



Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata

BIOPROSPECCIÓN DE BACTERIAS ASOCIADAS A PLANTAS DE *CANNABIS SATIVA* L. PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN COMO BIOINSUMOS

Trabajo Final Laboratorio de Procesos Biotecnológicos

Benjamin Puente Pietrocola
Director: Dr. Santiago A. Vio
Tutora: Lic. Carmen Martínez Sbrancia

Año 2025



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microorganismos de Aplicación en la Agricultura, perteneciente al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata bajo la dirección del Dr. Santiago A. Vio y la tutoría de la Lic. Carmen Martínez Sbrancia.



ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 CANNABIS SATIVA L.	7
1.1.1 Generalidades	7
1.1.2 Descripción botánica	7
1.1.3 Reseña histórica y situación actual	8
1.1.4 Legislación en Argentina	11
1.2 BIOPROSPECCIÓN BACTERIANA: I+D DE BIOINSUMOS AGRÍCOLAS	14
1.2.1 Holobionte vegetal y su fitomicrobiota	14
1.2.2 Bioinsumos agropecuarios	16
1.2.3 Investigación y desarrollo de bioinsumos a base de PGPB	17
1.3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
2. MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS ASOCIADAS A PLANTAS DE CANNABIS	21
2.1.1- Toma de muestras a campo	21
2.1.2- Procesamiento de muestras de cannabis para el aislamiento de bacterias	22
2.1.3 Recuento poblacional, selección de aislamientos y mantenimiento de la colección	29
2.2 ASIGNACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS	31
2.3 CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS	32
2.3.1 Caracterización de enzimas líticas asociadas a la colonización vegetal	32
2.3.2 Caracterización <i>in vitro</i> de mecanismos de promoción del crecimiento vegetal	33
2.3.3 Determinación del potencial de biocontrol	37
2.3.3.1 Determinación de enzimas líticas de efecto antagonista. Cálculo de índice ICEA	37
2.3.3.2 Ensayos de antagonismo contra hongos fitopatógenos. Cálculo de índices PICR e IPA	39
2.3.4 Cálculo de índices IPPCV e IPB; Selección de aislamientos en base a índices	42
2.4 ENSAYO <i>IN VIVO</i> EN ESQUEJES DE <i>CANNABIS SATIVA L.</i>	43
3. RESULTADOS	47
3.1 RECUENTO POBLACIONAL Y GENERACIÓN DE LA COLECCIÓN	47
3.1.2 Selección de Morfotipos, Aislamiento y Generación de la Colección	47
3.2 ASIGNACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS	49
3.3 CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS	51
3.3.1 Caracterización de enzimas líticas asociadas a la colonización vegetal y cálculo de ICEC	51
3.3.2 Caracterización respecto de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal	53
3.3.3 Caracterización de aislamientos bacterianos: potencial antagonismo	58
3.3.3.1 Determinación de enzimas líticas de efecto antagonista. Cálculo de índice ICEA	58
3.3.3.2 Ensayos <i>in vitro</i> de antagonismo contra hongos fitopatógenos	61

3.3.4 Cálculo de índices IPPCV e IPB; Selección de aislamientos en base a índices	64
3.4 ENSAYO <i>IN VIVO</i> EN ESQUEJES DE <i>CANNABIS SATIVA</i> L.	66
4. CONCLUSIONES GENERALES	69
ANEXO 1	73
ANEXO 2	75
ANEXO 3	77
ANEXO 4	85
ANEXO 5	87
BIBLIOGRAFÍA	93

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CANNABIS SATIVA L.

1.1.1 Generalidades

Cannabis sativa L. es una especie vegetal de gran relevancia histórica, agronómica y medicinal. Originaria de Asia Central, ha sido cultivada por el ser humano desde hace milenios para distintos fines, incluyendo la producción de fibras textiles, combustible, alimentos y compuestos con propiedades medicinales. En las últimas décadas, el interés en el cannabis para uso terapéutico ha crecido exponencialmente debido a la identificación y caracterización de sus metabolitos activos, principalmente los del grupo de los fitocannabinoides, entre los cuales destacan el tetrahidrocannabinol (THC) y el cannabidiol (CBD). Estos compuestos han demostrado poseer diversas aplicaciones terapéuticas, incluyendo el tratamiento del dolor crónico, la epilepsia refractaria y trastornos neurológicos. Históricamente, el cultivo y uso del cannabis han estado sujetos a fluctuaciones en su aceptación y regulación: en el siglo XX, muchas naciones impusieron restricciones severas sobre su producción y comercialización debido a su relación con el consumo recreativo y sus efectos psicoactivos; sin embargo, en la actualidad, varios países han adoptado legislaciones más flexibles que permiten su investigación y utilización con fines medicinales y terapéuticos. En Argentina, la regulación del cannabis medicinal se ha desarrollado progresivamente, con la aprobación de la Ley 27.350 en el año 2017, que habilita la investigación científica y el acceso controlado a derivados medicinales del cannabis. En 2020, se avanzó con la reglamentación de su producción nacional y el autocultivo con fines medicinales, lo que ha impulsado nuevas líneas de investigación en el país.

1.1.2 Descripción botánica

Cannabis sativa L., clasificada botánicamente por primera vez en 1753 por Carl Linnaeus, es una planta anual que pertenece a la familia Cannabaceae. Actualmente, el Jardín Botánico de Missouri reconoce 13 especies de *Cannabis*, siendo las más destacadas *C. Sativa*, *C. indica* y *C. Ruderalis* (Ángeles López et al., 2014).

C. sativa es una planta herbácea anual de hasta 4 m de alto, dioica, de tallo erecto y hojas palmadas estipuladas, las inferiores opuestas y las superiores alternas. Las hojas se encuentran sobre pecíolos de hasta 7 cm de largo. Cada hoja se compone de entre 3 a 9 folíolos angostos, de ápice agudo, con márgenes serrados y tricomas glandulares

recostados sobre el haz y el envés de un color más claro. Tiene inflorescencias en las axilas de las hojas superiores o al terminar las ramas, con brácteas herbáceas y glandulosas. Las inflorescencias masculinas son ramificadas, laxas y con muchas flores pediceladas; mientras que, las femeninas tienen pocas flores sésiles (de 5 a 8) pero son más compactas (Figura 1.1.2a). El fruto es un aquenio, con una sola semilla, ovoide, algo comprimida, blanco o verdoso teñido de púrpura, encerrado en el perianto (CONABIO, Ficha informativa).

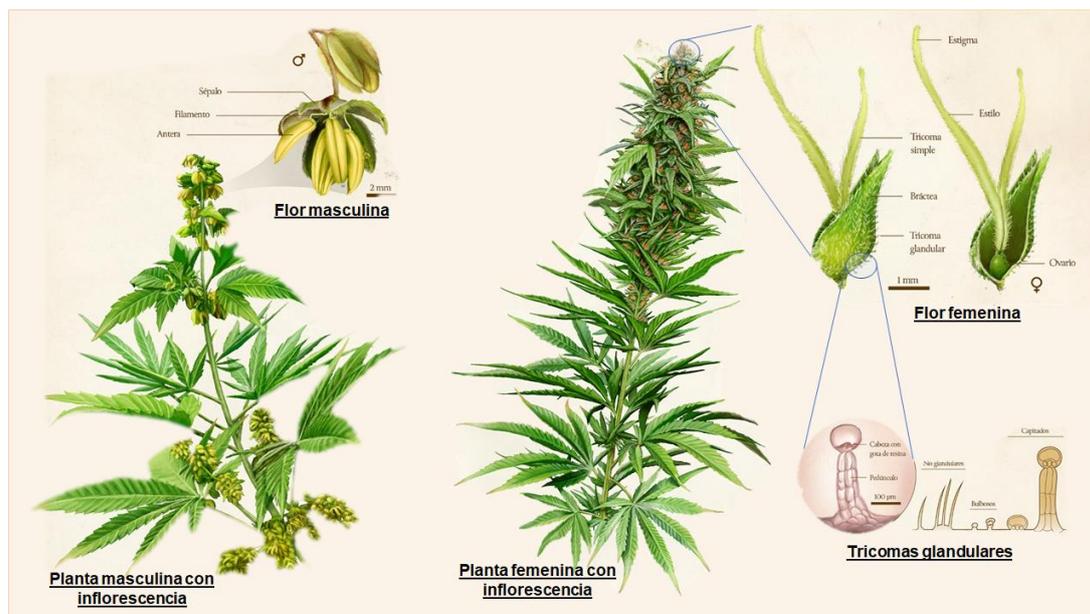


Figura 1.1.2a Morfología de la planta *Cannabis sativa* L., ejemplar con flores masculinas y ejemplar con flores femeninas (Fuente: [Fundación CANNA](#))

1.1.3 Reseña histórica y situación actual

El uso del *Cannabis sativa* L. se remonta a miles de años, abarcando diversas civilizaciones que han aprovechado sus propiedades para aplicaciones textiles, religiosas y medicinales. Desde la Edad Antigua, las referencias a su uso terapéutico han evolucionado en paralelo con el conocimiento médico de cada época, hasta llegar a la actual investigación científica que ha permitido caracterizar sus compuestos activos y mecanismos de acción.

- La utilización del cannabis en China se remonta a hace aproximadamente cinco mil años, principalmente para la producción de fibras y aceite de sus semillas (Camp et al., 1936). El emperador Huang Ti (2600 a.C.) mencionó sus aplicaciones médicas en el libro "Nei Ching", constituyendo una de las primeras referencias documentadas sobre sus propiedades terapéuticas.
- En India, el cannabis formaba parte del acervo religioso vinculado al dios Shiva.

