



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS
DEGRADADORES DE BAGAZO DE MAÍZ Y SU
PROPAGACIÓN UTILIZANDO COMO MEDIO DE
CULTIVO EL NEJAYOTE

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
OSCAR DAVID CHOLULA CASTILLO

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Antonino Baez Rogelio

ENERO 2025



A mis padres:

Esta tesis se las dedico con todo mi amor y cariño, agradezco de todo corazón su gran apoyo durante estos 20 años que, de principio a fin, han sido de arduo trabajo y dedicación hacia mis estudios, cuidándome y motivándome a seguir adelante hasta alcanzar este logro que hoy, gracias a Dios, culmino.

AGRADECIMIENTOS

A Dios primeramente porque sin Él nada sería posible, siendo que por su voluntad puedo culminar mis estudios de licenciatura, pues Él me los concedió y ha sido mi sustento cada día.

A mis padres, Delfino Cholula y Jocabeth Castillo, quienes con amor y paciencia me han guiado, quienes me apoyaron en mis proyectos y buscaron mi sustento, gracias por cuidar de mi y darme un hogar al cual llegar, lo amo.

A mi hermana Mildred por acompañarme, no hay un vínculo más fuerte que el de hermanos, porque está hecho de amor, risas y recuerdos inolvidables. Así mismo porque llenaste de alegría a la familia con los pequeños Harim y Hadasa.

A mis tíos y primos con quienes he compartido viajes, recuerdos y que me han ayudado con mis estudios, animándome y apoyándome desde que comencé a estudiar.

Al dr. Antonino por aceptarme en su laboratorio, por ayudarme en el desarrollo de este proyecto y porque a pesar de varias dificultades en el proceso siempre estuvo para orientarme.

A los profesores que formaron parte de esta licenciatura, gracias por acompañarnos en este viaje de aprendizaje a mis compañeros y a mí, gracias porque educar no es algo fácil y su esfuerzo se ve en cada uno de sus alumnos y como a través de consejos, platicas y lo ameno también nos dejan una valiosa enseñanza.

Un agradecimiento especial a la dra. Abigail Torres, la dra. Ivonne Xochipa, la dra. Norma Rojas, la dra. Lilia Cedillo, la dra. Orlenda Cortés, la dra. Patricia Amador Ramirez al dr. Ramiro Caso, al dr. Carlos Contreras y al dr. Jorge Juarez Posadas.

A Jesús Alejandro “El chuy”, gracias porque sin tu ayuda y compañerismo la licenciatura hubiese sido mucho más complicada, gracias por acordarme de las tareas y proyectos y por ser un buen amigo.

A Alejandro Cardoso, gracias porque las conversaciones y de pasar el rato, aun si no hacíamos nada, son lo que hacen de una amistad algo entrañable.

A mis compañeros alumnos del dr. Antonino Azucena, Alexis, Kevin, Vero, Frida y Melisa. Aunque cada uno con su proyecto y debíamos compartir un espacio pequeño, entre todos hubo ese compañerismo y apoyo en los días de lab.

Un agradecimiento especial a Ana Karen Avedaño, de verdad que sin tu apoyo, esta tesis hubiese sido mucho más complicada, gracias porque aún sin recibir nada a cambio estuviste ahí para apoyarme a pesar de que fuese poco lo que pude haberte enseñado.

INDICE

1.	RESUMEN	5
2.	INTRODUCCIÓN	6
3.	ANTECEDENTES	7
3.1.	El maíz en México	7
3.2.	El problema del Nejayote.....	7
3.3.	Residuos postcosecha del maíz y su aprovechamiento para fertilizar el suelo 9	
3.4.	Microorganismos degradadores de celulosa y hemicelulosa	9
3.5.	Cultivo de microorganismos en medios de cultivo a base de nejayote	11
4.	OBJETIVOS	12
5.	HIPÓTESIS	12
6.	JUSTIFICACIÓN	12
7.	METODOLOGÍA.....	13
7.1.	Aislamiento de microorganismos a partir del bagazo de maíz.	13
7.2.	Ensayo de degradación de carbohidratos complejos.....	14
7.2.1.	Determinación de la carga microbiana y azúcares libres al final de la fermentación de 96 h.	15
7.3.	Análisis ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) del gen ADNr 16S para descartar aislados repetidos.	16
7.4.	Secuenciación del gen ADNr 16S.....	19
7.5.	Evaluación del crecimiento de los aislados en medio a base de nejayote y LB líquido.	20
7.6.	Optimización de las condiciones de crecimiento en nejayote	20
7.7.	Ensayo de promoción de crecimiento vegetal.....	21
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
8.1.	Aislamiento de microorganismos a partir del bagazo de maíz.	23
8.2.	Ensayo de degradación de carbohidratos complejos y crecimiento de los aislados durante 96 h de fermentación en fase sólida.....	24
8.3.	Análisis ARDRA del gen ADNr 16S de los 7 aislados bacterianos.	26
8.4.	Ensayo de crecimiento en medio a base de nejayote y LB líquido a 30 C y pH 7 29	
8.5.	Secuenciación del gen ADNr 16S de los aislados ODC2 y ODC3.	32

8.6	Optimización de las condiciones de crecimiento en nejayote de la cepa Bacillus sp. ODC2.....	34
8.7	Ensayo de promoción de crecimiento.....	36
9	CONCLUSIONES.....	37
10	PERSPECTIVAS.....	38
11	BIBLIOGRAFÍA.....	38
12	ANEXO.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Tabla 1. Característica de las muestras del fragmento ADNr 16s de cada cepa. _____	19
Tabla 2. Resultados de peso seco de cada planta de maíz _____	36
Tabla 3. Resultados de peso seco de fresas sembradas _____	37
Figura 1. Curva patrón para ensayo de azúcares reductores mediante DNS _____	16
Figura 2. Cantidad de azúcares reductores liberados por gramo de bagazo fermentado _	24
Figura 3. Incremento de la carga microbiana por gramo de bagazo tras 96 h de fermentación _____	25
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. _____	27
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión. _____	28
Figura 6. De izquierda a derecha: ODC1, ODC2 y ODC3. _____	29
Figura 7. Crecimiento del aislado ODC1 en medio nejayote y LB a 30 °C, pH 7 _____	30
Figura 8. Crecimiento del aislado ODC2 en medio nejayote y LB a 30 °C, pH 7 _____	30
Figura 9. Crecimiento del aislado ODC3 en medio nejayote y LB a 30 °C, pH 7 _____	31
Figura 10. Árbol filogenético del Método de unión de vecinos (Neighbor joining tree) del aislado ODC2 (resaltado en amarillo). Se utilizaron 11 secuencias del gen DNAr 16S rRNA de <i>Bacillus</i> spp. _____	33
Figura 11. . Árbol filogenético del Método de unión de vecinos (Neighbor joining tree) del aislado ODC3 (resaltado en amarillo). Se utilizaron 12 secuencias del gen DNAr 16S rRNA de <i>Pseudomonas</i> spp. _____	33
Figura 12. Crecimiento del aislado ODC2 en medio nejayote a 35 °C, pH 6.5, 7 y 7.5 _____	34
Figura 13. Crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. ODC2 en medio nejayote a 30 °C, pH 6.5, 7 y 7.5 _	35
Figura 14. Crecimiento del aislado <i>Bacillus</i> sp. ODC2 en medio nejayote a 25 °C, pH 6.5, 7 y 7.5 _____	35
IMAGEN ANEXO 1 Imagen con los tiempos y temperaturas seleccionadas según el protocolo para la PCR. _____	43
IMAGEN ANEXO 2 Electroferograma secuencia “forward” del gen ADNr 16S del aislado ODC2. _____	44
IMAGEN ANEXO 3 Electroferograma secuencia “reverse” del gen ADNr 16S del aislado ODC2. _____	45
IMAGEN ANEXO 4. Electroferograma secuencia “forward” del gen ADNr 16S del aislado ODC3. _____	46
IMAGEN ANEXO 5. Electroferograma secuencia “reverse” del gen ADNr 16S del aislado ODC3. Algunas muestras de microscopías _____	47
IMAGEN ANEXO 6. Microscopía cepa 1. _____	51
IMAGEN ANEXO 7. Microscopía cepa 6. _____	51
IMAGEN ANEXO 8. Microscopía cepa 10. _____	51
IMAGEN ANEXO 9. Microscopía cepa 12. _____	51
IMAGEN ANEXO 10. Microscopía cepa D.. _____	51
IMAGEN ANEXO 11. Microscopía cepa D _α . _____	51
IMAGEN ANEXO 12. Fotografías de placas con diversos aislados _____	51

<i>IMAGEN ANEXO 13. Fotografías de placas con diversos aislados</i>	<u>52</u>
<i>IMAGEN ANEXO 14. Primeros brotes del maíz tratamiento ODC3 tras 10 días</i>	<u>53</u>
<i>IMAGEN ANEXO 15. Fresas de control (+) tras 20 días</i>	<u>53</u>
<i>IMAGEN ANEXO 16. Maíz de control (-) y fresas tratamiento ODC2 tras 20 días</i>	<u>54</u>
<i>IMAGEN ANEXO 17. Maíz tratamiento ODC 1 tras 20 días</i>	<u>54</u>
<i>IMAGEN ANEXO 18. Fresas tratamiento ODC 1 tras 20 días.</i>	<u>55</u>
<i>IMAGEN ANEXO 19. Fresas tratamiento ODC3 tras 20 días</i>	<u>55</u>
<i>IMAGEN ANEXO 20. Fresas tratamiento ODC2 tras 28 días</i>	<u>56</u>
<i>IMAGEN ANEXO 21. Fresas tratamiento ODC3 tras 28 días.</i>	<u>56</u>
<i>IMAGEN ANEXO 22. Maíz tratamiento ODC3 tras 28 días.</i>	<u>57</u>
<i>IMAGEN ANEXO 23. Fresas control (-) izquierda y control (+) derecha tras 28 días.</i>	<u>57</u>

1. RESUMEN

La presente investigación exploró el potencial biotecnológico de los microorganismos presentes en los residuos postcosecha del cultivo de maíz. Se aislaron y caracterizaron microorganismos presentes en bagazo de maíz (hojas y tallos triturados) con actividad celulolítica capaces de crecer tanto en bagazo como en nejayote; un subproducto alcalino de la nixtamalización. Los resultados mostraron que *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. fueron capaces de crecer en dichos residuos y degradarlos, liberando azúcares reductores. Se optimizaron las condiciones de cultivo para *Bacillus* sp. en un medio líquido a base de nejayote, obteniendo un crecimiento exponencial de hasta alcanzar 10^9 UFC/ml a pH 7.5, 25 °C y 100 rpm en 48 horas. Las cepas aisladas de *Bacillus* sp. ODC2 y *Pseudomonas* sp. ODC3 tienen el potencial de degradar bagazo de maíz, liberando de 12 a 23 mg de azúcares reductores por gramo de bagazo. Estos hallazgos sugieren que los microorganismos aislados tienen el potencial de ser utilizados en el desarrollo de bioprocesos para tratar residuos de la industria maicera, promoviendo la economía circular y generando valor agregado a partir de subproductos agrícolas.

2. INTRODUCCIÓN

El nejayote es el residuo líquido de la nixtamalización del maíz, el cual es un proceso ancestral y de uso común en México. La producción de masa a partir de nixtamal genera 50 millones de m³ de nejayote al año (Buitimea-Cantúa et al., 2020) El nejayote contiene una alta concentración de materia orgánica, compuesta principalmente por carbohidratos, proteínas, fibra y minerales provenientes del grano de maíz, que se pierden durante el proceso de nixtamalización. Los gastos asociados al manejo de residuos de la industria de la tortilla y los riesgos de incumplimiento de las normativas ambientales son altos (Rosentrater, 2006).

Desde la perspectiva de la economía circular es deseable que los desechos de la nixtamalización sean empleados para generar productos de valor agregado y con ello reducir el impacto al ambiente. Debido al alto contenido de carbohidratos y proteínas (Díaz-Montes et al., 2016), el nejayote podría ser utilizado como medio de cultivo para propagar algún microorganismo que pueda utilizarse como inoculante en la agricultura. Para ello sería idóneo que el microorganismo cumpla con dos características: 1) pueda crecer degradando los carbohidratos complejos del nejayote y 2) tener una propiedad benéfica para las plantas.

Las bacterias autóctonas del maíz podrían ser candidatas que pudieran cumplir con las dos funciones requeridas. En este trabajo se aislaron 37 cepas a partir de bagazo de maíz (hojas y tallos triturados), cuyas capacidades para utilizar dicho residuo como única fuente de carbono y nitrógeno fueron ensayadas. Además, se ensayó la capacidad de los microorganismos aislados para liberar azúcares reductores; producto del metabolismo celulolítico. Ulterior a su crecimiento en nejayote, se evaluaron las capacidades promotoras del crecimiento vegetal de los aislados, *Bacillus* sp. (ODC2) y *Pseudomonas* sp. (ODC3).

3. ANTECEDENTES

3.1. El maíz en México

En México el maíz (*Zea mays*) es uno de los cultivos más importantes y es el cereal más consumido desde tiempos antiguos (Díaz Montes et al., 2017) . En el año 2022 se produjeron 23,168,504 toneladas de maíz en México (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2023). Solamente en Puebla se sembraron 22,584 hectáreas y se cosecharon 47,906 toneladas de maíz en el periodo otoño – invierno del 2020 según se reporta en el Avance de Siembras y Cosechas del SIAP y para el 2024 se espera que se siembren 23,006.58 hectáreas y una producción de 51,679 toneladas de maíz según el registro de la Intención de Siembra y de Cosecha del SIAP.

3.2. El problema del Nejayote

El nejayote, es el agua del proceso de la nixtamalización, que proviene del náhuatl “*nextli*” (cal de ceniza) y “*tamalli*” (masa cocida de maíz), la cual consiste en un proceso térmico y alcalino autóctono mexicano que mejora tanto la textura del grano como su biodisponibilidad, pues remueve el pericarpio. Este cocimiento se realiza con una solución de agua e hidróxido de calcio del 1 al 3%, en relación 1:3 de maíz y agua, durante 40 minutos a 90 °C, resultando así dos productos, el nixtamal y el nejayote (Díaz Montes et al., 2017).

El subproducto nejayote presenta un problema en cuanto al manejo de residuos por su alta carga contaminante. Esto debido a su composición, pues según lo reportado (Castro-Muñoz & Yáñez-Fernández, 2015a) tiene un pH en un rango de 12 a 14, 0.767% de cenizas, 0.862% de carbohidratos, de 200 a 300 ppm de nitrógeno libre, $1,526.21 \frac{mg}{L}$ de calcio, 1.53 °Brix de sólidos solubles totales, conductividad eléctrica de $4510.12 \frac{\mu S}{cm}$, turbidez de 963.3 NTU y una demanda química de oxígeno de $40,058.12 \frac{mgO_2}{L}$ (Castro-Muñoz & Yáñez-Fernández, 2015). La demanda biológica de oxígeno es un parámetro que nos indica el nivel de contaminación de un cuerpo

de agua(Boyd, 2015) (Chapman, 2021) , este parámetro muestra cómo la actividad microbiana consume el oxígeno disuelto en el agua, lo cual puede provocar condiciones anóxicas que afectan a los ecosistemas acuáticos (Chapman, 2021). A su vez, un valor elevado de demanda química de oxígeno nos indica la presencia compuestos químicos, ya sea orgánicos o inorgánicos que consumen oxígeno durante su descomposición química (Chapman, 2021). Esto significa que el nejayote es altamente contaminante porque cuando se vierte sin tratar a un cuerpo de agua contribuye a la disminución del oxígeno presente en el cuerpo de agua debido a su alta concentración de materia orgánica (Castro-Muñoz & Yáñez-Fernández, 2015) .Así mismo su composición rica en carbohidratos, proteínas, fibra y minerales, estimula la eutrofización disminuyendo aún más el oxígeno disponible alterando el ecosistema del cuerpo de agua donde se es vertido (Smith et al., 1999), aunado a esto el pH alcalino que aporta el nejayote puede ser tóxico para algunos organismos acuáticos dado que el rango de óptimo de pH para la mayor parte de organismos acuáticos se encuentra entre 6.5 y 8.5 (Boyd, 2015).

