

Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biología con Énfasis en Manejo de Recursos Naturales

Informe Escrito Final

Caracterización de microorganismos aislados de suelo para la biodegradación de residuos agrícolas del cultivo de banano (*Musa* AAA).

“Tesis de Grado” presentado como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Biología con Énfasis en Manejo de Recursos Naturales

B.Sc. Natalia Villalobos Sequeira

Campus Omar Dengo
Heredia, 2018

Este trabajo de graduación fue_____ por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Manejo de Recursos Naturales.

Dr. Ángel Herrera Ulloa
Presidente del Tribunal

Dr. Meyer Guevara Mora
Dirección de la Escuela de Ciencias Biológicas

M.Sc. Luis Adrián Vega Corrales
Tutor

M.Sc. Claudiana Carr Rodríguez
Asesora

M.Sc. Carola Scholz
Invitada especial

Agradecimientos

Primordialmente quiero agradecer a mis padres, hermanas y hermanos, por haberme apoyado, acompañado y orientado incondicionalmente desde el primer día en que comencé mis estudios de educación superior, de no haber sido por mi familia nada de este gran sueño se hubiese hecho realidad.

A la Universidad Nacional de Costa Rica, porque a través de sus programas de apoyo socioeconómico y académico, he logrado culminar mis estudios e integrar mi conocimiento con un profundo sentido de humanidad y ética. Especialmente quiero agradecer a los académicos M.Sc. Luis Adrián Vega Corrales, Dr. Meyer Guevara Mora y M.Sc. Rodolfo Umaña Castro, de la Escuela de Ciencias Biológicas, por su excelente asesoramiento durante el proceso de gestión, ejecución y análisis de mi trabajo final de graduación.

A la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), porque a través de su financiamiento, sus instalaciones y del conocimiento de su recurso humano se logró desarrollar mi trabajo final de graduación en su Dirección de Investigaciones. Especialmente a M.Sc. Claudiana Carr Rodríguez, los colaboradores del Laboratorio de Control Biológico Juan Carlos Retana Guzmán, Omar Gabriel Vega Molina, al Departamento de Fitoprotección y todos los funcionarios de dicha institución, porque a través de su valioso trabajo incidieron directa o indirectamente en el éxito de este estudio.

Al M.Sc. Alejandro Rodríguez Rodríguez, por gestar los cimientos de esta investigación, e incentivar me como profesional y persona desde el comienzo, pese a cualquier circunstancia. Aprender que la integración del conocimiento de distintas áreas para el servicio de un bien en común, fue una de sus principales enseñanzas.

A Dayan Rivera García, quien no conoció de barreras físicas para transmitirme su amor y apoyo en momentos determinantes para alcanzar esta gran meta profesional y personal.

A todas y todos las y los colegas, amigas y amigos, y docentes que me han acuerpado y extendido una mano cuando más lo necesité.

A la Divinidad, Dios, porque pese a la adversidad, siempre detrás de cada acierto y desacierto, hubo una enseñanza que edificó mi vida tanto a nivel profesional como personal. Amar lo que se hace y hacer lo que se ama es una verdadera bendición de los cielos.

“...el que hace lo que ama, está benditamente condenado al éxito, que llegará cuando deba llegar, porque lo que debe ser será, y llegará naturalmente.” Facundo Cabral (1937 – 2011)

Dedicatoria

A mi familia: padres, hermanas y hermanos, porque gracias a su amor y apoyo incondicional logre culminar mis estudios de educación superior. ¡Gracias infinitas!

Índice

Miembros del Tribunal	I
Agradecimiento	II
Dedicatoria	III
Índice	IV
Índice de cuadro	V
Índice de figuras	VI
Abreviaturas	VII
Resumen	VIII
1. Introducción.....	1
1.2.Antecedentes	1
1.3.Justificación	3
1.4.Planteamiento del problema.....	5
1.5.Objetivos	6
1.5.1.Objetivo General	6
1.5.2.Objetivos Específicos.....	6
2. Marco Teórico	6
3. Marco Metodológico	18
4. Resultados.....	28
5. Discusión.....	32
6. Conclusiones.....	40
7. Recomendaciones	41
8. Referencias	42
9. Anexos.....	54

Índice de cuadro

Cuadro 1. Composición bioquímica de las diferentes partes morfológicas de la planta de banano variedad Cavendish (% p/p del tejido).....	10
Cuadro 2. Principales géneros de microorganismos con actividad celulolítica y lignolítica identificados en matrices de suelo.....	15
Cuadro 3. Principales alternativas para el aprovechamiento del residuo agrícola del cultivo de banano.....	17
Cuadro 4. Composición del medio de cultivo Bushnell Haas.....	20
Cuadro 5. Composición de la solución vitamínica.....	21
Cuadro 6. Cepas identificadas molecularmente a través del gen ARNr 16S para bacterias, según finca de procedencia (confiabilidad 95 %).....	30

Índice de figuras

Figura 1. Principales productos de exportación del sector agrícola de Costa Rica. Fuente: SEPSA (2016).....	7
Figura 2. Principales cantones productores de banano en Costa Rica. Fuente: CORBANA (2011).....	8
Figura 3. Planta de banano (<i>Musa</i> spp.) según sus partes morfológicas. Fuente: Turrado, Saucedo, Sanjuán & Sulbaran, (2009).....	9
Figura 4. Estructura primaria lineal de la celulosa.....	11
Figura 5. Estructura compleja y ramificada de la lignina.....	11
Figura 6. Esquema del flujo de energía en la naturaleza. Fuente: Hernández, (2003).....	12
Figura 7. Relación entre la concentración del crecimiento celular de microorganismos y la concentración de metabolitos a través del tiempo. a) Metabolitos primarios. b) Metabolitos secundario. Fuente: Hernández, (2003).....	13
Figura 8. Puntos de muestreo en la a) Finca La Rebusca del Grupo Acón, b) Finca Balatana del Grupo Surá Green y c) Finca San Pablo de la Compañía Internacional de Banano S.A.Figura.....	19
Figura 9. a) Control positivo de actividad celulolítica: <i>Chitinophaga</i> spp. b) Control positivo de actividad lignolítica: <i>Pleorotus ostreatus</i>	23
Figura 10. Promedio \pm IC 95 % del porcentaje de tasa de degradación según la relación C/N y peso respecto a cada tratamiento e incubación. FR= Finca la Rebusca, FB = Finca Balatana, FSP= Finca San Pablo, I1= Incubación N°1, I2= Incubación N°2 e I3= Incubación N°3.....	27
Figura 11. Tasa de aumento de la concentración de carbono y nitrógeno según cada tratamiento después de cada periodo de incubación. FR= Finca la Rebusca, FB = Finca Balatana, FSP= Finca San Pablo, I1= Incubación N°1, I2= Incubación N°2, I3= Incubación N°3, CI1= Control de la I1, CI2= Control de la I2 y CI3= Control de la I3.....	28
Figura 12. Promedio \pm IC 95 % del índice de diversidad de Shannon (H) de bacterias y hongos respecto a cada tratamiento e incubación. FR= Finca la Rebusca, FB = Finca Balatana, FSP= Finca San Pablo, I1= Incubación N°1, I2= Incubación N°2 e I3= Incubación N°3.....	29
Figura 13. Aproximación filogenética de los aislamiento obtenidos identificadas a través de la integración del análisis bayesiano (IB) y el de máxima verosimilitud (ML) del gen ADNr 16S bacteriano. Los números de soporte se indican sobre la línea de cada una de las ramas (IB/ML, siendo 1 = 100 %), así como los códigos de acceso de las secuencias tomadas del NCBI. spp1= control positivo de actividad celulolítica.....	31

Abreviaturas

ADE: Agua Destilada Estéril

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AIC (siglas en inglés): Akaike

AN: Agar Nutriente

BH: Bushnell Haas

C/N: Relación carbono/nitrógeno

CORBANA: Corporación Bananera Nacional

DGGE (siglas en inglés): Electroforesis en Gradiente Desnaturalizante

FB: Finca Balatana del Grupo Surá Green

FR: Finca La Rebusca del Grupo Acon

FSP: Finca San Pablo de la Compañía Internacional de Banano S.A

I1: Incubación N° 1

I2: Incubación N°2

I3: Incubación N°3

IB: Inferencia Bayesiana

ML (siglas en inglés): Máxima Verosimilitud

NCBI (siglas en inglés): Centro Nacional para la Información Biotecnológica

PCR (siglas en inglés): Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDA: Papa Dextrosa Agar

PGP (siglas en inglés): Promotoras del Crecimiento de Plantas

RA: Residuos Agrícolas

TAE: Tris-acetato-EDTA

UNA: Universidad Nacional de Costa Rica

Resumen

El cultivo del banano, en términos de producción, es el cuarto más importante a nivel mundial y es una de las principales actividades socioeconómicas de Costa Rica. Sin embargo, alrededor del 67% de la biomasa total producida corresponde a residuos agrícolas: pseudotallo, hojas y raquis, los cuales se componen principalmente por biopolímeros como la celulosa y la lignina. En la actualidad esta biomasa residual no tiene un manejo para su aprovechamiento como fuente potencial de materia orgánica y nutrimentos. No obstante, la biodegradación asistida por microorganismos puede ser una alternativa biotecnológica para el manejo de los residuos agrícolas del cultivo de banano. Se realizó la caracterización de microorganismos aislados de suelo de plantaciones de banano del Caribe de Costa Rica, para la biodegradación de residuos agrícolas del cultivo de banano (*Musa* AAA). Muestras compuestas de suelo de tres fincas bananeras que implementan el sistema de siembra en hexágono, se inocularon en el medio de enriquecimiento Bushnell Haas suplementado con 1% de residuos agrícolas como única fuente de carbono. Luego de los periodos de incubación se determinó la tasa de biodegradación según el peso y la relación C/N, mediada por los consorcios de los microorganismos desarrollados, el índice de diversidad a través del análisis DGGE y se aislaron cepas de microorganismos con actividad celulolítica y lignolítica en placas con agar Bushnell Haas con 0.5 % de carboximetilcelulosa y 0.5 % de lignina alcalina (guaiacol 0.2 %), respectivamente. Los aislamientos que presentaron halos de hidrólisis > 2 mm fueron identificados molecularmente. La tasa de biodegradación promedio de los residuos agrícolas del cultivo de banano varió entre el 21.41 y 50.52 % según la relación C/N. De los consorcios de microorganismos desarrollados en cada tratamiento, se aislaron 19 cepas con actividad celulolítica, las cuales presentaron halos de hidrólisis promedio entre 2.09 y 14.3 mm. No se aislaron cepas con actividad lignolítica. Las cepas identificadas se ubicaron en clados correspondientes a 11 géneros diferentes, los de mayor abundancia fueron *Burkholderia* spp., *Aeromonas* spp. y *Flavobacterium* spp. La implementación de buenas prácticas agrícolas y el sistema de siembra hexagonal repercute positivamente en la tasa de biodegradación de los residuos agrícolas a través de la proliferación de microorganismos benéficos. Se debe promover la investigación de biotecnologías que implementen buenas prácticas agrícolas en función del mejoramiento de las condiciones de producción del cultivo de banano, de la reducción del consumo de agroquímicos y el manejo de los recursos naturales.

1. Introducción

1.2. Antecedentes

El monocultivo del banano es la cuarta producción agrícola más importante a nivel mundial (Garcez, Martins & Rodrigues, 2016). Sin embargo, esta actividad implica la generación constante de residuos agrícolas o biomasa residual que no es utilizada técnicamente (Abril, 2016).

En Ecuador, el principal productor y exportador de banano en el mundo (FAO, 2014a), se planteó la optimización de un protocolo para obtener glucosa a partir de los residuos agrícolas del banano, la cual podría ser utilizada como biocombustible (Abril, 2016). Asimismo, Carchi (2014) propuso generar nanocelulosa a partir de estos residuos y Medina, Nuñez, & Ordoñez (2010) produjeron bioalcohol mediante la fermentación sólida asistida por hongos. En Colombia, otro de los más destacados productores de banano en Suramérica, se ha incursionado en la producción de papel de banano (Meneses et al., 2012). Según estos estudios, es posible obtener un producto útil que atribuye un valor agregado a la producción de banano.

Sin embargo, puede que el tratamiento más estudiado y evaluado sea el aprovechamiento de los residuos agrícolas para la producción de abonos orgánicos que reincorporen biomasa y nutrientes al cultivo (Hamidat et al., 2016; Kadir, Jamaludin & Azhari, 2016; Mejía & Gómez, 2002). Esta biofertilización destaca por su potencial para promover el crecimiento de microorganismos benéficos que enriquecen y nutren al suelo, lo cual se refleja en la salud y vigorosidad de las plantas de banano, así como en la tasa de producción y la calidad del fruto (Hamidat et al., 2016).

La generación constante de residuos agrícolas es un panorama común en la mayoría de los monocultivos mundiales, como por ejemplo el trigo, el maíz y los pastizales, estos últimos usados para alimentar ganado (de Lima Brossi, Jiménez, Cortes & van Elsas, 2016). Por ello es de fundamental importancia el desarrollo de tecnologías de producción sostenible que sean amigables con el ambiente, maximicen el aprovechamiento de los recursos naturales y mantengan una alta productividad (Mia, Baset, Shamsuddin & Mahmood, 2010).

Entre las tecnologías de producción sostenible que actualmente se estudian, destacan las innovaciones biotecnológicas vinculadas con microorganismos (bacterias y hongos) dadas sus características fisiológicas y metabólicas (Fanin, Moorhead & Bertrand, 2016). La microbiota o consorcios microbianos son los principales responsables de la sucesión biológica, degradación y reincorporación de materia orgánica e influyen directamente sobre las dinámicas de mineralización del ecosistema (Freixa et al., 2016).

Los consorcios microbianos derivados de distintas matrices: suelo forestal, sedimento de manglares y ríos, residuos agroindustriales o bien de ambientes adversos o degradados (de Lima Brossi et al., 2016; Freixa et al., 2016; González-Sánchez et al., 2015; Soares et al., 2013; Soares, Melo, Dias & Andreote, 2012), se han caracterizado por la capacidad de descomponer celulosa, lignina y hemicelulosa, los cuales corresponden a los principales y más complejos componentes de la biomasa vegetal (de Lima Brossi et al., 2016; Oliveira et al., 2007; Soares et al., 2013; Soares et al., 2012). La actividad celulolítica, lignolítica y hemicelulolítica que tienen estos microorganismos les permite actuar como agentes biodegradantes de residuos agrícolas, de manera que puedan ser aprovechados para biofertilizar el suelo cultivado o generar algún subproducto (de Lima Brossi et al., 2016, González-Sánchez et al., 2015, Medina et al., 2010).

El estudio realizado por de Lima Brossi et al. (2016) utilizó sustratos orgánicos de paja de trigo, hojuelas de maíz y pastizal para enriquecer consorcios microbianos especializados en degradar la celulosa, lignina y hemicelulosa que compone esta biomasa vegetal residual. Esta investigación destaca que la biodegradación asistida por estos microorganismos, implica una transformación enzimática directamente influenciada por la especificidad de la fuente de carbono, la concentración celular y la disponibilidad extracelular, por lo tanto, indican que la biodegradación se maximiza a altas concentraciones celulares.

Es importante recalcar que aunque se ha descrito que los hongos son los principales descomponedores de la lignina (Mohammad, Alam, Kabbashi & Ahsan, 2012), tanto las bacterias como los hongos secretan enzimas que catalizan la degradación de este y los demás polímeros que componen la biomasa vegetal, entre estas se puede mencionar la β -1,4-glucosidasa (BG), β -D-celobiosidasa (CBH), β -xylosidasa (XYL), α -1,4-glucosidasa (AG), β -1,4-N-acetil-glucosaminidasa (NAG), L-leucina aminopeptidasa (LAP) y fosfatasa alcalina (AP) (Fanin et al., 2016). La investigación de Fanin et al. (2016) destaca la importancia estequiométrica y vectorial de la actividad enzimática realizada por estos microorganismos, con lo que concluyó que el origen y la calidad de la fuente de carbono son factores determinantes de la eficiencia del proceso enzimático.

Los estudios realizados por de Lima Brossi et al. (2016) y Jiménez et al. (2016) se desarrollaron en Groningen, una provincia situada al norte de los Países Bajos. En ambos casos se realizaron ensayos de biodegradación mediada por consorcios derivados de suelo de bosque, estos concluyeron que la actividad metabólica de los microorganismos es una alternativa eficiente para la biodegradación del material vegetal y que el desarrollo de estos ensayos permite conocer mejor el proceso enzimático que requiere la descomposición de materia orgánica. En ambos estudios se

realizaron análisis moleculares como extracción y cuantificación de ADN, PCR-DGGE y secuenciación del genoma, con el objetivo de calcular índices de diversidad e identificar cuáles fueron los microorganismos presentes en los consorcios evaluados.

Las innovaciones biotecnológicas están estrechamente vinculadas con la transgénesis como una de las técnicas moleculares más desarrolladas y prometedoras (Han et al., 2017). En el estudio realizado por López-Mondéjar et al. (2016) en República Checa, se recolectaron muestras de suelo de bosque templado de roble, allí identificaron molecularmente los microorganismos con mayor potencial de biodegradación de biomasa residual para obtener biocombustible. La bacteria *Paenibacillus* O199 destacó por poseer un arsenal enzimático con alta actividad celulolítica. Esta investigación planteó el uso de la ingeniería genética para producir una cepa recombinante que produzca una gran cantidad de la enzima identificada en *Paenibacillus* O199, con lo que se puede acelerar sustancialmente el proceso de obtención del biocombustible.

En Costa Rica los principales cultivos permanentes son café, palma aceitera, caña de azúcar, banano y piña (INEC, 2015) y en la actualidad se han planteado estudios para el tratamiento o aprovechamiento del residuo agrícola que genera la caña de azúcar (Delgado, 2004), la piña (Rojas, 2015) y el café (Rojas et al., 2003). No obstante, también han realizado estudios sobre la producción de papel (Blanco, 2008) y mezclas de polipropileno con fibras de pinzote o raquis de banano (Zamora, 2015) con el objetivo de generar biomateriales. Sin embargo, hasta el conocimiento a la fecha, no se han desarrollado investigaciones que consideren el potencial que tienen los microorganismos que habitan los suelos bananeros para biodegradar los residuos agrícolas que genera esta actividad.

1.2. Justificación

El banano es una fruta caracterizada por su alto valor nutricional, el cual es fundamental durante el desarrollo y la madurez del ser humano (Hapsari & Lestari, 2016). Los principales cultivos a nivel mundial son el arroz, maíz, trigo y banano (Viljoen et al., 2004), cada año se producen aproximadamente 85 millones de toneladas de banano, en diferentes países de Centroamérica, Suramérica, Asia y África. Globalmente se exportan 16.5 millones de toneladas de banano, destacando Centroamérica, México y Suramérica como los principales proveedores (FAO, 2014a).

La industria bananera es uno de los sectores agropecuarios más importantes de Costa Rica, influyendo directamente sobre la estabilidad socioeconómica tanto a nivel nacional como regional. El cultivo de banano es una de las principales fuentes de ingreso de divisas al país, exportando más de 106 millones de cajas de banano cada año (CORBANA, 2016), lo cual constituye aproximadamente

el 9.4 % del total de exportaciones (CORBANA, 2017a). Costa Rica dedica más de 50 000 ha al cultivo de banano (Blume & Reichert, 2015), esto representa poco menos del 1 % del territorio nacional y está concentrado principalmente en la provincia de Limón (INEC, 2015).