En el Atharvaveda (1500-1200 a.C.), se describe como una "hierba sagrada" con propiedades curativas (Chopra & Chopra, 1957). Desde la India, el uso del cannabis se extendió a Persia y a Siria, donde su empleo con fines religiosos y medicinales estuvo documentado (Eliade et al., 1964).

- En la Grecia y Roma antiguas, el cáñamo fue cultivado por su fibra, empleada en la fabricación de cuerdas y velas. Médicos griegos reconocieron algunas de sus propiedades medicinales (Brunner et al., 1973).

- En Inglaterra, John Parkinson, herbalista real, describió varias propiedades terapéuticas del cáñamo en su obra de 1640, citando a Galeno, Dioscórides y otros herboristas (Parkinson et al., 1640). Hacia el año 500 d.C., el cultivo de cáñamo para fibra ya estaba establecido en Inglaterra (Godwin et al., 1967).

- El cannabis llegó a la Península Ibérica a través de los árabes y se popularizó en Gran Bretaña por sus propiedades curativas. O'Shaughnessy (1842) publicó el primer estudio sobre sus efectos analgésicos, antiespasmódicos y relajantes musculares. Durante las siguientes décadas, se documentaron más de cien estudios sobre sus aplicaciones medicinales.

- El cannabis fue introducido en los virreinos de Perú y México por los españoles y en Canadá y Estados Unidos por los franceses e ingleses (Figura 1.1.3a), inicialmente para la obtención de fibra y luego incluso en preparados farmacéuticos. Sus propiedades psicoactivas fueron reconocidas posteriormente, lo que condujo a su regulación y prohibición en varias naciones (Marihuana Tax Act, 1937).

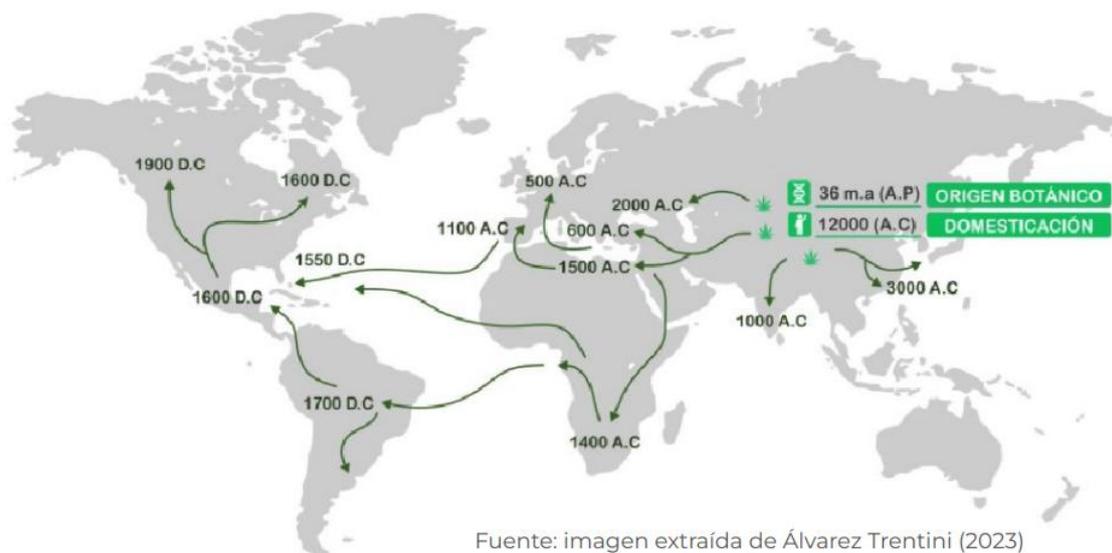


Figura 1.1.3a Origen botánico de la planta *Cannabis sativa* L. y distribución mundial (fuente: Álvarez Trentini, 2023).

Posiblemente, uno de los hechos más relevantes sucede en la década del 60, cuando se logró aislar y caracterizar el principal componente psicoactivo del cannabis: el Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (THC) (Gaoni y Mechoulam et al., 1964). Este descubrimiento abrió las puertas a la investigación científica de las propiedades biológicas y médicas del cannabis y sirvió para el desarrollo de derivados con capacidad terapéutica.

Los **fitocannabinoides**, presentes mayormente en los tricomas glandulares que se encuentran en mayor abundancia en las flores femeninas ([Figura 1.1.3b](#)), son los principales responsables de los efectos que el cannabis produce en el organismo, se tratan de moléculas lipofílicas cuya acción terapéutica se debe a que son agonistas de los receptores del sistema endocannabinoide humano (CB1 y CB2) (Di Marzo y col., 2015). Por lo tanto, actúan como moduladores de muchos procesos fisiológicos donde interviene el sistema endocannabinoide, cuyo papel principal es regular la homeostasis del organismo. Uno de los fitocannabinoides más conocidos y estudiados es el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) que está vinculado fundamentalmente a los efectos psicoactivos del cannabis, pero resulta muy efectivo en el tratamiento del dolor crónico en adultos, como antiemético en el tratamiento de las náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia, así como para mejorar los síntomas de espasticidad de la esclerosis múltiple (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2017). Otros fitocannabinoides que se presentan en forma mayoritaria y que han sido estudiados son el cannabidiol (CBD), sustancia sin poder psicoactivo a la cual se atribuyen propiedades antiinflamatorias, analgésicas, ansiolíticas y antipsicóticas; y el cannabinol (CBN) con propiedades anticonvulsivas (Greydanus y col., 2013; Pertwee y col., 2014). Dada la importancia de estos compuestos medicinales y el fuerte respaldo de la comunidad científica, en la última década la producción mundial de cannabis medicinal creció fuertemente, sobre todo desde el año 2020 en adelante ([Figura 1.1.3c](#)).

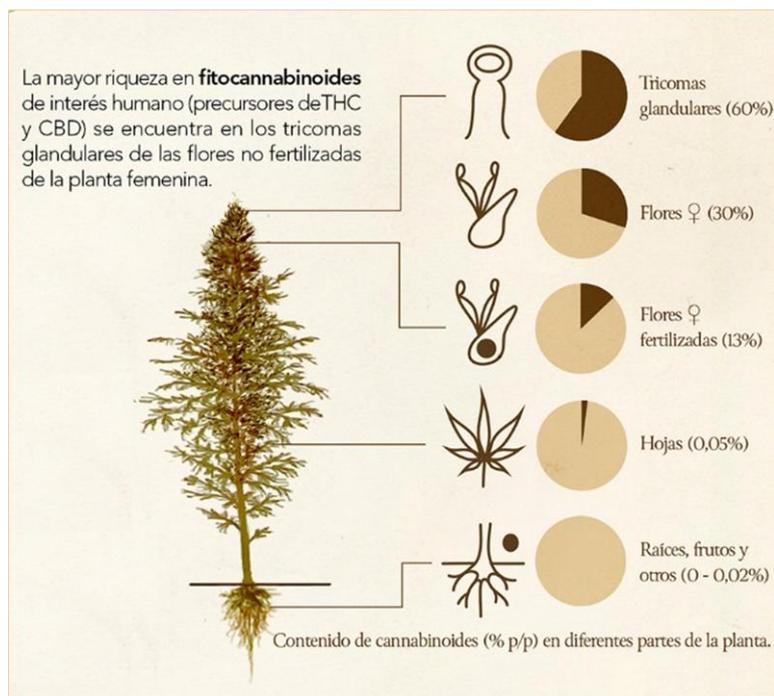


Figura 1.1.3b Distribución del contenido de fitocannabinoides THC y CBD en los diferentes órganos vegetales de la planta de cannabis (fuente: [Fundación CANNA](#)).

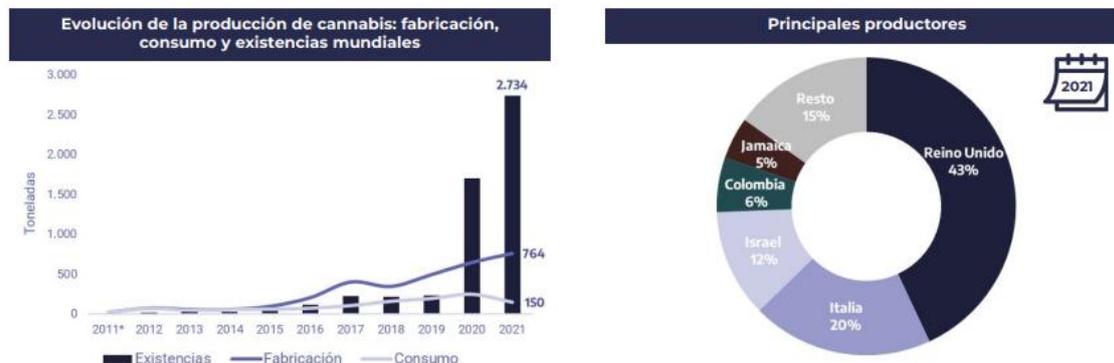


Figura 1.1.3c Evolución de la producción de cannabis medicinal desde el año 2011 y principales países productores (fuente: [Ministerio de Economía de la República Argentina, 2024](#)).

1.1.4 Legislación en Argentina

En Argentina, no ajenos a la situación mundial, producto de dos fuerzas: por el lado social, en el año 2016 con la organización Mamá Cultiva, y por otro lado la comunidad científica, a través del Dr. Marcelo Morante, médico y profesor, en 2017 se sancionó, por unanimidad en la Cámara de Senadores, la [Ley N° 27350 de "Investigación Médica y Científica de Uso Medicinal de la Planta de Cannabis y sus Derivados"](#). Dicha ley

establece un marco regulatorio para la investigación médica y científica del uso medicinal de la planta de cannabis y sus derivados, con el objetivo de garantizar y promover el cuidado integral de la salud (art. 1). Además, contempla la posibilidad de importar el aceite de cannabis y sus derivados, cuando resulte requerido por pacientes que presenten determinadas patologías y cuenten con la indicación médica pertinente (art. 7). Esto generó múltiples acciones judiciales contra obras sociales y empresas de medicina prepaga ante la falta de provisión por parte del Estado. La reglamentación sólo permitió la incorporación en el programa a personas que presentaran diagnóstico de epilepsia refractaria excluyendo a personas con otros diagnósticos. Además, muchos pacientes encontraron dificultades económicas para el acceso al tratamiento, ya que sólo se permitían aceites importados.