Para el año 2012 se estimaba que la producción de nejayote en México era de 14.4 millones de m³ al año (Rojas-García et al., 2012), aunque otros autores mencionan que podrían estar entre los 16 y 22 millones de m³ al año (Ali Asaff, 2012). Estos efluentes se disponen en cuerpos de agua, en suelo o son llevados a plantas de tratamiento. Sin embargo, por su composición y por su alta demanda química de oxígeno los tratamiento actuales no son suficientes para reducir el grado de contaminación que produce (Salmerón-Alcocer et al., 2003).

El tipo de efluentes a los que pertenece el Nejayote son regulados principalmente por la SEMARNAT, la Comisión Nacional del agua y la iniciativa privada (NORMAS ISO). Como ejemplo, Grupo GRUMA que es la dueña de la marca de harina de maíz nixtamalizado “MASECA” reporta que con el fin de reducir su impacto ambiental y certificar su producción con la norma ISO 14001 ha planteado dos maneras de reducir el impacto ambiental de sus efluentes con respecto al nejayote, con tratamiento de aguas basado en ciclos de hidrocriba, centrifugación, hidrólisis, anaeróbica, aeróbica y clarificación, para posteriormente formar lagunas facultativas

con terreno agrícola que se riegan con esta agua tratada (Gruma, 2023). También reportan un proceso denominado “compacto” que consiste en utilizar reactores de fermentación anaeróbica y aeróbica, clarificadores y separadores centrífugos para posteriormente descargar el agua tratada a drenajes de la ciudad. Con esto mencionan que se hace más eficiente el uso del agua utilizada hasta alcanzar un consumo de $1.5 \frac{m^3}{t}$ de maíz. Para el año 2023 reportan una extracción de 7,879,583 m³ de agua y una descarga de 4,311,865 m³ de agua. De este total de descargas 2,826,131 m³ se utilizan en aguas de riego, 160,787 m³ se vierten en ríos y mares y 1,324,947 m³ se descargan en el suministro municipal (Gruma, 2023).

3.3. Residuos postcosecha del maíz y su aprovechamiento para fertilizar el suelo

La producción de maíz representa un reto en cuanto al manejo de los residuos postcosecha, pues hasta el 50% de la biomasa aérea de la planta es residuo no destinados al consumo humano, por lo que el agricultor debe decidir qué hacer con este restante de la planta del maíz, que puede ser utilizado para alimento de ganado o para desecho (Muñoz-Tlahuiz et al., 2013). La quema agrícola se percibe como un método rápido para enriquecer el suelo, eliminar malas hierbas y controlar plagas. Lamentablemente esto resulta en la pérdida del nitrógeno y las propiedades productivas del suelo, reduciendo el rendimiento en cada cosecha y propiciando la erosión del suelo (Galán Loro Alfredo José et al., 2021).

Los residuos postcosecha del maíz necesitan de ciertas condiciones (temperatura, humedad actividad microbiana) para que puedan degradarse y reincorporarse al suelo. La temperatura, humedad, pH, aireación y la disponibilidad de nutrientes son los principales factores que determinaran esta incorporación, de estos factores, los que contribuyen a una mejor tasa de descomposición son aquellos que favorecen el crecimiento bacteriano (Pablo F. Richmond & Sergio N. Rillo, 2009).

3.4. Microorganismos degradadores de celulosa y hemicelulosa

Los microorganismos degradadores de celulosa y hemicelulosa son un grupo diverso de bacterias, hongos y arqueas que desempeñan una función fundamental

en el ciclo del carbono (Cappuccino James & Sherman Natalie, 2008) (Lynd et al., 2002). Estos organismos tienen la capacidad única de descomponer la celulosa y la hemicelulosa, los principales componentes de la pared celular vegetal (Lynd et al., 2002). Esta descomposición libera azúcares que sirven como fuente de energía y carbono para el crecimiento de los microorganismos (Sánchez-Santillán & Cobos-Peralta, 2016).

Las bacterias celulolíticas más comunes son *Ruminococcus albus*, *Bacteroides succinogenes*, *Clostridium* sp. y *Actinomyces* sp. Estas se encuentran principalmente en el rumen de animales herbívoros (Nicolás Torres-Salado et al., 2022) (Londoño-Zapata et al., 2012).

Las enzimas encargadas de esta descomposición son las celulasas (β -1,4-endoglucanasas, β -1,4-exoglucanasas y β -glucosidasas) endoglucanasas, que rompen las cadenas de celulosa y hemicelulosa en fragmentos más pequeños; las exocelulasas, que liberan azúcares de los extremos de las cadenas de celulosa y hemicelulosa; las β -glucosidasas que hidrolizan los enlaces glicosídicos entre los azúcares (Florez et al., 2016) (Díaz Romero, 2023) (Yolanda Garza-García et al., 2011).

Los microorganismos degradadores de celulosa y hemicelulosa, como son bacterias, hongos y protozoarios, son cruciales en el ciclo del carbono, ya que descomponen la materia vegetal muerta, liberando azúcares que otros organismos pueden utilizar (Lynd et al., 2002). Estas bioconversiones pueden emplearse para la producción de biocombustibles, bioplásticos, textiles, para tratamiento de aguas residuales, en biodigestores y para producción de energía (Florez et al., 2016).

El nejayote contiene gran proporción del pericarpio del maíz, que puede ser utilizado para obtención de ácido ferúlico y otros metabolitos de interés biotecnológico como la producción de biocombustibles, en la industria papelera o para la síntesis de ésteres derivados (Sanchez-Gonzalez et al., 2011).

3.5. Cultivo de microorganismos en medios de cultivo a base de nejayote

Los avances en biotecnología han permitido desarrollar diferentes usos y aplicaciones para los residuos como una manera de disminuir el impacto ambiental y al mismo tiempo generar productos de interés como metabolitos o producción de microorganismos, tal es el caso para el uso de residuos como el suero de leche, melazas, bagazo o nejayote como base para el desarrollo de medios de cultivo (Vargas Corredor & Pérez Pérez, 2018).

El nejayote es un residuo rico en nutrientes, se compone de 7.42% de proteína cruda, 1.48% de grasa cruda, 19.3% de fibra cruda, también tiene $\frac{\text{mg de ácido gálico}}{\text{L}}$ de polifenoles (moléculas de potencial antioxidante), por lo que se ha convertido en una alternativa prometedora para enriquecimiento de medios de cultivo para microorganismos o la recuperación de componentes de valor agregado (Díaz-Montes et al., 2016).

Entonces, es posible emplear nejayote para desarrollar medios de cultivo adecuados para el crecimiento de microorganismos de interés, por ejemplo: se han desarrollado cultivos de *Arthrospira maxima* y *Chlorella vulgaris* que son útiles para producción de enzimas, bioetanol y biomasa proteica (López-Pacheco et al., 2019). También se han desarrollado medios para cultivo de *Lactobacillus* sp. para producción de ácido láctico y para su uso como probióticos y también se han desarrollado medios a base de nejayote para cultivo de hongos como *Aspergillus niger* para la producción de enzimas y compuestos bioactivos. En estos casos el nejayote se ha utilizado como una manera de reducir costos en la producción de estos metabolitos de interés (G. Ramirez-Romero et al., 2013) (López-Pacheco et al., 2019) (Eileen Vittoria Canchola Carrillo, 2019).

Sin embargo, para cada uno de estos cultivos se modificó el nejayote para hacerlo un medio más adecuado según las necesidades del microorganismo, para *Arthrospira máxima* y *Chlorella vulgaris* se utilizó una mezcla de 25% nejayote, 50% agua inoculada con los microorganismos y 25% de aguas residuales porcinas (López-Pacheco et al., 2019). Para *Lactobacillus* sp. se filtró el nejayote con gasa, se

centrifugó a 10,000 rpm, se tomó el sobrenadante y se ajustó el pH a 5 con ácido clorhídrico antes de utilizarlo como medio para crecimiento (G. Ramirez-Romero et al., 2013). Para *Aspergillus niger* se formuló el medio de cultivo a 75% nejayote, 1% salvado de trigo y 25% medio mínimo a pH 5 ajustado con ácido sulfúrico para conseguir el medio de cultivo adecuado (G. Ramirez-Romero et al., 2013) (López-Pacheco et al., 2019) (Eileen Vittoria Canchola Carrillo, 2019). En ningún caso se ha reportado que algún microorganismo pueda crecer en el nejayote sin diluir.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar microorganismos del bagazo de maíz que sean capaces usar el bagazo del maíz y el nejayote para su crecimiento, y a su vez tengan la capacidad para promover el crecimiento de plantas.

Objetivos específicos

- Aislar microorganismos a partir del bagazo de maíz.
- Seleccionar los aislados capaces de degradar celulosa y hemicelulosa.
- Evaluar el crecimiento de los aislados en un medio líquido a base de nejayote.
- Evaluar diferentes condiciones de temperatura y pH que maximicen el crecimiento de los microorganismos en nejayote.
- Identificar el género de los microorganismos aislados.
- Evaluar la capacidad de los microorganismos para promover el crecimiento vegetal.

5. HIPÓTESIS

Los microorganismos aislados del bagazo de maíz serán capaces de crecer y/o degradar el bagazo de maíz y el nejayote, además, tendrán la capacidad de promover el crecimiento de las plantas.

6. JUSTIFICACIÓN

La incorporación de residuos agroindustriales a la cadena de producción de alimentos puede contribuir a la sustentabilidad de estos. Al aprovechar los residuos

postcosecha del maíz y el nejayote (residuo de la producción de nixtamal) es posible desarrollar una economía circular alrededor del consumo de este cereal que es de gran importancia en México.

7. METODOLOGÍA

7.1. Aislamiento de microorganismos a partir de bagazo de maíz

Se preparó un medio de selección agar-bagazo de maíz para microorganismos degradadores de celulosa/hemicelulosa de maíz de la siguiente manera: 1 g de hojas de plantas de maíz secas obtenidas de los residuos postcosecha de una parcela del municipio de San Juan Atenco, Puebla fueron trituradas en licuadora con 100 ml de agua destilada. Posteriormente se filtró para eliminar los sólidos. Al líquido filtrado se le adicionó agar a una concentración de 15 g/L. Una vez disuelto el agar el medio se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min. Una vez estéril el medio se vertió en placas de Petri (véase anexo 1).

Para aislar los microorganismos, 1 g de bagazo de maíz previamente lavado con agua, se trituró en licuadora con 100 ml de agua destilada estéril, a partir de la suspensión se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-2} y se platearon 100 μ l de cada dilución en el medio de selección (agar-bagazo de maíz) anteriormente descrito.

Las placas de Petri se incubaron a 30 °C por 72 h y después de ello, crecieron en las placas una gran diversidad de microorganismos.

Para aislar cada microorganismo se prepararon cajas de Petri con agar-bagazo de maíz, y se separaron las diferentes colonias mediante estría cruzada, sembrando en el medio de selección (agar-bagazo de maíz). Al final se obtuvieron 23 aislados con morfologías diferentes.

Posterior a ello, se realizaron dos siembras por cada morfología, una en medio LB (véase anexo 2) y otra en medio PDA (véase anexo 3) adicionado con cloranfenicol a una concentración de $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ para limitar el crecimiento microbiano. Esto con el fin de poder distinguir las morfologías que en el medio de selección pudieran parecer iguales.

Se realizó una tinción con azul de metileno siguiendo la metodología de Cappuccino J., Sherman N. (2008) con el fin de caracterizar de mejor manera las estructuras y morfologías de cada microorganismo.

Los aislados se agruparon por su similitud en forma de colonia, color, textura, morfología al microscopio y tiempo de crecimiento.

7.2. Ensayo de degradación de carbohidratos complejos

Se preparó un ensayo de fermentación en fase sólida en matraz para evaluar la capacidad de los aislados de descomponer el bagazo de maíz. Para cada aislado se utilizó un matraz de 250 ml, en el cual se adicionó 1 g de bagazo y 2 ml de agua destilada estéril. Cada matraz fue esterilizado en autoclave por 15 min a 121 °C. Una vez estéril y frío, el matraz se inoculó con 1 ml de cultivo de cada aislado crecido por 12 horas a 30 °C en LB líquido. Una vez inoculado, se agregaron 5 ml de agua destilada estéril al matraz, se homogenizó y se incubó a 27 °C por 96 horas. Como control negativo se disponía de igual manera de un matraz de 250 ml, con 1 g de bagazo humedecido con 2 ml de agua destilada, que se esterilizó en autoclave por 15 min a 121 °C, pero este matraz no se inoculó, si no que se adicionó 6 ml de agua estéril y se pasó directamente a la incubadora a 27 °C por 96 horas.

Para el monitoreo del crecimiento microbiano en cada matraz se realizaron dos procedimientos. Primero se cuantificó a las UFC presentes en el inóculo mediante la siembra de las diluciones seriadas en placas de LB-agar (cita). Sabiendo que el inóculo era de 1 ml, se podía estimar la carga microbiana inicial en cada matraz. Pasadas las 96 horas de crecimiento se tomaron 2 muestras de bagazo fermentado contenido en cada matraz con ayuda de unas pinzas estériles, cada muestra de 2 g aproximadamente se recolectó en un tubo Falcon estéril de 50 ml. Uno de los tubos se utilizó para determinar la carga microbiana y azúcares libres presentes en la muestra y el otro tubo para determinar el peso seco.

7.2.1. Determinación de la carga microbiana y azúcares libres al final de la fermentación de 96 h.

Para determinar las UFC presentes al final de las 96 h de fermentación sólida, a cada muestra de 2 g de bagazo húmedo contenidas en cada tubo Falcon de 50 ml se le adicionaron 5 ml de agua destilada estéril y se homogenizaron con vortex por 30 segundos. Del sobrenadante se tomó 1 ml para la determinación de UFC por medio de diluciones seriadas hasta 10^{-7} , que se sembraron en medio LB-agar. A partir de esta siembra se contaron las colonias formadas en cada dilución y se calculó la cantidad de UFC por mililitro de la suspensión de la muestra y a partir de ello, considerando los gramos de bagazo presente a cada matraz, se estimó el crecimiento en UFC/g de bagazo en peso seco.

Para la determinación de la cantidad de azúcares libres presentes en la muestra se utilizó el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico o DNS (Miller, 1959). Este método nos ayuda a determinar la cantidad de azúcares reductores presentes en una muestra utilizando el ácido 3,5 dinitrosalicílico, el cual reacciona en presencia de calor con azúcares reductores oxidando la muestra, la cual adquiere una coloración de amarillo a ámbar en función de la cantidad de azúcares oxidados. Con base en esto es posible calcular la cantidad de azúcares reductores con ayuda de un espectrofotómetro y una curva patrón.

Para este análisis colorimétrico se realizó una curva patrón, en la cual fue posible relacionar el valor de absorbancia con la concentración de azúcares reductores en la muestra. Se preparó la solución patrón de glucosa con 6 concentraciones: $0 \frac{g}{l}$, $0.3 \frac{g}{l}$, $0.9 \frac{g}{l}$, $1.5 \frac{g}{l}$, $2.1 \frac{g}{l}$, $2.7 \frac{g}{l}$ y $3 \frac{g}{l}$. Se añadió un volumen de 250 μ l de cada solución de la curva patrón o muestra problema y se mezclaron con 250 μ l de reactivo DNS (Miller, 1959b) en microtubos los cuales se colocaron en baño María a 92 °C por cinco minutos, después de ello las muestras se colocaron por 5 min en un baño de agua fría para detener la reacción. Una vez terminado este tiempo se agregó un volumen de 2.5 ml de agua destilada a cada tubo, se homogenizaron y

se realizaron las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro ajustando a una longitud de onda de 540 nm.

Para la construcción de la curva patrón, se graficaron los datos de absorbancia en el eje de las ordenadas y la concentración de la muestra en el eje de las abscisas, después de hacer una regresión lineal mediante el programa Excel, se obtuvo una ecuación de una recta, $y = mx + b$. Ecuación que se utilizó para determinar la concentración de azúcares reductores en cada muestra a partir de la absorbancia medida en cada muestra. Después de este ensayo se seleccionaron 7 aislados que presentaron mayor crecimiento y/o liberación de azúcares reductores.