Estudios realizados por la Escuela de Economía de la Universidad Nacional de Costa Rica, indican que Limón es la segunda provincia con mayor tasa de desempleo en el país (Ortiz, 2013) y, de acuerdo con CORBANA (2017a) el cultivo de banano representa una de las principales fuentes de empleo en la región. La industria bananera genera 40 000 empleos directos y 100 000 indirectos, en actividades tales como comercio, fábricas de insumos y transporte (CORBANA, 2017a).

La actividad bananera ha aumentado exponencialmente desde sus inicios y paralelo a ello ha incrementado el consumo de los recursos naturales considerados dentro de los ecosistemas que han sido utilizados o modificados para expandir su producción (Blanco, 2008). Estos monocultivos implican el uso intensivo de agroquímicos y fertilizantes que contrarrestan los efectos de enfermedades causadas por organismos y mantienen la fertilidad del suelo. No obstante, estos agentes químicos tienen una alta toxicidad y persistencia en el ambiente (Guédez, Castillo, Cañizales & Olivari, 2008), con repercusiones negativas sobre la actividad biológica de la microbiota presente en el suelo (Blume & Reichert, 2015). Ante este panorama, entes como la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), promueven la investigación y el desarrollo de tecnologías de producción sostenible que conserven la salud y calidad del suelo, reduzcan el uso de agentes químicos, mitiguen el impacto ambiental y conserven la productividad que caracteriza la industria bananera costarricense.

La industria bananera genera una gran cantidad de residuos agrícolas que pueden tener un tratamiento o aprovechamiento más eficiente e integral (Blanco, 2008). Los principales residuos agrícolas que genera el cultivo de banano son: banano de rechazo, pseudotallo, hojas y raquis (Blanco, 2008). Por ejemplo, si se considera un peso promedio de 100 kg para una planta de banano al momento de su cosecha, distribuida en 33 % de banano, 50 % de pseudotallo, 15 % de hojas y 2 % de raquis, significa que el 67 % del volumen total de la planta lo constituye biomasa residual que no es aprovechada sistemáticamente (Abril, 2016).

Los residuos agrícolas generados en las bananeras pueden ser apilados y acumulados, deteriorándose lentamente al menos que se aplique algún producto químico que acelere su degradación. También se ha optado por el picado y colocado de esta materia en trincheras de tierra hasta lograr su descomposición natural, reincorporando materia orgánica y alguna cantidad de nutrientes al suelo (Blanco, 2008). A pesar de los esfuerzos de incorporación de estas acciones, la

gran cantidad de biomasa residual que se genera implica la constante búsqueda de nuevas alternativas que den un abordaje integral y que provea de un tratamiento o aprovechamiento apropiado.

Las investigaciones recientes destacan el gran potencial que tienen los microorganismos derivados de suelo para acelerar el proceso de biodegradación de la biomasa vegetal residual de distintos cultivos (de Lima Brossi et al., 2016; Jiménez, Korenblum & van Elsas, 2014; Lo et al., 2009; Pandey et al., 2014). Sin embargo, no se han realizado estudios que caractericen y evalúen el potencial de dichos microorganismos como agentes biodegradantes de los residuos agrícolas que genera la actividad bananera, lo cual plantearía un abordaje integral al manejo del residuo, y además promovería la proliferación de la microbiota benéfica y el enriquecimiento natural del terreno de cultivo (Giacobbe et al., 2016; Mia et al., 2010; Thomas & Soly, 2009).

Estas investigaciones son de fundamental importancia para identificar, evaluar y optimizar procesos de biodegradación de residuos agrícolas asistidos por microorganismos. El panorama actual mundial alude al desaprovechamiento de la biomasa residual que genera uno de los sectores económicos y sociales más importantes del mundo: la agricultura (de Lima Brossi et al., 2016; Jiménez et al., 2016; Jiménez et al., 2014). De modo que la presente investigación tiene por objetivo caracterizar microorganismos aislados de suelo de plantaciones de banano del Caribe de Costa Rica, para la biodegradación de residuos agrícolas del cultivo de banano (*Musa AAA*).

1.3. Planteamiento del problema a investigar

El cultivo de banano es una de las actividades agrícolas más importantes tanto a nivel nacional como internacional. Los residuos agrícolas que genera este cultivo pueden ser tratados o aprovechados mediante el potencial biotecnológico que tienen los microorganismos con actividad celulolítica y lignolítica aislados de suelo, por lo tanto, en la presente investigación se plantea ¿Cuáles microorganismos aislados de suelo bananero tienen potencial para biodegradar los residuos agrícolas del cultivo de banano (*Musa AAA*)?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Caracterizar microorganismos aislados de suelo de plantaciones de banano del Caribe de Costa Rica, para la biodegradación de residuos agrícolas del cultivo de banano (*Musa* AAA).

1.4.2. Objetivos específicos

1. Determinar la tasa de biodegradación de residuos agrícolas del cultivo de banano (*Musa* AAA) mediada por microorganismos aislados de suelo de plantaciones de banano del Caribe de Costa Rica.
2. Seleccionar microorganismos con actividad celulolítica y lignolítica con potencial para la biodegradación de residuos agrícolas del cultivo de banano (*Musa* AAA).
3. Identificar a través de técnicas moleculares, los microorganismos celulolíticos y lignolíticos con potencial para la biodegradación de residuos agrícolas del cultivo de banano (*Musa* AAA).

2. Marco Teórico

2.1. Importancia socioeconómica del cultivo de banano (*Musa* AAA).

La planta de banano pertenece al género *Musa*, específicamente *M. acuminata* (genoma A) y *M. balbisiana* (genoma B). Sin embargo, se puede encontrar una amplia gama de razas nativas y cultivares. La variedad Cavendish es la más cultivada porque mantiene alta productividad durante todo el año (Oliveira et al., 2007). A nivel mundial hay aproximadamente 5 393 811 ha cultivadas con banano (*Musa* AAA) (FAO, 2014b). Este cultivo se desarrolla en regiones con climas tropicales porque requiere de altas temperaturas (18-30 °C), un gran abastecimiento de agua durante todo el año (alrededor de 170 mm por mes), y además suelos profundos con buen drenaje (Elbehri et al., 2015).

Los principales países exportadores de banano se concentran en Latinoamérica y el Caribe, países en vías de desarrollo con climas tropicales. Los importadores más prominentes son Estados Unidos de América, Francia y España, consumiendo cerca de 3 756 000.1 toneladas de banano por año (Elbehri et al., 2015, FAO, 2014a). La ubicación geográfica, las características agronómicas y el

alto rendimiento de producción de Ecuador, Colombia y Costa Rica, les ha permitido destacar como los países latinoamericanos que mayor volumen de banano exportan (FAO, 2014a). No obstante, el cultivo de banano es una industria intensa que implica una sucesión comercial integrada mundialmente (Elbehri et al., 2015).

Costa Rica exporta alrededor de US\$ 1 100 millones por año, de ello el 60.4 % corresponde al sector agrícola. La exportación de banano representa US\$ 228 millones cada año (SEPSA, 2016), cifra que lo coloca como el principal fruto de exportación nacional (Figura 1).

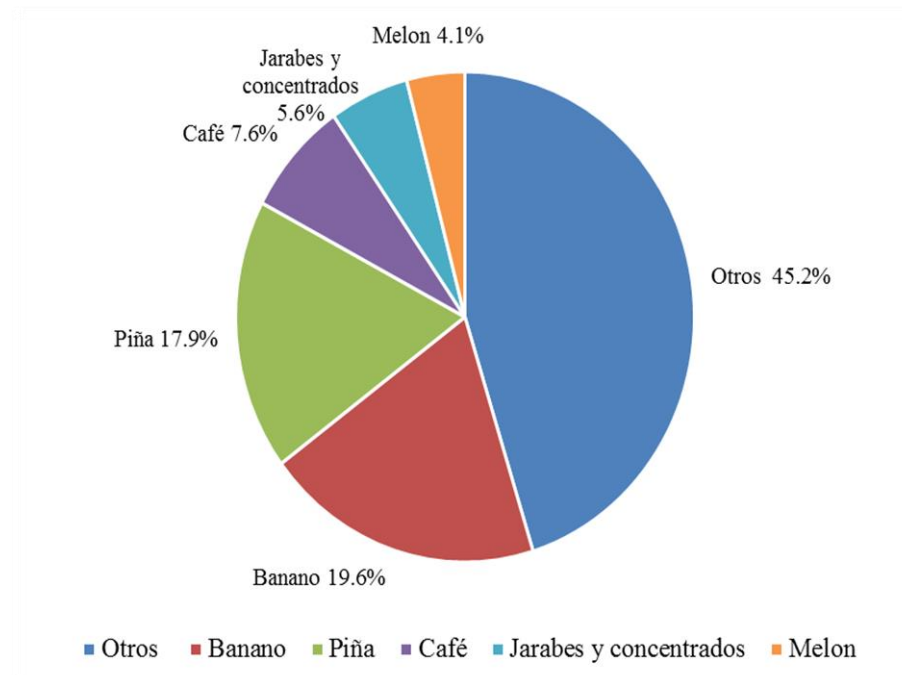


Figura 1. Principales productos de exportación del sector agrícola de Costa Rica. Fuente: SEPSA (2016).

Los cultivos de banano en Costa Rica se distribuyen principalmente en la Región Caribe (Figura 2) y se caracterizan por tener una productividad promedio de 2 325 cajas de banano por hectárea, una de las más altas del mundo (CORBANA, 2011). Según las estadísticas de la Corporación Bananera Nacional, el país exporta aproximadamente 101 millones de cajas de banano cada año, es decir, alrededor de 1 825 498 toneladas métricas. Este volumen es destinado en un 55.2 % a la Unión Europea, 36 % a Estados Unidos de América y 8.8 % a Panamá, Arabia Saudita, Rusia, Turquía y Noruega (CORBANA, 2017b).

La logística de importación se basa en la distancia geográfica, por ello los Estados Unidos recibe el producto bananero en los puertos de la costa este, mientras que en Europa, la mayoría del

cargamento se descarga en los puertos de Italia, Reino Unido, Alemania, Bélgica, Holanda, España, Grecia y Finlandia, quienes son a su vez los principales países europeos consumidores del banano costarricense (CORBANA, 2017b).

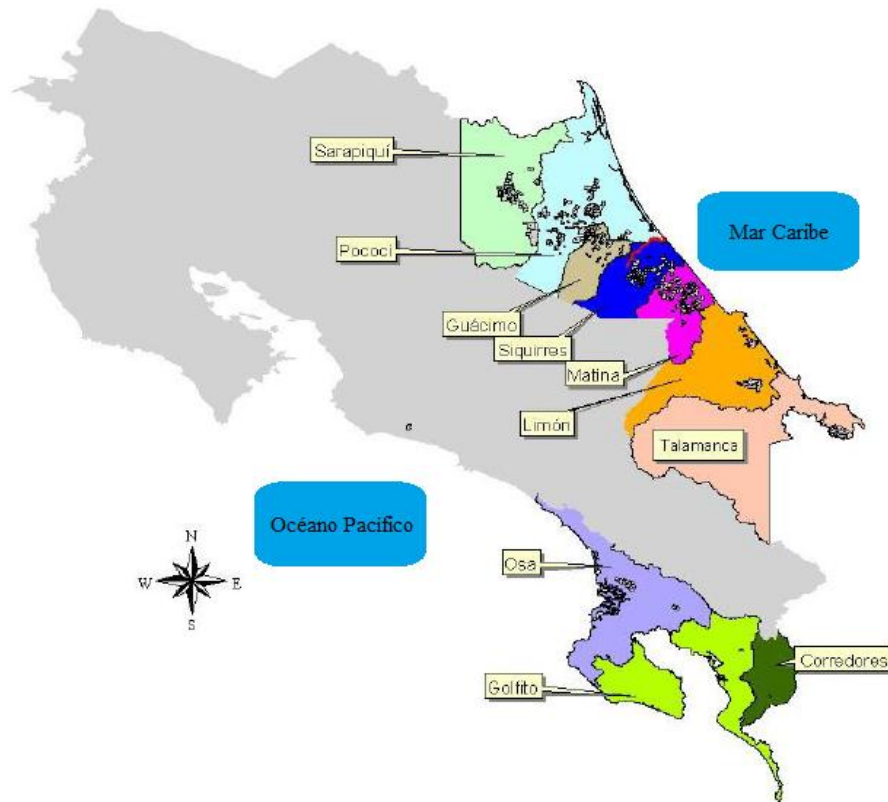


Figura 2. Principales cantones productores de banano en Costa Rica. Fuente: CORBANA (2011).

En la actualidad, con una trayectoria mayor a los 100 años, la industria bananera es una de las actividades agrícolas con mayor impacto socioeconómico en Costa Rica, tiene un posicionamiento fundamental en el ámbito agrícola nacional, al catalogarse como una de las principales fuentes de desarrollo económico y social en la Zona Caribe (CORBANA, 2011). Por lo tanto, la industria bananera en Costa Rica integra intereses sociales, económicos y ambientales. Destacarse como una de las principales actividades agrícolas del país la coloca en una posición de liderazgo en términos de compromiso socioeconómico y ambiental.

Es de fundamental importancia la constante investigación que provea de herramientas para desarrollar, mejorar y administrar correctamente la industria bananera nacional e implementar buenas prácticas agrícolas que incorporen tecnologías sostenibles, la reducción del consumo de

agroquímicos, el manejo de los recursos naturales y el tratamiento de los residuos agrícolas (CORBANA, 2011).

2.2. Residuos agrícolas del cultivo de banano (*Musa* AAA).

El concepto de “residuo” alude al material restante de una actividad determinada que no es aprovechado sistemáticamente. Los residuos agrícolas corresponden al tejido vegetal que no es tratado o aprovechado integralmente dentro o posterior a la actividad agraria (Oliveira et al., 2007). El cultivo de banano cosecha solamente un racimo de fruto por planta, lo que significa que aproximadamente el 67 % del volumen total de la planta, es considerado biomasa residual (Abril, 2016). Los principales residuos agrícolas del cultivo de banano son pseudotallo, hojas y raquis (Blanco, 2008), y en el caso de la variedad Cavendish se producen, en términos de peso seco, 8 t/ha residuales de pseudotallo, 7.7 t/ha de hojas y 0.5 t/ha de raquis (Oliveira et al., 2007).

El conocimiento de la composición bioquímica del tejido vegetal de la planta de banano, según sus diferentes partes morfológicas (Figura 3), es de fundamental importancia para desarrollar investigaciones para el aprovechamiento del residuo agrícola que genera esta actividad agrícola (Oliveira et al., 2007).

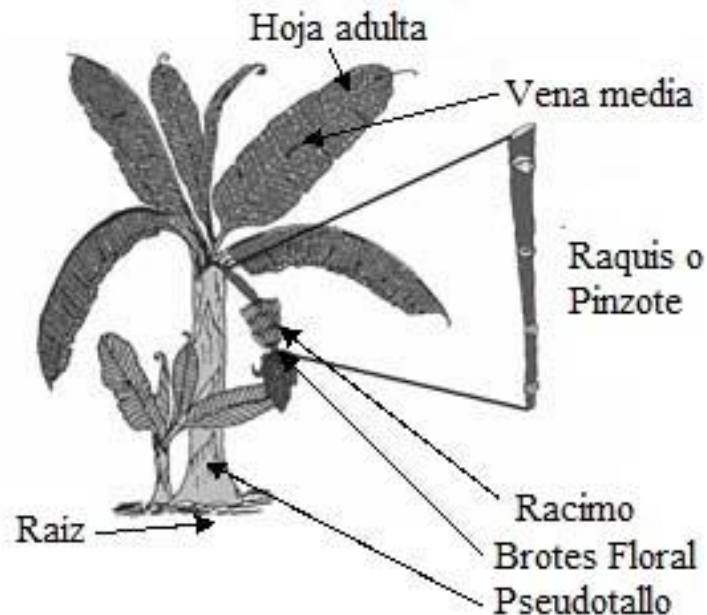


Figura 3. Planta de banano (*Musa* spp.) según sus partes morfológicas. Fuente: Turrado, Saucedo, Sanjuán & Sulbaran, (2009).

Oliveira et al. (2007) determinaron la composición bioquímica del tejido vegetal de la planta de banano variedad Cavendish. Los resultados de la investigación indicaron que la composición química del vegetal es compleja y dinámica, por lo que puede ser materia prima para distintos ensayos químicos o tratamientos metabólicos. La ceniza se compone principalmente de sales de calcio, potasio, magnesio y sílice (Carchi, 2014), y se presenta en gran cantidad en el pseudotallo, hojas y el raquis, sin embargo, la celulosa y la lignina son los componentes mayoritarios de cada una de las partes morfológicas de la planta de banano (Oliveira et al., 2007) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición bioquímica de las diferentes partes morfológicas de la planta de banano variedad Cavendish (% p/p del tejido).

Componente	Pseudotallo		Hojas		
	Tallo Floral	Vainas Foliare	Peciolo	Hojas	Raquis
Ceniza	26.1	19	11.6	19.4	26.8
Extractivosa	17.6	12.6	5.9	16.1	17.6
Diclorometano	1.4	1.4	1.2	5.8	1.5
Etanol/Tolueno	1.1	2.1	0.9	2.6	1.4
Aguab	15.1	9.1	3.8	7.7	14.7
Lignina	10.7	13.3	18	24.3	10.5
Insolublea	9.8	12.6	16.8	22	9.6
Soluble	0.9	0.7	1.2	2.3	0.9
Hollocelulosa	20.3	49.7	62.7	32.1	37.9
Hemicelulosa Aa	2.8	7.2	14.8	6.7	3.9
Hemicelulosa Ba	2.7	4.2	6.7	1.9	3.6
α -Celulosaa	14.4	37.1	39.5	20.7	28.4
Celulosaa	15.7	37.3	31	20.4	31
Pentosanosa	8	12.4	16.2	12.1	8.3
Almidón	26.3	8.4	0.4	1.1	1.4
Proteínas	3.2	1.9	1.6	8.3	2

a Corregido para el contenido de ceniza. b Corregido para el contenido de almidón.

Fuente: Oliveira et al. (2007).

La celulosa es el principal constituyente estructural de la pared celular vegetal de las plantas leñosas y fibrosas, por ello es, además, el polisacárido más abundante en la naturaleza. Presenta una estructura primaria lineal compuesta por residuos monoméricos β -D-glucosa unidos por enlaces β (1 \rightarrow 4), por lo tanto, es denominado un homopolisacárido que conforma microfibrillas entrecruzadas que convergen en una matriz constituida por otros polisacáridos como la hemicelulosa y la lignina (Mathews, Van-Holde, Appling & Anthony-Cahill, 2013) (Figura 4).

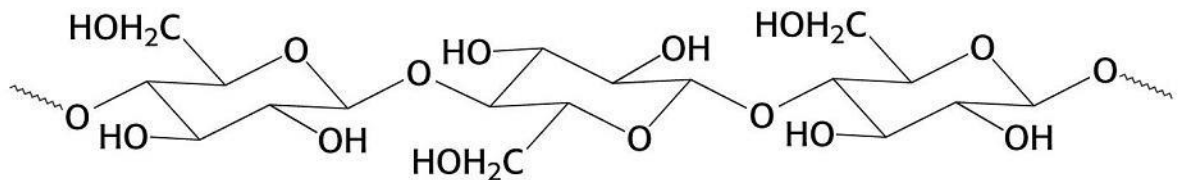


Figura 4. Estructura primaria lineal de la celulosa.