Frente a estas circunstancias, el autocultivo o el cultivo solidario se presentaron como las opciones que mejor permiten el acceso al tratamiento con la planta de cannabis y sus derivados. Gracias al impulso de las organizaciones de la sociedad civil vinculadas a la temática, pacientes y familiares de pacientes usuarios de cannabis, logró que finalmente en el año 2020 se dictara una nueva reglamentación de la Ley N° 23750 que admite el autocultivo y el cultivo solidario como una opción que se enmarca en el derecho de los pacientes a elegir su tratamiento. En el año 2021, el Ministerio de Salud emite la Resolución N° 800/2021, la cual crea el “Registro del Programa de Cannabis” (**REPROCANN**), en el cual hacia junio de 2024 había alrededor de 179 mil usuarios autorizados para cultivar cannabis con fines medicinales ya sea para consumo personal o solidario ([Ministerio de Economía de la República Argentina, 2024](#)). Para el año 2023 se crea la Agencia Regulatoria de la Industria del Cáñamo y del Cannabis Medicinal (**ARICCAME**), orientada a fomentar y ordenar la cadena productiva sectorial, combinando la parte medicinal e industrial, y también promover la investigación científica y la producción industrial.

Según un informe de la Dirección Nacional de Estudios Regionales y de Cadenas de Valor, dependiente del Ministerio de Economía de la República Argentina, hacia junio del 2024 había 56 proyectos aprobados en el marco de la Ley N°27.350 para la producción de cannabis medicinal ([Figura 1.1.4a](#)), de los cuales el 71% cuentan con la contribución del INTA y/o el CONICET, tanto en la provisión de asesoramiento técnico, investigación y desarrollo, como en el impulso de la colaboración público – privada.

Mapa federal

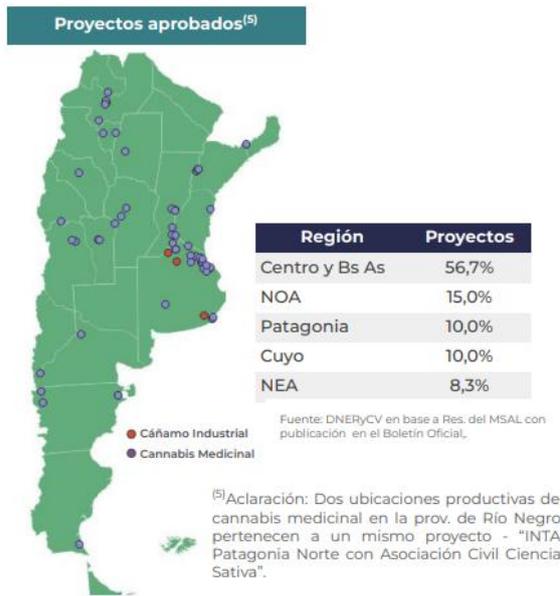


Figura 1.1.4a Distribución geográfica de los distintos proyectos de producción de cannabis medicinal, aprobados en el marco de la Ley N° 27250 (Fuente: [Ministerio de Economía de la República Argentina, 2024](#))

En un sector productivo en fuerte expansión como es la industria del cannabis medicinal y cáñamo industrial, no solo a nivel mundial sino también en el plano local, la investigación básica, así como el desarrollo en nuevas tecnologías de cultivo de cannabis han mostrado un claro crecimiento en el ámbito científico-académico, como puede evidenciarse en la [Figura 1.1.4b](#) el crecimiento exponencial en los últimos años de manuscritos científicos que tratan sobre diversas investigaciones sobre este cultivo.

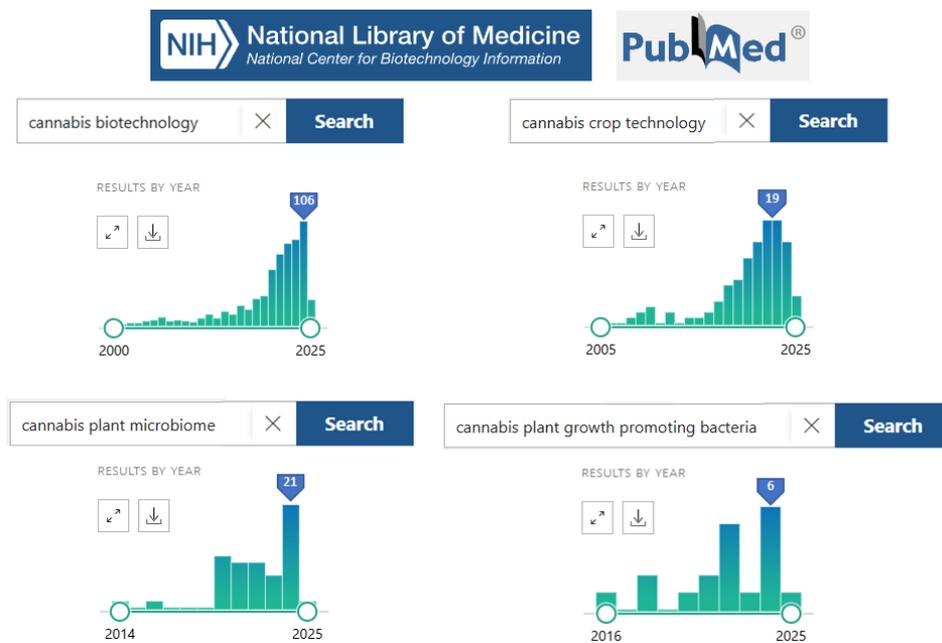


Figura 1.1.4b Búsqueda de bibliografía sobre diversos aspectos del cultivo de cannabis en la base de datos [PubMed](#) disponible en la página web del [National Center for Biotechnology Information \(NCBI\)](#). Fecha de búsqueda: 01/03/2025.

En este sentido, a continuación, se introduce a la temática de investigación que se desarrolló en este Trabajo Final de Laboratorio de Procesos Biotecnológicos: *la bioprospección de la diversidad bacteriana naturalmente asociada a las plantas de cannabis con énfasis en potenciales bacterias promotoras del crecimiento vegetal para su uso como bioinsumos en el cultivo de Cannabis sativa L.*

1.2 BIOPROSPECCIÓN BACTERIANA: I+D DE BIOINSUMOS AGRÍCOLAS

1.2.1 Holobionte vegetal y su fitomicrobiota

En la naturaleza, plantas y animales están asociados con diversos microorganismos tales como arqueas, bacterias, hongos y protistas (Rosenberg y Rosenberg et al., 2022). Los microorganismos han desarrollado mecanismos para colonizar y proliferar por sobre y dentro de estos hospederos. En la naturaleza, plantas y animales están asociados con diversos microorganismos tales como arqueas, bacterias, hongos y protistas (Rosenberg y Rosenberg et al., 2022). Los microorganismos han desarrollado mecanismos para colonizar y proliferar por sobre y dentro (endófitos) de estos hospederos gracias a su alta diversidad genética y metabólica, pudiendo establecer una amplia gama de interacciones beneficiosas, neutras o perjudiciales (Berg et al., 2020). Esto ha llevado a la generalización de los conceptos de *holobionte* –entidad funcional conformada por el hospedero multicelular y los microorganismos asociados– y *hologenoma* –la suma de la información genética del holobionte– (Rosenberg y Rosenberg et al., 2022). En cuanto al componente microbiano del holobionte se lo ha denominado con el término *microbiota*, y es considerado el conjunto de microorganismos que habitan un ambiente determinado. En el caso del holobionte vegetal, la microbiota asociada se denomina *fitomicrobiota*. Si bien las plantas han desarrollado sus propias estrategias para crecer, desarrollarse y sobrellevar los estreses bióticos y abióticos que deben superar en la naturaleza, han delegado a su *fitomicrobiota* ciertas funciones relacionadas con la nutrición y la salud vegetal (Lyu et al., 2021). Particularmente las bacterias benéficas han sido foco de estudio en las últimas décadas debido a su rol activo en el crecimiento vegetal, y se las denomina PGPB –del inglés *Plant Growth Promoting Bacteria*– (de-Bashan et al., 2020). Muchas de éstas juegan papeles cruciales en el crecimiento y la salud vegetal facilitando la absorción de nutrientes minerales, proporcionando una mayor tolerancia al estrés biótico y abiótico, e incluso pueden modular la producción de metabolitos secundarios vegetales. Estos efectos son el resultado de diversos mecanismos de promoción del crecimiento ([Figura 1.2.2a](#)), los cuales han sido clasificados como directos –liberación de sustancias

sintetizadas por los microorganismos o ayuda en el ingreso de nutrientes a las plantas desde el ambiente– e indirectos –disminuyen o previenen la acción de patógenos por producción de sustancias o por incrementar la resistencia natural del vegetal a diferentes situaciones de estrés (Glick et al., 2012).