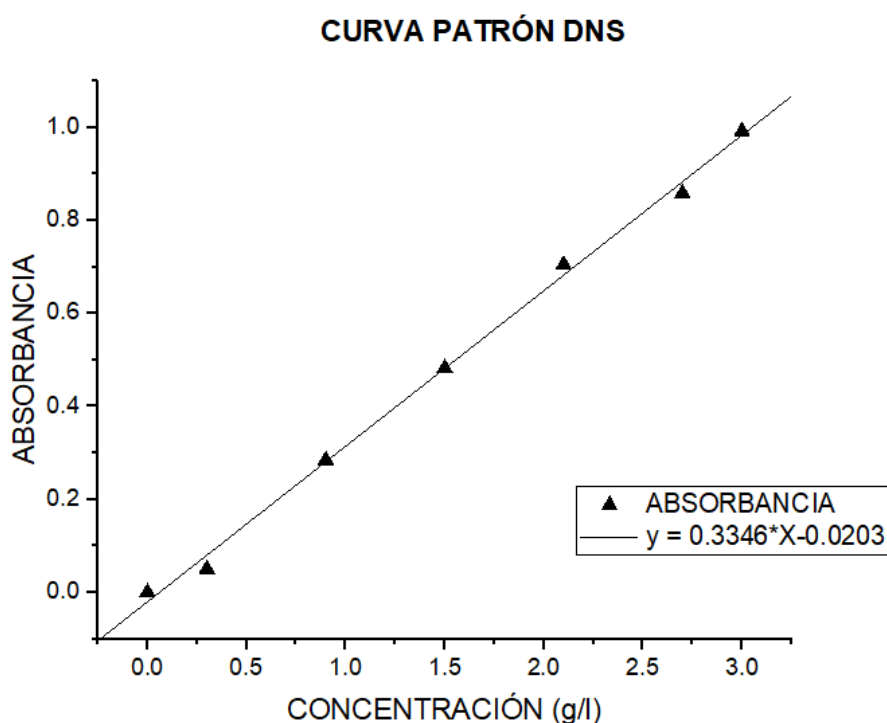


Figura 1. Curva patrón para ensayo de azúcares reductores mediante DNS

7.3. Análisis ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) del gen ADNr 16S para descartar aislados repetidos

Dado que el interés era en las bacterias, se planteó un análisis del ADN ribosomal 16S a través de un ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) que es una técnica de diferenciación de productos de PCR con base en una digestión con enzimas de restricción. El perfil electroforético de la digestión puede ser utilizado

para diferenciar posibles aislados repetidos. La técnica se basa en la digestión del gen ribosomal 16S (Becerra et al., 2012).

Se preparó un cultivo líquido de 10 ml en medio LB en un tubo falcón de 50 ml para la extracción de ADN de cada muestra. Esta extracción se realizó con un el kit de Extracción ZymoResearch (no. De catálogo D6005) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% para evaluar la calidad de ADN genómico extraído. Una vez recuperado el ADN se almacenó en ultracongelación a -70 °C.

La amplificación del gen ADNr16S se hizo mediante PCR (Polimerase chain reaction) en un termociclador BioRad T100 (véase anexo 4).

Se determinó la presencia del amplicón al terminar la PCR observándola con ayuda de una electroforesis. La electroforesis es una técnica que consiste en separar partículas según su carga eléctrica, los fragmentos de ADN cuando son sometidas a un campo eléctrico se desplazan hacia un ánodo debido a su carga negativa. Ésta utiliza una matriz porosa, que puede ser la agarosa generalmente entre 0.7 y 1.5%, en una solución buffer, el utilizar ADN genómico es mejor utilizar un gel al 0.7%. A la muestra se le agrega un colorante para teñir la muestra y poder observar bajo condiciones especiales los fragmentos y su desplazamiento por la matriz de agarosa, utilizando como referencia un marcador de peso molecular, el cual forma un patrón conocido en peso y distancia de corrimiento.

Para la electroforesis se preparó un gel de agarosa al 1% con 8 carriles o pozos donde 2 pocillos se utilizaron para el marcador de peso molecular y al resto se le agregó una mezcla de 10 µl de producto de PCR y 1 µl de buffer de carga. Se colocó el gel en una cámara de electroforesis y se corrió a 90 V por 45 minutos. Finalizado este tiempo se observaron bandas de aproximadamente 1500 pb que coinciden con el tamaño esperado según el diseño del oligonucleótido y con lo reportado por Del et al., 2004.

Los Oligonucleótidos utilizados son del tipo universal para el gen ARNr 16S y tienen la siguiente secuencia:

TXBA1: 5' AGAGTTTGATCATGGCTCA 3'

TXBA 101: 5' AGGAGGTGATCCAACCGCA 3'

(Márquez et al., 2014)

Con ayuda de la herramienta de Análisis de secuenciación del programa bioinformático "Geneious" se identificó qué enzima de restricción sería la óptima según la naturaleza de los fragmentos y de las bacterias a evaluar. Las enzimas de restricción se utilizan para generar patrones de bandas de ADN característicos que permiten comparar diferentes muestras de ADN. Cada enzima de restricción está diseñada para reconocer una secuencia específica de pares de bases de ADN. Esta secuencia suele ser corta (4-8 pares de bases) y es un palíndromo.

Como el crecimiento en las placas exhibió una morfología presumiblemente similar al crecimiento de *Bacillus* sp., se tomaron en cuenta enzimas que nos ayudarían a diferenciar especies como *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* entre sí. Con ayuda del programa bioinformático se determinó que la enzima de restricción PstI era la enzima disponible que más nos favorecía. PstI tiene una secuencia $5'CTGCAG^3'$ y para *Bacillus cereus* no presenta un sitio de anclaje, en *Bacillus subtilis* presenta 2 sitios de anclaje en el fragmento 868 y 650 pb y en *Bacillus amyloliquefaciens* presenta un sitio de anclaje entre 837 y 650 pb.

Siendo así que PstI es capaz de diferenciar entre estos 3 microorganismos y era una enzima disponible, se decidió que el ARDRA se basaría en el resultado de esta, por lo que se procedió a la digestión siguiendo las indicaciones del proveedor Jena Bioscience (Número de catalogo: EN-127S).

Con los resultados del análisis ARDRA del gen ADNr 16S, se seleccionaron 3 aislados finales para secuenciar el gen ribosomal 16S.

Para identificar estos 3 aislados finales se realizó otra amplificación del gen ADNr 16S con la metodología de PCR (véase anexo 4), pero esta vez se realizó con el fin de obtener la secuencia del fragmento de 1500 bp para identificar el género de cada aislado. Para esto, el producto de PCR se purificó con ayuda del Kit de purificación ZymoResearch (no. De catálogo D4013) siguiendo las indicaciones del fabricante.

7.4. Secuenciación del gen ADNr 16S

Para la identificación del género de los tres aislados finalistas, se realizó la secuenciación del producto de PCR del gen ADNr 16S.

Para esto se solicitó el servicio a un laboratorio externo, el laboratorio de Servicios Genómicos Langebio-Cinvestav cuyas instalaciones se encuentran en Irapuato, Guanajuato, México.

Estas muestras fueron enviadas según los requerimientos del laboratorio, los cuales se verificaron con ayuda de un nanofotómetro IMPLEN que son de una relación O.D. 260/280nm en un rango de 1.7-2.0 y la relación Abs 260/230 en un valor de 2.0. Una vez aseguradas estas características, las muestras fueron enviadas.

Se evaluó la pureza y concentración del producto de PCR purificado con ayuda de un nano fotómetro IMPLEN y se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 1. Característica de las muestras del fragmento ADNr 16s de cada cepa.

Muestra	Concentración ($\frac{ng}{\mu l}$)	Relación absorbancia 260/280	Relación absorbancia. 260/230
ODC1	9.98	1.818	2.000
ODC2	66.4	1.822	2.046
ODC3	37.9	1.810	2.054

Sólo se analizaron las secuencias de las cepas ODC 2 y ODC 3, porque la ODC 1 no cumplió con las características de calidad requeridas y no creció bien en medio nejayote.

El laboratorio devolvió los resultados en archivos para visualización en FASTA y el electroferograma (véase anexo 5). Obteniendo así la secuencia base por base del sentido “forward” y “reverse” de cada uno de los genes secuenciados.

Con ayuda del programa SnapGene se hizo una alineación de las secuencias “Forward” y “Reverse”. Una vez teniendo la secuencia se utilizó el sistema de alineación de nucleótidos BLAST que ofrece el National Institute of Health (NIH).

7.5. Evaluación del crecimiento de los aislados en medio a base de nejayote y LB líquido.

Para evidenciar si los 3 aislados seleccionados eran capaces de crecer utilizando como medio de cultivo el nejayote se preparó un ensayo de crecimiento en matraces.

Se utilizó nejayote donado el día 20 de agosto del año 2023 por la tortillería “Puebla” ubicado en Calle 7 poniente # 211, Colonia Centro, Oriental, Puebla.

El pH del nejayote fue de 11.74 por lo que se ajustó con ácido fosfórico al 16% hasta alcanzar un pH de 7.01. En un matraz de 250 ml se vertieron 50 ml de este nejayote para su esterilización en autoclave por calor húmedo. Así mismo se preparó para cada aislado un matraz con 50 ml de medio líquido LB como control positivo. Se incubaron los matraces a 30 °C por 3 días con agitación de 100 rpm.

Para evaluar el crecimiento de cada aislado tanto en nejayote como en medio líquido LB se tomaron 4 muestras, a la hora 0, 6, 24 y 48 después de la inoculación de cada matraz. Las diluciones seriadas de estas muestras se sembraron en placas Petri con medio LB-agar, para construir la curva de crecimiento y compararlas entre sí.

7.6. Optimización de las condiciones de crecimiento en nejayote

Se realizó un diseño experimental utilizando un modelo de 3^2 factores para conocer las condiciones de cultivo que maximizaban el crecimiento de esta bacteria en un medio líquido de nejayote. Tomando como factores el pH y la temperatura.

Un diseño experimental 3^2 permite estudiar dos factores simultáneamente, cada uno con tres niveles. El número total de experimentos realizados sería 9 (es decir 3^2). Con este tipo de experimento podemos evaluar los efectos de los factores individuales y sus interacciones entre sí.

El diseño fue de la siguiente manera: Se estableció que los factores serían el pH y la temperatura, con niveles bajo, medio y alto. Para el pH, estos valores, serían de 6.5, 7 y 7.5 respectivamente y para la temperatura serían de 25, 30 y 35 °C respectivamente.

Para evaluar cada factor se preparó medio de cultivo líquido en matraces de 250 ml con 50 ml de nejayote a 100 rpm, para ajustar el pH de cada medio se utilizó una solución de ácido fosfórico al 17%. Cada matraz fue inoculado con 50 μ l de un cultivo de 18 h en LB líquido.

Cada experimento se realizó por triplicado y el monitoreo del crecimiento microbiano en cada condición se evaluó con siembra de diluciones seriadas en placas Petri con medio LB-agar, tomando muestra a las horas 0, 4, 6, 8, 12 y 24 h de cultivo.

Finalmente se recabaron los resultados de cada matraz para generar un gráfico y así obtener una curva de crecimiento microbiano.

7.7. Ensayo de promoción de crecimiento vegetal.

Para evaluar el potencial de las cepas aisladas para promover el crecimiento vegetal se realizó un ensayo con plantas de maíz y fresas.

Para esto se prepararon macetas de 30 por 20 por 10 cm con un sustrato constituido en proporción 4 volúmenes de vermiculita por cada volumen de composta.

Para el cultivo de maíz se prepararon 6 macetas y en cada una se sembraron 5 semillas de maíz, de estas seis macetas se consideró un control negativo (semillas sumergidas en agua), un control positivo que se inoculó con INOCREP (Inoculante multiespecies patentado) (Elizabeth Morales-García et al., 2020) y las cuatro macetas restantes se inocularon sumergiendo las semillas en una dilución 1:10 de cultivo de cada cepa por treinta minutos, esto para ODC1, ODC2 y ODC3 por separado y una con una mezcla de las tres cepas.

Para el cultivo de fresas, se prepararon 6 macetas y en cada maceta se sembraron 5 plántulas de fresa variedad "Minognette", de estas se consideró un control

negativo (solo agua, 1 ml por planta), un control positivo que se inoculó con 1 ml de INOCREP (Inoculante multiespecies) por planta diluido 1:10 (Elizabeth Morales-García et al., 2020) y para las tres macetas restantes se inocularon agregando 1 ml de una dilución 1:10 de cultivo por planta, esto para ODC1, ODC2 y ODC3 por separado y una mezcla de las tres cepas.

Todas las macetas se mantuvieron en condiciones ambientales de aproximadamente 5 – 24 °C, del 1 de diciembre de 2023 al 9 de enero de 2024. Con un regado de 30 ml de agua de la llave por maceta cada tercer día.

Al terminar los experimentos, se determinó el peso seco de cada planta de maíz y fresa. Para secar las plantas se utilizó un horno a 68 °C por 72 horas, posterior a lo cual se midió la masa de cada una de las 5 plántulas de cada maceta. También se tomó en cuenta la viabilidad de la semilla de maíz.

$$Viabilidad (\%) = \frac{N^{\circ} \text{ semillas que germinaron}}{N^{\circ} \text{ total de semillas}} * 100$$

De todos estos datos se realizó una prueba *t* de Student para evaluar diferencias estadísticas con un $p < 0.05$.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Aislamiento de microorganismos a partir del bagazo de maíz.

Se obtuvieron varios microorganismos capaces de crecer en el medio agar-bagazo de maíz. En los aislados se encontraban hongos y bacterias. Con la tinción de azul de metileno se pudieron observar las hifas de los hongos y otras estructuras tipo levaduriformes que sirvieron para diferenciar aislados bacterianos de los fúngicos.

La diversidad en morfologías, tamaños y tiempos de crecimiento evidenciaron que existen diversos microorganismos presentes en el bagazo de maíz. Dentro de esta diversidad se apreciaron al microscopio estructuras como cocos, bacilos, levaduras esféricas y elípticas, hifas, ascosporas, esporangios, blastoporos (ver fotos anexo 7); así como diversidad de colores desarrollados, pues se presentaron colonias blancas, rojas, verdes, amarillas y fluorescentes. Las morfologías coloniales también presentaron amplia diversidad en tamaños, yendo de puntiformes a colonias que crecieron por encima de los 15 mm en diámetro, de formas circulares, filamentosas y lobuladas; de distintas opacidades, de consistencias mucoides, suaves y duras (ver fotos en anexo 8).

El utilizar el medio de selección agar-bagazo de maíz nos ayudó a aislar microorganismos capaces de descomponer el bagazo de maíz, puesto que la única fuente de nitrógeno y carbono de este medio era el bagazo.

Para nombrar cada aislado, se utilizó un sistema de números y letras, que conforme se aisló de una misma placa se agregaban subíndices en letras griegas, alfanuméricas o con alguna característica de la cepa que la identificara. Estas características fueron apreciadas también utilizando un microscopio óptico (Véase anexo 7).

Del total de estos aislados se identificaron 18 microorganismos con morfología única y que fueron capaces de crecer en el medio de selección agar-bagazo de maíz.

8.2. Ensayo de degradación de carbohidratos complejos y crecimiento de los aislados durante 96 h de fermentación en fase sólida.

Cada aislado se incubó durante 96 h en matraces conteniendo bagazo de maíz húmedo y estéril como se describió en la metodología. Al final de dicho tiempo se tomaron muestras para cuantificar los azúcares reductores liberados y la carga microbiana alcanzada en UFC por gramo de bagazo fermentado.

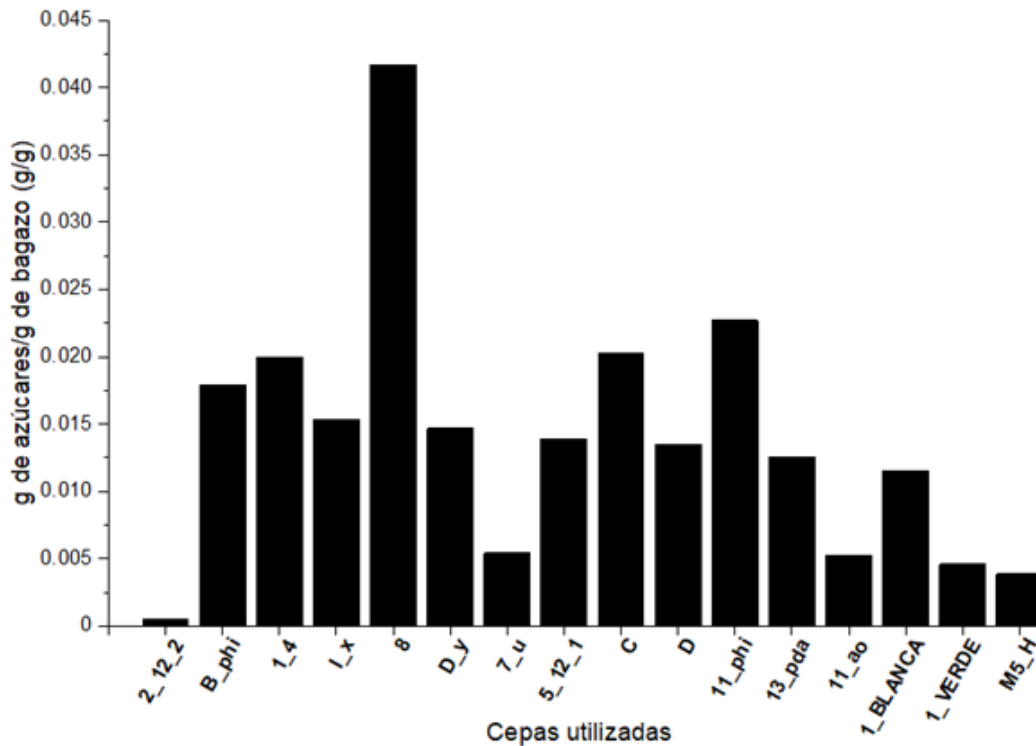


Figura 2. Cantidad de azúcares reductores liberados por gramo de bagazo fermentado

La cepa 8, 11_phi y 1_4 fueron las que más azúcares reductores liberaron por gramo de bagazo fermentado (Figura 2).