La lignina es un heteropolímero complejo concentrado principalmente en el tejido leñoso y el segundo más abundante desde el punto de vista biológico (Mathews et al., 2013). Tiene la función estructural de mantener unida la celulosa y la hemicelulosa que conforman la pared celular vegetal, fortaleciendo la construcción del tallo y las ramas. La estructura de la lignina es variada y ramificada, presenta unidades de fenilpropanos unidos por enlaces tipo éter y carbono-carbono distribuidos aleatoriamente (Abril, 2016) (Figura 5).

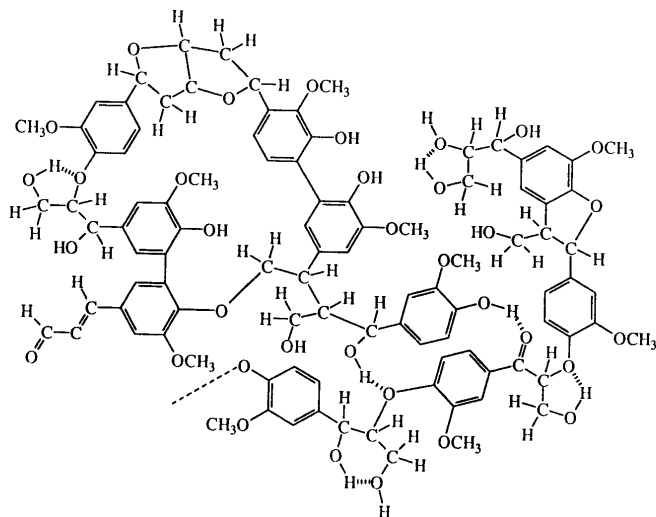


Figura 5. Estructura compleja y ramificada de la lignina.

Los principales componentes bioquímicos de los residuos agrícolas del cultivo de banano: celulosa y lignina, se caracterizan porque tienen un arreglo estructural cristalino regional que previene la acción enzimática o penetración de moléculas pequeñas como el agua, mientras que en otras regiones tienen una distribución amorfa, que facilita su desintegración en unidades menos complejas (Carchi, 2014).

2.3. Metabolismo de microorganismos con actividad celulolítica y lignolítica.

En la actualidad, el conocimiento sobre los microorganismos y su metabolismo ha crecido exponencialmente, convergiendo integralmente con áreas como la ingeniería química, la ingeniería genética y la biotecnología (Hernández, 2003). La biotecnología aplicada del presente siglo, ha incursionado en el uso de microorganismos para dar solución a distintas necesidades o problemáticas ambientales, entre ellas destaca su uso en la biodegradación de biomasa vegetal residual. Esta aplicación se basa en el principio del flujo de la energía, el cual consiste en el equilibrio que existe entre la fotosíntesis llevada a cabo por plantas y algas, y la biodegradación asistida por microorganismos descomponedores que convierten la mayor parte de la materia orgánica en dióxido de carbono y agua (Chen et al., 2016; Hernández, 2003) (Figura 6).

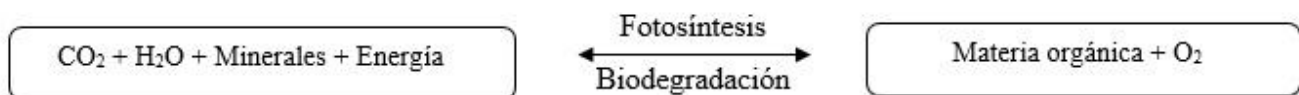


Figura 6. Esquema del flujo de energía en la naturaleza. Fuente: Hernández, (2003).

Los microorganismos, como cualquier otro sistema celular, tienen un conjunto de reacciones químicas a las cuales se les denomina metabolismo y las sustancias que se producen durante dicho evento se llaman metabolitos. Los metabolitos primarios están directamente vinculados con el crecimiento celular, contrario a los metabolitos secundarios, pues estos se sintetizan generalmente cuando la velocidad de crecimiento es muy similar a la velocidad de muerte, es decir, en la etapa estacionaria de su curva de crecimiento (Hernández, 2003) (Figura 7).

Industrialmente, es de fundamental importancia conocer el metabolismo del microorganismo de interés, e identificar si lo que se requiere obtener es biomasa o algún metabolito, de esta manera se

puede alterar la vía natural por la que el microorganismo genera el compuesto en cuestión y estimular o controlar su producción a conveniencia (Hernández, 2003).

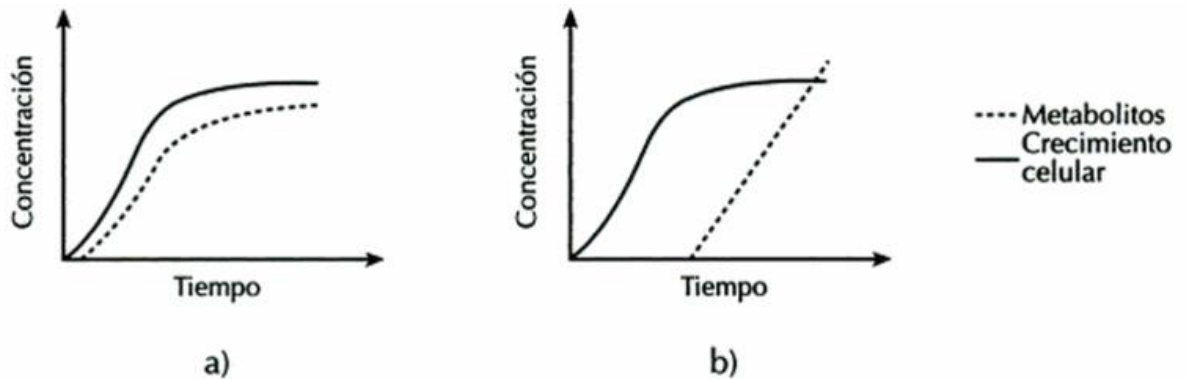


Figura 7. Relación entre la concentración del crecimiento celular de microorganismos y la concentración de metabolitos a través del tiempo. a) Metabolitos primarios. b) Metabolitos secundario. Fuente: Hernández, (2003).

Los microorganismos se caracterizan por utilizar la materia orgánica en descomposición como su principal fuente de carbono, a partir de ella obtienen energía y sintetizan sus principales biomoléculas: ácidos nucleicos, sacáridos, lípidos, ácidos grasos, proteínas y enzimas. Metabólicamente los microorganismos tienen la capacidad de secretar enzimas que catalizan la descomposición de la materia orgánica, es decir la degradación de grandes y complejos biopolímeros en moléculas más simples (Atlas & Bartha, 2002). La biodegradación de polímeros como la celulosa y la lignina, principales componentes de la pared celular vegetal de los residuos agrícolas del cultivo de banano, es un proceso estructurado que implica una sucesión biológica que inicia con la acción de hongos y finaliza con la de bacterias aerobias y anaerobias (Dworkin et al., 2006).

Según Gutiérrez & Martínez (1996), la biodegradación de la lignina implica tres aspectos importantes: el primero es la naturaleza multienzimática, pues este proceso implica tanto la actividad de peroxidasas que oxidan este polímero, como la de enzimas que reducen los radicales libres que se generan para evitar la repolimerización y los complejos enzimáticos que generan peróxido de hidrógeno. En el segundo aspecto destacan algunos metabolitos aromáticos secretados por los hongos, que actúan como intermediarios que catalizan la acción de las peroxidasas lignolíticas sobre compuestos con elevado potencial redox, y por último, el tercer aspecto es la compartimentalización del proceso, es decir, la demarcación de secuencias coordinadas por enzimas intra- y extracelulares. Algunas de estas enzimas son las peroxidasas, lacasas, endoglucanasas, exoglucanasas, β -

glucosidasas, fucosidasas y xilanasas (de Lima Brossi et al., 2016). Históricamente han sido los hongos quienes se caracterizan por la capacidad de degradar lignina, sin embargo, de Lima Brossi et al. (2016) indican que bacterias de los géneros *Comamonas*, *Sanguibacter* y *Paenibacillus* tienen también esta capacidad.

La biodegradación de la celulosa es catalizada después de la lignina por complejos enzimáticos denominados celulosomas, macromoléculas extracelulares compuestas por subunidades con módulos funcionales específicos. El CBD (dominio enzimático de unión a la celulosa) es uno de los celulosomas más estudiados, se caracteriza por ser altamente específico sobre su sitio de unión al sustrato, además por ser muy conservado filogenéticamente (Dworkin et al., 2006). Los dominios catalíticos de cohesión y dockerin son otra familia de módulos, se especializan en la hidrólisis de la celulosa y sirven de anclaje del celulosoma a la superficie celular (Dworkin et al., 2006). Aparte de los celulosomas, las endoxilanasas y poligalacturonasas también catalizan la degradación de la celulosa y son comúnmente encontradas en bacterias (Venegas & Suárez, 2004).

Los microorganismos con actividad celulolítica y lignolítica incluyen protozoos, bacterias, micro-hongos y hongos, son en su mayoría ubicuos, es decir, se pueden encontrar en una gran variedad de ambientes, como por ejemplo suelos, pantanos, ríos, lagos y sedimentos de agua dulce y salada. También en madera, fardos de algodón, material vegetal en descomposición, lodos de depuradora, lixiviados, aguas residuales y compostajes, así como en ambientes extremos como manantiales calientes y volcánicos, manantiales ácidos y alcalinos, o bien, hábitats simbiotes como el intestino de gusanos, termitas y vertebrados como los rumiantes (Dworkin et al., 2006).

Venegas & Suárez (2004) esclarecen la estrecha relación que existe entre la biotecnología y la biodiversidad de la naturaleza. El aumento en el conocimiento y la investigación de la biodiversidad y la variedad de hábitats que existen en el mundo, provee de herramientas y criterios para desarrollar nuevas tecnologías, procesos y productos. El suelo es uno de los principales hábitats de microorganismos con actividad celulolítica y lignolítica, por ello también es una de las más destacadas matrices de investigación para analizar y evaluar el potencial biotecnológico que tienen estos microorganismos, como por ejemplo la capacidad biodegradante de residuos agrícolas que generan los cultivos más importantes del mundo. En el cuadro 2 se detallan algunos de los microorganismos con capacidad celulolítica y lignolítica identificados en matrices de suelo (de Lima Brossi et al., 2016, Jiménez et al., 2016, Jiménez et al., 2014, Lo et al., 2009).

Cuadro 2. Principales géneros de microorganismos con actividad celulolítica y lignolítica identificados en matrices de suelo.

Microorganismo	
Bacterias	Hongos
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acremonium</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Arthrotrrys</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Chaetomium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Coniochaeta</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Dactylaria</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Humicola</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Escherichia</i>	<i>Plectophaerella</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Scytalidiu</i>
<i>Kluyvera</i>	<i>Thermomyces</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Trichocladium</i>
<i>Raoultella/Klebsiella</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Ruminococcus</i>	<i>Trichosporon</i>
<i>Serratia</i>	<i>Trichosporon</i>
<i>Sphingobacterium</i>	

Fuente: de Lima Brossi et al. (2016), Jiménez et al. (2016), Jiménez et al. (2014) y Lo et al. (2009).

2.4. Biodegradación de residuos agrícolas mediada por microorganismos.

La biodegradación es un proceso complejo que es llevado a cabo por una gran gama de organismos, está constituido por una serie de etapas que incluyen la lixiviación, fragmentación, cambios en la estructura física y química e incluso la ingesta o excreción de productos de desecho (Júlio et al., 2018). La descomposición de materia orgánica supone la desintegración de los tejidos vegetales y animales que originalmente fueron contruidos por la fotosíntesis y las demás sucesiones tróficas, por ello es un proceso clave en el reciclado de los nutrientes y minerales de interés biológico, es decir, es responsable de la mineralización de los ecosistemas (Chen et al., 2016).

Todos los heterótrofos son descomponedores de cierta manera, sin embargo, los principales organismos responsables de la biodegradación de la materia orgánica muerta o de desecho son las

bacterias, los hongos y los detritívoros (Smith & Smith, 2007). Estos microorganismos tienen la capacidad de biodegradar los biopolímeros que componen la biomasa vegetal residual de los principales cultivos del mundo (de Lima Brossi et al., 2016).

El apilamiento y acumulación de residuos agrícolas sin tratamiento, es un desperdicio de biomasa vegetal y recursos naturales que pueden ser aprovechados para beneficiar al cultivo de interés. Los residuos agrícolas tienen un alto contenido de nutrientes y almacenan carbono que puede ser asimilado por microorganismos celulolíticos y lignolíticos, de modo que podrían ser utilizados para fertilizar el suelo y promover la microbiota benéfica para el cultivo (Mahalakshmi & Naveena, 2016).

En la actualidad, la investigación en materia de tecnologías amigables con el ambiente, ha promovido la utilización de los residuos agrícolas de cultivos como el maíz y la caña de azúcar como fuente de carbono para que microorganismos celulolíticos y lignolíticos produzcan biocombustible (Martínez-Anaya, Balcázar-López, Dantán-González & Folch-Mallol, 2008). Precisamente, la creciente demanda y los elevados precios de los combustibles fósiles, que son a su vez un agente de contaminación ambiental y de controversia política mundial, han impulsado la búsqueda de nuevos recursos renovables que sean fuente de biocombustibles (Martínez-Anaya et al., 2008).

Los residuos agrícolas de la industria de palma aceitera pueden ser aprovechados por su alto contenido energético para producir concentrados para aves de corral y, mediante la fermentación con los hongos *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium*, se puede reducir considerablemente su contenido de lignina y celulosa (Nuraini & Trisna, 2017).

Los microorganismos con la capacidad de biodegradar los principales biopolímeros de las células vegetales, también tienen un rol importante en el área de la biorremediación, pues se han identificado microorganismos del género *Bacillus* con capacidad de crecer en suelos irrigados con efluentes de aguas residuales de industrias papeleras, altamente alcalinizados y con gran cantidad de lignina (Pandey et al., 2014).

En la India, muy similar al panorama en Costa Rica, el cultivo de banano es la segunda actividad agrícola más importante y su economía depende directamente de esta industria. En este país se ha investigado el potencial que tienen las bacterias celulolíticas para biodegradar el pseudotallo residual del cultivo de banano y posteriormente producir un biofertilizante (Mahalakshmi & Naveena, 2016).

Los microorganismos asisten a la biodegradación de la materia orgánica en consorcios microbianos, es decir, acompañados por una gran diversidad de individuos, este método les facilita el

acceso a los complejos componentes de la biomasa y así la actividad enzimática actúa sinérgicamente (Dworkin et al., 2006). Los consorcios de microorganismos derivados de suelo han sido investigados por su alto potencial en la biodegradación de residuos agrícolas. El desarrollo de este tipo de tratamientos implica caracterizar bioquímicamente al residuo agrícola, optimizar las características metabólicas del consorcio e identificar las principales comunidades bacterianas y fúngicas que están implicadas en el proceso de biodegradación (de Lima Brossi et al., 2016, Jiménez et al., 2016, Jiménez et al., 2014).

El tratamiento o aprovechamiento de los residuos agrícolas del cultivo de banano ha sido abordado en distintas investigaciones científicas que han desarrollado alternativas novedosas para su aprovechamiento (Carchi, 2014) (Cuadro 3). Pese a ello, la biomasa residual que genera la producción bananera carece de un manejo o uso integral apropiado y consolidado (Blanco, 2008).

Cuadro 3. Principales alternativas para el aprovechamiento del residuo agrícola del cultivo de banano.

Aprovechamiento del residuo agrícola
Harina de raquis.
Papel.
Fibra de refuerzo en resina poliéster.
Fibra de refuerzo en fenol formaldehído.
Fibras, papel y filmes.
Obtención de alcohol carburante.
Producción de carbón activado a partir de raquis.
Producción de metabolitos secundarios por fermentación con el hongo <i>Lentinus crinitus</i> .
Whiskers de celulosa para refuerzo de nanocompuestos.
Nanocompuestos reforzados con microfibrillas de celulosa.
Sustrato para la obtención de enzimas celulasas.

Fuente: Carchi, (2014).

3. Marco Metodológico

3.1. Preparación del sustrato de residuos agrícolas: se recolectaron 5 kg de pseudotallo, 5 kg de hojas y 5 kg de raquis de cultivo de banano (*Musa* AAA) del Jardín de Musáceas de CORBANA. El material se lavó con agua potable, se fragmentó en trozos de aproximadamente 5 cm, se secó a 70 °C hasta obtener un peso constante y se trituró en trozos de aproximadamente 1 mm. Seguidamente, se preparó el sustrato de los residuos agrícolas (RA), según Oliveira et al. (2007) (proporción pseudotallo, hojas y raquis: 1.5:1.5:1), para ser utilizado como única fuente de carbono en los medios de cultivo de los ensayos de biodegradación (de Lima Brossi et al., 2016, Jiménez et al., 2016, Jiménez et al., 2014) (Anexo 1).

3.2. Recolecta de las muestras: las muestras de suelo se recolectaron en tres fincas bananeras localizadas en el Caribe de Costa Rica: Finca La Rebusca del Grupo Acón (FR) Finca Balatana del Grupo Surá Green (FB) y Finca San Pablo de la Compañía Internacional de Banano S.A (FSP) (Figura 9), las cuales se caracterizan por presentar el sistema de siembra en hexágono, en el cual la materia orgánica residual (pseudotallo, hojas y raquis) se coloca en el centro del mismo. Cada una de las fincas correspondió a un tratamiento. En cada tratamiento se seleccionaron tres hexágonos representativos de la plantación y de éstos se recolectaron, asépticamente utilizando bolsas estériles, cinco submuestras de 10 g del suelo adyacente al material orgánico residual colonizado del centro del hexágono. Las submuestras de cada hexágono se homogeneizaron para obtener una muestra compuesta de cada tratamiento, a partir de la cual se realizó el aislamiento de microorganismos con potencial para la biodegradación de los residuos agrícolas. Las muestras se transportaron en frío (<4 °C) al Laboratorio de Control Biológico de la Dirección de Investigaciones de CORBANA, La Rita, Pococí, Costa Rica y se procesaron en menos de 12 h (de Lima Brossi et al., 2016, Jiménez et al., 2016, Jiménez et al., 2014) (Anexo 2).