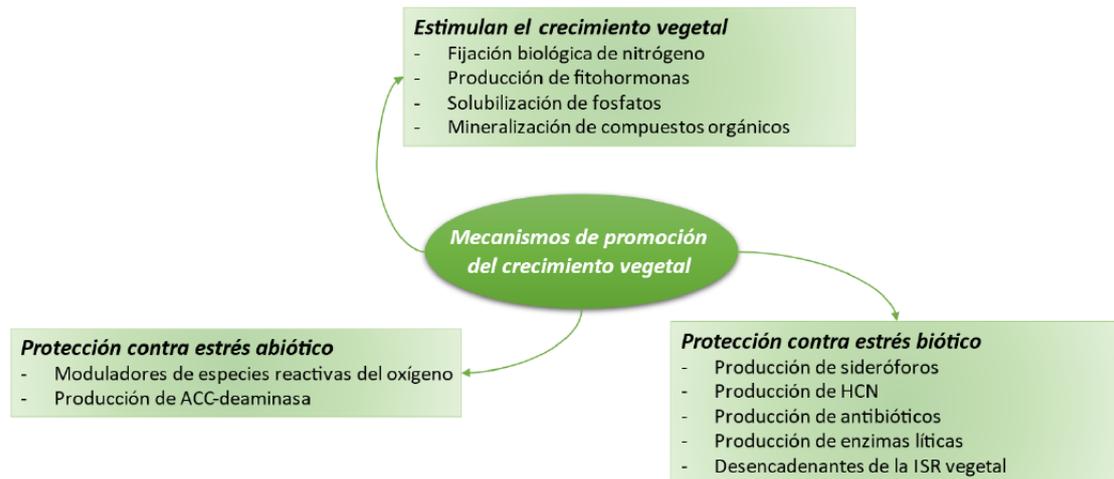


Figura 1.2.2a Mecanismos de acción de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Adaptada de Goswami et al., 2016.

Para el caso específico de cannabis, al ser un cultivo en auge reciente, la información sobre las comunidades bacterianas asociadas y su interacción es escasa en comparación con otras plantas. En la [Figura 1.2.2b](#) se muestran los principales géneros bacterianos asociados a diferentes cultivares de *C. sativa* utilizando métodos dependientes de cultivo, de acuerdo a lo reportado por Taghinasab et al., 2020 en un trabajo de revisión.

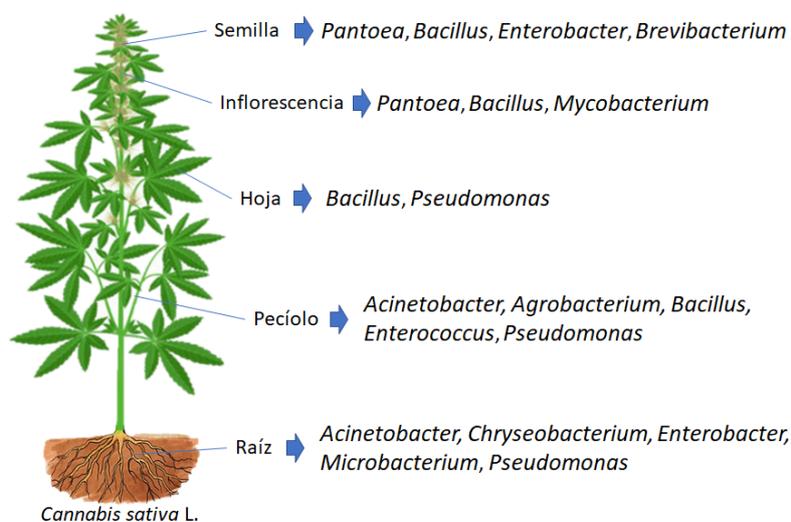


Figura 1.2.2b Principales géneros bacterianos asociados a los distintos microhábitats de diferentes cultivares de *C. sativa*. Adaptado de Taghinasab et al., 2020.

1.2.2 Bioinsumos agropecuarios

La revolución verde trajo consigo un aumento significativo en la productividad agrícola a través de la mejora genética de variedades de cultivos, pesticidas químicos y fertilizantes, pero este “éxito” fue acompañado por una disminución de la salud del suelo (Arif et al., 2020; Barros-Rodríguez et al., 2021; Meena et al., 2020) y todo su entorno (Murillo y Paliouff et al., 2021). La necesidad de producir grandes cantidades de alimentos ha llevado a emplear cada vez mayores cantidades de agroquímicos sintéticos para satisfacer esta demanda (Afridi et al., 2022; Singh y Trivedi et al., 2017).

Algunas características y consecuencias de estos sistemas agrícolas convencionales son:

- Uso poco racional de los suelos y del agua.
- Alteración del equilibrio dinámico de los ecosistemas terrestres y acuáticos con la consiguiente pérdida de biodiversidad.
- Acumulación y persistencia de residuos tóxicos en el ambiente y en los alimentos.
- Aumento de la salinidad del suelo y disminución de la materia orgánica.
- Aparición de patógenos resistentes y surgimiento de nuevas plagas.
- Eliminación de enemigos naturales y de microorganismos responsables de la degradación de la materia orgánica y del control biológico.

Según la [FAO \(2015\)](#), la agricultura será sustentable si satisface las necesidades de las generaciones actuales y futuras y, al mismo tiempo, garantiza la rentabilidad, la salud ambiental, y la equidad social y económica. Las acciones que pueden conducir a la sustentabilidad en sistemas agrícolas (Pretty et al., 2008) se centran en el desarrollo de tecnologías y prácticas agrícolas que:

- No tengan efectos adversos sobre el medio ambiente.
- Sean accesibles y eficaces para los agricultores.
- Mantengan o mejoren la productividad de alimentos inocuos reduciendo el uso de agroquímicos.
- Conserven o mejoren la biodiversidad (Barros-Rodríguez et al., 2021; de Graaff et al., 2019)

Estas nuevas estrategias agrícolas apuntan a reemplazar de manera gradual los productos de síntesis química por productos de origen orgánico, los que, a su vez, estimulan las actividades de los organismos beneficiosos que habitan el suelo (Mallory y Griffin et al., 2007). Dentro de esta gama de productos entran los llamados bioinsumos, que según la última resolución del SENASA, se denomina como **bioinsumo** a todo

producto que consista o haya sido producido por microorganismos o macroorganismos de origen animal o vegetal, extractos o compuestos bioactivos obtenidos a partir de ellos, y que estén destinados a ser aplicados como insumos en la producción agrícola con fines nutricionales, estimulación vegetal, enmiendas, sustratos, protectores biológicos o para la protección del cultivo. Este trabajo de investigación particularmente se centra en los bioinsumos a base de PGPB, herramientas biotecnológicas que son utilizadas en los cultivos agrícolas como biofertilizantes, fitoestimulantes y/o biocontroladores. Su uso se ha fomentado en Argentina en los últimos años y de acuerdo al Ministerio de Desarrollo Productivo de la Nación se considera necesaria más [investigación y desarrollo en esta temática](#).

1.2.3 Investigación y desarrollo de bioinsumos a base de PGPB

La bioprospección microbiana, definida como la exploración de la biodiversidad en la búsqueda sistemática de microorganismos completos y/o componentes naturales con posibles usos para beneficio del ser humano en diferentes sectores (industrial, alimentario, cosmético, farmacéutico, agropecuario) (Castree, 2003), comprende diversas tareas que pueden variar la metodología según el futuro uso biotecnológico del mismo. En lo que respecta a los bioinsumos bacterianos a base de PGPB para su uso en agricultura, dichas tareas se pueden resumir en los siguientes apartados (Figura 1.2.3a):



Figura 1.2.3a: se observan cada uno de los pasos para el desarrollo de bioinsumos a base de PGPB.

❖ Aislamiento de bacterias a partir de su microhábitat natural.

El aislamiento consiste en obtener un cultivo puro de un determinado microorganismo a partir de una muestra compleja, como puede ser un órgano vegetal que alberga numerosas poblaciones de microorganismos. Para esto, es condición necesaria brindar al microorganismo en cuestión todos los requerimientos para que pueda crecer y reproducirse: esto se logra a través del uso de medios de cultivo que incluyen diferentes tipos de fuentes de carbono, vitaminas, fuentes de energía, al igual que consideraciones sobre los factores fisicoquímicos que afectan el crecimiento, tales como temperatura, pH, requerimientos de oxígeno, salinidad, entre otros. La aplicación de estas técnicas, conocidas como **técnicas dependientes de cultivo** es esencial para disponer de cultivos de microorganismos puros, que permitan su caracterización genotípica y fenotípica, el estudio de la interacción planta-microorganismo, no sólo con fines ecológicos sino también de bioprospección (Porto de Souza Vandenberghe et al., 2017). Disponer de los microorganismos permite realizar cultivos que tienen el potencial de ser escalados para su producción y uso como bioinsumos microbianos. Otra de las ventajas asociadas a esta metodología reside en su bajo costo y en que el investigador cuenta con el “material microbiano” para su uso en futuros estudios. Una desventaja es que subestiman los valores de la diversidad microbiana ya que solo un pequeño porcentaje de los microorganismos pueden cultivarse en el laboratorio, mientras que el resto permanece no cultivable pero detectable por métodos moleculares.

❖ Caracterización in vitro y selección de PGPB

Una vez se dispone del material biológico puro para su estudio, se procede a la caracterización del mismo empleando pruebas bioquímicas, utilizando medios de cultivo selectivos para evaluar diferentes actividades enzimáticas o mecanismos de promoción del crecimiento vegetal, e incluso recurriendo a técnicas de biología molecular (independientes de cultivo, que consisten en aislar y estudiar determinadas biomoléculas como ADN o proteínas). Dependiendo el objetivo de la caracterización serán las pruebas a realizar en esta etapa: por ejemplo, utilizando medios de cultivo sin fuente nitrogenada para evaluar si el microorganismo es capaz de crecer fijando el nitrógeno atmosférico; o realizando un enfrentamiento en placa contra un hongo fitopatógeno para evaluar si tiene la capacidad de inhibir el crecimiento del mismo. También resulta relevante conocer la taxonomía asociada a los diferentes microorganismos aislados, por lo que se puede recurrir a diversas técnicas de estudios para realizar la asignación taxonómica (secuenciación del gen ARNr 16S en bacterias o ITS en hongos, utilización de MALDI-TOF, entre otras).