Podemos comparar estos resultados con lo reportado por Quintín Rascón-Cruz et al., (2011) quienes caracterizaron bacterias capaces de degradar celulosa y almidón, obteniendo un máximo de 6 mg/ml de azúcares reductores a partir de la hidrólisis carboximetil celulosa (CMC). Es importante mencionar que la CMC es un polímero

menos complejo y recalcitrante que el bagazo de maíz. Diana Maria Gaitan Bohorquez & Liliana Ibeth Perez Perez, (2007) en un medio líquido enriquecido al 1% con CMC a 37 °C reportan que para *Bacillus* sp. se registra una liberación de 0.26 mg/ml en 12 horas y para *Sreptomycetes* sp. de 0.29 mg/ml, así mismo reporta que para *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de humedales se obtiene una concentración de aproximadamente 0.3034 mg/ml de azúcares reductores, para cuantificar la actividad enzimática de esta cepa específica (reportada como C18A) menciona que se cultivó por 48 horas en un medio enriquecido con CMC al 1% a 35 °C. Comparado con estas últimas referencias, nuestros aislados parecen ser eficientes para la liberación de azúcares reductores alcanzando un máximo de hasta 1.090 mg/ml de azúcares a partir de 0.176 g de bagazo de maíz.

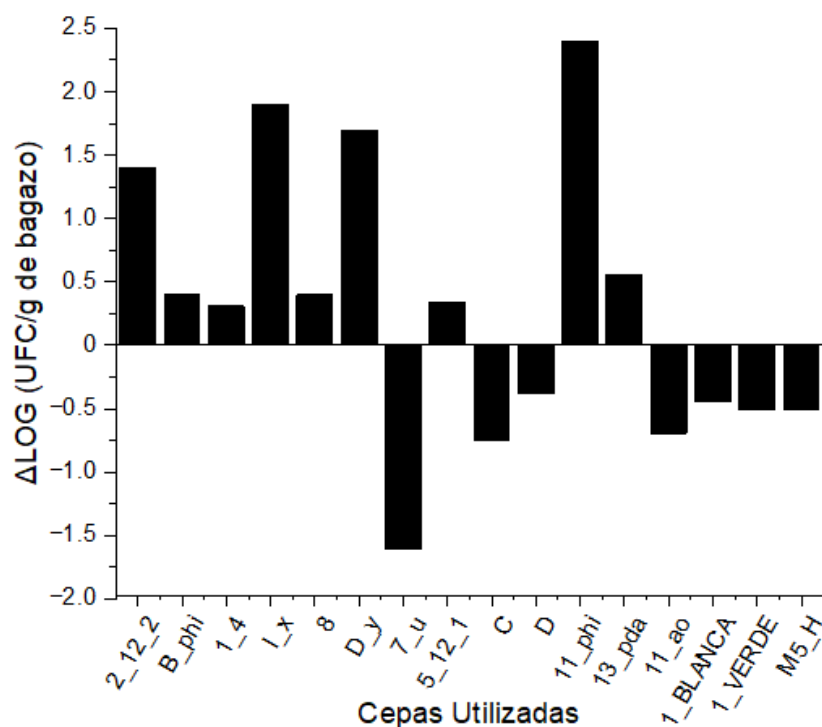


Figura 3. Incremento de la carga microbiana por gramo de bagazo tras 96 h de fermentación

Con base en estos resultados se excluyeron todas aquellas cepas de hongos (1_verde, M5_H, 1_BLANCA) o de bacterias (1_4, 7_u, C, D, 11_ao) que no lograron incrementar su población inicial, esto es que no crecieron. Las que si lograron aumentar su población inicial en al menos 1 Log (UFC/g de bagazo) fueron 2_12_2,

I_x, D_Y, y 11_phi. El aislado 2_12_2 quedó descartado por su baja liberación de azúcares. Dado que sólo se quería trabajar con bacterias, el aislado D_Y se eliminó por ser hongo. De esta manera sólo los aislados I_x. y 11_phi fueron considerados para la siguiente etapa del proyecto.

En este punto del proyecto se sospechó que los aislados 1_x y 11_f no estaban totalmente puros, por lo que se realizaron más siembras por estriado en medio LB y se obtuvieron 7 morfologías aparentemente distintas, estos 7 aislados que se recuperaron fueron renombradas del número 1 al número 7.

8.3. Análisis ARDRA del gen ADNr 16S de los 7 aislados bacterianos.

Se amplificó el gen ADNr 16S de los 7 aislados en cuestión.

El tamaño del producto de PCR esperado era de aproximadamente 1500 pb, lo cual se pudo confirmar en el gel de agarosa que se muestra en la Figura 4.

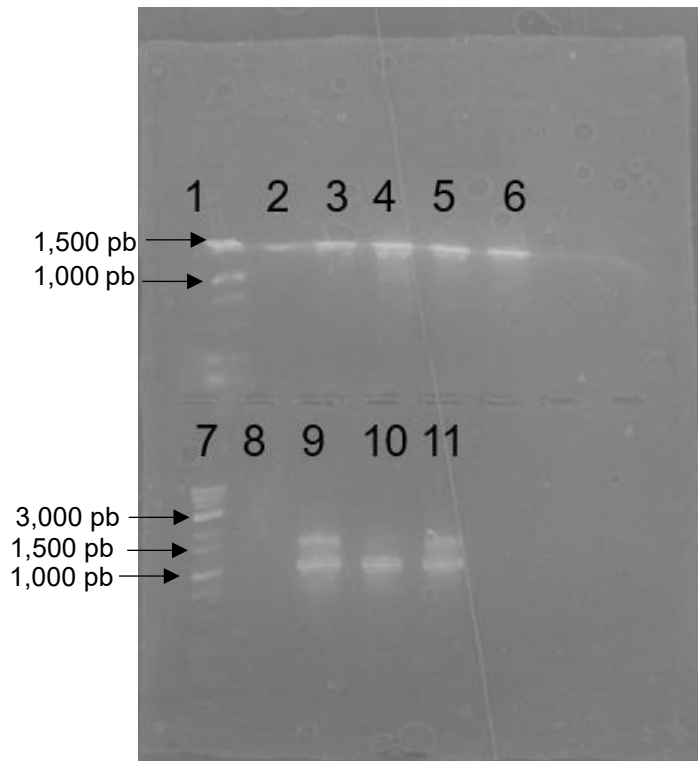


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR.

Carriles de izquierda a derecha (1) Marcador de peso molecular 100pb a 10 kpb. (2) Carril vacío, se observa una mancha debido a la fotodocumentación. (3) Producto de PCR cepa 1. (4) Producto de PCR cepa 2. (5) Producto de PCR cepa 3. (6) Producto de PCR cepa 4. (7) Marcador de peso molecular 100pb a 10 kpb. (8) Carril vacío (9) Producto de PCR cepa 5. (10) Producto de PCR cepa 6. (11) Producto de PCR cepa 7.

Nota: Se observa que el marcador de peso molecular del carril 1 y del carril 7 tuvieron una migración inusual, esto podría deberse a una sobrecarga en el pocillo o a irregularidades en la preparación del gel, que pudieron afectar la resolución esperada de las bandas. Esto no impacta la validez del análisis, ya que las muestras de interés migraron correctamente según su posición.

El producto de PCR de la cepa 5 (carril 9) y cepa 7 (carril 11) presentan una banda extra de aproximadamente 2000 pb, lo cual puede sugerir que el DNA no se encontraba lo suficientemente puro o que hubo interferencia para su amplificación por lo que dichos aislados se resembraron. Para poder realizar el análisis ARDRA, se volvió a realizar una PCR para obtener amplificados de mayor calidad, lo cual se logró y se procedió a realizar la digestión de cada producto de PCR con la enzima PstI siguiendo las indicaciones del fabricante.

Con ayuda de una electroforesis, se pudo observar los productos de la digestión del amplicón del gen ADNr 16S de cada una de las cepas y el respectivo amplicón sin digerir (Figura 5). Con base en esta electroforesis observamos que existen muestras con los mismos sitios de corte

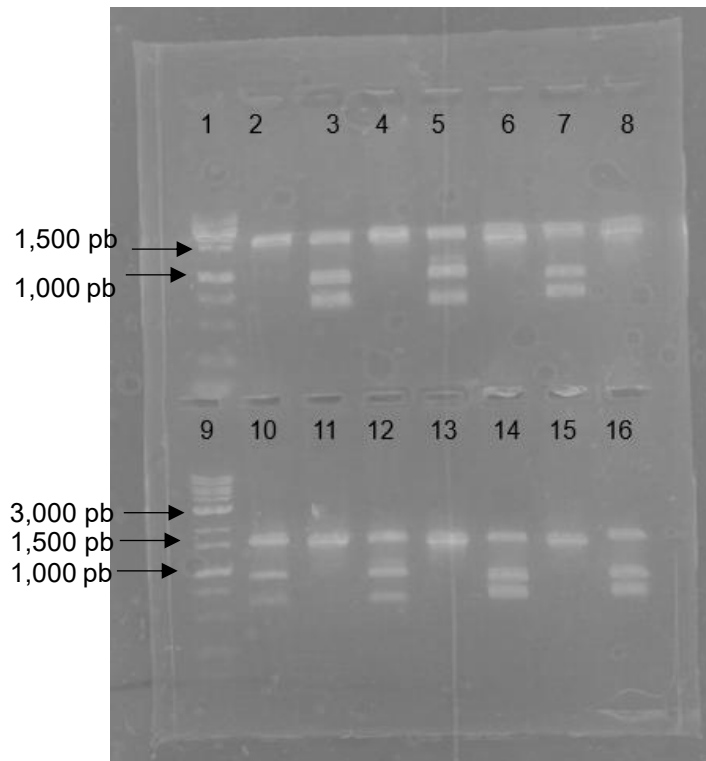


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión.

Carriles en orden de izquierda a derecha y arriba a abajo (1) Marcador de peso molecular 100pb a 10 kpb. (2) Producto PCR cepa 1. (3) Producto de digestión cepa 1. (4) Producto PCR cepa 2. (5) Producto de digestión cepa 2. (6) Producto PCR cepa 3. (7) Producto de digestión cepa 3. (8) Producto PCR cepa 4. (9) Marcador de peso molecular 100pb a 10 kpb (10) Producto de digestión cepa 4. (11) Producto PCR cepa 5. (12) Producto de digestión cepa 5. (13) Producto PCR cepa 6. (14) Producto de digestión cepa 6. (15) Producto PCR cepa 7. (16) Producto de digestión cepa 7.

Con este ARDRA podemos identificar que existen 3 distintos patrones de cortes, es decir 3 cepas diferentes. (Figura 5). Las cepas 1 (carril 3), 3 (carril 7), 6 (carril 14) y 7 (carril 16) son similares y presentan 2 fragmentos en 1000 y 750 pares de bases; las cepas 2 (carril 5) y 5 (carril 12) son similares y presentan 3 fragmentos en entre 1500 y 1000, 1000 y 750 pares de bases; finalmente la cepa 4 (carril 10) es diferente a todas las demás y presenta también 2 fragmentos, pero en 1000 y entre 750 y 500 pares de base.

Estos resultados, al ser comparados con las morfologías observadas en placas de Petri, muestran que estas variaciones en los perfiles de restricción coinciden con las diferencias que pueden apreciarse entre cada una de las morfologías (Figura 6). Por

lo que se decidió tomar las cepas 2, 3 y 4, y cambiar el nombre a ODC1 (cepa 2), ODC 2 (cepa 3) y ODC3 (cepa 4).

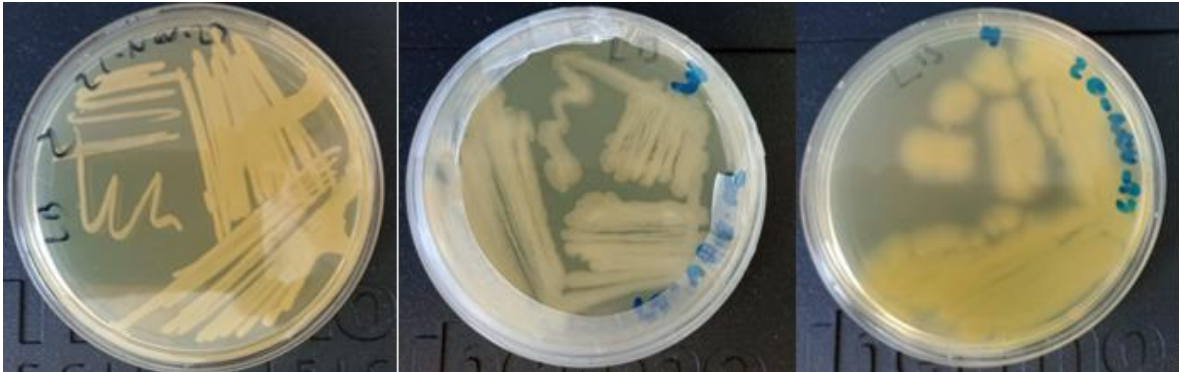


Figura 6. De izquierda a derecha: ODC1, ODC2 y ODC3.

8.4. Ensayo de crecimiento en medio a base de nejayote y LB líquido a 30° C y pH 7

Para este ensayo se evaluó el crecimiento en matraces de las cepas ODC1, ODC2 y ODC3. De los datos obtenidos de UFC/ml se realizaron 3 gráficos, uno para cada cepa, comparando el crecimiento en un medio restrictivo a base de nejayote con el crecimiento en un medio rico como LB líquido (control positivo).