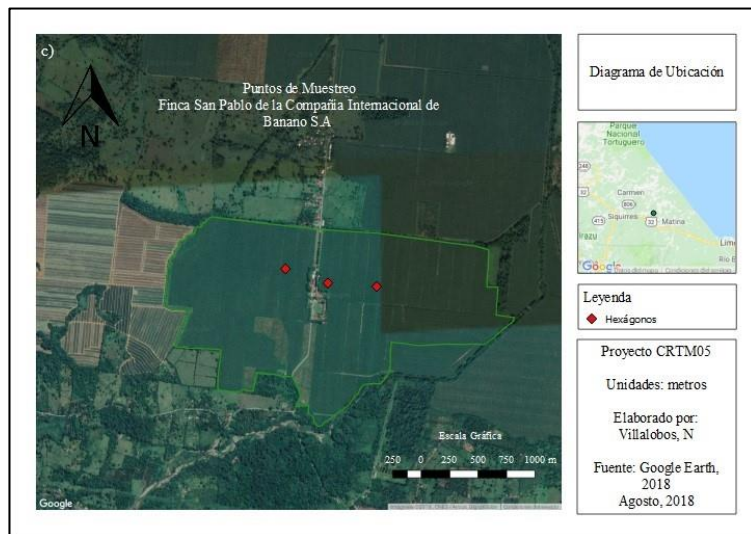
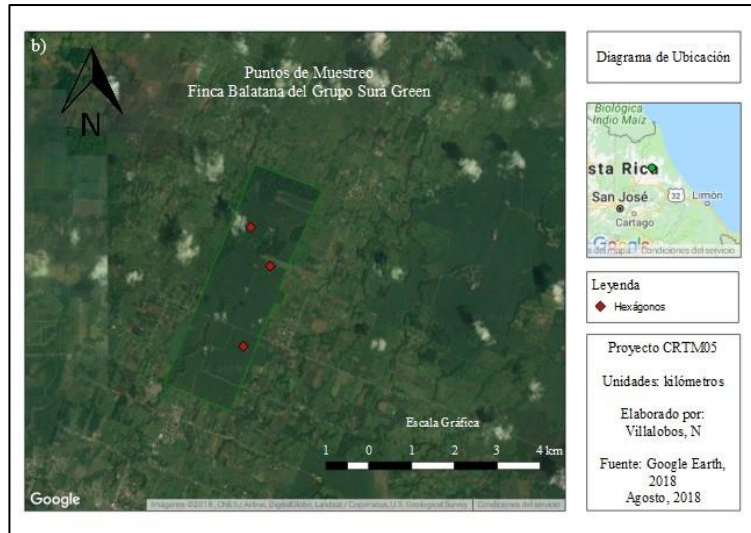
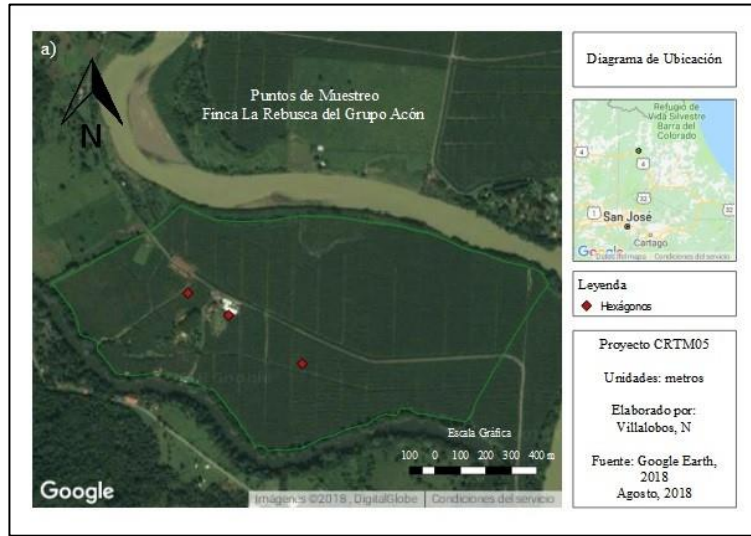


Figura 8. Sitios de muestreo, a) Finca La Rebusca del Grupo Acón, b) Finca Balatana del Grupo Surá Green y c) Finca San Pablo de la Compañía Internacional de Banano S.A.

3.3. Enriquecimiento: diez gramos de cada una de las muestras de suelo se suspendieron en 90 mL de solución salina (0.9 % p/v NaCl) y se agitaron por 20 min a 250 rpm. Seguidamente, se inoculó de la solución de suspensión, por triplicado, 300 μ L en un matraz de 125 mL con 30 mL de medio de cultivo de enriquecimiento Bushnell Haas (BH) (Cuadro 4) (Jiménez et al., 2016; Jiménez et al., 2013; de Lima Brossi et al., 2016; Lo et al., 2009). El medio de cultivo se suplementó con 1 % de RA y, además, se le añadió a cada matraz 30 μ L de solución vitamínica (Cuadro 5). Los cultivos de enriquecimiento se incubaron a aproximadamente 28 °C durante 7 días a 150 rpm. Como control negativo se utilizó medio de cultivo sin inocular (de Lima Brossi et al., 2016, Jiménez et al., 2016, Jiménez et al., 2014).

Cuadro 4. Composición del medio de cultivo Bushnell Haas (Lo et al., 2009).

Componente	g/L
Sulfato de magnesio hepta-hidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2
Cloruro de calcio ($CaCl_2$)	0.02
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	1
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	1
Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	1
Cloruro de hierro hexa-hidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$).	0.05
Fuente de carbono (1 %)	10
pH final a 25 °C 7.0 ± 0.2 .	

Cuadro 5. Composición de la solución vitamínica (Fuente: Laboratorio de Control Biológico de CORBANA).

Componente	mg/100 mL
Biotina (vitamina B7, B8 o H)	10 mg
Pyridoxol-HCL (vitamina B6)	20 mg
Disolver a 100 °C	

Posterior al periodo de incubación, se reinocularon 30 μ L de cada cultivo en medio BH fresco (suplementado con 1 % R.A y 30 μ L de solución vitamínica) y se incubaron bajo las mismas condiciones, este procedimiento se repitió una vez más, para un total de tres periodos de incubación.

Al final de cada periodo de incubación se recolectó de cada uno de los tratamientos 1 mL para determinar la actividad hidrolítica, 1 mL para realizar una Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE, por sus siglas en inglés) y 1 mL fue criopreservado con 20 % de glicerol a -80 °C (de Lima Brossi et al., 2016, Jiménez et al., 2016, Jiménez et al., 2014).

3.4. Determinación de la tasa de biodegradación: los cultivos de enriquecimiento se utilizaron para determinar las tasas de biodegradación respecto a la pérdida de peso y a la relación de la concentración de carbono y nitrógeno de los residuos agrícolas utilizados como fuente de carbono en el medio BH, mediada por los consorcios de los microorganismos desarrollados. El contenido total de los cultivos de cada tratamiento, luego de cada periodo de incubación, se filtró a través de papel Fisherbrand P8. El material retenido en el papel filtro se lavó tres veces con agua destilada estéril, se secó a 70 °C hasta obtener un peso constante y se registró el peso final. Antes y después del enriquecimiento, se recolectó de cada tratamiento aproximadamente 500 mg de los residuos agrícolas triturados y secos para determinar la concentración de carbono y nitrógeno (Anexo 3). La determinación de la concentración de estos elementos se realizó con un analizador de carbono, según los protocolos del Laboratorio de Química de la Dirección de Investigaciones de CORBANA (Anexo 3), y la relación carbono/nitrógeno (C/N) se obtuvo a partir del cálculo de la proporción de la concentración del carbono entre la del nitrógeno.

La tasa de biodegradación fue definida como la proporción de peso y la relación de las concentraciones de carbono/nitrógeno final, comparada con el valor inicial de cada variable, según la fórmula (Jiménez et al. 2016 y de Lima Brossi et al. 2016):

Tasa de biodegradación (%) = $[(a-b)/c] \times 100$, donde a = valor del tratamiento control negativo, b = valor final del ensayo y c = valor inicial del ensayo.

3.5. Determinación de la actividad hidrolítica: a partir de la alícuota de 1 mL almacenada en cada incubación para determinar la actividad hidrolítica, se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-5} en solución salina 0.9 %. De las diluciones 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-5} , se inocularon por esparcido 100 μ L en medio BH suplementado, por separado, con 0.5 % de carboximetilcelulosa y con 0.5 % de lignina - guaiacol 0,2 % (v/v). Las placas se incubaron a 30 °C durante 7 días (Paillie, 2012; Gaitán & Pérez, 2007). Luego del periodo de incubación, cada aislamiento se purificó y se corroboró la capacidad de estos para degradar los respectivos polímeros.

La caracterización de las actividades hidrolíticas se realizó de acuerdo con Paillie (2012). Como control positivo de la actividad celulolítica se utilizó *Chitinophaga* spp. aislada del Jardín de Musáceas de CORBANA, y para la actividad lignolítica se utilizó *Pleorotus ostreatus* facilitado por

el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional (Figura 9). El diámetro de los halos de degradación, áreas claras alrededor de la colonia, se registró en mm y se evidenciaron luego del período de incubación según cada polímero.

Los halos de hidrólisis de la actividad celulolítica se reveló al agregar a la placa de cultivo 3 mL de Rojo Congo al 0.1 % por 15 min, se descartó el exceso y seguidamente se agregó 3 mL NaCl 0.1 M por 15 min y se descartó el exceso. Posteriormente, las placas se refrigeraron a 4 °C durante 24 h para luego registrar el diámetro de los halos (Figura 9a). Para la actividad ligninolítica, el medio de cultivo se preparó con el indicador guaiacol 0.2 % (v/v), el cual se oxida por acción de las enzimas ligninolíticas dando una coloración oscura diferente al color ámbar del medio de cultivo (Figura 9b) (Batista-García et al., 2017).

Los aislamientos que presentaron actividad hidrolítica con halos de hidrólisis alrededor de la colonia superior a 2 mm, según de Lima Bossi et al. (2016), fueron re-aislados en Agar Nutritivo (AN) con propiconazol (ingrediente activo funguicida) y Papa Dextrosa Agar (PDA) con Agri-Mycin® (bactericida), para verificar el tipo de microorganismo aislado (hongo o bacteria). Las placas de AN se incubaron por 48 h a 30 °C y las de PDA por 48 h a 26 °C. Los aislamientos se criopreservaron con 20 % de glicerol a -80 °C y ADE a temperatura ambiente.

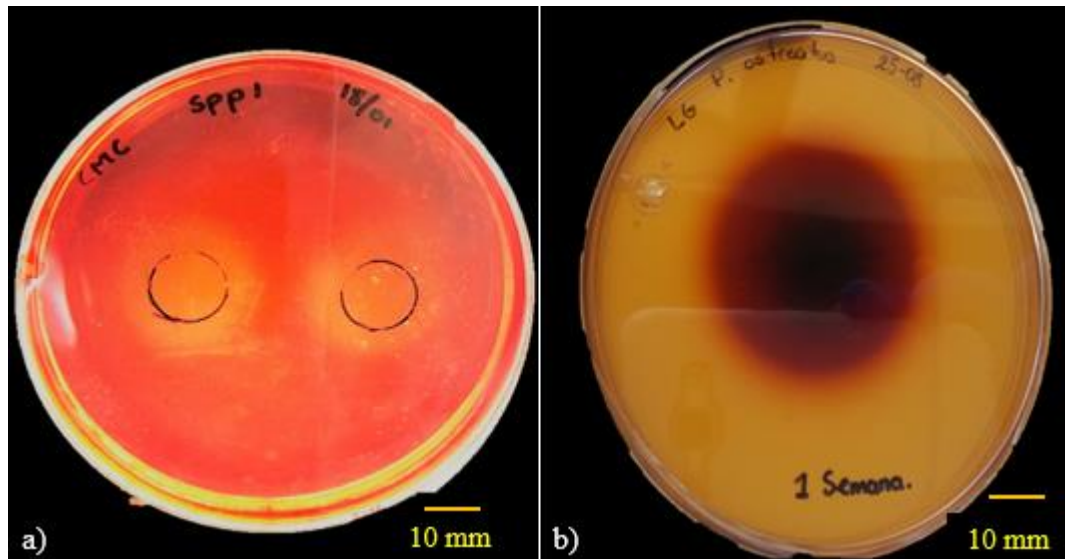


Figura 9. Controles positivos utilizados en el presente estudio. a) Control positivo de actividad celulolítica: *Chitinophaga* spp. b) Control positivo de actividad ligninolítica: *Pleorotus ostreatus*.

3.6. Análisis molecular: tanto el análisis DGGE como la identificación molecular de los microorganismos aislados con actividad celulolítica y lignolítica, se realizaron de acuerdo con los protocolos confidenciales del Laboratorio de Biología Molecular de la Dirección de Investigaciones de CORBANA, por esta razón la metodología de este apartado es descriptiva y no revela ninguna información en particular, no obstante, los métodos son en principio los comúnmente usados en Biología Molecular.

La línea del análisis molecular fue la siguiente: 1) extracción del ADN total del consorcio microbiano de la alícuota de 1 mL colectada de cada matraz posterior a cada incubación y de cada uno de los aislamientos obtenidos con actividad celulolítica y lignolítica, mediante protocolos optimizados para microorganismos de rizósfera de plantaciones bananeras. 2) PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés), 3) Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE, por sus siglas en inglés) de los productos PCR obtenidos, 4) PCR específica para obtener secuencias genéticas por el método Sanger ddNTPs. 5) análisis bioinformático.

A partir de la alícuota de 1 mL tomada de cada matraz posterior a cada incubación, se realizó la extracción del ADN total del consorcio microbiano de cada muestra. Seguidamente, se realizó una PCR dirigida a la amplificación del gen 16S rARN de bacterias y 18S rARN de hongos, y los productos de esta se utilizaron para el análisis DGGE. En cuanto a la extracción del ADN de los aislamientos con actividad celulolítica y lignolítica obtenidos, este se realizó a partir de placas con medio de cultivo AN o PDA, posterior a 24h de inoculadas, según preferencia de cada cepa.

Se añadió una alícuota determinada del buffer de extracción a la muestra de 1 mL del consorcio microbiano y se colocó un balón dentro del tubo. En el caso de las placas inoculadas, se impregno la superficie del crecimiento, se barrió del agar con una espátula para recuperar el buffer con la muestra de interés y se colocó en el macerador mecánico con balines. El buffer de extracción se compone de detergentes que facilitan la lisis celular e inactivadores de nucleasas, además se caracteriza por presentar una alta viscosidad, por ello se debe trabajar caliente para facilitar su manipulación.

Posteriormente, se recuperó un volumen determinado del macerado y se colocó en un tubo de 1.5 mL, se realizó una pequeña incubación a altas temperaturas y se centrifugó. Seguidamente, se procedió en la cámara de extracción, a tomar el sobrenadante y colocarlo en un nuevo tubo al cual se le agregó agentes reductores y enzimas. Los anteriores favorecen la extracción al actuar como desnaturalizantes e inhibir la actividad de nucleasas. Las enzimas se mezclaron con el sobrenadante en un vortex, para una posterior incubación a altas temperaturas.

Después de incubar, se agregó un compuesto orgánico que favorece la división de fases (acuosa y orgánica), de esta manera se separa el ADN de interés del resto del material celular. Las muestras se debieron mezclar con este compuesto orgánico e incubarse a bajas temperaturas. Luego se centrifugó y recuperó el sobrenadante, al cual se le añadió dos reactivos que favorecen la precipitación del ADN, y se incubó a bajas temperaturas. Seguidamente, se centrifugaron las muestras y a cada una se le decantó el sobrenadante, después de ello se observó el botón que corresponde al ADN, al cual se le añadió alcohol para lavarlo y se mezcló manualmente invirtiendo el tubo. Finalmente, se centrifugó y el sobrenadante se decantó, secando los tubos por inversión sobre una toalla de papel.

Una vez que el botón se secó, se evaluó la cantidad y calidad del ADN, para ello se diluyó con agua desionizada estéril de acuerdo al tamaño del botón. Cuando se obtuvo la dilución apropiada, se procedió a realizar la cuantificación y el análisis de pureza en el espectrofotómetro marca NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific), según los parámetros de manufactura.

Cuando se corroboró la cantidad y calidad del ADN extraído, se procedió a realizar el análisis DGGE en el caso del ADN extraído a partir de la alícuota de 1 mL de cada matraz posterior a cada incubación, y en el caso de las muestras de ADN extraído de los asilamientos con actividad celulítica y lignolítica, se procedió con la técnica PCR punto final en un termociclador marca Applied Biosystems® Gen Amp® empleando los cebadores 8/1492 en el caso de bacterias e ITS1/4 para hongos, para el gen 16S rARN y 18S rARN, respectivamente. Los productos PCR resultantes se enviaron a Macrogen Inc (Corea de Sur) para proceder con la secuenciación Sanger.

El análisis DGGE se realizó para conocer diversidad bacteriana y fúngica de las comunidades presentes en las muestras. El DGGE consiste en separar fragmentos de ADN con el mismo tamaño, pero con distinta composición nucleotídica, esta separación se debe al movimiento electroforético de los fragmentos a través del gradiente desnaturizante del gel de poliacrilamida. Los fragmentos de ADN corresponden a productos de PCR de la amplificación del gen 16S rARN de bacterias (cebadores 357/518) y 18S rARN de hongos (cebadores ITS1/4 y ITS1/2).

Inicialmente se prepararon las soluciones para elaborar el gel, las cuales varían en la cantidad del agente desnaturizante y deben ser agitadas constantemente durante su preparación. Paralelo a ello, se limpiaron meticulosamente los vidrios en donde se colocaron las soluciones para elaborar el gel, los mismos deben estar separados con espaciadores de aproximadamente 3 mm de ancho, colocados sobre una capa de grasa para que el vidrio quede debidamente adherido al separador y se evite la fuga de la mezcla. Posteriormente, se procedió a vertir el gel y una vez que este haya

polimerizado se vertió el gel sin gradiente que amortigua el ingreso de la muestra, luego se insertó el peine, y hasta que el gel polimerizó se sumergió dentro de la cámara llena del buffer correspondiente (Pérez, 2000).

Seguidamente se colocaron las muestras, las cuales se debieron desnaturalizar previamente en un termociclador, y por último se procedió a programar el voltaje determinado en la fuente de poder y se mantuvo encendida durante 24 h. Después de este periodo de tiempo, el gel se tiñó mediante una solución del buffer TAE (Tris-acetato-EDTA) más Gel Red, la cual se colocó sobre el gel y se debió dejar en reposo y oscuridad por un periodo corto de tiempo, luego de la tinción se procedió a fotografiar el gel.

Las fotografías del DGGE brindan perfiles o patrones de bandas que fueron analizados mediante el software UVI-1D de UVI-TEC. Se consideró a cada banda como una especie diferente, para posteriormente calcular el índices de diversidad de especies de bacterias y hongos de Shannon con el programa R v3.4.1 (Cedeño, 2005).

Las secuencias en dos direcciones obtenidas tras la secuenciación Sanger, se editaron manualmente con el programa Geneious (versión 8.0; Biomatters Inc) y se obtuvieron secuencias consenso para proceder con el alineamiento múltiple con el programa *on line* MAFFT a través del método iterativo de refinamiento FFT-NS-i x 1000. Para el alineamiento múltiple, se incluyeron secuencias obtenidas del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, consultado en agosto del 2018), correspondientes al gen 16S de géneros bacterianos. Mediante el programa Gblocks Server v0.91b se eliminaron las regiones más divergentes, no obstante se usó el método menos astringente posible, de forma tal que se conservó el 86% de las secuencias originales, lo que correspondió a 1245 pb de 1499 pb.

