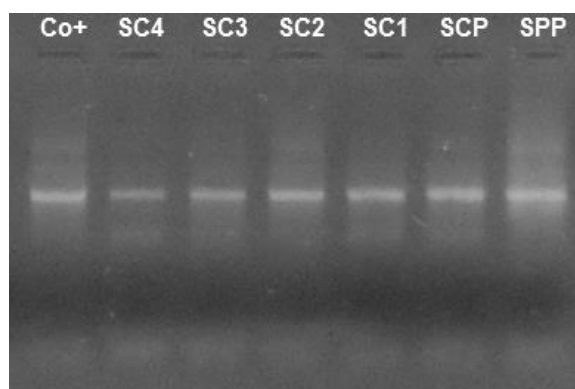
Anexo 4. Procesamiento del ADN aislado de las muestras de suelos prístino y cultivados para la metagenómica dirigida al gen ADNr 16S.

A. Cuantificación y calidad de ADN metagenómico aislado de las muestras de suelo prístino (SPP) y suelos cultivados (SCP, SC1, SC2, SC3 y SC4).

ADN	Descripción de suelo		Método de extracción	Absorbancia a ug/ml	A _{260/280}	A _{260/230}
SC ₁	Muestra suelo cultivado	0.25 g	Power soil	11	1.48	0.48
SC ₂	Muestra suelo cultivado	0.25 g	Power soil	13	2.21	0.26
SC ₃	Muestra suelo cultivado	0.25 g	Power soil	7	1.55	0.32
SC ₄	Muestra suelo cultivado	0.25 g	Power soil	10	1.74	0.44
SCP _P	Muestra agrupada de suelo cultivado	4g	Prot. IB	10	1.68	0.20
SP _P	Muestra agrupada de suelo prístino	4g	Prot. IB	9	1.44	1.68



B. Gel de electroforesis del ADN aislado de las muestras de suelo prístino (SPP) y suelos cultivados (SCP, SC1, SC2, SC3 y SC4).



C. Gel de electroforesis del gen ADNr 16S de las muestras de suelo prístino (SPP) y suelos cultivados (SCP, SC1, SC2, SC3 y SC4). C+:control positivo

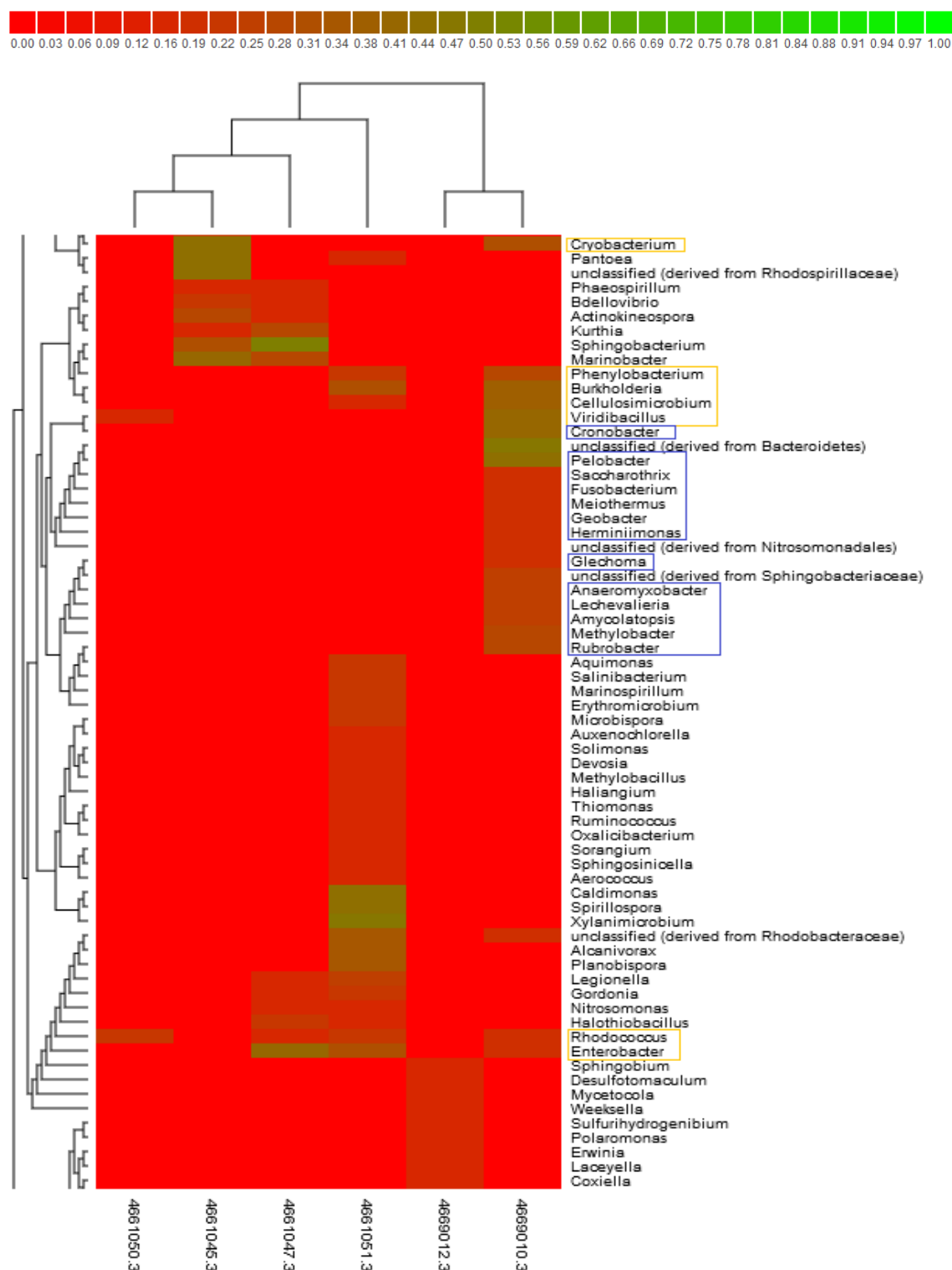
Anexo 5A. Heatmap a nivel género de las metagenómicas en suelo prístino y cultivado. En esta gráfica se observa la diferencia entre las metagenómicas en relación a sus