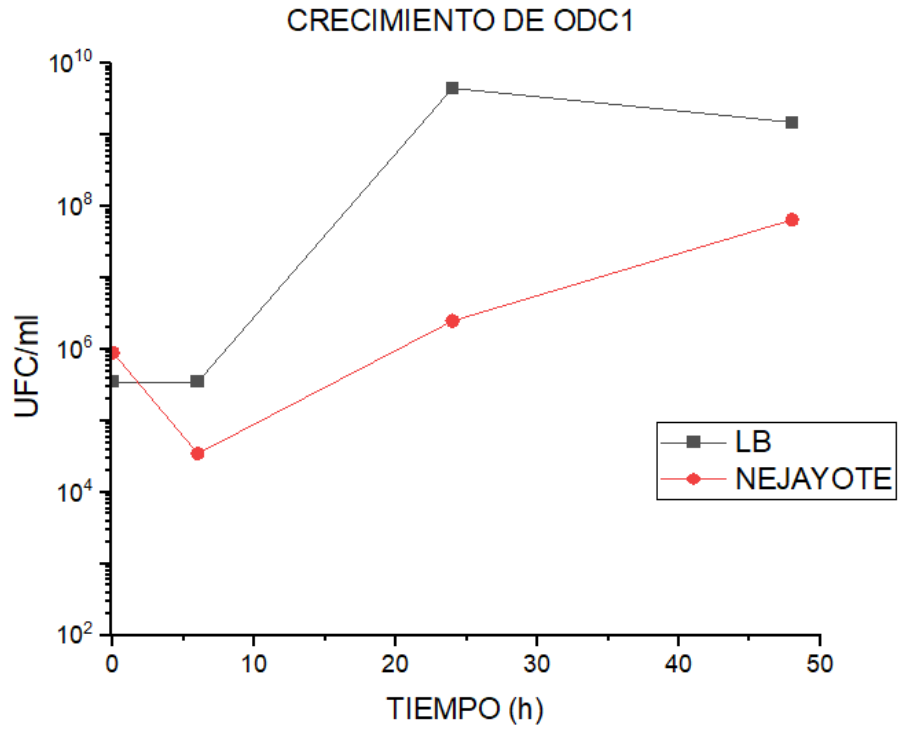


Figura 7. Crecimiento del aislado ODC1 en medio nejayote y LB a 30 °C, pH 7

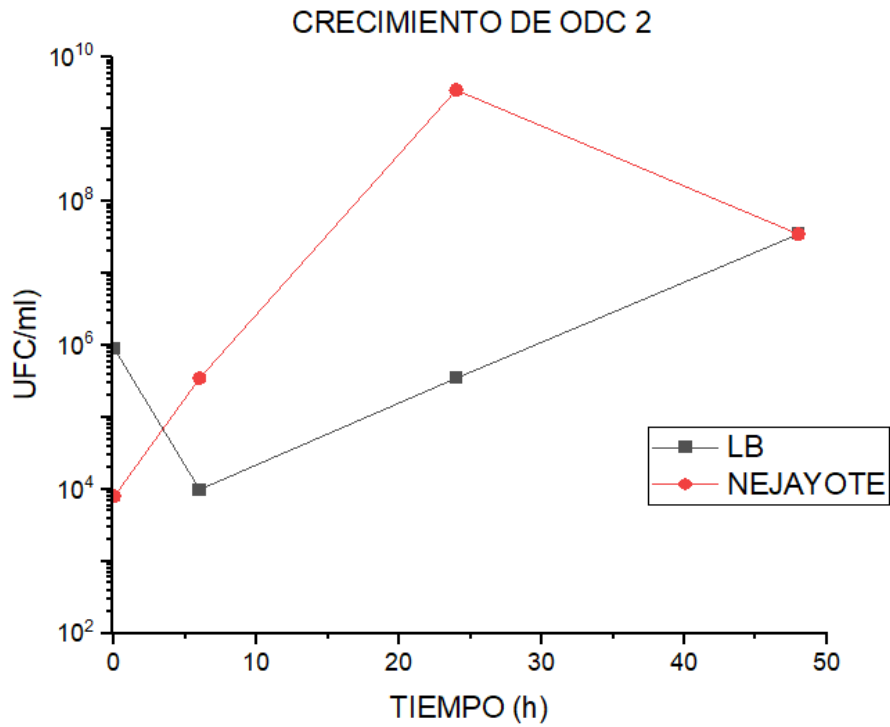


Figura 8. Crecimiento del aislado ODC2 en medio nejayote y LB a 30 °C, pH 7

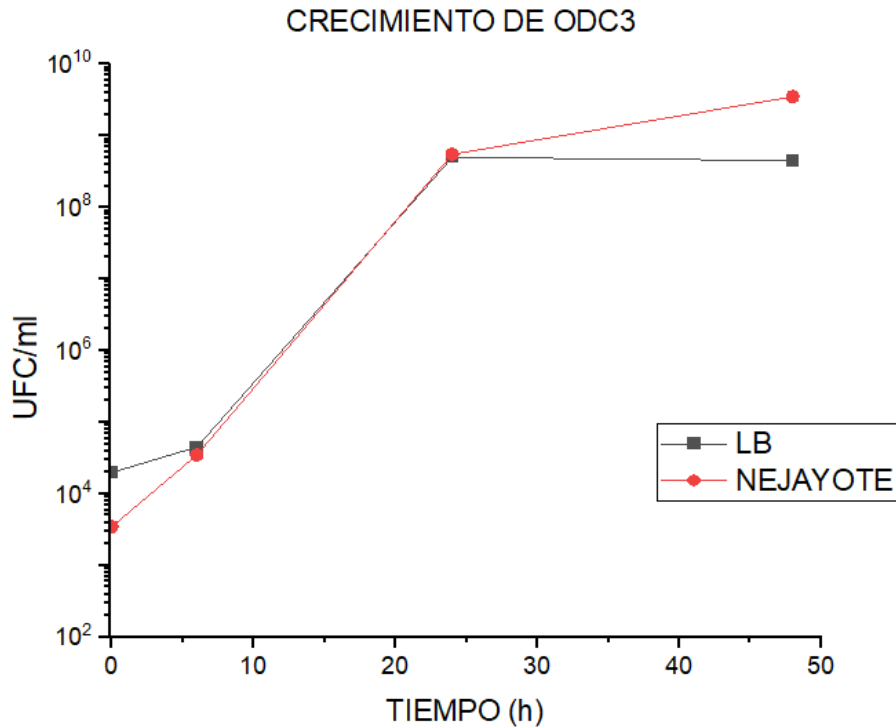


Figura 9. Crecimiento del aislado ODC3 en medio nejayote y LB a 30 °C, pH 7

De los gráficos podemos observar que para ODC1 el medio LB es más adecuado, logrando alcanzar la fase estacionaria a las 24 horas del cultivo con una densidad de 4.5×10^9 UFC/ml (Figura 7). En el medio a base de nejayote, al comienzo la concentración de bacterias disminuye, lo cual se atribuye a que el cambio en las condiciones nutricionales del medio donde se propagó el inóculo (LB) somete a las bacterias a un estrés que reduce la población, sin embargo, una vez adaptada la población comienza el crecimiento en el medio nejayote, que es más lento en comparación al crecimiento en el medio LB, pero que al final de las 48 horas de cultivo se alcanzan 6×10^7 UFC/ml y el crecimiento parece continuar en una fase exponencial (Figura 7).

Para el caso de ODC2, el crecimiento en el medio LB alcanza el fin de su fase exponencial después de 24 horas de cultivo con 3.5×10^9 UFC/ml (Figura 8). Al igual que ODC1, la población de ODC2 en un principio disminuye pero después de 6 h de adaptación la población aumenta exponencialmente hasta alcanzar 3.5×10^7 UFC/ml en 48 h de cultivo y parece continuar en fase exponencial (Figura 8).

El aislado ODC3 es el que exhibe un mejor crecimiento en el medio a base de nejayote, siendo comparable al crecimiento que hay en el medio LB durante las primeras 24 h de cultivo (Figura 9). A las 48 h de cultivo en medio nejayote se alcanzan 3.5×10^9 UFC/ml mientras que en LB solo 3.5×10^8 UFC/ml. Este cultivo (ODC3) no presenta una fase *lag* como fue el caso de ODC1 y ODC2, indicando que de los 3 es quien presenta una mejor adaptabilidad al medio a base de nejayote.

8.5. Secuenciación del gen ADNr 16S de los aislados ODC2 y ODC3.

Debido a problemas para amplificar el gen ADNr 16S del aislado ODC1, éste no se mandó a secuenciar. El laboratorio de Servicios Genómicos Langebio-Cinvestav realizó la secuenciación del gen ADNr 16S de los aislados ODC2 y ODC3, tanto en sentido “forward” como “reverse”, y envió los resultados de cada secuencia en formato FASTA y su electroferograma (véase anexo 5).

Conociendo la secuencia en sentido “forward” el reverso complementario es posible formar una cadena, cuyo alineamiento en el programa BLAST de nucleótidos nos permitió identificar las cepas ODC 2 y ODC 3, las cuales resultaron ser las bacterias del género *Bacillus* sp. (para el caso de ODC 2) con un “Query cover” de 99% y un “E-value” de 0 y el aislado ODC 3 resultó ser *Pseudomonas* sp. con un “Query cover” de 99% y un “E-value” de 0. Además, se realizó un árbol filogenético para cada secuencia con el software. MEGA11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). (véase anexo 6)

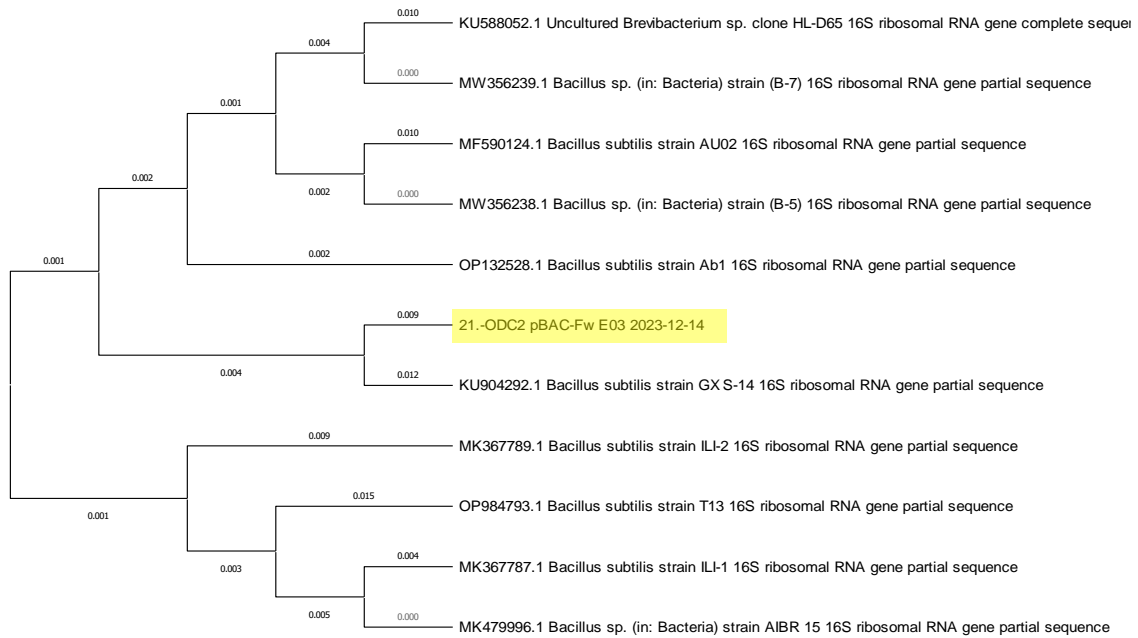


Figura 10. Árbol filogenético del Método de unión de vecinos (*Neighbor joining tree*) del aislado ODC2 (resaltado en amarillo). Se utilizaron 11 secuencias del gen DNAr 16S rRNA de *Bacillus* spp.

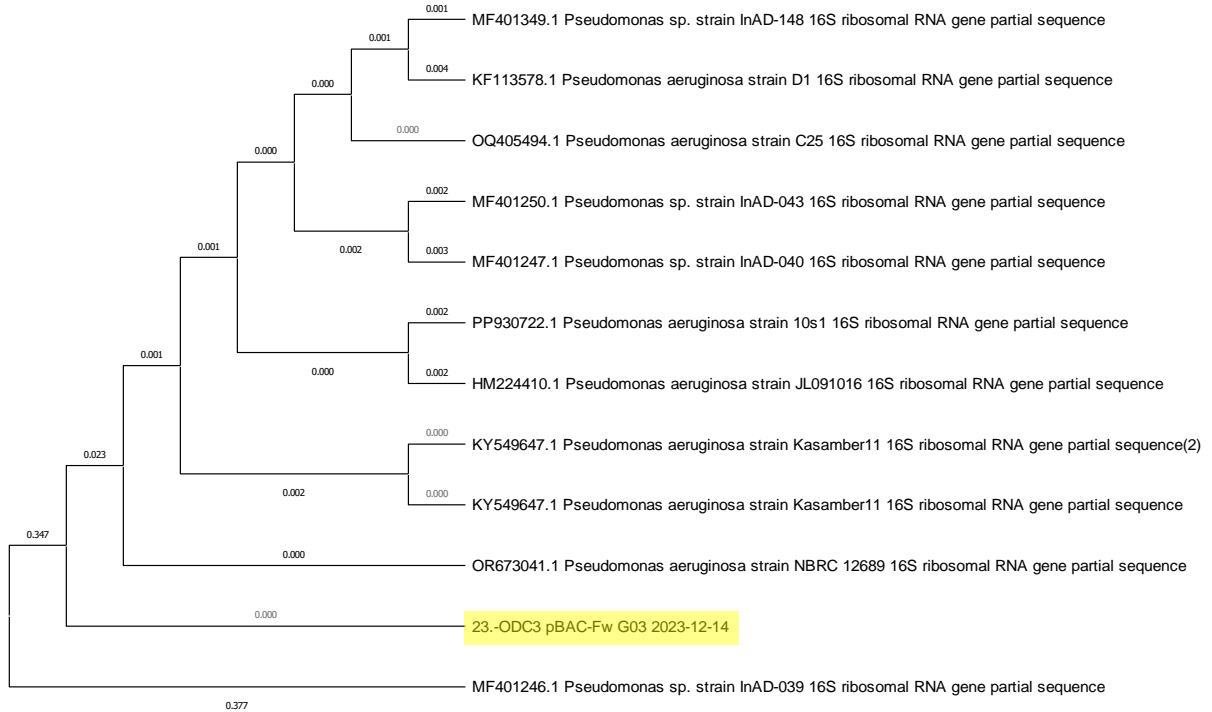


Figura 11. . Árbol filogenético del Método de unión de vecinos (*Neighbor joining tree*) del aislado ODC3 (resaltado en amarillo). Se utilizaron 12 secuencias del gen DNAr 16S rRNA de *Pseudomonas* spp.

8.6. Optimización de las condiciones de crecimiento en nejayote de la cepa *Bacillus* sp. ODC2.

Se evaluó el crecimiento de *Bacillus* sp. ODC2 en medio a base de nejayote a 35 °C y se obtuvieron los siguientes resultados

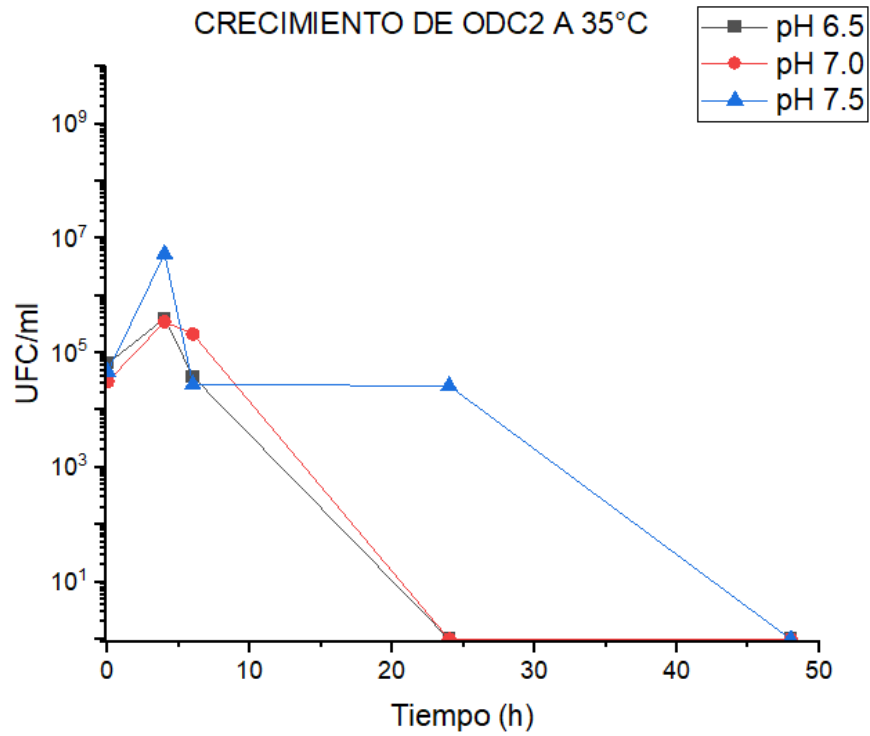


Figura 12. Crecimiento del aislado ODC2 en medio nejayote a 35 °C, pH 6.5, 7 y 7.5