El programa jModelTest v2.1.10 se utilizó para determinar el mejor modelo de sustitución nucleotídica, bajo el criterio de información de Akaike con 96% de confianza (AIC, por sus siglas en inglés), el programa arrojó los cinco mejores modelos: TrN+I+G, TIM2+I+G, TIM1+I+G, TIM3+I+G y GTR+I+G, sin embargo se aplicó el modelo de sustitución GTR+I+G, el cual es homólogo a TrN+I+G en la ejecución de inferencia bayesiana. La elaboración de los árboles filogenéticos se basó en un análisis bayesiano mediante el programa MrBayes v.3.2.6 (Antony et al., 2010), con los siguientes parámetros: ngen= 1500000, samplefreq= 100, nchains= 4, nst= 6, rates= invgamma y el algoritmo de máxima verosimilitud (ML, por sus siglas en inglés) a través del programa raxmlGUI.3 v.7.4.2 empleando 2000 permutaciones y un bootstrap rápido (Jones & Hallin, 2010). Los árboles obtenidos se visualizaron y editaron con el programa FigTree v1.4 (Campos et al., 2013).

3.7. Análisis estadísticos: la normalidad de cada variable se determinó mediante la prueba de Shapiro Wilk. La significancia de la diferencia de cada variable respecto a los tratamientos y a los periodos de incubación se determinó mediante un Análisis de Varianza y la prueba de Tukey para las variables con distribución normal y la prueba de Kruscal Wallis para las variables con distribución no normal (de Lima Brossi et al., 2016, Jiménez et al., 2016, Jiménez et al., 2014). Para realizar los análisis estadísticos y para graficar los resultados obtenidos se utilizó el lenguaje de programación R (R Core Team, 2018).

4. Resultados

La tasa de biodegradación promedio de los residuos agrícolas del cultivo de banano, mediada por los consorcios de los microorganismos aislados del suelo de cada uno de los tratamientos, varió entre el 21.41 y 50.52 % según la relación C/N. Por su parte, la tasa de biodegradación según el peso mantuvo valores promedio menores al 20 % y, de acuerdo con la prueba de Kruskal Wallis, no hubo diferencias significativas respecto a los tratamientos y a las incubaciones (Figura 10).

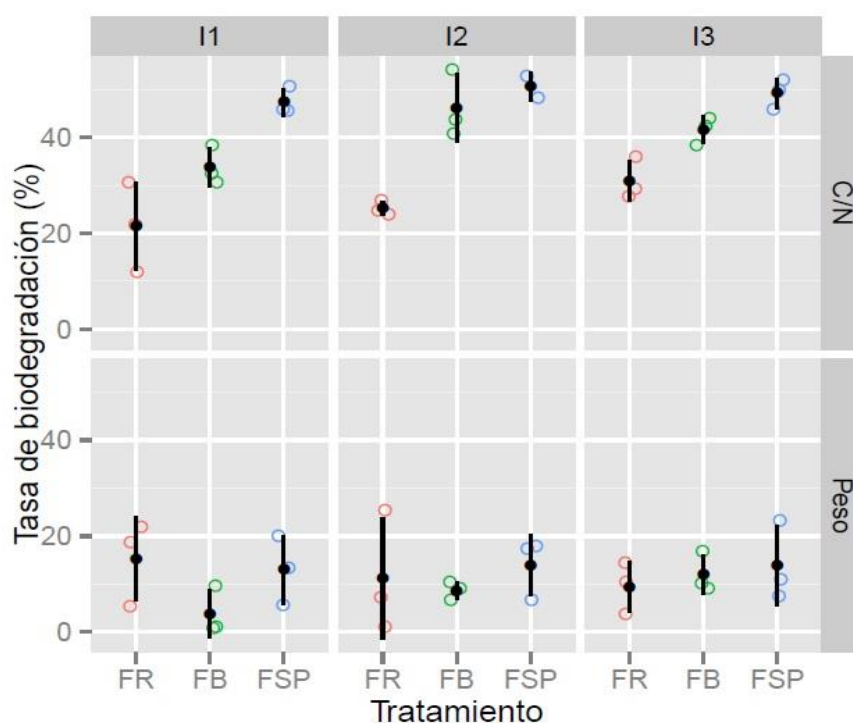


Figura 10. Promedio \pm IC 95 % del porcentaje de tasa de degradación según la relación C/N y peso respecto a cada tratamiento e incubación. FR= Finca la Rebusca, FB = Finca Balatana, FSP= Finca San Pablo, I1= Incubación N°1, I2= Incubación N°2 e I3= Incubación N°3.

El tratamiento que presentó mayor tasa de biodegradación según la relación C/N fue la Finca San Pablo durante el segundo periodo de incubación. De acuerdo con el Análisis de Varianza y la prueba de Tukey, la tasa de biodegradación según la relación C/N de cada tratamiento no presentó diferencias significativas respecto a los periodos de incubación. La Finca San Pablo presentó valores de biodegradación según la relación C/N significativamente mayor (48.78 ± 2.94 %) que la Finca La Rebusca (25.84 ± 6.62 %). La tasa de aumento de la concentración de carbono fue estable respecto al

control, sin embargo, la de nitrógeno aumentó al transcurrir las incubaciones en cada uno de los tratamientos (Figura 11).

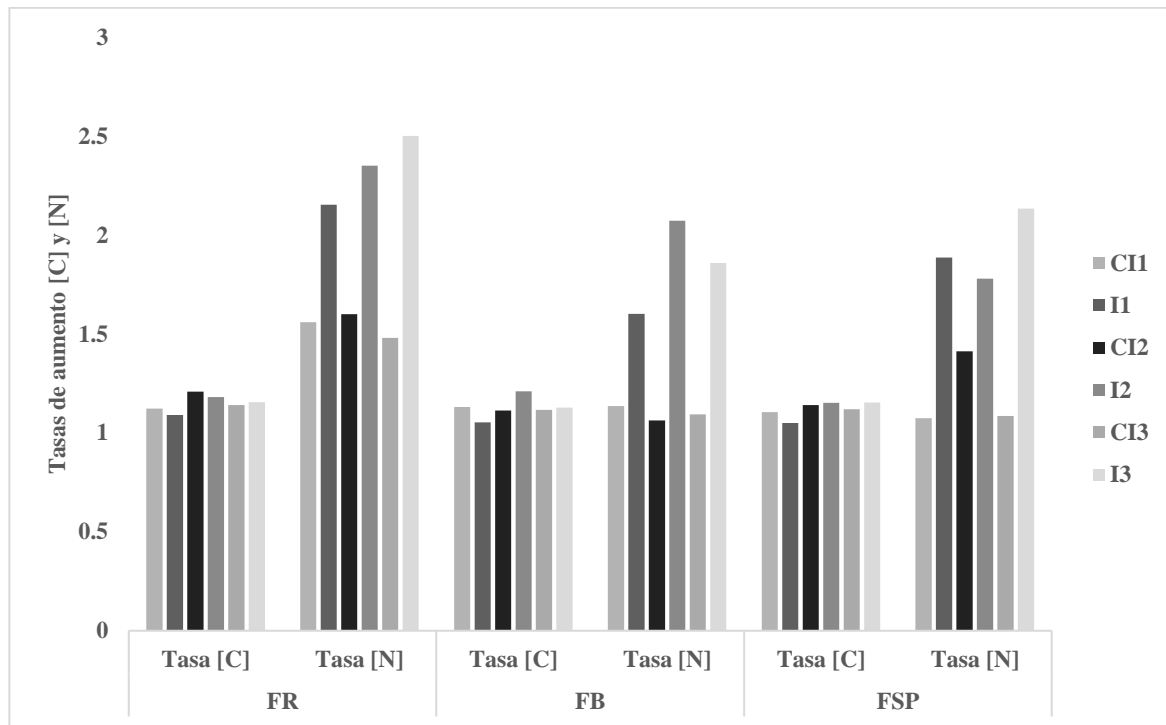


Figura 11. Tasa de aumento de la concentración de carbono y nitrógeno según cada tratamiento después de cada periodo de incubación. FR= Finca la Rebusca, FB = Finca Balatana, FSP= Finca San Pablo, I1= Incubación N°1, I2= Incubación N°2, I3= Incubación N°3, CI1= Control de la I1, CI2= Control de la I2 y CI3= Control de la I3.

En cuanto al índice de diversidad de Shannon para bacterias y hongos, determinado a través del análisis del DGGE (Anexo 4 y 5), no indicó diferencias significativas respecto al tratamiento ni la incubación según la prueba de Kruskal Wallis (Figura 12). Cualitativamente, los matraces que contenían el ensayo con el inóculo del consorcio presentaron una tenue biopelícula blancuzca, ausente en los matraces control (Anexo 6). Además, el volumen de los residuos agrícolas disminuyó sustancialmente y la coloración era un verde más oscuro en comparación con el ensayo control, en el cual los residuos eran de un tono verde más claro y las fibras parecían más conservadas (Anexo 7).

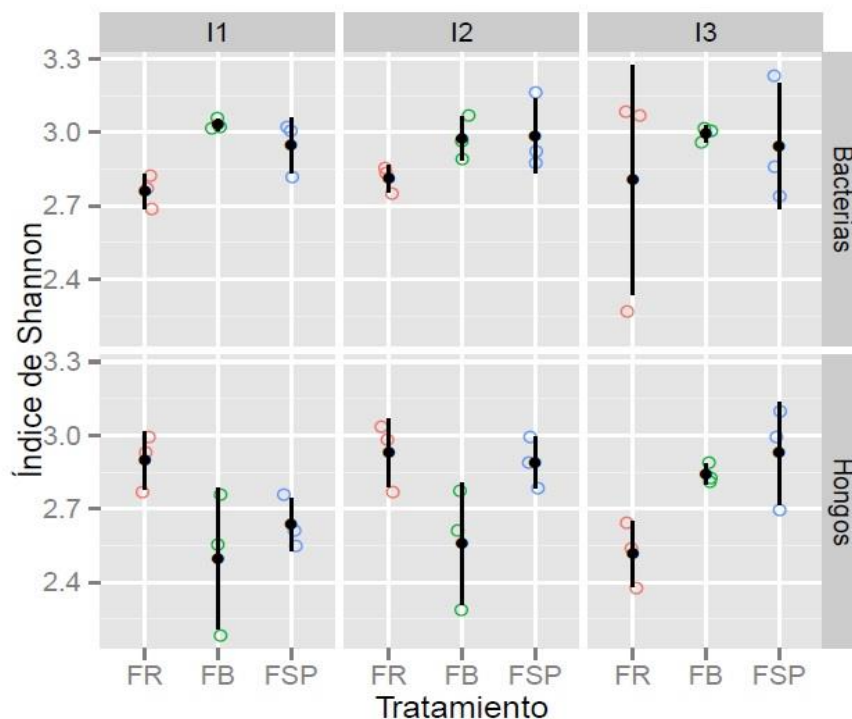


Figura 12. Promedio \pm IC 95 % del índice de diversidad de Shannon (H) de bacterias y hongos respecto a cada tratamiento e incubación. FR= Finca la Rebusca, FB = Finca Balatana, FSP= Finca San Pablo, I1= Incubación N°1, I2= Incubación N°2 e I3= Incubación N°3.

De los consorcios de microorganismos desarrollados en cada tratamiento, se aislaron 19 cepas con actividad celulolítica. Dos cepas se aislaron de la Finca La Rebusca, 2 de la Finca Balatana y 15 de la Finca San Pablo. Las cepas aisladas presentaron halos de hidrólisis promedio entre 2.09 y 14.3 mm. La cepa que presentó mayor capacidad de degradación fue la FSP-12. No se aislaron cepas con actividad lignolítica (Cuadro 6).

El posicionamiento filogenético mediante el análisis bayesiano y el de máxima verosimilitud presentaron aproximaciones muy similares, por ello se realizó una integración de ambos modelos. Las cepas identificadas se ubicaron en clados correspondientes a 11 géneros diferentes. Los géneros con mayor abundancia fueron *Burkholderia* spp. y *Aeromonas* spp., con cuatro cepas cada uno, seguido por el género *Flavobacterium* spp. con dos cepas (Figura 13).

El género *Burkholderia* spp. se presentó en las tres fincas y el género *Paenibacillus* spp. se presentó sólo en la Finca Balatana, sin embargo la cepa del género *Streptomyces* spp., aislada solamente de la Finca San Pablo, fue la que presentó el mayor halo de degradación (14.30 ± 1.01 mm) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Cepas identificadas molecularmente a través del gen 16S rARN para bacterias, según finca de procedencia (confiabilidad 95 %).

Código	Clase/Género	FR	FB	FSP	Promedio del Halo de Hidrólisis (mm) ± SD
FR-01	<i>Burkholderia</i> spp.	X			4.70 ± 0.88
FR-02	<i>Burkholderia</i> spp.	X			2.96 ± 0.64
FB-01	<i>Paenibacillus</i> spp.		X		11.94 ± 6.09
FB-02	<i>Burkholderia</i> spp.		X		4.55 ± 1.48
FSP-01	<i>Burkholderia</i> spp.		X		3.72 ± 1.59
FSP-02	<i>Aeromonas</i> spp.			X	2.71 ± 1.00
FSP-03	<i>Gamaproteobacteria</i>			X	2.09 ± 0.67
FSP-04	<i>Aeromonas</i> spp.			X	3.74 ± 1.04
FSP-05	<i>Aeromonas</i> spp.			X	4.87 ± 0.97
FSP-06	<i>Ralstonia</i> spp.			X	8.89 ± 1.41
FSP-07	<i>Pseudomonas</i> spp.			X	9.45 ± 0.58
FSP-08	<i>Cellvibrio</i> spp.			X	10.33 ± 1.00
FSP-09	<i>Bacillus</i> spp.			X	10.77 ± 1.07
FSP-10	<i>Flavobacterium</i> spp.			X	8.69 ± 0.85
FSP-11	<i>Gordonia</i> spp.			X	2.23 ± 0.43
FSP-12	<i>Streptomyces</i> spp.			X	14.30 ± 1.01
FSP-13	<i>Flavobacterium</i> spp.			X	3.80 ± 0.58
FSP-14	<i>Microbacterium</i> spp.			X	7.23 ± 1.51
FSP-15	<i>Bacillus</i> spp.)			X	13.94 ± 0.92

IB/ML 16S ARNr

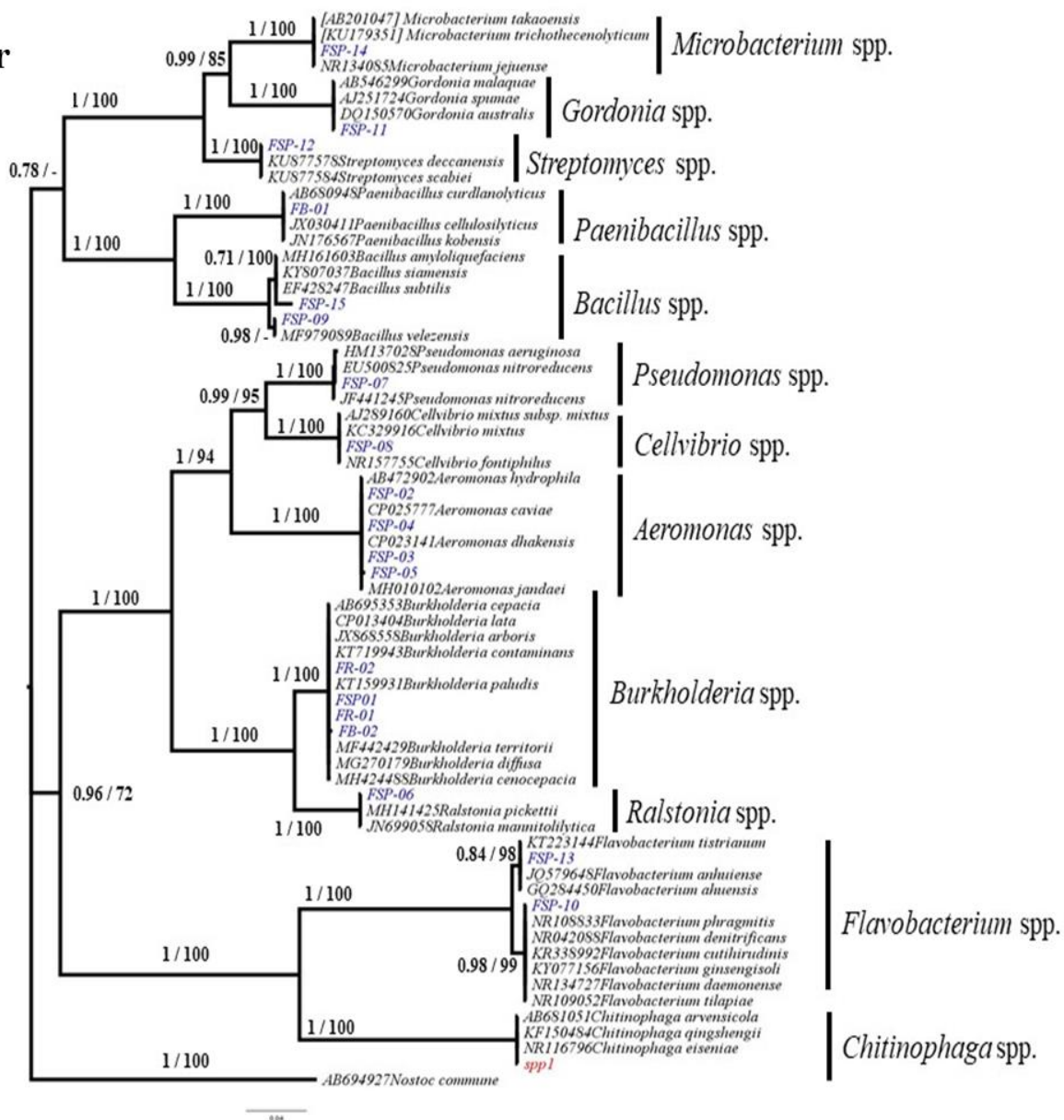


Figura 13. Aproximación filogenética de los aislamiento obtenidos identificadas a través de la integración del análisis bayesiano (IB) y el de máxima verosimilitud (ML) del gen ADNr 16S bacteriano. Los números de soporte se indican sobre la línea de cada una de las ramas (IB/ML, siendo 1 = 100 %), así como los códigos de acceso de las secuencias tomadas del NCBI. spp1= control positivo de actividad celulolítica.

5. Discusión

La degradación de la materia orgánica es un proceso integrado por la acción de consorcios microbianos especializados en metabolizar biopolímeros complejos como los que componen la pared celular vegetal (Lenoir et al., 2007). Los residuos agrícolas son biomasa con alto potencial de aprovechamiento para reincorporar materia orgánica, biofertilizar y agregar complejidad biológica al agroecosistema (Kadir, Jamaludin & Azhari, 2016). La mineralización de elementos como el carbono y el nitrógeno en los suelos, estimula la fertilización, las rutas metabólicas de fijación de otros elementos como el fósforo y el control de variables ambientales como temperatura, pH y humedad (Júlio et al., 2018).

La biodegradación de los residuos agrícolas, utilizados como única fuente de carbono en los ensayos, se refleja por la disminución de la concentración del carbono y el aumento de la concentración del nitrógeno, posterior a la incubación. La relación C/N se obtiene a partir de la concentración de carbono y nitrógeno, dos de los principales elementos de la materia orgánica y la mineralización biológica (Chen et al., 2016). Una alta concentración de carbono indica alto contenido de materia orgánica, mientras que un alto contenido de nitrógeno indica la mineralización nitrogenada y la producción de biomoléculas (Jiang, Liu, Huang & Huang, 2015). Pese a que la concentración de carbono siempre fue mayor que la del nitrógeno en los tratamientos, la tasa de aumento de la concentración del nitrógeno fue mayor, lo cual indica la presencia de microorganismos con la capacidad de degradar biomasa vegetal residual y obtener de esta forma la energía metabólica para producir biomoléculas (Jiang et al., 2015).