OTUs; el gráfico fue realizado mediante la normalización de la abundancia de cada muestra, se calculó las distancias Bray-Curtis y se agrupó por Ward. (SP_P, Cod: 4669010.3; SC_P, Cod.: 4669012.3; SC₁, cod.: 4661047.3; SC₂, cod.: 4661045.3; SC₃, cod.:4661050.3; SC₄, cod.: 4661051.3). Recuadro amarillo: género identificado en SP_P que permanece en suelo cultivado; recuadro azul: género identificado solo en SP_P. Gráfico elaborado por el software MG-RAST.



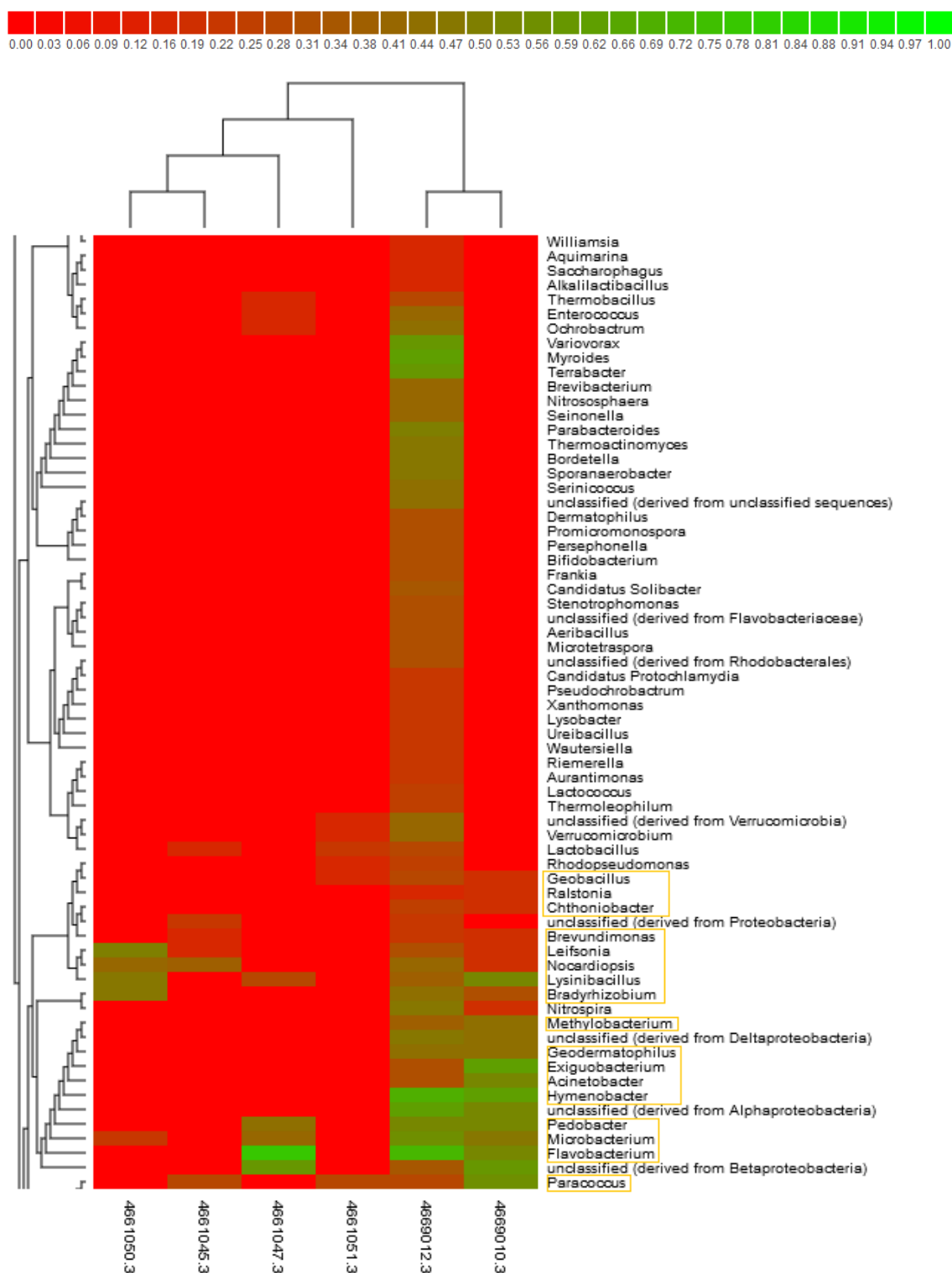
Anexo 5B. Heatmap a nivel género de las metagenómicas en suelo prístino y cultivado. En esta gráfica se observa la diferencia entre las metagenómicas en relación a sus