Finalizada la caracterización, se deberán revisar los resultados para tomar la decisión de

cuales aislamientos pueden llegar a tener potencial para continuar con los estudios de validación *in vivo* de las características observadas *in vitro*.

❖ Ensayos *in vivo* para validar el efecto promotor del crecimiento vegetal

Los aislamientos seleccionados son utilizados para ensayos *in vivo*, inicialmente en condiciones controladas de laboratorio, para luego pasar a una etapa en condiciones de campo. Para esto deberá idearse y ponerse a punto diferentes aspectos, por ejemplo, la forma y el momento en que se realiza la práctica de la inoculación del microorganismo. Además de evaluar el efecto de promoción del crecimiento sobre el cultivo de interés o el efecto de antagonismo contra determinado hongo fitopatógeno y/o plaga, en esta etapa es igual de importante estudiar la capacidad de sobrevivir y colonizar eficientemente el microhábitat donde se inocula el microorganismo en cuestión, así como el efecto que esta práctica tiene sobre las comunidades microbianas que naturalmente habitan esos microhábitats.

❖ Cultivos a pequeña escala y estudios fisiológicos. Escalado y Formulación.

Igual de importante a los rasgos PGPB de un microorganismo es la factibilidad de poder cultivarlo en condiciones que sean aplicables y reproducibles a nivel industrial. Para ello, en esta etapa se realiza un estudio detallado de su fisiología y se investiga las mejores condiciones para lograr un cultivo puro, con elevado recuento de células viables. Se evalúan las mejores condiciones para su escalado y cultivo en biorreactor a escala de producción, así como una formulación que asegure una sobrevivida en el envase durante el tiempo necesario hasta su utilización.

❖ Registro de producto en SENASA, liberación al mercado

En la etapa final del desarrollo de productos bioinsumos, previa a la liberación al mercado es obligatoria su inscripción y registro en el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA).

En el presente trabajo final de laboratorio de procesos biotecnológicos se aborda este esquema de investigación y desarrollo de bioinsumos bacterianos de aplicación agrícola, cubriendo las primeras etapas desde el aislamiento hasta la caracterización *in vitro* de rasgos PGPB, selección de cepas promisorias y evaluación en ensayos *in vivo* en condiciones controladas de laboratorio.

1.3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Bajo la hipótesis de que las plantas de *Cannabis sativa* L. son habitadas por diversas bacterias con capacidad de promover el crecimiento vegetal y ejercer actividad de biocontrol contra hongos fitopatógenos, las cuales pueden ser aisladas y caracterizadas para su uso biotecnológico como bioinsumos con acción biofertilizante, bioestimulante y/o biocontroladora de hongos fitopatógenos, es que se propone el siguiente objetivo de investigación:

→ **Objetivo General:**

Contribuir a la sustentabilidad del cultivo de *Cannabis sativa* L. mediante la caracterización de la biodiversidad de la microbiota bacteriana asociada a través del uso de técnicas dependientes de cultivo para la elaboración de bioinsumos bacterianos.

→ **Objetivos Específicos:**

1. **Aislar, identificar taxonómicamente y obtener una colección** de bacterias cultivables pertenecientes a la comunidad bacteriana asociada a *Cannabis sativa* L.
2. **Caracterizar *in vitro* los aislamientos bacterianos** en relación a sus capacidades de promoción del crecimiento vegetal.
3. **Seleccionar los aislamientos bacterianos con mayor potencial PGPB para ser utilizados como bioinsumos**, utilizando índices que permitan valorar la caracterización realizada en **B**.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS ASOCIADAS A PLANTAS DE CANNABIS

2.1.1- Toma de muestras a campo

El cultivo de cannabis del cual se obtuvieron las muestras de campo pertenece a la empresa ARCANNA S.A, ubicada en los alrededores de la localidad General Mansilla, partido de Magdalena, Argentina, quien lleva adelante un plan de fitomejoramiento genético en *Cannabis sativa* L. para uso medicinal.

Se tomaron a campo muestras de rizosfera, raíz, tallo, hojas e inflorescencias de 6 ejemplares pertenecientes a la genética Charlotte´s Angel (quimiotipo III, ratio CBD-THC= 18:1), Fenotipo N° 2 (Banco de Semillas Dutch Passion, Holanda), los cuales estaban en etapa de floración, crecidos bajo cubierta y con iluminación mixta (natural y artificial). El procedimiento consistió en descalzar cuidadosamente cada una de las plantas descartando el suelo menos adherido a las raíces, y se separó el sistema radical de la parte aérea cortando a nivel de cuello de la planta con tijera de poda previamente desinfectada con una solución de etanol 70% v/v (Figura 2.1.1a). Las raíces con la rizosfera (suelo íntimamente adherido) se guardaron en bolsas estériles separadas identificando cada ejemplar. Respecto a la parte aérea de las plantas recolectadas, se guardaron separadamente porciones de tallo, hojas enteras y las inflorescencias en frascos previamente esterilizados identificando cada ejemplar. Las distintas muestras se mantuvieron en conservadora con hielo hasta ser transportadas al Laboratorio de Microorganismos de Aplicación en Agricultura (MAALab) (CINDEFI – UNLP / CCT CONICET La Plata) y se procesaron inmediatamente tal como se detalla a continuación.

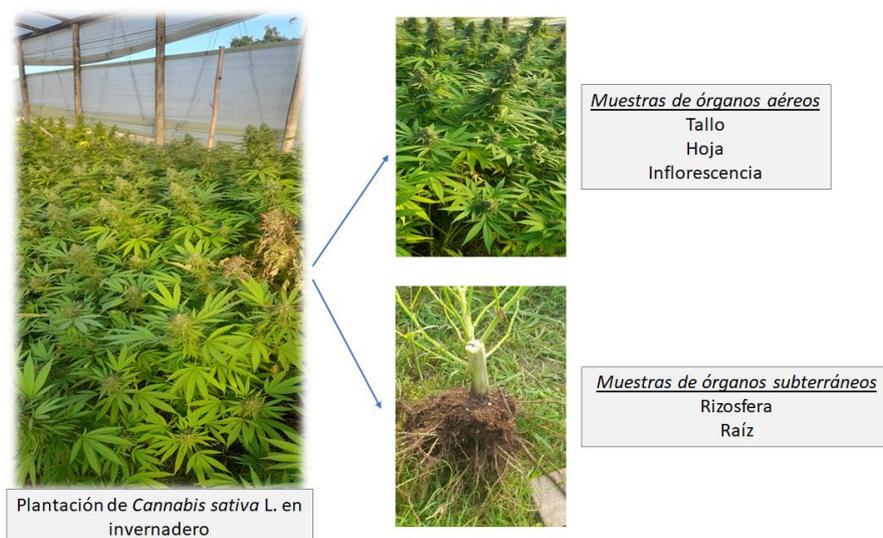


Figura 2.1.1a Cultivo de *Cannabis sativa* L. en invernadero y toma de muestras

2.1.2- Procesamiento de muestras de cannabis para el aislamiento de bacterias

Una vez en el laboratorio, las muestras fueron procesadas adaptando según fue necesario los protocolos descritos por Vio (2023). Todo el procesamiento se realizó en condiciones de esterilidad, en banco de flujo laminar y utilizando todo el material de laboratorio esterilizado en autoclave (121°C durante 15 min) y/o desinfectado con solución de etanol al 70% v/v.

En primera instancia, los distintos materiales muestreados de los 6 ejemplares de cannabis se combinaron arbitrariamente para dar origen a muestras compuestas de la siguiente forma (ver [Figura 2.1.2a](#)):

- Muestra compuesta 1: partes iguales de los ejemplares 1, 2 y 3 (rizosfera y tejidos vegetales)
- Muestra compuesta 2: partes iguales de los ejemplares 4, 5 y 6 (rizosfera y tejidos vegetales)
- Muestra compuesta 3: partes iguales de los ejemplares 1, 2, 3, 4, 5 y 6 (solo tejidos vegetales)

Las muestras compuestas 1 y 2, se utilizaron para aislar separadamente bacterias de la rizosfera y de la endosfera de los distintos órganos vegetales colectados (raíz, tallo, hoja, inflorescencia).

La muestra compuesta 3 se utilizó para aislar las bacterias totales (superficiales y endófitas) de los diferentes órganos vegetales colectados.