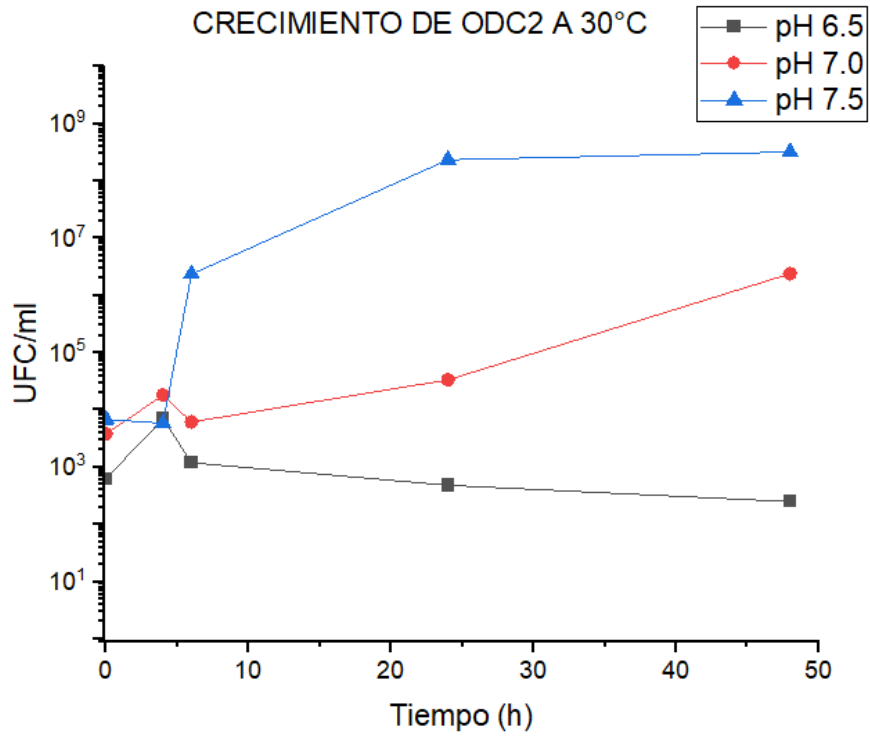


Figura 13. Crecimiento de *Bacillus* sp. ODC2 en medio nejayote a 30 °C, pH 6.5, 7 y 7.5

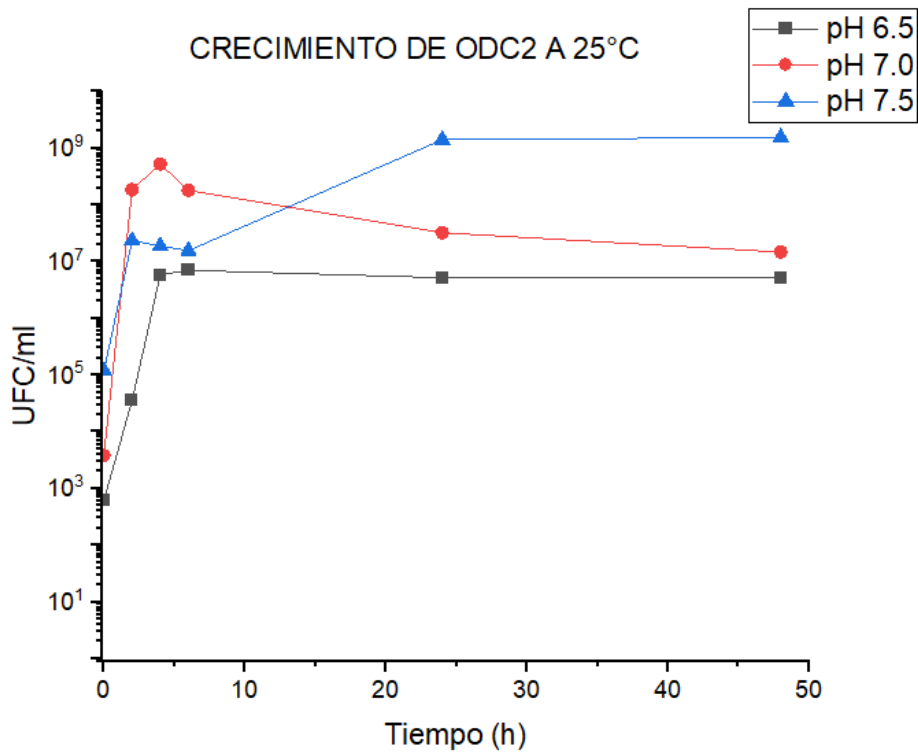


Figura 14. Crecimiento del aislado *Bacillus* sp. ODC2 en medio nejayote a 25 °C, pH 6.5, 7 y 7.5

Con base en estos resultados observamos que sí influyen la temperatura y el pH del cultivo, siendo que *Bacillus* sp. ODC2 obtiene un mejor crecimiento a pH 7.5 y a una temperatura de 25 °C, en comparación a los demás factores indicados.

8.7. Ensayo de promoción de crecimiento

Se obtuvieron los siguientes datos para el maíz cultivado.

Tabla 2. Resultados de peso seco de cada planta de maíz

	PESO (g)				
	A	B	C	D	E
ODC1	0.3689	0.6541	0.4813	NO HUBO CRECIMIENTO	NO HUBO CRECIMIENTO
ODC2	0.2688	0.6357	0.4003	0.5232	NO HUBO CRECIMIENTO
ODC3	0.804	0.8648	0.5577	0.4639	NO HUBO CRECIMIENTO
M	0.5918	0.05458	0.5122	NO HUBO CRECIMIENTO	NO HUBO CRECIMIENTO
C (+)	0.3633	0.5429	0.5815	NO HUBO CRECIMIENTO	NO HUBO CRECIMIENTO
C(-)	0.375	0.7423	NO HUBO CRECIMIENTO	NO HUBO CRECIMIENTO	NO HUBO CRECIMIENTO

Para cada tratamiento se realizaron 5 réplicas las cuales se denominaron A, B, C, D y E.

Respecto a la germinación de las semillas determinamos que con el tratamiento de ODC2 y ODC3 se alcanzó un 80% de germinación en comparación del control positivo que fue de 60%, ODC1 y la mezcla con 60% y del control negativo con tan solo 40% de germinación, es posible que las semillas utilizadas tuviesen una baja viabilidad y gracias al tratamiento con ODC2 y ODC3 la semilla logró germinar.

Con respecto a este ensayo se pudo observar que el tratamiento con los microorganismos no presentó ningún síntoma de fitotoxicidad durante el desarrollo de la planta, es decir el tratamiento con microorganismos no disminuyó el crecimiento del maíz ni presenta signos de enfermedad con respecto al control con agua (véase anexo 9). Con respecto a la biomasa total producida en peso seco no se puede concluir que el uso de la bacteria sea promotor del crecimiento del maíz debido al tamaño tan pequeño de las muestras por tratamiento (n=2 - 4), sin embargo, es posible que ODC3 (0.672 g/planta) tenga algún beneficio como inoculante con respecto al control negativo (0.558 g/planta).

Con respecto a las fresas se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 3. Resultados de peso seco de fresas sembradas

	PESO (g)				
	A	B	C	D	E
ODC1	0.4921	0.2842	0.2829	0.30103	0.3318
ODC2	0.4017	0.4048	0.2603	0.1511	0.02361
ODC3	0.2887	0.2619	0.1861	0.1151	0.165
M	0.4017	0.4048	0.1511	0.2603	0.2361
C (+)	0.2788	0.2944	0.3071	0.2552	0.3239
C (-)	0.1786	0.21	0.2022	0.2491	0.2019

Para cada tratamiento se realizaron 5 réplicas las cuales se denominaron A, B, C, D y E.

Con los datos obtenidos no es posible determinar si el uso de los aislados promueve el crecimiento de las plantas de fresa en este ensayo. Además, que en promedio el 27% de las hojas de cada planta del control negativo mostraron algún signo de muerte o daño celular, esto probablemente debido a las condiciones climáticas que alcanzaron hasta una temperatura de 5 °C, lo que imposibilita que se desarrolle una conclusión respecto a la repercusión del uso de inoculantes en el cultivo de fresa.

9. CONCLUSIONES

Los aislados *Bacillus* sp. (ODC2) y *Pseudomonas* sp. (ODC3) fueron capaces de crecer en al menos 4 órdenes en bagazo de maíz como única fuente de carbono y energía y de liberar 12-23 mg de azúcares reductores por gramo de bagazo. Dichas características los habilitan como organismos candidatos para el desarrollo de procesos de degradación y aprovechamiento de residuos agroindustriales del maíz.

El aislado de *Bacillus* sp. (ODC2) creció mejor a pH ligeramente alcalino a una temperatura media, lo cual podría ser una ventaja si se propagara en medios alcalinos como el nejayote.

Con respecto a la promoción del crecimiento de plantas, se puede concluir que los aislados *Bacillus* sp. (ODC2) y *Pseudomonas* sp. (ODC3) no son patógenos para las plantas de maíz y fresa.

10. PERSPECTIVAS

Las características que presentaron los aislados *Bacillus* sp. (ODC2) y *Pseudomonas* sp. (ODC3) representan varias oportunidades para el desarrollo de nuevas investigaciones. Principalmente debido a su crecimiento en medio sólido compuesto solamente de bagazo de maíz, pues esto representa un gran potencial para el desarrollo de nuevas tecnologías con potencial para acelerar el compostaje y que no presenten un detrimento en el crecimiento de las plantas que se han de beneficiar de ese compostaje.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ali Asaff, *et al.* (2012). *DESARROLLO DE LA CADENA DE VALOR DE LOS EFLUENTES DE LA INDUSTRIA DEL NIXTAMAL*. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Becerra, L., Jorge, U., Lozano, T., Puentes, V., Martínez, J., Hernández, J., Universidad, F., & Lozano, J. T. (2012). *Revista de la Universidad Jorge Tadeo Lozano ARDRA para la identificación de las bacterias coliformes Citrobacter sedlakii y Citrobacter gilleni, del humedal "Laguna de Tierra Blanca" Soacha, Cundinamarca*.
- Boyd, C. E. (2015). *Water Quality*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-17446-4>
- Buitimea-Cantúa, N. E., Antunes-Ricardo, M., Gutiérrez-Urbe, J. A., del Refugio Rocha-Pizaña, M., de la Rosa-Millán, J., & Torres-Chávez, P. I. (2020). Protein-phenolic aggregates with anti-inflammatory activity recovered from maize nixtamalization wastewaters (nejayote). *LWT*, 134, 109881. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109881>
- Cappuccino James, & Sherman Natalie. (2008). *Microbiology: A Laboratory Manual* (12th ed.). Pearson Education.
- Castro-Muñoz, R., & Yáñez-Fernández, J. (2015a). Valorization of Nixtamalization wastewaters (Nejayote) by integrated membrane process. *Food and Bioproducts Processing*, 95, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.03.006>

- Castro-Muñoz, R., & Yáñez-Fernández, J. (2015b). Valorization of Nixtamalization wastewaters (Nejayote) by integrated membrane process. *Food and Bioproducts Processing*, 95, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.03.006>
- Chapman, D. V. . (2021). *Water quality assessments: a guide to the use of biota, sediments, and water in environmental monitoring*. CRC Press.
- Del, M., Rodicio, R., & Mendoza, C. (2004). FORMACIÓN MÉDICA CONTINUADA Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. In *Enferm Infecc Microbiol Clin* (Vol. 22, Issue 4). <http://www.springer-ny.com/bergeysoutline/>
- DIANA MARIA GAITAN BOHORQUEZ, & LILIANA IBETH PEREZ PEREZ. (2007). AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS CELULOLITICOS A PARTIR DE RESIDUOS VEGETALES FRESCOS Y EN COMPOSTA GENERADOS EN CULTIVO DE CRISANTEMO. PONTIFICIAUNIVERSIDADJAVERIANA.
- Díaz Montes, E., Yáñez Fernández, J., & Blanca Estela Barragán Huerta. (2017). *Evaluación del perfil fenólico del nejayote de tres tipos de maíces mexicanos*. Instituto Politécnico Nacional.
- Díaz Romero, A. (2023). Importancia y aplicaciones de la enzima β -glucosidasa: “El Pacman biotecnológico.” *ESMOS -ICUAP*. <https://doi.org/http://doi.org/10.5281/zenodo.7593023>
- Díaz-Montes, E., Castro-Muñoz, R., & Yáñez-Fernández, J. (2016). An overview of nejayote, a nixtamalization by product. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 8(2), 41–60. <https://doi.org/10.5154/r.inagbi.2016.03.002>
- Eileen Vittoria Canchola Carrillo. (2019). *Utilización de nejayote para la producción de xilanasas y feruloilesterasas de Aspergillus niger FP160 en bioreactor*. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.
- Elizabeth Morales-García, Y., Juárez-Hernández, D., Laura Hernández-Tenorio, A., Mariana Muñoz-Morales, J., Baez, A., & Muñoz-Rojas, J. (2020). Inoculante de segunda generación para incrementar el crecimiento y salud de plantas de jardín. *Alianzas y Tendencias*. BUAP, 136–154. <https://doi.org/10.11235/BUAP.05.20.06>
- Florez, P. A. V., Guerra, D. A. C., & Rosero, S. E. V. (2016). Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia. *Acta Agronomica*, 65(4). <https://doi.org/10.15446/acag.v65n4.50181>
- G. Ramirez-Romero, M. Reyes-Velazquez, & A. Cruz-Guerrero. (2013). ESTUDIO DEL NEJAYOTE COMO MEDIO DE CRECIMIENTO DE PROBIOTICOS Y PRODUCCION DE BACTERIOCINAS. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(3), 463–471.

- Galán Loro Alfredo José, B., Guevara Alejandría Paul Orlando, B., & Arq Rivadeneyra Huaroto Karina Ivette, M. (2021). *FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y URBANISMO Asesor*. <https://orcid.org/0000-0001-6414-0457>
- Gruma, S. A. B. de C. V. (2023). *GESTIÓN DEL AGUA: REPORTE ESG GRUMA 2023*.
- Londoño-Zapata, A. F., Fernández-Correa, J. A., Molina-Guzman, L. P., Polanco-Echeverry, D., & Gutiérrez-Builes, L. A. (2012). Cuantificación de bacterias celulolíticas anaerobias provenientes del rumen de ganado bovino: comparación de tres técnicas. *Hechos Microbiológicos*, 2(1), 51–59. <https://doi.org/10.17533/udea.hm.10878>
- López-Pacheco, I. Y., Carrillo-Nieves, D., Salinas-Salazar, C., Silva-Núñez, A., Arévalo-Gallegos, A., Barceló, D., Afewerki, S., Iqbal, H. M. N., & Parra-Saldívar, R. (2019). Combination of nejayote and swine wastewater as a medium for *Arthrospira maxima* and *Chlorella vulgaris* production and wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 676, 356–367. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.278>
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506–577. <https://doi.org/10.1128/mnbr.66.3.506-577.2002>
- Márquez, V. M. P., Ochoa, J. L., Cruz, C. V., Alonso, P. S., Olmedo-Alvarez, G., P, S. V., & Abascal, E. N. (2014). Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from Layer Hens Showing Clinical Signs of Infectious Coryza. *Avian Diseases*, 58(4), 638–641. <https://doi.org/10.1637/10798-021314-Case.1>
- Miller, G. L. (1959a). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Miller, G. L. (1959b). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Muñoz-Tlahuiz, F., De Dios Guerrero-Rodríguez, J., Antonio López, P., Gil-Muñoz, A., López-Sánchez, H., Ortiz-Torres, E., Arahón Hernández-Guzmán, J., Taboada-Gaytán, O., Vargas-López, S., & Valadez-Ramírez, M. (2013). Stover and grain production from maize landraces under rainfed conditions in the highland plateau of Libres-Serdán, Puebla, Mexico. In *Rev Mex Cienc Pecu* (Vol. 4, Issue 4).

- Nicolás Torres-Salado, Marco-Antonio Ayala-Monter, Paulino Sánchez-Santillán, & Isaac Almaraz-Buendía. (2022). Efecto de la adición de bacterias celulolíticas a bacterias ruminales sobre las características fermentativas in vitro. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 36(1), 22–32. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v35n4a5>
- Pablo F. Richmond, & Sergio N. Rillo. (2009). Caracterización de la dinámica de incorporación de residuos de cosecha al suelo en un sistema agrícola en siembra directa en el centro-oeste de Buenos Aires. *Informaciones Agronómicas*, 43, 22–26.
- Quintín Rascón-Cruz, Nidia Paola Castillo-Vázquez, Marcos Ortiz-Caro, Guadalupe Virginia Nevárez-Moorillón, Armando Quintero Ramos, Ma. Lourdes Ballinas-Casarrubias, Tania Siqueiros-Cendón, Octavio Paredes-López, & Carlos Calvillo. (2011). *CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE CELULOSA Y ALMIDÓN*.
- Rojas-García, C., García-Lara, S., Serna-Saldivar, S. O., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2012). Chemopreventive Effects of Free and Bound Phenolics Associated to Steep Waters (Nejayote) Obtained After Nixtamalization of Different Maize Types. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(1), 94–99. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0272-y>
- Rosentrater, K. A. (2006). A review of corn masa processing residues: Generation, properties, and potential utilization. *Waste Management*, 26(3), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.03.010>
- Salmerón-Alcocer, A., Rodríguez-Mendoza, N., Pineda-Santiago, V., Cristiani-Urbina, E., Juárez-Ramírez, C., Ruiz-Ordaz, N., & Galíndez-Mayer, J. (2003). Aerobic treatment of maize-processing wastewater (nejayote) in a single-stream multi-stage bioreactor . *Journal of Environmental Engineering and Science*, 2(5), 401–406. <https://doi.org/10.1139/s03-046>
- Sanchez-Gonzalez, M., Blanco-Gamez, A., Escalante, A., Valladares, A. G., Olvera, C., & Parra, R. (2011). Isolation and characterization of new facultative alkaliphilic *Bacillus flexus* strains from maize processing waste water (nejayote). *Letters in Applied Microbiology*, 52(4), 413–419. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03021.x>
- Sánchez-Santillán, P., & Cobos-Peralta, M. A. (2016). In vitro PRODUCTION OF VOLATILE FATTY ACIDS BY REACTIVATED CELLULOLYTIC BACTERIA AND TOTAL RUMINAL BACTERIA IN CELLULOSIC SUBSTRATE. *AGROCIENCIA*, 50, 565–574.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2023). *Datos básicos del Sector Primario Comportamiento por subsector*.