El proceso de reinoculación realizado en cada periodo de incubación, tenía por objetivo especializar al consorcio microbiano en la biodegradación de los residuos agrícolas del cultivo de banano (de Lima Brossi et al., 2016; Jiménez et al., 2016). Sin embargo, es importante considerar que en este estudio la reinoculación se realizó en matraces con medio de cultivo fresco y con residuos agrícolas sin previa digestión, por lo tanto, los consorcios microbianos desarrollados debieron comenzar la biodegradación de los residuos agrícolas en cada una de las incubaciones y posiblemente por ello la tasa de biodegradación según la relación C/N no presentó diferencias significativas durante los periodos de incubación, manteniéndose estable en cada tratamiento.

En otros estudios como los realizados por de Lima Brossi et al. (2016) y Jiménez et al. (2016), los residuos agrícolas eran inoculados al inicio del ensayo, se volvían a inocular tras cada incubación y eran los mismos durante todo el tratamiento, presentando de esta forma una digestión previa al inicio de cada periodo de incubación. El suelo matriz de los microorganismos que utilizaron estos estudios

provenía de bosques sin perturbación antropogénica o demanda agrícola, mientras que los consorcios desarrollados y cepas aisladas en esta investigación provenían de muestras de suelo dedicado al cultivo de banano. de Lima Brossi et al. (2016), Haque, Khan & Ahamad (2018) y Jiménez et al. (2016) concluyeron que el origen de los microorganismos es una característica determinante en la especialización del consorcio para la biodegradación de una fuente de carbono específica y recomiendan que los microorganismos utilizados en estos experimentos deben estar aclimatados a las condiciones agroecosistemáticas y físico-químicas del suelo en cuestión.

La descomposición de la materia orgánica es un proceso colaborativo de microorganismos vinculados entre sí a través de biopelículas, esta se caracteriza por que algunos de sus miembros secretan sustancias para sostener la matriz o biopelícula, mientras que otros se enfatizan en desintegrar las fuentes de energía disponibles en el medio (Rinland, 2016). El término “biopelícula” alude a una forma de vida de los microorganismos en la que pueden vivir y proliferar individualmente en el medio u organizarse en comunidades multicelulares secretando una matriz asociada a superficies o interfaces (Lasa, 2006). La biopelícula presente en los matraces correspondientes a los ensayos con el inóculo, podría explicar la diferencia cualitativa en el volumen de los residuos agrícolas obtenidos post-incubación, así como la coloración y descomposición de las fibras vegetales.

La tasa de biodegradación según peso no fue un buen descriptor del proceso de biodegradación, esto posiblemente se debió a que la cantidad de residuos agrícolas en cada ensayo era muy pequeña. El aumento de la cantidad de gramos por ensayo y el acceso a instrumentación con mayor sensibilidad de detección, así como prolongar los periodos de incubación y aumentar la alícuota y concentración celular del inóculo, podría favorecer la determinación de algún cambio significativo en cuanto a la tasa de biodegradación según peso de los residuos agrícolas del cultivo de banano (de Lima Brossi et al., 2016; Jiménez et al., 2016).

La electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) es una técnica de la biología molecular introducida en la ecología microbiana por Muyzer (1993). En la actualidad, DGGE es una herramienta útil para determinar la diversidad y riqueza microbiana de muestras ambientales, como por ejemplo el índice de diversidad de Shannon. El índice de diversidad de Shannon para bacterias y hongos determinado en este estudio no presentó ninguna relación respecto al tratamiento u incubación. Lo cual podría deberse, según Cedeño (2005), a que el DGGE es una técnica que detecta microorganismos cultivables, no cultivables, activos e inactivos (endóspora), es decir, genera información valiosa sobre la diversidad de la comunidad microbiana sin distinguir grupos funcionales o géneros específicos asociados. No obstante, a partir de este análisis se pueden identificar patrones

de bandas que pueden ser posteriormente purificadas y secuenciadas a partir del gel, con lo cual se puede generar información más meticulosa sobre la comunidad microbiana en cuestión (de Lima Brossi et al., 2016; Jiménez et al., 2016).

La Finca San Pablo fue el tratamiento que presentó mayores tasas de biodegradación según la relación C/N. De acuerdo con de Lima Brossi et al. (2016) y Jiménez et al. (2016), este resultado indica que el consorcio microbiano desarrollado a partir de las muestras de suelo de la Finca San Pablo tienen un alto potencial para la degradación y producción de metabolitos tomando como fuente de carbono los residuos agrícolas del cultivo de banano. La Finca San Pablo de la Compañía Internacional de Banano S.A es la finca comercial de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), donde es posible implementar y corroborar las tecnologías desarrolladas por la Dirección de Investigaciones de CORBANA en función del mejoramiento de las condiciones del cultivo de banano (CORBANA, 2011). La implementación de buenas prácticas agrícolas, la siembra en red hexagonal y el apilamiento de los residuos agrícolas de prácticas culturales normales como deshoja o desburille, dentro del mismo, son algunas de las condiciones que favorecen la proliferación de microorganismos benéficos que promuevan una óptima degradación de la materia orgánica, lo cual se puede ver reflejado en la tasa de biodegradación según la relación C/N y la cantidad de cepas aisladas de esta finca (CORBANA, 2011; Araya et al., 2014).

La Finca La Rebusca fue una de las fincas pioneras en la implementación de la siembra en red hexagonal, sin embargo, en la actualidad la falta de restitución y mantenimiento a desfavorecido dicho sistema de siembra, y en su lugar, la finca suplementa el suelo con pinzote en trozos. Este manejo podría explicar que esta finca fue la que presentó la tasa de biodegradación más baja. Por su parte, la Finca Balatana implementa la siembra en red hexagonal y coberturas para evitar la erosión del suelo. No obstante, al igual que en la Finca La Rebusca, la tasa de biodegradación y la cantidad de aislamientos obtenidos de esta finca fueron menor respecto a la Finca San Pablo.

Investigaciones realizadas por el Departamento de Agrofisiología de CORBANA, destacan la importancia que tiene el manejo de los residuos de cosecha como fuente potencial de nutrientes y materia orgánica necesarios en el cultivo, tales como nitrógeno y potasio. De acuerdo con Vargas, Rodríguez, González & Blanco (2012), el arreglo en forma de red hexagonal es un acomodo en donde se aprovecha la disponibilidad de luz y espacio, sin perjudicar la densidad poblacional ni la productividad. Además, el apilamiento de los residuos agrícolas de cada hexágono en el interior del mismo, podría favorecer la proliferación de microorganismos benéficos, la biodisponibilidad de nutrientes almacenados en la materia orgánica y mitigar la esporulación del hongo causal de la

Sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis*). La implementación, restitución y mantenimiento del sistema de siembra en hexágonos, el apilamiento de los residuos agrícolas dentro del hexágono y el uso de coberturas para evitar la erosión y favorecer la fijación de nitrógeno, son entre otras, buenas prácticas agrícolas que promueven el manejo de los residuos agrícolas, la biofertilización y la conservación de los recursos naturales asociados al cultivo de banano (Vargas et al., 2012; FAO, 2015).

El aprovechamiento de los residuos agrícolas como fuente de materia orgánica es una práctica agrícola amigable con el ambiente que promueve la mineralización de nutrientes dentro de los ecosistemas agrícolas. La mineralización es un proceso determinante en la biodisponibilidad de nutrientes tales como nitrógeno, potasio y fósforo, elementos indispensables para la nutrición mineral del cultivo (Chen et al., 2016). La disposición de los residuos agrícolas como fuente de potasio y fósforo es una forma indirecta de promover la biodisponibilidad de nitrógeno, y esta adición de fosforo a los agroecosistemas podría estimular rutas enzimáticas de microorganismos nitrificadores, favoreciendo de esta forma procesos de biodegradación y biofertilización (Chen et al., 2016; Vargas et al., 2012).

La lignina es un biopolímero vegetal que se caracteriza por su complejidad estructural, requiere de un proceso gradual y multienzimático para biodegradarse y mantener la biodisponibilidad de fuentes de carbono más sencillas estructuralmente en la naturaleza (Chong et al., 2018). Según se ha descrito, los hongos son los principales descomponedores de la lignina, sin embargo de Lima Brossi et al. (2016) y Chong et al. (2018) indican que géneros bacterianos como *Comamonas*, *Sanguibacter*, *Paenibacillus* y *Bacillus* poseen esta capacidad. No obstante, en la presente investigación no se lograron obtener aislamientos con actividad lignolítica, posiblemente debido a la rápida colonización y especialización de los microorganismos con actividad celulolítica tras el método de reinoculación, puede además que por ello se haya obtenido mayor cantidad de cepas con capacidad celulolítica que lignolítica (de Lima Brossi et al., 2016; Chong et al., 2018).

En cuanto a la biodegradación de la celulosa, este es un proceso que es llevado a cabo por complejos enzimáticos denominados celulosomas (CBD) asociados con otras enzimas que catalizan la degradación de la celulosa y son comúnmente encontradas en bacterias (Venegas & Suárez, 2004). Las 19 cepas aisladas con actividad celulolítica se identificaron en 11 géneros que tienen en común su presencia en la rizósfera, su rol en los procesos de biodegradación de la materia orgánica y en el ciclaje de nutrientes en los agroecosistemas, y su potencial para biodegradar biomasa residual de

origen agropecuario (Akhtar, Akhtar & Ghauri, 2017; de Lima Brossi et al., 2016; Jiménez et al., 2016; Rossmann et al. 2012; Zhao & Kuipers, 2016).

De acuerdo con Rossmann et al. (2012), existe un grupo funcional de bacterias denominado “promotoras del crecimiento de plantas” o PGP (por sus siglas en inglés Plant Growth Promoting) en ecosistemas y agroecosistemas. En este último, brinda una serie de beneficios para el cultivo tales como: fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo, producción de fitohormonas, protección contra patógenos, entre otras particularidades de acuerdo al género de la bacteria. Según, Rossmann et al. (2012), en el cultivo del banano, el género *Flavobacterium* al cual se asocian las cepas FSP-10 y FSP-13 (Figura 13), puede proveer de protección contra la enfermedad “Marchitez por Fusarium” y reducir la esporulación del hongo *Pseudocercospora fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra.

Las cepas FSP-02, FSP-03, FSP-04 y FSP-05 se agruparon en el clado del género *Aeromonas* (Figura 13), el cual se caracteriza por ser bacterias Gram-negativas, rígidas, sin esporas y anaerobias facultativas, asociadas con procesos fermentativos y de reducción de nitratos, además, algunas especies tienen la capacidad de degradar quitina (Martin-Carnahan & Joseph, 2005). de Lima Brossi et al. (2016) y Jiménez et al. (2016) han descrito los géneros *Aeromonas* y *Flavobacterium* en matrices de sistemas de biodegradación análogos a los de este estudio, utilizando residuos agrícolas de cultivos de trigo y maíz. Ellos identifican a estos dos géneros en las primeras etapas de la biodegradación de la biomasa residual y les caracterizan como estrategias r de rápida colonización, desplazando a los microorganismos del orden *Actinomycetales*, los cuales realizan la digestión primaria de la biomasa vegetal residual.

Del orden *Actinomycetales* se aislaron cepas de los géneros *Gordonia*, *Streptomyces* y *Microbacterium*, las cuales corresponden a FSP-11, FSP-12 y FSP-14 respectivamente (Figura 13). de Lima Brossi et al. (2016) y Jiménez et al. (2016) han descrito a *Gordonia* y *Streptomyces* en las etapas correspondientes a la digestión primaria de los residuos agrícolas. *Gordonia* es un género de bacterias Gram-positivas, aeróbicas y nocardiofórmicas, es decir, forman un micelio basal fragmentado dando formas de cocos y bacilos, esta disposición espacial es característica de cepas con capacidad de degradar ceras, polímeros de carbono e hidrocarburos (Arenskötter, Bröker & Steinbüchel, 2004). De acuerdo Arenskötter, Bröker & Steinbüchel (2004), Akhtar, Akhtar & Ghauri (2017) y Hong et al. (2011), *Gordonia* es considerado un género de bacterias PGP y se caracteriza por su capacidad de degradar xenobióticos, contaminantes ambientales, metales pesados y polímeros complejos. En la actualidad son empleadas como agentes bioacumuladores a través de la rizorremediación para recuperar áreas degradadas ambientalmente.

Por su parte *Streptomyces* es un género de bacterias filamentosas Gram-positivas, su crecimiento se caracteriza por formar una especie de micelio del cual emergen filamentos con esporas (Chater, 2016). Este género produce más del 80% de los antibióticos que se conocen en la actualidad y es de fundamental importancia en la sucesión biológica por ser responsable de la degradación preliminar de la materia orgánica y de biopolímeros complejos como la quitina, la lignina y la celulosa, así como contaminantes ambientales como organoclorados, carbamatos y triazinonas (Chater, 2016; Spasic, Mandic, Djokic & Nikodinovic-Runic, 2018). La biocatálisis de celulasa, peroxidasa, xilanasas, lipasas, lacasas, tirosinasas, entre otras enzimas, son algunas de las que produce este género, las cuales sobresalen por su termo estabilidad, ácido resistencia, alcalino estabilidad y estabilidad ante detergentes (Spasic et al., 2018).

El género de actinobacterias *Microbacterium* también es asociado con la digestión primaria de la materia orgánica (de Lima Brossi et al., 2016; Jiménez et al., 2016) y corresponde a bacterias Gram-positivas, aerobias y endófitas (Evtushenko & Takeuchi, 2006). Según Evtushenko & Takeuchi (2006), algunas especies como *M. trichothecenolyticum* tienen la capacidad de degradar micotoxinas, destacando por su potencial para el control biológico de hongos patógenos en distintos cultivos.

Los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus* y *Bacillus*, son bacterias ampliamente estudiadas y destacadas por su alto potencial como agentes de control biológico y manejo integrado de diferentes cultivos como el banano (Rossmann et al., 2012). Generan metabolitos y enzimas que inciden en la degradación de la materia orgánica y polímeros complejos, son bacterias PGP, presentan asociaciones colaborativas con plantas y secretan antibióticos y sustancias con actividad fungicida (Gnanamanickam, 2006). El género *Pseudomonas*, del cual solo se aisló la cepa FSP-07 en la Finca San Pablo (Figura 13), corresponde a bacterias Gram-negativas, aerobias, generalmente presentan forma de bastón, no forman esporas y están emparentadas filogenéticamente con el género *Flavobacterium*, al formar parte de la misma familia *Sphingobacteriaceae* (Gnanamanickam, 2006). Especies como *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* tienen la capacidad de actuar como agentes biocontroladores ante nematodos mediante la antibiosis, la inducción de resistencia en el huésped y la producción de sideróforos (agentes quelantes), y lipodepsipéptidos que inhiben la infección que causan en distintos cultivos a nivel radicular (Haque, Khan & Ahamad, 2018).

La producción de autotoxinas en plantas y su efecto en las comunidades microbianas de la rizósfera, es un fenómeno que recientemente se comienza a estudiar y que tiene un impacto directo sobre el efecto de dichas toxinas en los monocultivos, los cuales se caracterizan por mantener una constante demanda del uso del suelo y sus nutrientes (Zhou & Wu, 2018). Estos autores indican que

los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* destacan de las comunidades microbianas de la rizósfera por su susceptibilidad ante autotoxinas de origen vegetal. De acuerdo con su investigación, estas bacterias en colaboración con el resto del consorcio microbiano y las condiciones físico-químicas de la rizósfera, funcionan como un agente buferizante que retiene el impacto de estas sustancias en los agroecosistemas.

Los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*, el primero identificado en la Finca San Pablo con las cepas FSP-09 y FSP-15, y el segundo en la Finca Balatana con la cepa FB-01 (Figura 13), son bacterias Gram-positivas, aerobias, formadoras de endosporas, con forma de bastones en el caso de *Bacillus* y con formas variables y complejas, análogas a diamantes, en *Paenibacillus* (Deng et al., 2012, Yousten, 2008). Son géneros ampliamente estudiados por su capacidad de secretar gran variedad de enzimas, tales como proteasas, amilasas, xilanasas, celulasas, lipasas, metabolitos biocontroladores; con aplicabilidad en sectores como la medicina, la agricultura y la industria (Zhao & Kuipers, 2016). Varias de las especies pertenecientes a estos géneros, como por ejemplo *B. subtilis* y *P. polymyxa*, son clasificadas como bacterias PGP (Finch, Caruso & Engl, 2018; Haque, Khan & Ahamad, 2018; Zhou & Wu, 2018; Rossmann et al., 2012).

El género *Burkholderia*, el único aislado en las tres fincas con las cepas FR-01, FR-02, FB-02 y FSP-01 (Figura 13), al igual que *Bacillus* y *Paenibacillus*, proveen de resistencia a la rizósfera ante la presencia de autotoxinas secretadas por plantas (Zhou & Wu, 2018). Son bacterias Gram-negativas, aerobias y con forma de bacilo, caracterizadas por su amplia aplicabilidad en la agricultura, clasificadas como bacterias PGP y se les ha identificado en cultivos de arroz, maíz, café, banano, caña de azúcar, piña, sorgo y pastos, actuando como supresores de patógenos (Bolívar-Anillo, Contreras-Zentella & Teherán-Sierra, 2016; Gnanamanickam, 2006; Rossmann et al., 2012).

Los géneros *Cellvibrio* y *Ralstonia* sólo fueron identificados en la Finca San Pablo con las cepas FSP-02 y FSP-06 respectivamente (Figura 13), al igual que *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Streptomyces*, *Microbacterium* y *Pseudomonas*. El género *Cellvibrio* corresponde a bacterias Gram-negativas, aerobias y con forma de bastones (Mergaert et al., 2003). *Cellvibrio* está emparentado filogenéticamente con el género *Pseudomonas*, caracterizándose por presentar especímenes endófitos involucrados con la sacarificación de xiloglucano, lo cual evita que la planta tenga quemaduras solares e incide en el desarrollo, el metabolismo y la regulación de la actividad inmune de las plantas (Li et al., 2017). Según Mergaert et al. (2003), Gao et al. (2016) y Wu & He (2015), especies como *C. japonicus* y *C. mixtus*, destacan por su capacidad de degradar polímeros de carbono complejos como la celulosa, dextrano, xilano, quitina y almidón, con potencial para usarse

como tratamiento biológico para aprovechar los residuos agrícolas de distintos cultivos y actividades pecuarias.

Ralstonia corresponde a un género de bacterias Gram-negativas, aerobias, caracterizadas por ser patógenas de humanos, animales y plantas, por ejemplo en el cultivo del tomate es responsable de la enfermedad denominada “Marchitez de *Ralstonia*” (Ryan & Adley, 2014; Yang et al., 2018) y en el de banano es causante de la enfermedad conocida con el nombre de “Moko” (Martínez y Guzmán, 2011). Sin embargo, en el estudio realizado por Moreira et al. (2019), indican que la especie *R. eutropha* 1C2, aislada de suelo contaminado con metales pesados, tiene la capacidad de promover el crecimiento de las plantas y la bioacumulación de zinc en cultivos de maíz, por lo tanto, en dicha investigación la clasifican como una bacteria PGP.