OTUs; el gráfico fue realizado mediante la normalización de la abundancia de cada muestra, se calculó las distancias Bray-Curtis y se agrupó por Ward. (SP_p, Cod: 4669010.3; SC_p, Cod.: 4669012.3; SC₁, cod.: 4661047.3; SC₂, cod.: 4661045.3; SC₃, cod.:4661050.3; SC₄, cod.: 4661051.3). Recuadro amarillo: género identificado en SP_p que permanece en suelo cultivado; recuadro azul: género identificado solo en SP_p. Gráfico elaborado por el software MG-RAST..



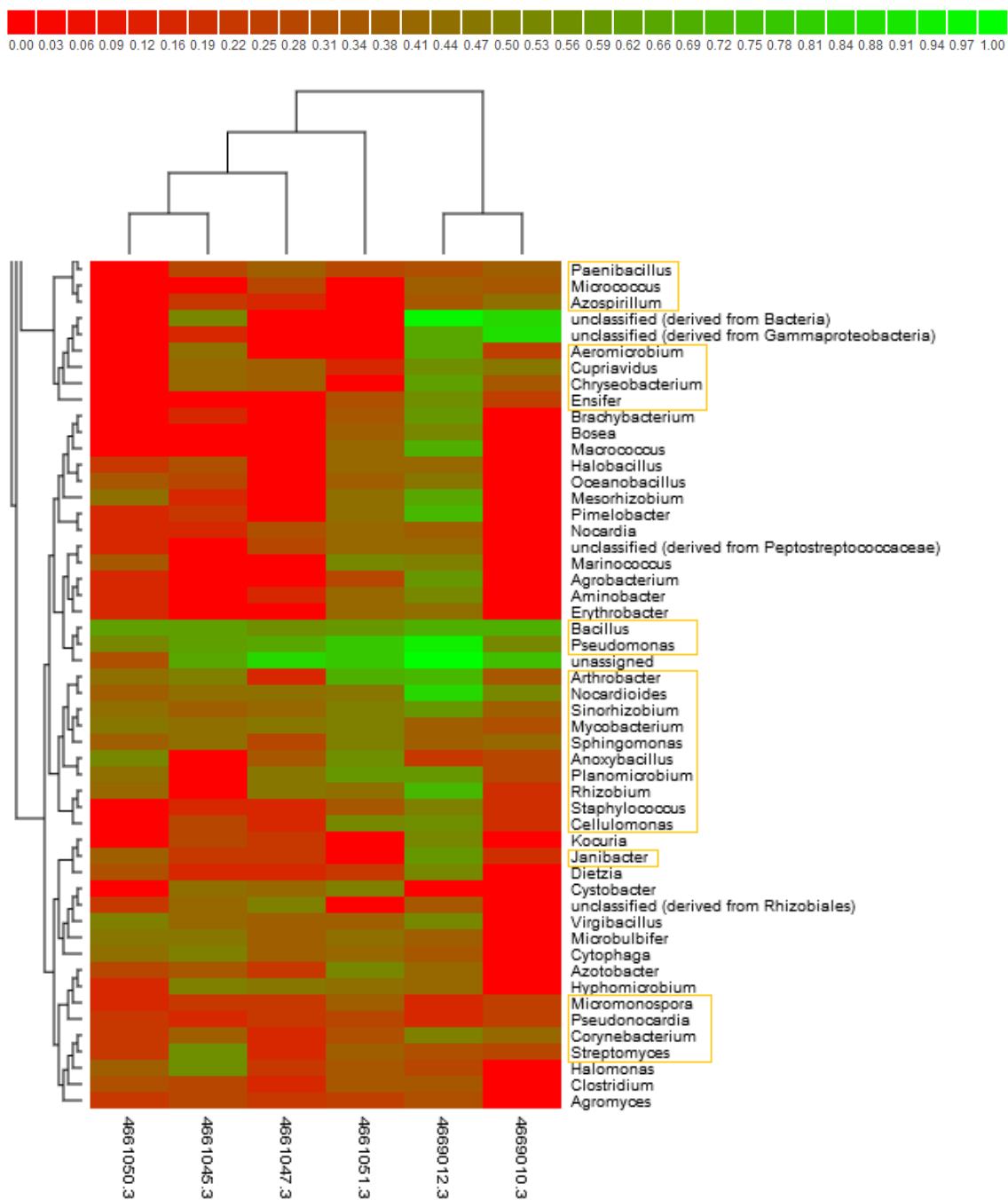
Anexo 5C. Heatmap a nivel género de las metagenómicas en suelo prístino y cultivado. En esta gráfica se observa la diferencia entre las metagenómicas en relación a sus OTUs; el gráfico fue realizado mediante la normalización de la abundancia de cada muestra, se