Smith, V. H., Tilman, G. D., & Nekola, J. C. (n.d.). *Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems*. www.elsevier.com/locate/envpol

Vargas Corredor, Y. A., & Pérez Pérez, L. I. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 59–72. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3108>

Yolanda Garza-García, Victoria L. Hernández-Orona, Baltazar Gutiérrez-Rodríguez, & José Gerardo Gaona-Lozano. (2011). *CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS SINTETIZADAS POR BACTERIAS DE AMBIENTES EXTREMOS*. (IX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA, Ed.).

12. ANEXO

1. Preparación del Medio Hoja Maíz:

Para preparar el medio se utilizaron 10 g/l hoja de maíz macerada. La hoja de maíz era seca, previamente lavada y se maceraba en agua, se filtraba y con el permeado se hizo el medio. Si se deseaba un medio sólido se agregaba 15 g/l de agar.

2. Preparación del Medio LB:

Para preparar el medio se utilizaron 10 g/l peptona, 5 g/l extracto de levadura y 5 g/l Cloruro de sodio. Si se deseaba un medio sólido se agregaba 15 g/l de agar.

3. Preparación del Medio PD:

Para preparar el medio se utilizaron 20 g/l de dextrosa y 200 g/l de papa. Se preparaba una infusión con la papa, es decir, se cortaba en trozos y se ponía en agua hasta ebullición y se filtraba, con el permeado se preparaba el medio. Si se deseaba un medio sólido se agregaba 15 g/l de agar.

4. Metodología de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con base en datos del fabricante de PCR Master Mix – Promega.

- I. Descongelar PCR Master Mix 2X, agitar con ayuda de un vortex y centrifugar por un breve periodo para recuperar el contenido del tubo en el fondo de este.
- II. Para cada 25 µl de volumen de reacción adicionar 12.5 µl de PCR Master Mix 2X, 0.5 µl de “Upstream Primer 10 µM”, 0.5 µl de “Downstream Primer 10 µM”, 5 µl de plantilla de ADN y 6.5 µl de agua libre de nucleasas.
- III. Amplificar el fragmento con ayuda de un termociclador BioRad T100, siguiendo los pasos de desnaturalización (94 °C por 1'30”), alineamiento

(55 °C por 45''), extensión (72 °C por 2'), por 30 ciclos y una amplificación final (72 °C por 4').

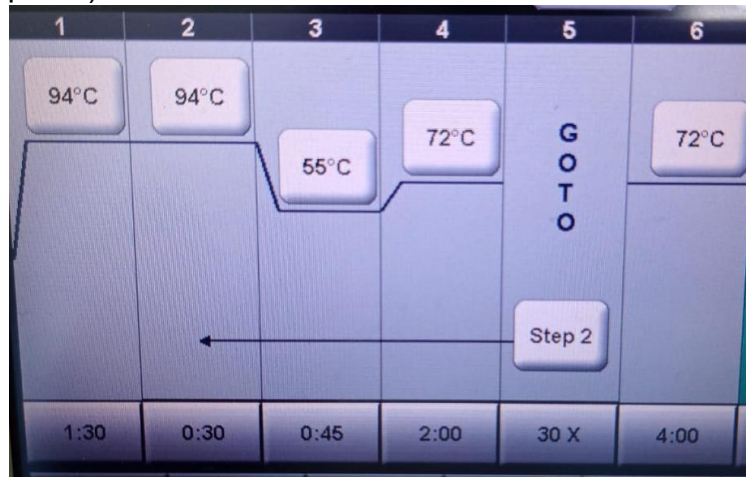


IMAGEN ANEXO 1 Imagen con los tiempos y temperaturas seleccionadas según el protocolo para la PCR.

IV. Finalizando se refrigera el producto en ultracongelación a -80°C.

5. Electroferogramas

File: 21.-ODC2_pBAC-Fw_E03_2023-12-14.ab1

Geospiza
www.geospiza.com

Sample Name: 21.-ODC2_pBAC-Fw

Signal Strengths: A = 828, C = 775, G = 759, T = 522

Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob

Lane/Cap#: 23

Spacing: 13.3187

Matrix: n/a

Comment: n/a

Direction: Native

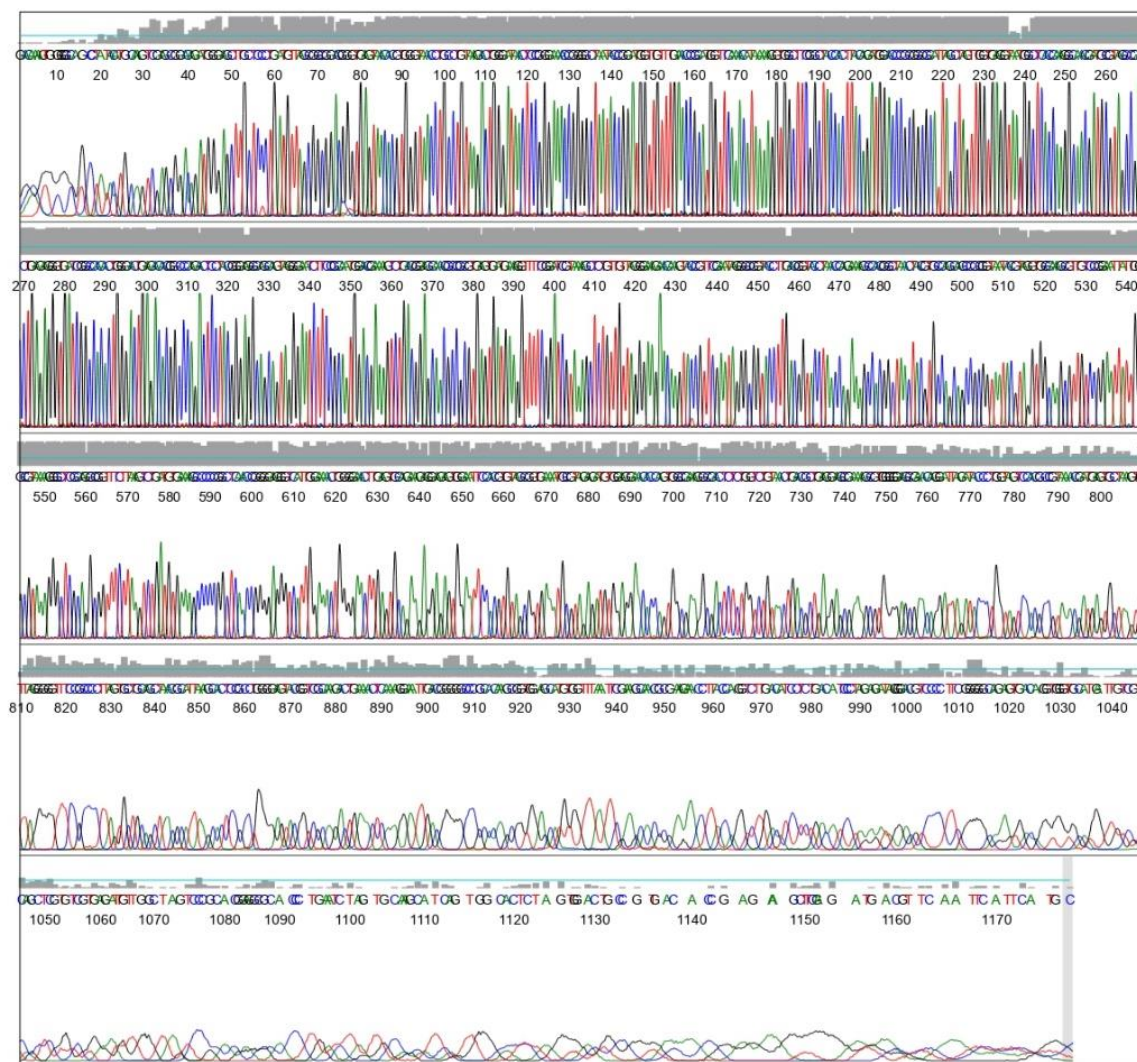


IMAGEN ANEXO 2 Electroferograma secuencia "forward" del gen ADNr 16S del aislado ODC2.

File: 23.-ODC3_pBAC-Fw_G03_2023-12-14.ab1

Sample Name: 23.-ODC3_pBAC-Fw
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 13.3692
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 778, C = 708, G = 673, T = 493
Lane/Cap#: 19
Matrix: n/a
Direction: Native

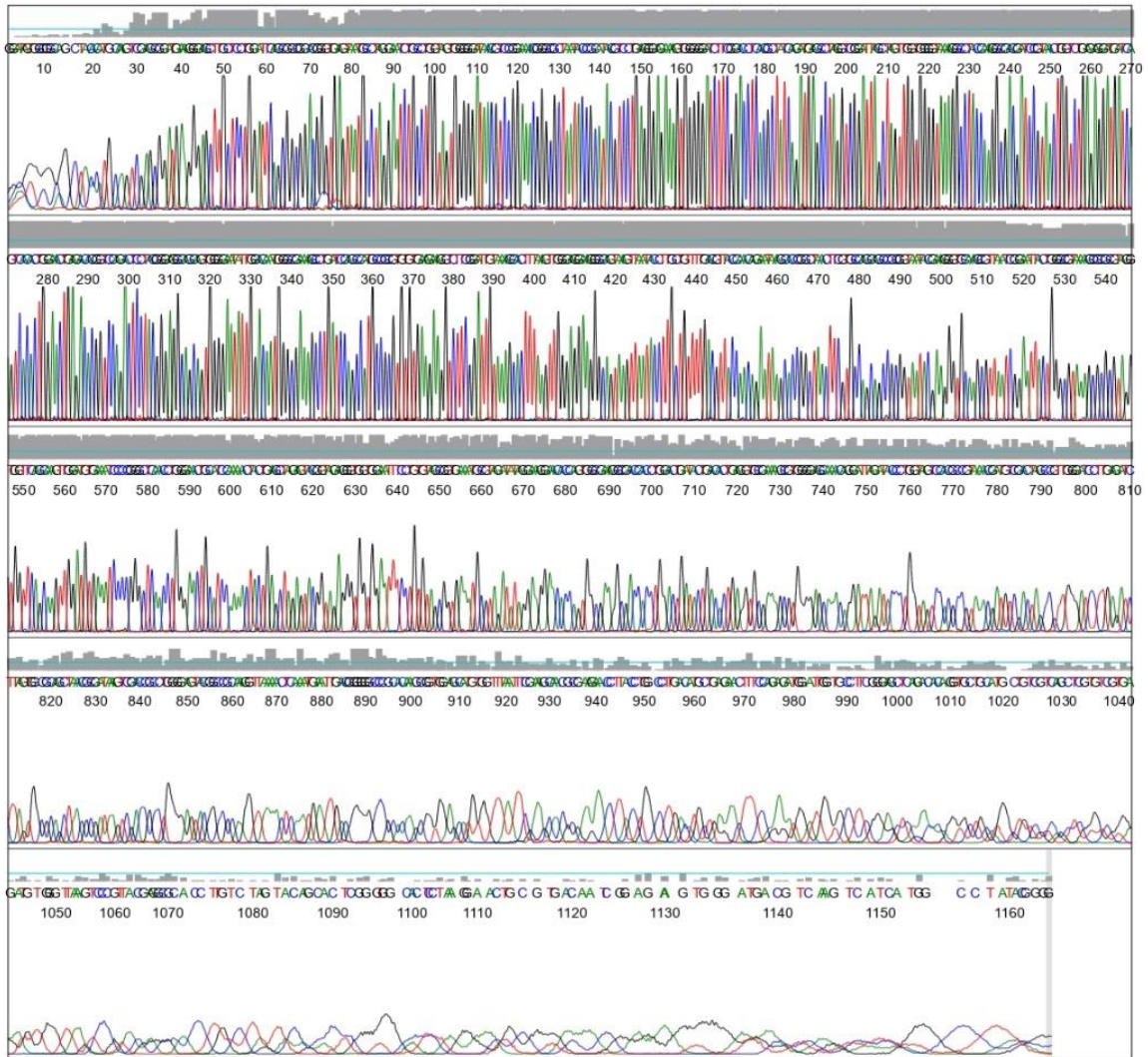


IMAGEN ANEXO 4. Electroferograma secuencia "forward" del gen ADNr 16S del aislado ODC3.

Sample Name: 24.-ODC3_pBAC-Rv
Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
Spacing: 13.4028
Comment: n/a

Signal Strengths: A = 575, C = 825, G = 564, T = 561
Lane/Cap#: 17
Matrix: n/a
Direction: Native

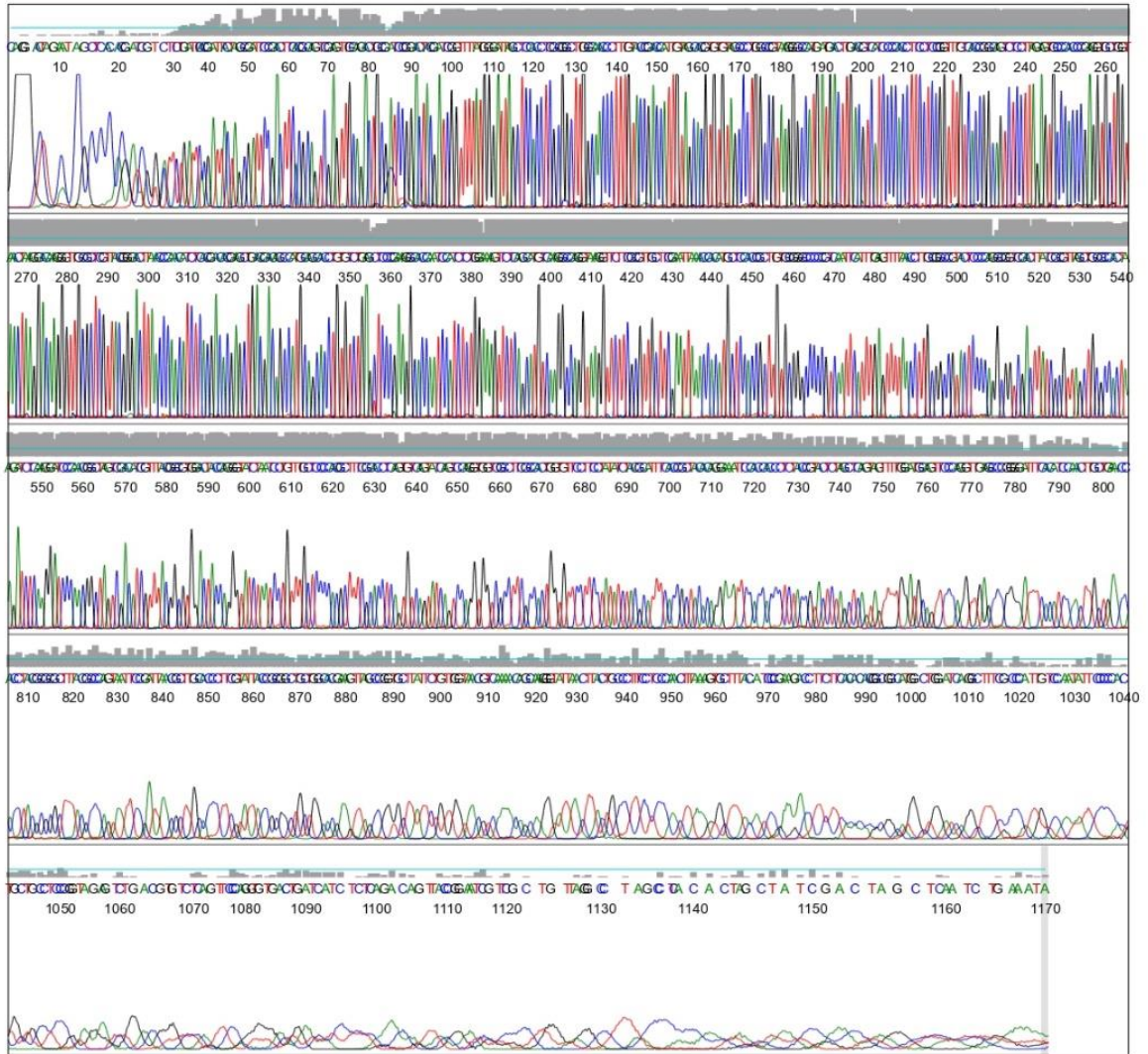


IMAGEN ANEXO 5. Electroferograma secuencia "reverse" del gen ADNr 16S del aislado ODC3. Algunas muestras de microscopías

6. Comentario resultado del árbol filogenético

- a. El resultado del primer árbol filogenético (para ODC 2) se acompaña de la siguiente leyenda:

“Evolutionary relationships of taxa

The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method [1]. The optimal tree is shown. (next to the branches). The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method [2] and are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 11 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 1305 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11 [3]

1. Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

2. Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.

3. Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.”

- a. El resultado del segundo árbol filogenético (para ODC 3) se acompaña de la siguiente leyenda:

“Evolutionary relationships of taxa

The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method [1]. The optimal tree is shown. (next to the branches). The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method [2] and are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 12 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 1669 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11 [3]

1. Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

2. Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
3. Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>..”

7. Microscopías de los aislados

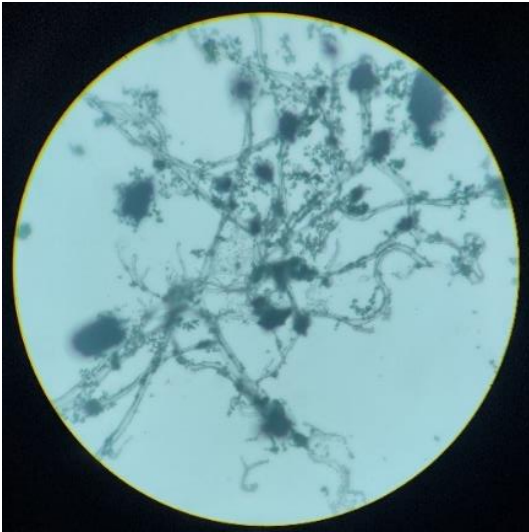


IMAGEN ANEXO 6. Microscopía cepa 1.

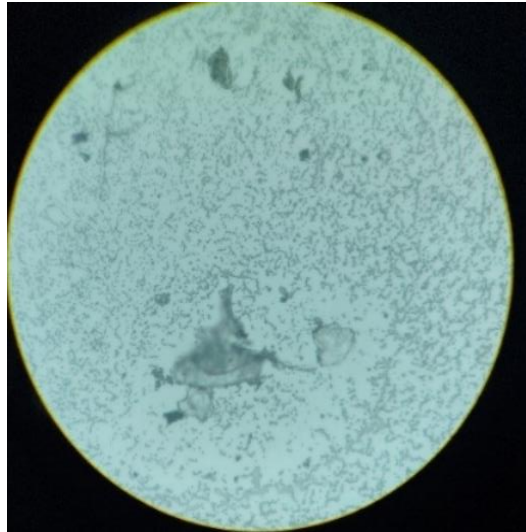


IMAGEN ANEXO 8. Microscopía cepa 10.



IMAGEN ANEXO 10. Microscopía cepa D..

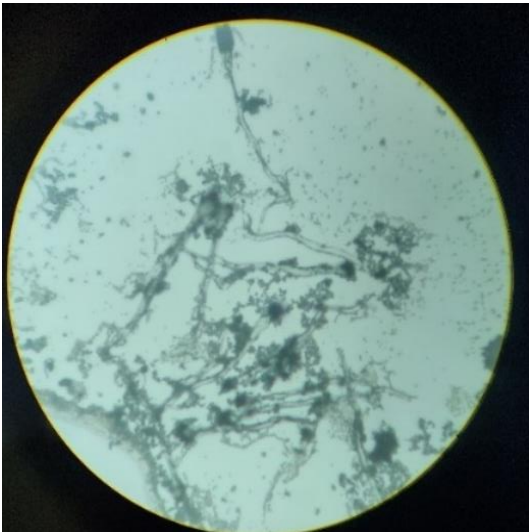


IMAGEN ANEXO 7. Microscopía cepa 6.

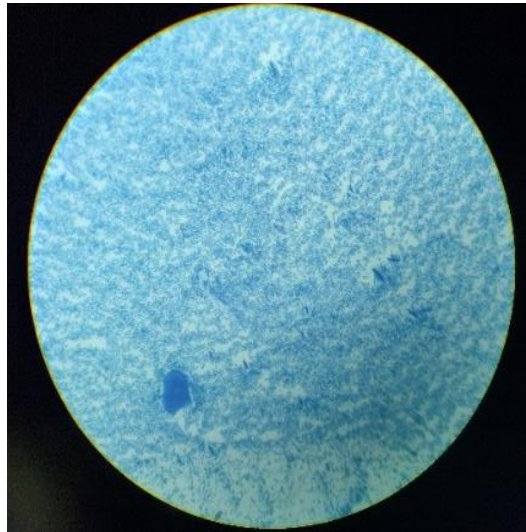


IMAGEN ANEXO 9. Microscopía cepa 12.

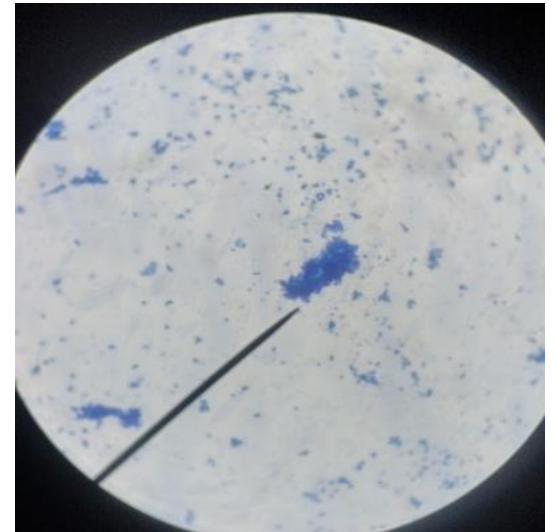


IMAGEN ANEXO 11. Microscopía cepa D_a.

8. Fotografías de los aislados

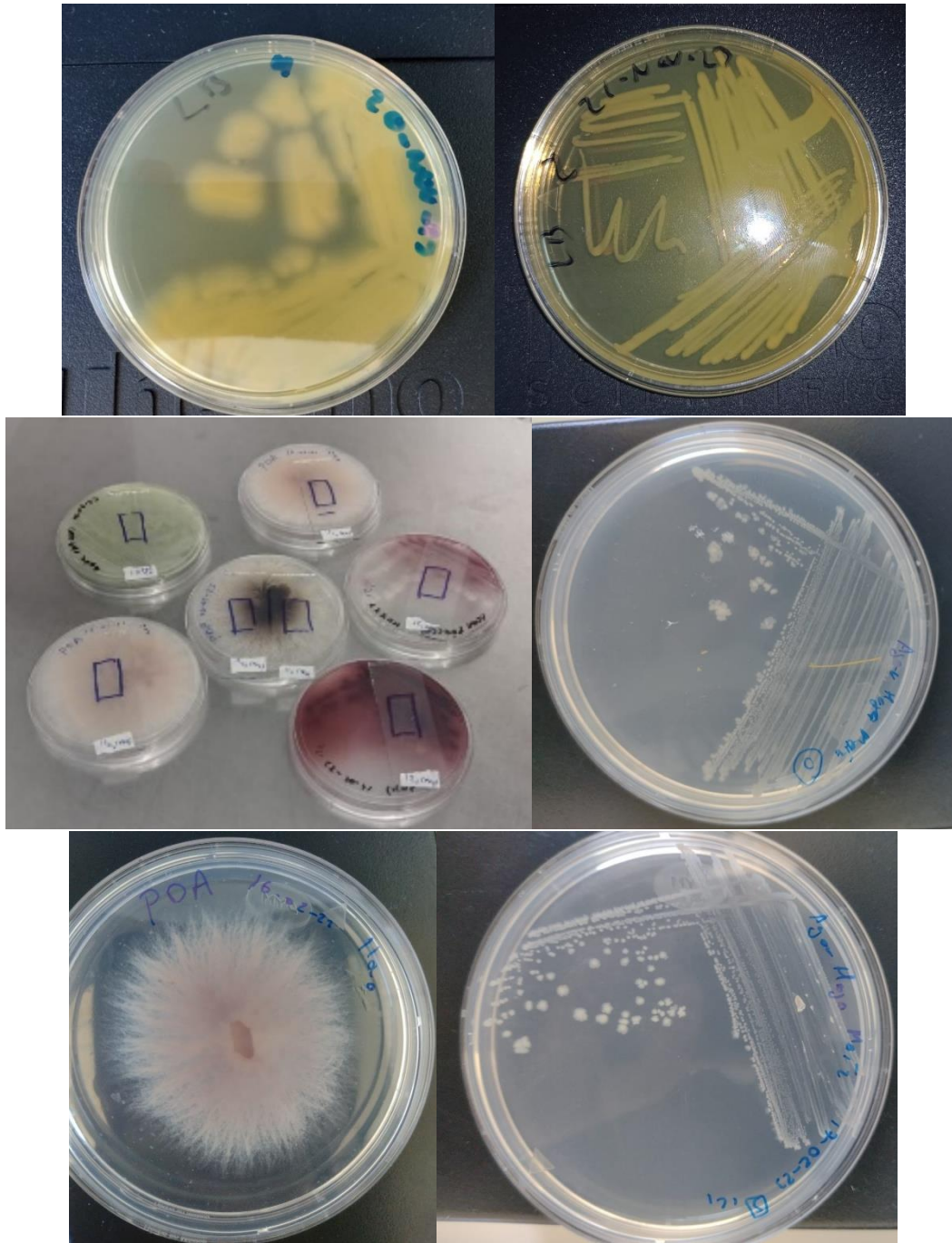


IMAGEN ANEXO 12. Fotografías de placas con diversos aislados

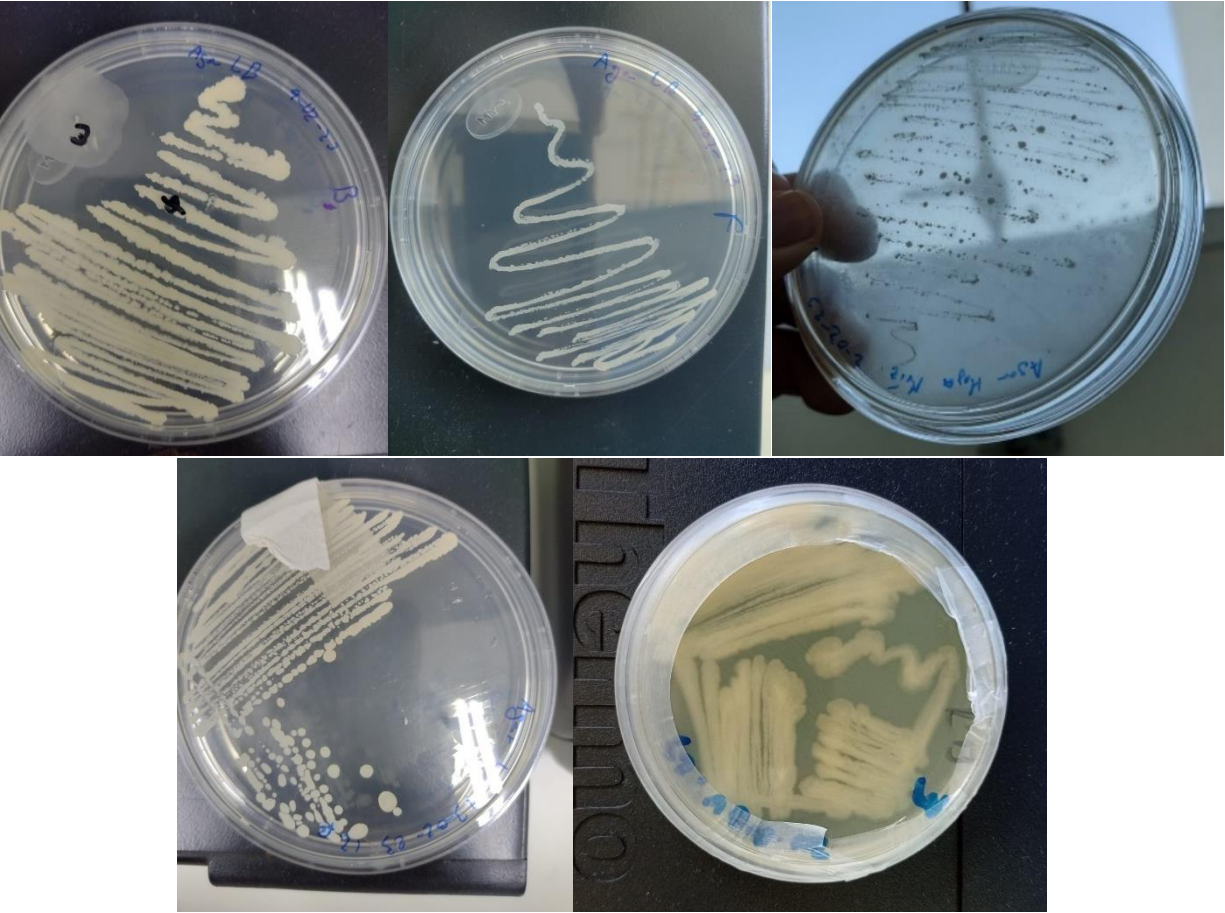


IMAGEN ANEXO 13. Fotografías de placas con diversos aislados

9. Fotografías de macetas de maíz y fresas para ensayo de fitopatogenicidad



IMAGEN ANEXO 14. Primeros brotes del maíz tratamiento ODC3 tras 10 días



IMAGEN ANEXO 15. Fresas de control (+) tras 20 días



IMAGEN ANEXO 16. Maíz de control (-) y fresas tratamiento ODC2 tras 20 días



IMAGEN ANEXO 17. Maíz tratamiento ODC 1 tras 20 días



IMAGEN ANEXO 18. Fresas tratamiento ODC 1 tras 20 días.

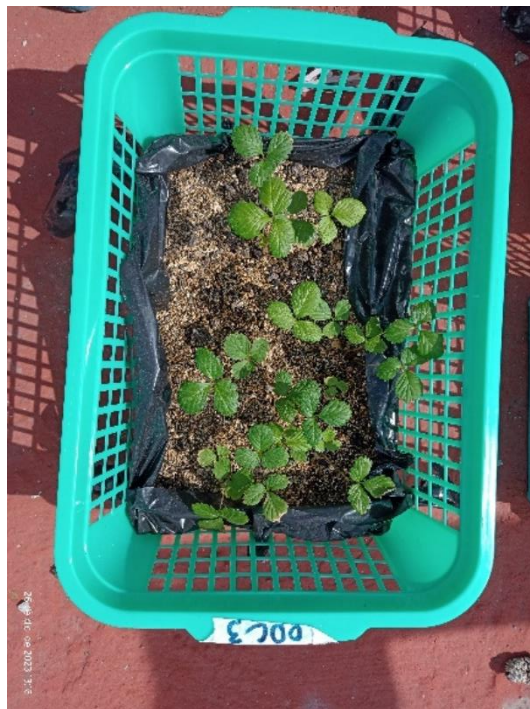


IMAGEN ANEXO 19. Fresas tratamiento ODC3 tras 20 días



IMAGEN ANEXO 20. Fresas tratamiento ODC2 tras 28 días



IMAGEN ANEXO 21. Fresas tratamiento ODC3 tras 28 días.



IMAGEN ANEXO 22. Maíz tratamiento ODC3 tras 28 días.



IMAGEN ANEXO 23. Fresas control (-) izquierda y control (+) derecha tras 28 días.