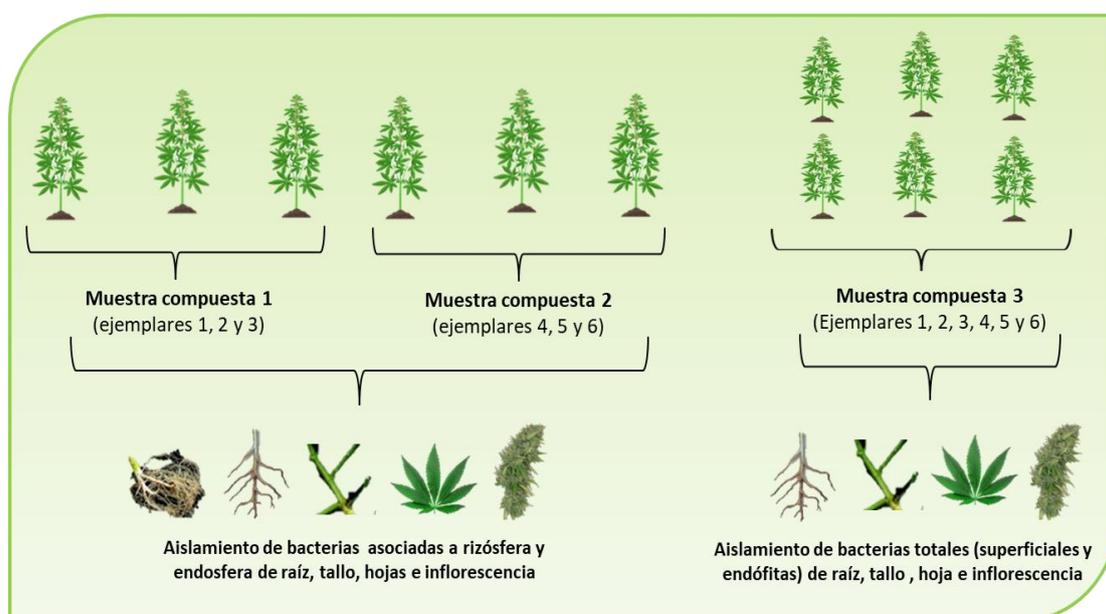


Figura 2.1.2a: Construcción de muestras compuestas para su posterior procesamiento en laboratorio.

El procesamiento de las distintas muestras se describe a continuación y se resume esquemáticamente en la [Figura 2.1.2b](#):

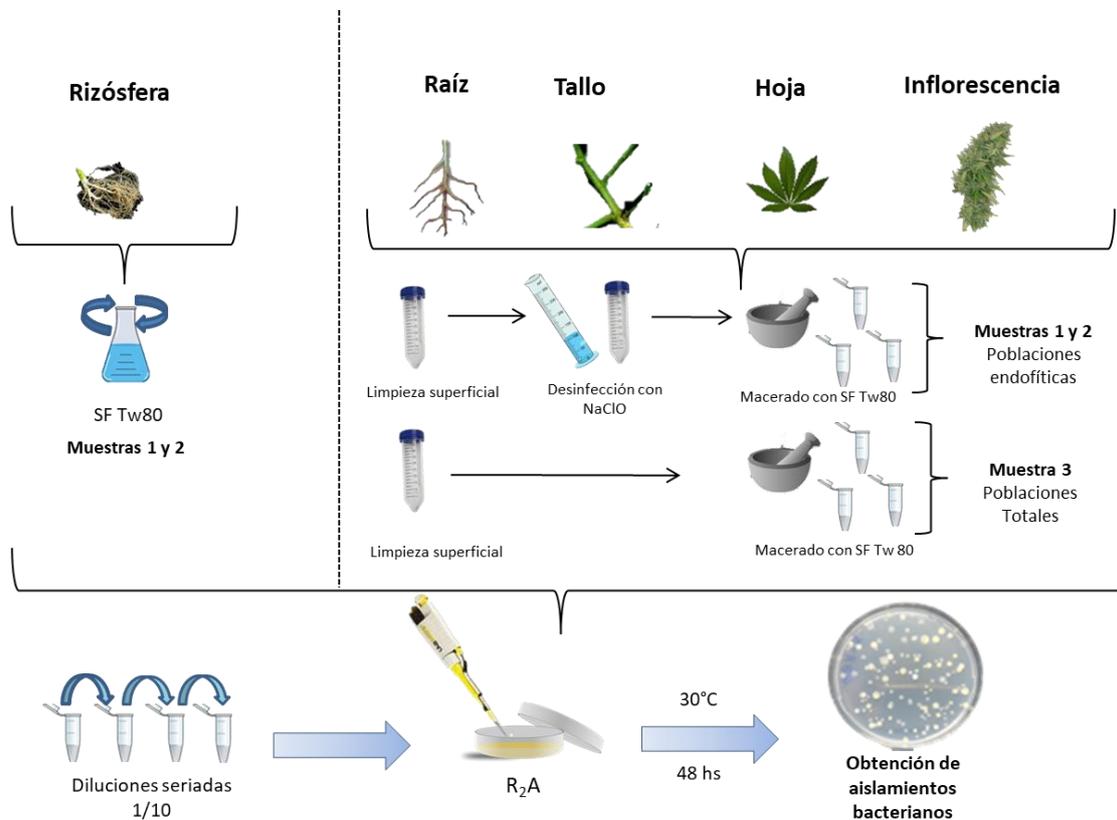


Figura 2.1.2b: Procesamiento de las muestras para obtención de aislamientos bacterianos superficiales y endófitos.

→ **RIZOSFERA:** Para obtener el suelo rizosférico de cada ejemplar, se tomó el sistema radical completo y se agitó en la bolsa estéril en la cual se transportó. El suelo desprendido de las raíces se utilizó para confeccionar las muestras compuestas 1 y 2 tal como se describió previamente. De cada una de las muestras compuestas 1 y 2, se tomó 10 gr de suelo rizosférico y se mezcló en erlenmeyer con 90 ml de solución fisiológica con tween80 0,1% v/v previamente esterilizada, y se agitó a 160 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente ([Figura 2.1.2c](#)). Luego se realizaron diluciones seriadas (la primera a razón de 1 ml del extracto en 9 ml de solución fisiológica y las siguientes utilizando 100 µl de la dilución anterior en 900 µl de solución fisiológica). Se plaqueó por duplicado 100 µl de varias diluciones seriadas en placas de petri con medio de cultivo específico para aislamiento de heterótrofos (R₂A, ver composición de medios de cultivo en [ANEXO 5](#)).



Figura 2.1.2c: Izquierda: pesaje de suelo rizosférico. Derecha: suspensión de 10 g de rizosfera en 90 ml de solución fisiológica con tween80 0,1% v/v.

→ **RAÍZ:** Luego de extraer la rizosfera, las raíces de las distintas muestras compuestas se cortaron en trozos de 4-5 cm y se pusieron en tubos de 50 ml previamente esterilizados. Luego, se sometieron a 2 lavados enérgicos con agua destilada estéril de dos minutos cada uno, y un tercer lavado de 1 minuto con solución fisiológica con tween80 0,1% v/v, agitándose manualmente. Posteriormente se secaron las raíces en papel absorbente y se realizó el pesaje de las muestras radicales limpias (sin suelo rizosférico) (Figura 2.1.2d). Luego, las muestras compuestas se procesaron con un protocolo diferencial según sea para aislamiento de bacterias endófitas o totales:

- **Aislamiento de bacterias endófitas:** las raíces de las muestras compuestas 1 y 2 se desinfectaron superficialmente utilizando una solución de NaClO (46 g L⁻¹) al 12% v/v durante 10 minutos en agitación manual, con el fin de eliminar las poblaciones bacterianas superficiales y quedarnos únicamente con las poblaciones bacterianas endófitas. Posterior a la desinfección, los tejidos fueron sometidos a dos lavados de 2 minutos cada uno con agua destilada estéril para eliminar los restos de desinfectante. Se realizaron controles del protocolo de desinfección sembrando el agua del último lavado en placa de petri con medio de cultivo R₂A, y cuando resultó necesario se realizó un ajuste de los parámetros (concentración de NaClO y/o tiempo de desinfección).
- **Aislamiento de bacterias totales:** las raíces de la muestra compuesta 3 se sometieron a 1 lavado de 2 minutos con agua destilada estéril, agitándose manualmente.

Posteriormente, las raíces (tanto desinfectadas como no desinfectadas superficialmente por separado) se cortaron en pequeños trozos con un bisturí desinfectado para luego ser maceradas en mortero desinfectado utilizando 3 ml de solución fisiológica con tween80 0,1% v/v para resuspender el material vegetal desintegrado (Figura 2.1.2d). Con el macerado obtenido se realizaron diluciones seriadas y se plaqueó por duplicado 100 μ l de diferentes diluciones en placas de petri con medio de cultivo R₂A.



Figura 2.1.2d: Izquierda: muestras compuestas posterior a su limpieza superficial y pesaje. Derecha: tejidos macerados.

→ **TALLO.** Cada muestra compuesta se conformó con un trozo de tallo de 5 cm de cada ejemplar correspondiente. Los tallos se dispusieron en tubos de 50 ml previamente esterilizados y se sometieron a dos lavados de 2 minutos cada uno con agua destilada estéril, y un tercer lavado con solución fisiológica con tween80 0,1% v/v de 2 minutos, agitándose manualmente. Posteriormente se secaron los trozos de tallo en papel absorbente y se realizó el pesaje de las muestras (Figura 2.1.2e).

De igual forma que se describió para el procesamiento de las raíces, para el aislamiento de bacterias endófitas se utilizaron las muestras compuestas de tallo 1 y 2, cuyo material se desinfectó superficialmente utilizando una solución de NaClO (46 g L⁻¹) al 12% v/v durante 5 minutos en agitación manual, y luego se sucedieron 2 lavados con agua destilada estéril de 2 minutos cada uno para remover los restos de desinfectante. Se realizaron los mismos controles de desinfección descritos para la raíz. Por otro lado, la muestra compuesta número 3 se empleó para el aislamiento de bacterias totales, por lo que únicamente se

sometió a un lavado de 2 minutos con agua destilada estéril, agitándose manualmente.

Posteriormente, las muestras de tallo (tanto las desinfectadas, como las no desinfectadas superficialmente por separado), se cortaron en pequeñas porciones con bisturí desinfectado para facilitar el macerado de los mismos en mortero desinfectado (Figura 2.1.2e). Para la re suspensión de los tejidos vegetales macerados se utilizaron 3 ml solución fisiológica con tween80 0,1% v/v previamente esterilizada. Se plaquearon por duplicado 100 μ l del extracto sin diluir y varias diluciones en placas de petri con medio de cultivo R₂A.