El aprovechamiento o tratamiento de los residuos agrícolas es una práctica agronómica que recientemente se comienza a implementar como una medida de manejo de la biomasa residual. Sun et al. (2017) destacan que la aplicación de la materia orgánica es también una medida para promover la conservación y fertilidad de los suelos, aumenta la diversidad microbiana y la actividad de enzimas extracelulares, mejora la capacidad de retención, porosidad e infiltración del agua del suelo, y tiene efectos positivos en la agregación del mismo. La implementación del aprovechamiento de los residuos agrícolas en los agroecosistemas mitiga y adapta los suelos agrícolas ante el cambio climático. La aplicación de la biomasa residual provee al suelo de características físico-químicas y biológicas que funcionan como amortiguamiento ante las variabilidades climáticas que tiene implícito este fenómeno (Sun et al., 2017).

Las investigaciones sobre la línea del control biológico y el manejo de los recursos naturales en los agroecosistemas, destacan la biodegradación asistida por microorganismos como una alternativa biotecnológica para el manejo de los residuos agrícolas, la reincorporación de nutrientes y materia orgánica al agroecosistema, y la reducción del alto costo del uso de fertilizantes dentro de la producción comercial. La biofertilización de los cultivos es una práctica sana que procura conservar o mitigar el impacto ambiental de la producción agrícola y además es una fuente de nutrientes que puede suplementar los requerimientos convencionales de fertilizantes químicos, reflejándose en una reducción del insumo económico correspondiente a agroquímicos.

6. Conclusiones

- ❖ Los consorcios de los microorganismos aislados del suelo de plantaciones bananeras alcanzaron tasas de biodegradación promedio de los residuos agrícolas entre el 21.41 y 50.52 %, siendo la relación C/N la variable que mejor describió este proceso.
- ❖ Con la metodología desarrollada fue posible aislar microorganismos con capacidad de degradar celulosa, con potencial para asistir en la biodegradación de los residuos agrícolas del cultivo de banano.
- ❖ Las bacterias celulolíticas identificadas se clasificaron en 11 géneros, los que presentaron mayor abundancia fueron *Burkholderia* spp., *Aeromonas* spp., y *Flavobacterium* spp. Estas bacterias han sido reportadas como PGP, las cuales se caracterizan por ubicarse en la rizósfera del suelo, promover el crecimiento y la vigorosidad de las plantas, proteger ante patógenos, secretar metabolitos benéficos y funcionar como agentes buferizantes ante cambios biológicos y físico-químicos del suelo.
- ❖ De acuerdo con los resultados obtenidos en la Finca San Pablo, la implementación de buenas prácticas agrícolas y el sistema de siembra hexagonal repercute positivamente en la tasa de biodegradación de los residuos agrícolas a través de la proliferación de microorganismos benéficos.
- ❖ La biodegradación asistida por microorganismos es una alternativa biotecnológica para el manejo de los residuos agrícolas, la reincorporación de nutrientes y materia orgánica al agroecosistema y la reducción del consumo de fertilizantes químicos dentro de la producción comercial.

7. Recomendaciones

- ❖ Para especializar al consorcio microbiano en la biodegradación de los residuos agrícolas se podría considerar aumentar los periodos de incubación, monitorear las condiciones físico-químicas y la concentración celular del ensayo.
- ❖ Reducir la concentración de lignina en el medio de aislamiento y aumentar el periodo de incubación de las placas inoculadas, para aumentar la posibilidad de aislar microorganismos con la capacidad de degradar este biopolímero.
- ❖ Realizar un ensayo paralelo en donde se añada algún bactericida a las matrices inoculadas, para determinar el posible efecto de la rápida colonización de las bacterias sobre las poblaciones de hongos.
- ❖ Realizar pruebas a nivel colectivo e individual de los aislamientos obtenidos, para determinar su potencial en la biodegradación de los residuos agrícolas del cultivo de banano en condiciones controladas y en campos experimentales.
- ❖ Los microorganismos que se utilicen para la biodegradación de los residuos agrícolas deben ser originarios del mismo nicho ecológico del que provenga la fuente de carbono.
- ❖ Implementar buenas prácticas agrícolas y el sistema de siembra hexagonal para la proliferación de microorganismos benéficos que favorezcan la tasa de biodegradación de los residuos agrícolas del cultivo de banano.
- ❖ Promover la investigación de biotecnologías que implementen buenas prácticas agrícolas en función del mejoramiento de las condiciones de producción del cultivo de banano, de la reducción del consumo de agroquímicos y el manejo de los recursos naturales.

8. Referencias

- Abril, M. F. (2016). *Optimización de la reacción de hidrólisis ácida de los residuos de la planta de banano, para mayor rendimiento a glucosa* (Tesis de Licenciatura, Universidad de Cuenca, Ecuador). Recuperada de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25974/1/Tesis.pdf>.
- Akhtar, N., Akhtar, K., & Ghauri, M. A. (2017). Biodesulfurization of Thiophenic Compounds by a 2-Hydroxybiphenyl-Resistant *Gordonia* sp. HS126-4N Carrying dszABC Genes. *Current microbiology*, 1-7. doi: doi.org/10.1007/s00284-017-1422-8
- Antony, C. P., Doronina, N. V., Boden, R., Trotsenko, Y. A., Shouche, Y. S., & Murrell, J. C. (2012). *Methylophaga lonarensis* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic methylotroph isolated from the soda lake sediments of a meteorite impact crater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(7), 1613-1618. doi: 10.1099/ijs.0.035089-0
- Araya, M., Tapia, A., Mata, R., Serrano, E., & Acuña, O. (2014). Efecto de la aplicación de compost y nematicida sobre la dinámica de las poblaciones de microorganismos, nematodos fitoparásitos del suelo y la salud del sistema radical en el cultivo del banano (*Musa aaa*) sembrado en domos. *Agronomía costarricense: Revista de ciencias agrícolas*, 38(2), 93-105.
- Arenskötter, M., Bröker, D., & Steinbüchel, A. (2004). Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. *Applied and environmental microbiology*, 70(6), 3195-3204. doi: 10.1128/AEM.70.6.3195-3204.2004
- Atlas, R. M. & Bartha, R. (2006). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Madrid, España: Pearson Education, S.A.
- Batista-García, R. A., Kumar, V. V., Ariste, A., Tovar-Herrera, O. E., Savary, O., Peidro-Guzmán, H., ... & Folch-Mallol, J. L. (2017). Simple screening protocol for identification of potential mycoremediation tools for the elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols from hyperalkalophile industrial effluents. *Journal of Environmental Management*, 198, 1-11. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.010>

- Blanco, M. (2008). *Papel de raquis de banana en Costa Rica: Historia y aspectos técnicos, periodo de 1976 a 2002*. San José, Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
- Blume, E. & Reichert, J. M. (2015). Banana leaf and glucose mineralization and soil organic matter in microhabitats of banana plantations under long-term pesticide use. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(6), 1232-1238. doi: 10.1002/etc.2933
- Bolívar-Anillo, H. J., Contreras-Zentella, M. L., & Teherán-Sierra, L. G. (2016). *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 19(2), 102-108.
- Campos, F., Cuevas-Velazquez, C., Fares, M. A., Reyes, J. L., & Covarrubias, A. A. (2013). Group 1 LEA proteins, an ancestral plant protein group, are also present in other eukaryotes, and in the archaee and bacteria domains. *Molecular genetics and genomics*, 288(10), 503-517. doi: 10.1007/s00438-013-0768-2
- Carchi, D. E. (2014). *Aprovechamiento de los residuos agrícolas provenientes del cultivo de banano para obtener nanocelulosa* (Tesis de Licenciatura, Universidad de Cuenca, Ecuador). Recuperada de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/5292/1/tesis.pdf>.
- Cedeño, R. (2005). Caracterización de Comunidades Bacterianas en sistemas de engorde de camarón mediante electroforesis en geles de gradiente denaturante (DGGE). *CENAIM INFORMA*, (133), 593-4.
- Chater, K. F. (2016). Recent advances in understanding Streptomyces. *F1000Research*, 5. doi: 10.12688/f1000research.9534.1
- Chen, Y., Sun, T. T., Qian, H. Y., Fan, J. B., He, Y. Q. & Sun, B. (2016). Nitrogen mineralization as a result of phosphorus supplementation in long-term phosphate deficient soil. *Applied Soil Ecology*, 106, 24-32.
- Chong, G. G., Huang, X. J., Di, J. H., Xu, D. Z., He, Y. C., Pei, Y. N., ... & Ma, C. L. (2018). Biodegradation of alkali lignin by a newly isolated *Rhodococcus pyridinivorans* CCZU-B16. *Bioprocess and biosystems engineering*, 41(4), 501-510. doi: <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1884-x>

- CORBANA (Corporación Bananera Nacional). (2011). Implementación de Buenas Prácticas Agrícolas para Reducir el Esguerrimiento de Plaguicidas en el Cultivo del Banano de la Región Caribe Costarricense. Recuperado de <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones-corbana/Estudio%20de%20caso%20Corbana.pdf>.
- CORBANA (Corporación Bananera Nacional). (2016). Industria bananera en Costa Rica. Costa Rica. Recuperado de <https://www.corbana.co.cr/categories/industria-bananera>.
- CORBANA (Corporación Bananera Nacional). (2017a). Estadísticas bananeras. Costa Rica. Recuperado de https://www.corbana.co.cr/categories/categoria_1348798091.
- CORBANA (Corporación Bananera Nacional). (2017b). Estadísticas bananeras. Costa Rica. Recuperado de https://www.corbana.co.cr/categories/categoria_1348243853.
- de Lima Brossi, M. J., Jiménez, D. J., Cortes-Tolalpa, L. & van Elsas, J. D. (2016). Soil-derived microbial consortia enriched with different plant biomass reveal distinct players acting in lignocellulose degradation. *Microbial ecology*, 71(3), 616-627. doi: 10.1007/s00248-015-0683-7
- Delgado, K. (2004). *Uso alternativo de residuos de caña de azúcar para la obtención de espumas rígidas de poliuretano* (Tesis de Licenciatura). Escuela de Química, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Deng, A. H., Sun, Z. P., Zhang, G. Q., Wu, J., & Wen, T. Y. (2012). Rapid discrimination of newly isolated Bacillales with industrial applications using Raman spectroscopy. *Laser Physics Letters*, 9(9), 636. doi: 10.7452/lapl.201210052
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. & Stackebrandt, E. (2006). *The Prokaryotes*. New York, Estados Unidos: Springer Science+Business Media, LLC.
- Elbehri, A., Calberto, G., Staver, C., Hospido, A., Roibas, L., Skully, D., Siles, P., Arguello, J., Sotomayor, I. & Bustamante, A. (2015). Cambio climático y sostenibilidad del banano en el Ecuador: Evaluación de impacto y directrices de política. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Roma, Italia.

- Evtushenko, L. I., & Takeuchi, M. (2006). The Family Microbacteriaceae. In *The Prokaryotes* (pp. 1020-1098). United States: Springer.
- Fanin, N., Moorhead, D. & Bertrand, I. (2016). Eco-enzymatic stoichiometry and enzymatic vectors reveal differential C, N, P dynamics in decaying litter along a land-use gradient. *Biogeochemistry*, 129(1-2), 21-36. doi: 10.1007/s10533-016-0217-5
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2014a). Banana Market Review and Banana Statistics 2012-2013. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/019/i3627e/i3627e.pdf>.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2014b). FAOSTAT, Cultivos. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2015). Uso y manejo de leguminosas como cobertura de suelos para reducir la vulnerabilidad de los sistemas de producción agrícola en República Dominicana. Recuperado de <http://teca.fao.org/es/read/8332>.
- Finch, E. A., Caruso, T., & Engl, C. (2018). Effects of *Paenibacillus polymyxa* inoculation on below-ground nematode communities and plant growth. *Soil Biology and Biochemistry*, 121, 1-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.01.026>
- Freixa, A., Ejarque, E., Crognale, S., Amalfitano, S., Fazi, S., Butturini, A. & Romaní, A. M. (2016). Sediment microbial communities rely on different dissolved organic matter sources along a Mediterranean river continuum. *Limnology and Oceanography*, 61(4), 1389-1405. doi: 10.1002/lno.10308
- Gaitan, D. & Pérez, L. (2007). *Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (Dendranthema grandiflora)* (Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia). Recuperada de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis274.pdf>.
- Gao, J. L., Yu, x. F., Zhang, B. L., Wang, Z. G., Naoganchaolu, B., HU, S. P., ... & Zhen, W. A. N. G. (2016). Screening of a microbial consortium with efficient corn stover degradation ability

at low temperature. *Journal of integrative agriculture*, 15(10), 2369-2379. Doi: 10.1016/S2095-3119(15)61272-2

Garcez, M., Martins, J. A. S. & Rodrigues, E. J. R. (2016). Evaluation of different banana genotypes for resistance to panama disease= Avaliacao de diferentes genótipos de bananeira quanto a resistencia ao Mal-do-Panamá. *Bioscience Journal*, 32(2), 431-435. doi: <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v32n2a2016-29818>

Giacobbe, S., Balan, V., Montella, S., Fagnano, M., Mori, M. & Faraco, V. (2016). Assessment of bacterial and fungal (hemi) cellulose-degrading enzymes in saccharification of ammonia fibre expansion-pretreated *Arundo donax*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2213-2224. doi: 10.1007/s00253-015-7066-3

Gnanamanickam, S. S. (Ed.). (2006). *Plant-associated bacteria* (Vol. 1). Germany: Springer.

González-Sánchez, M. E., Pérez-Fabiél, S., Wong-Villarreal, A., Bello-Mendoza, R. & Yañez-Ocampo, G. (2015). Residuos agroindustriales con potencial para la producción de metano mediante la digestión anaerobia. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 229-235. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.05.003>

Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L. & Olivar, R. (2008). Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Academia*, 13, 50-74.

Gutiérrez, A. & Martínez, A. (1996). Mecanismo de biodegradación de la lignina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 13(1): 18-23.

Hamidat, M., Barakat, M., Ortet, P., Chanéac, C., Rose, J., Bottero, J. Y. ... & Santaella, C. (2016). Design Defines the Effects of Nanoceria at a Low Dose on Soil Microbiota and the Potentiation of Impacts by the Canola Plant. *Environmental science & technology*, 50(13), 6892-6901. doi: 10.1021/acs.est.6b01056

Han, X., Hu, H., Shi, X., Zhang, L. & He, J. (2017). Effects of different agricultural wastes on the dissipation of PAHs and the PAH-degrading genes in a PAH-contaminated soil. *Chemosphere*, 172, 286-293. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.012.

- Hapsari, L. & Lestari, D. A. (2016). Fruit characteristic and nutrient values of four Indonesian banana cultivars (*Musa* spp.) at different genomic groups. *Agrivita*, 38(3), 303. doi: <http://dx.doi.org/10.17503/agrivita.v38i3.696>
- Haque, Z., Khan, M. R., & Ahamad, F. (2018). Relative antagonistic potential of some rhizosphere biocontrol agents for the management of rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*. *Biological Control*, 126: 109–116. doi: doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.07.018
- Hernández, A. (2003). *Microbiología Industrial*. Costa Rica: Editorial de la Universidad Estatal a Distancia.
- Hong, S. H., Ryu, H., Kim, J., & Cho, K. S. (2011). Rhizoremediation of diesel-contaminated soil using the plant growth-promoting rhizobacterium *Gordonia* sp. S2RP-17. *Biodegradation*, 22(3), 593-601. doi: [10.1007/s10532-010-9432-2](https://doi.org/10.1007/s10532-010-9432-2)
- INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censo). (2015). VI Censo Nacional Agropecuario. Resultados Generales. San José, Costa Rica. Recuperado de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00338.pdf>
- Jiang, J., Liu, X., Huang, Y., & Huang, H. (2015). Inoculation with nitrogen turnover bacterial agent appropriately increasing nitrogen and promoting maturity in pig manure composting. *Waste management*, 39, 78-85. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2015.02.025>
- Jiménez, D. J., de Lima Brossi, M. J., Schückel, J., Kračun, S. K., Willats, W. G. T. & van Elsas, J. D. (2016). Characterization of three plant biomass-degrading microbial consortia by metagenomics-and metasecretomics-based approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(24), 10463-10477. doi: [10.1007/s00253-016-7713-3](https://doi.org/10.1007/s00253-016-7713-3)
- Jiménez, D. J., Korenblum, E. & van Elsas, J. D. (2014). Novel multispecies microbial consortia involved in lignocellulose and 5-hydroxymethylfurfural bioconversion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(6), 2789-2803. doi: [10.1007/s00253-013-5253-7](https://doi.org/10.1007/s00253-013-5253-7)
- Jones, C. M., & Hallin, S. (2010). Ecological and evolutionary factors underlying global and local assembly of denitrifier communities. *The ISME Journal*, 4(5), 633.

- Júlio, A. D. L., Fernandes, R. D. C. R., Costa, M. D., Neves, J. C. L., Rodrigues, E. M., & Tótolá, M. R. (2018). A new biostimulation approach based on the concept of remaining P for soil bioremediation. *Journal of environmental management*, 207, 417-422. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.11.061>
- Kadir, A. A., Jamaludin, S. N. & Azhari, N. W. (2016). An Overview of Composting Based on Variable Feedstock Material. In *MATEC Web of Conferences*, 47, 1-6. doi: <https://doi.org/10.1051/mateconf/20164705016>
- Lasa Uzcudun, Í. (2006). Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *International Microbiology*, 9 (1), 21-28.
- Lenoir, L., Persson, T., Bengtsson, J., Wallander, H., & Wiren, A. (2007). Bottom-up or top-down control in forest soil microcosms? Effects of soil fauna on fungal biomass and C/N mineralisation. *Biology and Fertility of Soils*, 43(3), 281-294. doi: 10.1007/s00374-006-0103-8
- Li, T., Liu, T., Zheng, C., Kang, C., Yang, Z., Yao, X., ... & Zhang, C. (2017). Changes in soil bacterial community structure as a result of incorporation of Brassica plants compared with continuous planting eggplant and chemical disinfection in greenhouses. *PloS one*, 12(3), e0173923. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173923>
- Lo, Y. C., Saratale, G. D., Chen, W. M., Bai, M. D. & Chang, J. S. (2009). Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(6), 417-425. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.03.002
- López-Mondéjar, R., Zühlke, D., Větrovský, T., Becher, D., Riedel, K. & Baldrian, P. (2016). Decoding the complete arsenal for cellulose and hemicellulose deconstruction in the highly efficient cellulose decomposer *Paenibacillus* O199. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 104. doi: 10.1186/s13068-016-0518-x
- Mahalakshmi, R. & Naveena, M. L. (2016). Usage of Banana Pseudostem Waste for the Production of Potassic Biofertilizer using Cellulolytic Bacteria. *International Journal of Current*

Microbiology and Applied Sciences, 5(8), 336-349. doi:
<http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.508.036>

- Martin-Carnahan, A., & Joseph, S. W. (2005). Aeromonadales ord. nov. In Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology (pp. 556-587). Estados Unidos: Springer.
- Martínez, I & Guzmán, M. (2011). Moko o marchitamiento bacteriano del banano y plátano (*Ralstonia solanacearum* Yabuuchi et al.). Plegable divulgativo N°1, Corporación Bananera Nacional.
- Martínez-Anaya, C., Balcázar-López, E., Dantán-González, E. & Folch-Mallol, J. L. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3-4), 119-131.
- Mathews, C., Van Holde, K., Appling, D & Anthony-Cahill, S. (2013). Bioquímica. Madrid, España: Pearson Education, S.A.
- Medina, D. A. P., Nuñez, M. F. A. & Ordoñez, M. S. (2010). Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banano. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 23(1), 81-88.
- Mejía, G. & Gómez, J. S. (2002). Los desechos generados por la industria bananera colombiana. Seminario Internacional Gestión Ambiental de Residuos Sólidos y Peligrosos, Siglo XXI. Colombia. Recuperado de <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/acodal/xxix.pdf>.
- Meneses, M. M., Agatón, L. L., Gutiérrez, L. F. M., Mendieta, L. E. G. & Botero, J. D. (2012). Aprovechamiento industrial de residuos de cosecha y poscosecha del plátano en el departamento de Caldas. *Revista Educación en Ingeniería*, 5(9), 128-139.
- Mergaert, J., Lednicka, D., Goris, J., Cnockaert, M. C., De Vos, P., & Swings, J. (2003). Taxonomic study of Cellvibrio strains and description of Cellvibrio ostraviensis sp. nov., Cellvibrio fibrivorans sp. nov. and Cellvibrio gandavensis sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(2), 465-471. doi: 10.1099/ijms.0.02316-0
- Mia, M., Baset, A., Shamsuddin, Z. & Mahmood, M. (2010). Use of plant growth promoting bacteria in banana: a new insight for sustainable banana production. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(3), 459-467.