calculó las distancias Bray-Curtis y se agrupó por Ward. (SP_P, Cod: 4669010.3; SC_P, Cod.: 4669012.3; SC₁, cod.: 4661047.3; SC₂, cod.: 4661045.3; SC₃, cod.:4661050.3; SC₄, cod.: 4661051.3). Recuadro amarillo: género identificado en SP_P que permanece en suelo cultivado; recuadro azul: género identificado solo en SP_P. Gráfico elaborado por el software MG-RAST.



Anexo 5D. Heatmap a nivel género de las metagenómicas en suelo prístino y cultivado. En esta gráfica se observa la diferencia entre las metagenómicas en relación a sus OTUs; el gráfico fue realizado mediante la normalización de la abundancia de cada muestra, se calculó las distancias Bray-Curtis y se agrupó por Ward. (SP_P, Cod: 4669010.3; SC_P, Cod.:

4669012.3; SC₁, cod.: 4661047.3; SC₂, cod.: 4661045.3; SC₃, cod.:4661050.3; SC₄, cod.: 4661051.3). Recuadro amarillo: género identificado en SP_P que permanece en suelo cultivado; recuadro azul: género identificado solo en SP_P. Gráfico elaborado por el software MG-RAST.



A mi familia: Savina, Augusto y Alejandro,
por su continuo apoyo en mi formación
personal, académica y profesional.

AGRADECIMIENTOS

A la CONCYTEC, al Dr. Auberto Hidalgo y a la Dra Enedia Vieyra coordinadores de la Maestría en Biotecnología Molecular por haberme permitido realizar la maestría.

A INCABIOTEC SAC y ECOSAC AGRICOLA SAC por el financiamiento del trabajo de investigación e invertir en la ciencia en el Perú.

Al Ph. D. D.E. Eric Mialhe por haberme guiado durante esta etapa, agradezco mucho sus consejos y enseñanza constante.

A la Dra. Virna Cedeño y al Dr. Emmerik Motte por ser muy buenos profesores y por sus consejos experimentales.

Al grupo de Control biológico de nematodos: Carlos, Stalyn, David y Segundo que con el trabajo en equipo hemos logrado el avance de diferentes tópicos, agradezco mucho su cooperación y compañerismo en estos dos años.

A Juan, Ricardo y Benoit por su paciencia en resolverme dudas experimentales y al grupo de técnicos de INCABIOTEC: Cesar, Peter, Pedro, Rodrigo y Jordana por el apoyo en el laboratorio.

Al grupo de Biotecnología vegetal y nuevos cultivos que hicieron estos dos años una grata experiencia tanto en la oficina como en el laboratorio.

A mis compañeros de maestría: Llacsá, Erick, Mercedes, Yuli, Melitza, Luis, Bernabé, Fredy, Jose y Krizia por todos los buenos momentos y el apoyo brindado en diferentes situaciones en estos dos años de maestría.

A Max por tu amistad, paciencia, compañía y por estar allí, siempre. Miles de gracias.