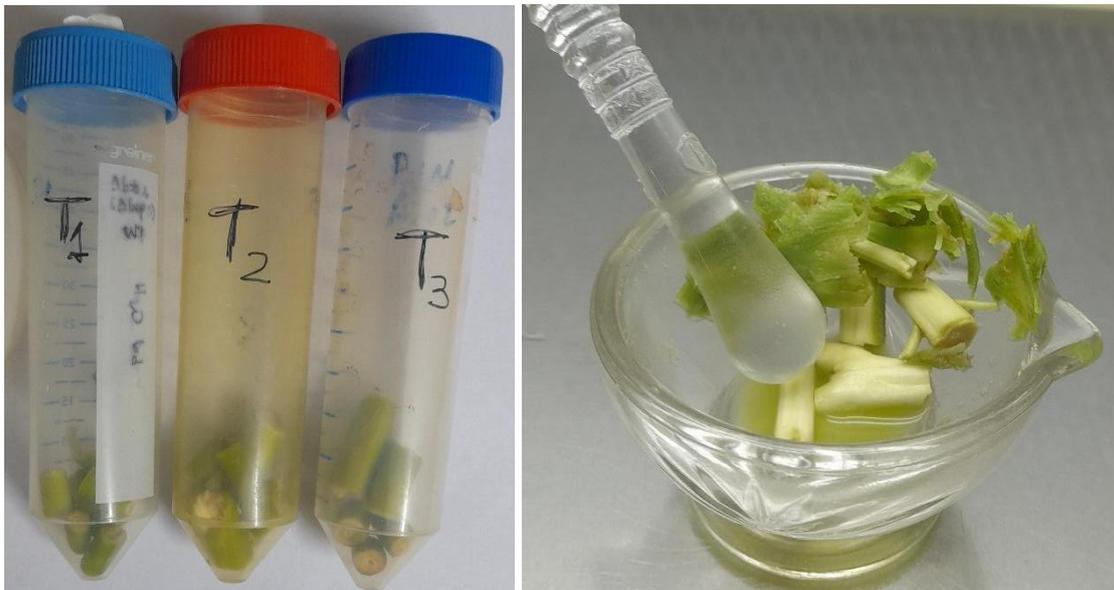


Figura 2.1.2e: Izquierda: muestras compuestas posterior a su limpieza superficial y pesaje. Derecha: Obtención del macerado.

→ **HOJAS:** Cada muestra compuesta se conformó con una hoja de cada ejemplar correspondiente. El material vegetal se dispuso en tubos de 50 ml previamente esterilizado y se sometió a dos lavados de 2 minutos cada uno con agua destilada estéril, y un tercer lavado con solución fisiológica con tween80 0,1% v/v de 2 minutos, agitándose manualmente. Posteriormente, el material vegetal se secó con papel absorbente y se realizó el pesaje de las muestras (Figura 2.1.2f).

De igual forma que se describió previamente para raíz y tallo, para el aislamiento de bacterias endófitas se utilizaron las muestras compuestas de hoja 1 y 2, cuyo material se desinfectó superficialmente utilizando una solución de NaClO (46 g L⁻¹) al 12% v/v durante 8 minutos en agitación manual, y luego se sucedieron 2

lavados con agua destilada estéril de 2 minutos cada uno para remover los restos de desinfectante. Se realizaron los mismos controles de desinfección descritos para la raíz. Por otro lado, la muestra compuesta número 3 se empleó para el aislamiento de bacterias totales, por lo que únicamente se sometió a un lavado de 2 minutos con agua destilada estéril, agitándose manualmente.

Posteriormente, las muestras de hoja (tanto las desinfectadas, como las no desinfectadas superficialmente por separado), se cortaron en pequeñas porciones con bisturí desinfectado para facilitar el macerado de los mismos en mortero desinfectado (Figura 2.1.2f). Para la re suspensión de los tejidos vegetales macerados se utilizaron 2 ml solución fisiológica con tween80 0,1% v/v previamente esterilizada. Se plaquearon por duplicado 100 μ l del extracto sin diluir y varias diluciones en placas de petri con medio de cultivo R₂A.



Figura 2.1.2f: Izquierda: muestras compuestas previo a su limpieza superficial y pesaje. Derecha: Obtención del macerado.

→ **INFLORESCENCIA:** Cada muestra compuesta de inflorescencias de cannabis se conformó con dos trozos de inflorescencia de cada ejemplar correspondiente. El material vegetal se dispuso en tubos de 50 ml previamente esterilizado y se sometió a dos lavados de 2 minutos cada uno con agua destilada estéril, y un tercer lavado con solución fisiológica con tween80 0,1% v/v de 2 minutos, agitándose manualmente. Posteriormente, el material vegetal se secó con papel absorbente y se realizó el pesaje de las muestras (Figura 2.1.2g).

De igual forma que se describió previamente para raíz, tallo y hoja, para el aislamiento de bacterias endófitas se utilizaron las muestras compuestas de inflorescencias 1 y 2, cuyo material se desinfectó superficialmente utilizando una

solución de NaClO (46 g L^{-1}) al 12% v/v agitando manualmente durante 8 minutos. A continuación, se realizaron 2 lavados con agua destilada estéril de 2 minutos cada uno para remover los restos de desinfectante. Se realizaron los mismos controles de desinfección descritos para la raíz. Por otro lado, la muestra compuesta número 3 se empleó para el aislamiento de bacterias totales, por lo que únicamente se sometió a un lavado de 2 minutos con agua destilada estéril, agitándose manualmente.

Posteriormente, las muestras de flores (tanto las desinfectadas, como las no desinfectadas superficialmente por separado), se cortaron en pequeñas porciones con bisturí desinfectado para facilitar el macerado de los mismos en mortero desinfectado (Figura 2.1.2g). Para la re suspensión de los tejidos vegetales macerados se utilizaron 2 ml solución fisiológica con tween80 0,1% v/v previamente esterilizada. Se plaquearon por duplicado 100 μl del extracto sin diluir y varias diluciones en placas de petri con medio de cultivo R₂A.

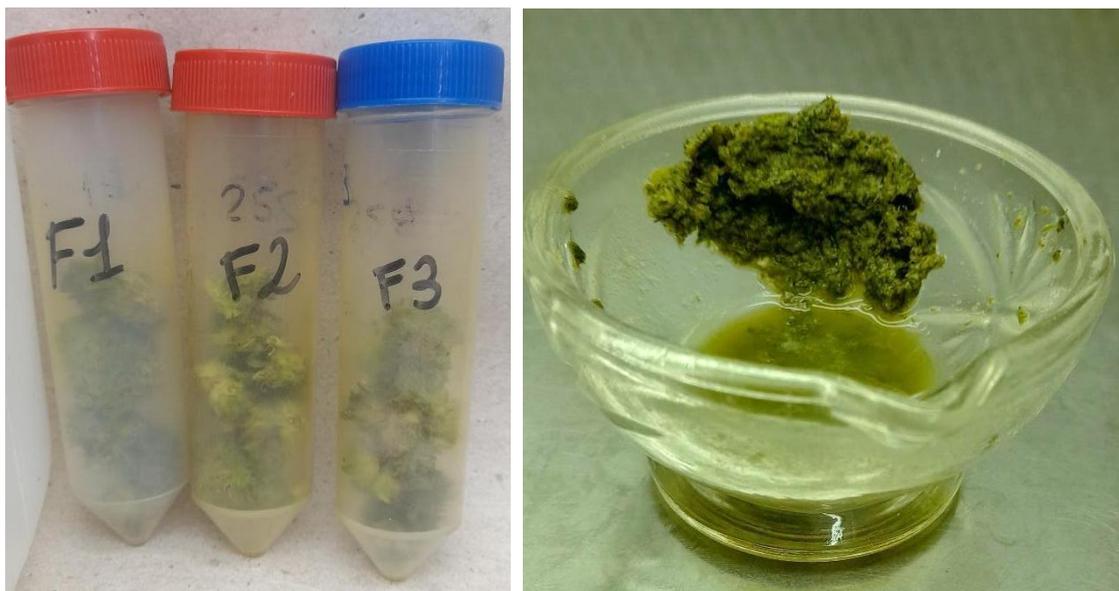


Figura 2.1.2g: Izquierda: muestras compuestas posterior a su limpieza superficial y pesaje. Derecha: Obtención del macerado.

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento y mantenimiento de los aislamientos fue el R₂A (Reasoner y Geldreich, 1985), un medio de cultivo complejo muy utilizado para aislamientos de heterótrofos, dada su amplia variedad de fuente de carbono y nitrógeno utilizadas, así como la presencia de diferentes vitaminas y aminoácidos. Todas las placas de petri sembradas se llevaron a estufa a 30°C donde se incubaron en oscuridad por 48 horas. Luego de ese período, se realizó el conteo de colonias y el cálculo de las

unidades formadoras de colonia por gramo de cada una de las muestras (expresado en unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de tejido) y, posteriormente se seleccionaron los aislamientos para conformar la colección de aislamientos bacterianos asociados a plantas de cannabis.