- Mohammad, N., Alam, M. Z., Kabbashi, N. A. & Ahsan, A. (2012). Effective composting of oil palm industrial waste by filamentous fungi: A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 58, 69-78. doi:10.1016/j.resconrec.2011.10.009
- Moreira, H., Pereira, S. I., Marques, A. P., Rangel, A. O., & Castro, P. M. (2019). Effects of soil sterilization and metal spiking in plant growth promoting rhizobacteria selection for phytotechnology purposes. *Geoderma*, 334, 72-81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.07.025>
- Muyzer, G., & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1), 127-141. doi: 10.1023/A:1000669317571
- Nuraini, A. D. & Trisna, A. (2017). Palm Oil Sludge Fermented by Using Lignocellulolytic Fungi as Poultry Diet. *International Journal of Poultry Science*, 16, 6-10. doi: 10.3923/ijps.2017.6.10
- Oliveira, L., Cordeiro, N., Evtuguin, D. V., Torres, I. C. & Silvestre, A. J. D. (2007). Chemical composition of different morphological parts from 'Dwarf Cavendish' banana plant and their potential as a non-wood renewable source of natural products. *Industrial Crops and Products*, 26(2), 163-172. doi:10.1016/j.indcrop.2007.03.002
- Ortiz, E. (08 de octubre del 2013). Guanacaste es la provincia que ocupa el primer lugar con mayor desempleo del país. Primero en Noticias. Recuperado de <https://primeroennoticias.com/2013/10/08/guanacaste-es-la-provincia-que-ocupa-el-primer-lugar-con-mayor-desempleo-del-pais/> .
- Paillié, M. (2012). *Determinación de la actividad celulolítica, ligninolítica y amilolítica de actinobacterias aisladas de suelo rizosférico de trébol blanco (Trifolium repens)* (Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia). Recuperada de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11781/PaillieJimenezMariaElisa2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Pandey, S., Tiwari, R., Singh, S., Nain, L. & Saxena, A. K. (2014). Evaluation of β -1, 4-Endoglucanases Produced by Bacilli Isolated from Paper and Pulp Mill Effluents Irrigated

Soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1073-1080. doi: <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1311.11051>

Pérez, H. M. G. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*, 1(2), 31-4.

Rinland, M. E. (2016). *Biodegradación anaeróbica del residuo de la producción de cebolla del valle bonaerense del río Colorado* (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

Rojas, D. (2015). *Evaluación in vitro de un consorcio de bacterias y hongos sobre la degradación del rastrojo de piña* (Tesis de Licenciatura). Escuela de Ciencias Ambientales, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Rojas, J. U., Verreth, J. A. J., Amato, S., & Huisman, E. A. (2003). Biological treatments affect the chemical composition of coffee pulp. *Bioresource Technology*, 89(3), 267-274. doi: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00070-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00070-1)

Rossmann, B., Müller, H., Smalla, K., Mpiira, S., Tumuhairwe, J. B., Staver, C., & Berg, G. (2012). Banana-associated microbial communities in Uganda are highly diverse but dominated by Enterobacteriaceae. *Applied and environmental microbiology*, 78(14): 4933-4941. doi: [doi:10.1128/AEM.00772-12](https://doi.org/10.1128/AEM.00772-12)

Ryan, M. P., & Adley, C. C. (2014). *Ralstonia* spp.: emerging global opportunistic pathogens. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 33(3), 291-304. doi: [10.1007/s10096-013-1975-9](https://doi.org/10.1007/s10096-013-1975-9)

SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). (2016). Informe Comercio Exterior del Sector Agropecuario. I Trimestre 2015-2016. Área de Estudios Económicos e Información – AEEI, San José, Costa Rica.

Smith, T & Smith, R. (2007). *Ecología*. Madrid, España: Pearson Education, S.A.

Soares, F. L., Dias, A. C. F., Fasanella, C. C., Taketani, R. G., Lima, A. O. D. S., Melo, I. S. & Andreote, F. D. (2013). Endo-and exoglucanase activities in bacteria from mangrove sediment. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 969-976.

- Soares, F. L., Melo, I. S., Dias, A. C. F. & Andreote, F. D. (2012). Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 2195-2203. doi: 10.1007/s11274-012-1025-2
- Spasic, J., Mandic, M., Djokic, L., & Nikodinovic-Runic, J. (2018). Streptomyces spp. in the biocatalysis toolbox. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(8), 3513-3536. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8884-x>
- Sun, D., Li, K., Bi, Q., Zhu, J., Zhang, Q., Jin, C., ... & Lin, X. (2017). Effects of organic amendment on soil aggregation and microbial community composition during drying-rewetting alternation. *Science of the Total Environment*, 574, 735-743. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.112>
- Thomas, P. & Soly, T. A. (2009). Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa* sp.) cv. Grand Naine and the affinity of endophytes to the host. *Microbial ecology*, 58(4), 952-964. doi: 10.1007/s00248-009-9559-z
- Turrado, J., Saucedo, A. R., Sanjuán, R. & Sulbaran, B. (2009). Pinzote de *Musa balbisiana* y *Musa acuminata* como fuente de fibras para papel. *Centro de Información Tecnológica*, 20(4), 117-122. doi: 10.1612/inf.tecnol.4065it.08
- Vargas, A., Rodríguez, A., González, M & Blanco, F. (2012). Influencia de los residuos de cosecha sobre las características químicas y microbiológicas del suelo, nematodos y condición radical en plantas de banano bajo un arreglo hexagonal de siembra. Informe Anual 2012, CORBANA.
- Venegas, J. F. M. & Suárez, D. E. C. (2004). Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6(1), 58-71.
- Viljoen, A., Kunert, K., Kiggundu, A., Escalant, J. V. & Bornman, C. H. (2004). Biotechnology for sustainable banana and plantain production in Africa: the South African contribution. *South African Journal of Botany*, 70(1), 67-74.
- Wu, Y. R., & He, J. (2015). Characterization of a xylanase-producing *Cellvibrio mixtus* strain J3-8 and its genome analysis. *Scientific Reports*, 5, 10521. doi: 10.1038/srep10521

- Yang, W., Yan, H., Zhang, J., Gao, Y., Xu, W., Shang, J., & Luo, Y. (2018). Inhibition of biofilm formation by Cd²⁺ on *Bacillus subtilis* 1JN2 depressed its biocontrol efficiency against *Ralstonia* wilt on tomato. *Microbiological Research*, 215:1-6. doi: doi.org/10.1016/j.micres.2018.06.002
- Yousten, A. A. (2008). *Paenibacillus*. In *Encyclopedia of Entomology* (pp. 2718-2719). Netherlands: Springer.
- Zamora, R. (2015). *Obtención y evaluación de mezclas de polipropileno con fibras de raquis de banano (Musa AAA)* (Tesis de Licenciatura). Escuela de Química, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.
- Zhao, X., & Kuipers, O. P. (2016). Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC genomics*, 17(1), 882. doi: DOI 10.1186/s12864-016-3224-y
- Zhou, X., & Wu, F. (2018). Vanillic acid changed cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedling rhizosphere total bacterial, *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. communities. *Scientific reports*, 8(1), 4929.

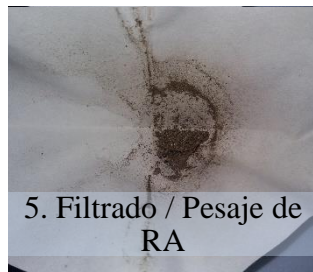
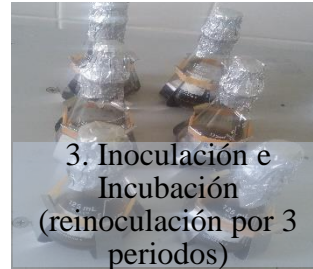
9. Anexos



Anexo 1. Sustrato de residuos agrícolas usados en los ensayos como única fuente de carbono.

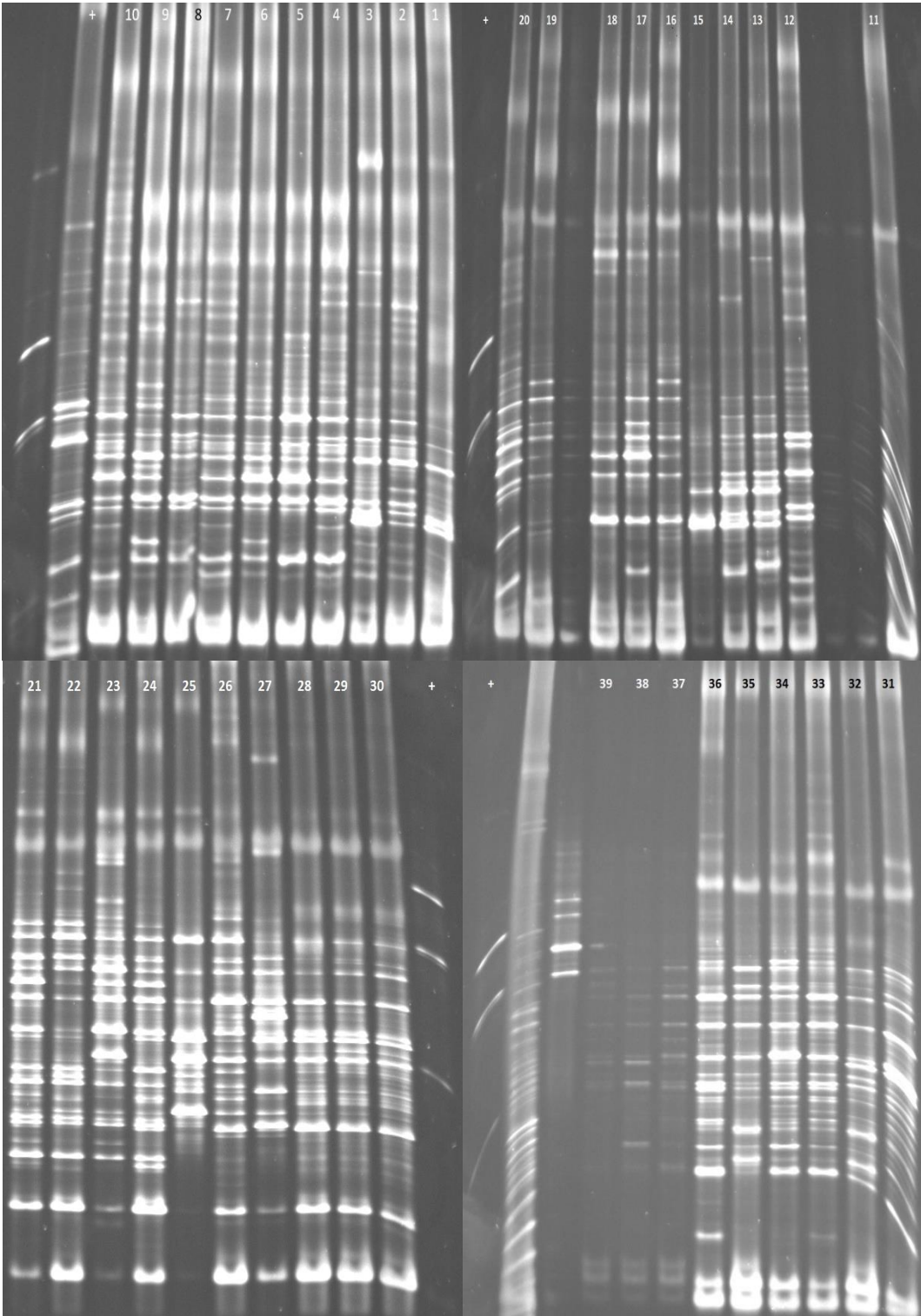


Anexo 2. Esquema de la recolecta de muestras de suelo de plantaciones bananeras con el sistema de siembra en hexágonos.

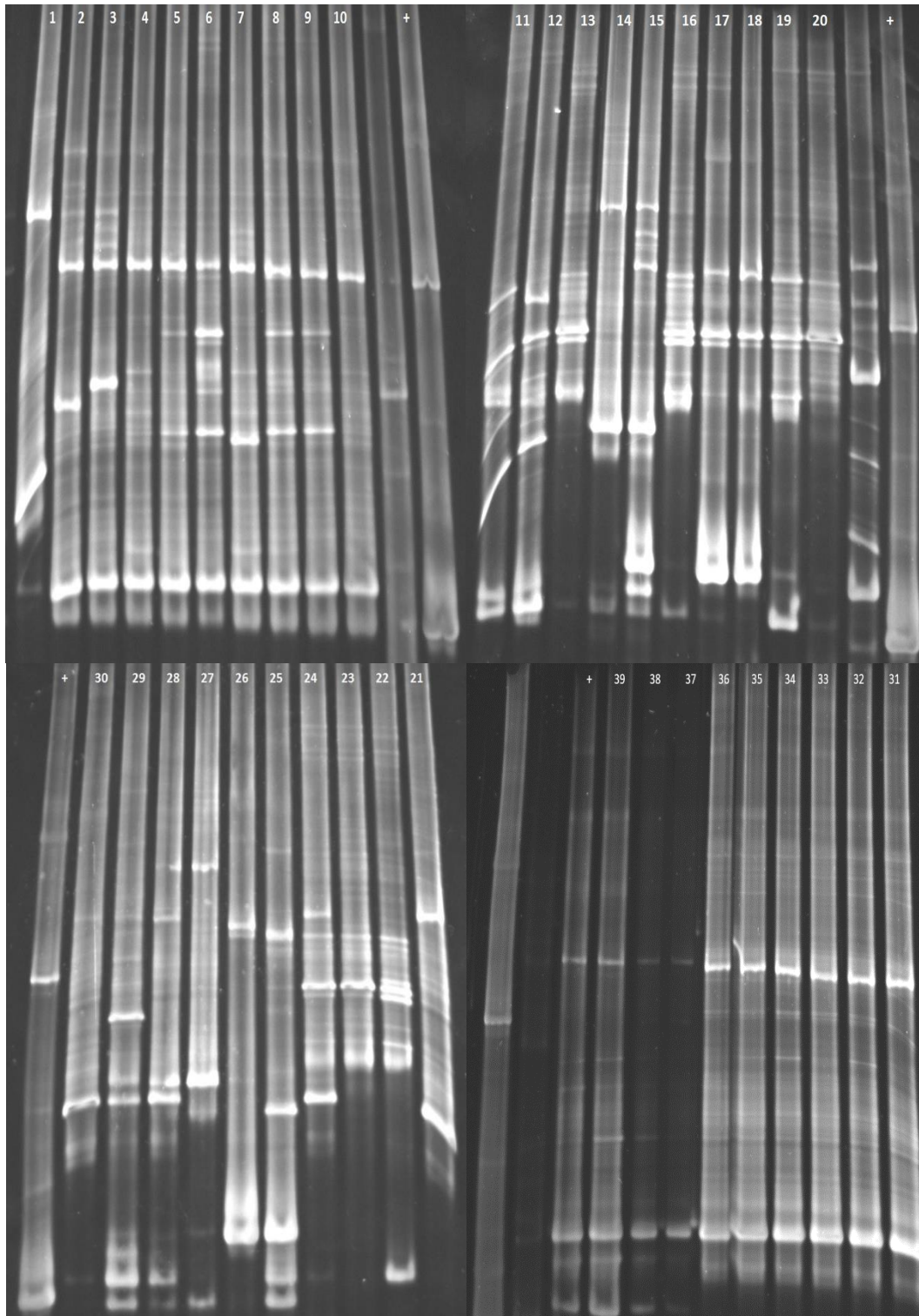


Anexo 3. Esquema del proceso de enriquecimiento, incubación y colecta de los residuos agrícolas filtrados post-incubación.

Anexo 4. Análisis de diversidad de bacterias mediante el método DGGE.

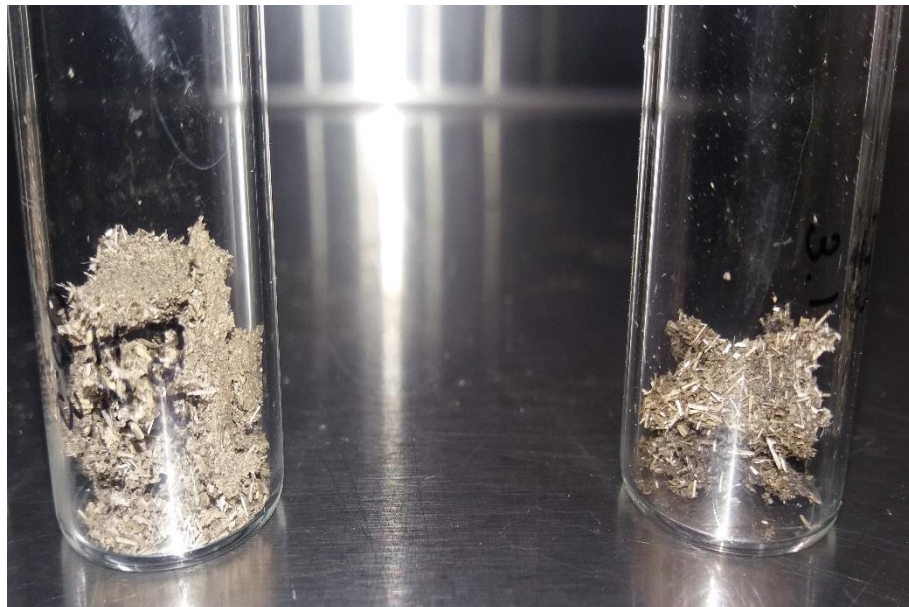


Anexo 5. Análisis de diversidad de hongos mediante el método DGGE.





Anexo 6. Matracas posteriores a la incubación, ensayo con inoculo (izquierda) y ensayo control (derecha).



Anexo 7. Residuos agrícolas posteriores al filtrado y secado, ensayo con inoculo (derecha) y ensayo control (izquierda).