2.1.3 Recuento poblacional, criterio de selección de aislamientos bacterianos y mantenimiento de la colección

Luego de transcurridas las 48 h de cultivo a 30°C y en oscuridad de las placas de petri donde se sembraron las diluciones de las distintas muestras obtenidas de cada uno de los tejidos vegetales y de rizosfera, se realizó el conteo de colonias que crecieron en cada una de las placas y se calculó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de muestra, utilizando la siguiente fórmula:

$$UFC\ g^{-1} = \frac{n^{\circ}\ colonias\ (UFC) \times 10^{(n^{\circ}\ diluciones)} \times (Volumen\ inicial \times 10)}{Peso\ de\ muestra\ (g)}$$

Donde:

N° diluciones: número de dilución utilizado para sembrar en la placa

Volumen inicial: volumen en ml de solución fisiológica agregado a la muestra inicial para resuspender la muestra

Empleando las mismas placas de petri, se identificaron macroscópicamente diferentes morfotipos de colonias bacterianas en base a la apariencia, color, borde, brillo, forma, etc., (Afzal et al 2015) con el objetivo de aislar la mayor diversidad bacteriana posible presente en cada microhábitat (rizosfera, raíz, tallo, hoja y flor). Para esto, se agruparon las placas de petri por microhábitat y en base a caracterización visual de los morfotipos se fueron seleccionando todas las colonias bacterianas que presentaban características distintivas respecto al resto, descartando el aislamiento de morfotipos en apariencia similares que puedan haber crecido en una placa distinta correspondiente a dicho microhábitat.

Los diferentes morfotipos se identificaron según el siguiente código alfanumérico, indicando el microhábitat de aislamiento y n° de morfotipo (Figura 2.1.3a):

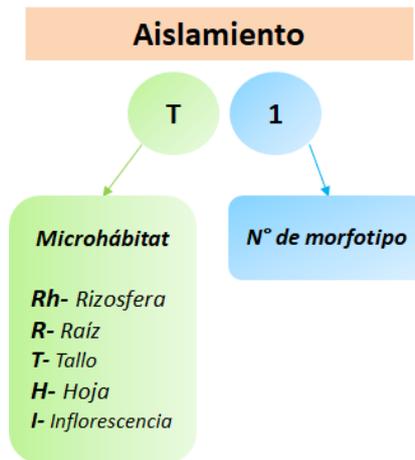


Figura 2.1.3a: Nomenclatura utilizada para identificar a los diferentes morfotipos especificando el microhábitat de aislamiento y n° de morfotipo.

Los distintos morfotipos seleccionados se re-aislaron mediante la técnica de agotamiento en estría en placas de petri empleando el mismo medio de cultivo, separándose en colonias aisladas para asegurar que se trate de una única morfología de colonia. A partir de una colonia aislada de cada morfotipo se hizo un crecimiento en placa de petri con medio de cultivo R₂A y se guardó por duplicado la biomasa bacteriana en tubos de 1,2 ml con medio de cultivo R₂A líquido con glicerol 20% v/v a -80°C (este protocolo se observa en la siguiente [Figura 2.1.3b](#)). Los repiques para su posterior caracterización y su uso en distintos ensayos se realizaron en placas de petri con medio de cultivo R₂A.

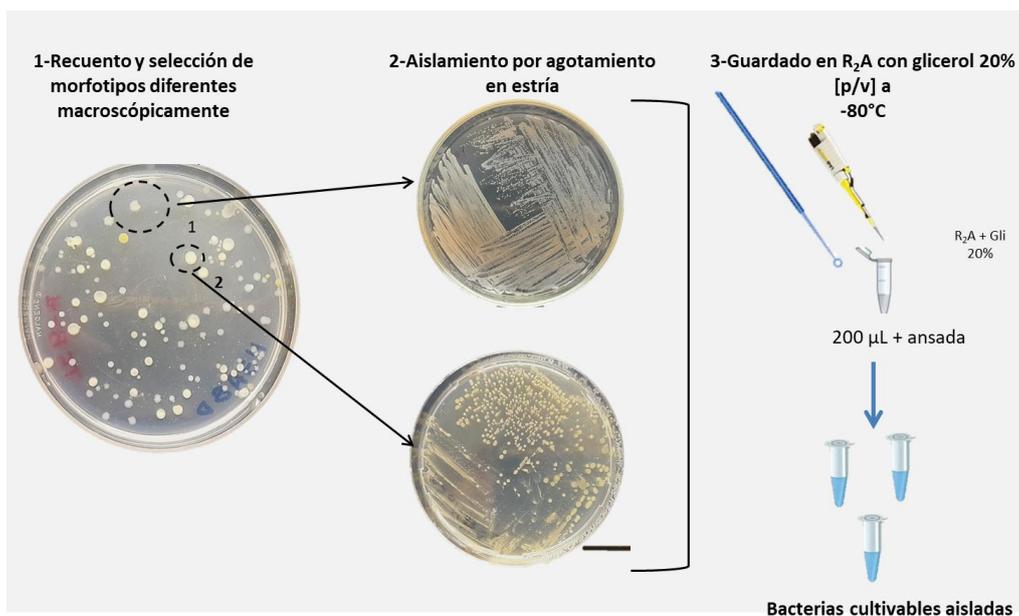


Figura 2.1.3b: Método de selección y aislamiento de morfotipos bacterianos, y mantenimiento de la colección de aislamientos seleccionados.

2.2 ASIGNACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE 16S rDNA.

La identificación taxonómica de los aislamientos bacterianos de la colección se realizó mediante secuenciación parcial del gen ARNr 16S y comparación de los resultados con la base de datos del [NCBI](#).

Para esto, se realizaron extracciones de ADN bacteriano a partir de una colonia aislada para cada uno de los aislamientos obtenidos de rizosfera, raíz, tallo, hoja y flor, mediante el siguiente protocolo (Vio, 2023):

1. Tomar con ansa una colonia aislada crecida durante 48h en placa de petri y depositarla en un tubo de 1,2 ml limpio y estéril.
2. Agregar 500 μ l de NaCl 1M, agitar en vórtex durante 30 seg, centrifugar por 2 min y descartar el sobrenadante. Repetir esta secuencia de pasos 3 veces.
3. Agregar 1 ml de agua bidestilada estéril, agitar en vórtex durante 30 seg y centrifugar durante 2 min. Descartar el sobrenadante.
4. Agregar 200 μ l de agua bidestilada estéril y agitar en vórtex durante 30 seg. Poner en baño de agua a 100°C durante 6-7 min. Centrifugar durante 2 min y pasar el sobrenadante (con el ADN bacteriano) a un nuevo tubo limpio y estéril. Guardar a -20°C hasta su uso.

Cada una de las extracciones de ADN obtenidas se midieron por espectrofotometría en equipo Nanodrop y se estimó la concentración de ADN ($\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$) y la pureza del mismo al obtener la relación de absorbancia 260/280 (las bases aromáticas de la estructura del ADN -purinas y pirimidinas- presentan un pico de absorbancia a 260 nm, mientras que la absorbancia a 280 nm estima el contenido de contaminantes como proteínas y compuestos fenólicos). Las muestras con ADN relativamente puro presentan un valor de A260/280 entre 1,8 y 2,0.

Las extracciones de ADN se enviaron a secuenciar a MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur), utilizando el primer 27F – 907R para amplificar en sentido forward la región V3-V7 del gen ARNr 16S. Los datos de secuenciación se procesaron con el programa bioinformático BioEdit versión 7.2 para evaluar la calidad de la secuenciación, cortar los extremos de baja calidad y quitar las secuencias de primers. Las secuencias obtenidas se contrastaron con la base de datos del NCBI mediante la herramienta [BLASTN](#) para determinar a qué grupo taxonómico bacteriano se asemeja con un mayor porcentaje de identidad.

2.3 CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS ASOCIADOS A CANNABIS.

2.3.1 Caracterización de enzimas líticas asociadas a la colonización vegetal. Cálculo de índice ICEC.

Los aislamientos bacterianos de la colección se caracterizaron mediante ensayos *in vitro* específicos para determinar la capacidad potencial de colonizar órganos vegetales a través de la producción de enzimas líticas involucradas en dicho proceso. Para esto, se realizaron ensayos *in vitro* en placas de petri con medios de cultivo específicos para determinar en los diferentes aislamientos la producción cualitativa de dos enzimas líticas extracelulares involucradas en mecanismos de colonización vegetal. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, obteniéndose un resultado positivo/negativo para cada determinación, los cuales se utilizaron posteriormente para el cálculo del **Índice de Caracterización Enzimática de Colonización (ICEC)** (Vio, 2023).

- Determinación de celulasas

Estas enzimas hidrolizan las moléculas de celulosa a unidades de glucosa. Para la determinación se utilizó un medio de cultivo conteniendo carboximetilcelulosa (CMC) como fuente de carbono (Ver composición del medio de cultivo en [ANEXO 5](#)). Se inocularon los distintos aislamientos bacterianos en las placas, por duplicado, y se incubaron en oscuridad a 30°C durante 5 días. Finalmente, para obtener los resultados de la determinación se reveló la placa mediante el agregado de solución de iodo/ioduro (I_2/I^- = 1 g de I_2 + 6 g de IK + 330 ml de agua) p/v. Una vez absorbido completamente, se consideró como bacteria productora de celulasas (resultado positivo) a aquellas que mostraron un halo decolorado alrededor de su colonia; el resultado negativo por el contrario se observó en aquellas bacterias donde la CMC no fue degradada y absorbió la solución I_2/I^- y el medio de cultivo se tornó de color violáceo.

- Determinación de pectinasas

Son enzimas responsables de la hidrólisis de la pectina, principal componente responsable de cementar las células vegetales y posibilitar la estructuración. Para la determinación se utilizó un medio de cultivo con pectina como fuente de carbono, el cual se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se dispuso en placas de petri (ver composición del medio de cultivo en el [ANEXO 5](#)). Las placas se inocularon con los diferentes aislamientos bacterianos, por duplicado, y se incubaron en oscuridad a 30°C durante 5 días. Luego de este período, las placas se revelan mediante el agregado de

solución de yodo/ioduro ($I_2/I^- = 1 \text{ g de } I_2 + 6 \text{ g de IK} + 330 \text{ ml de agua}$). El yodo reacciona con la pectina del medio de cultivo formando un complejo de color café. El resultado positivo se evidencia mediante una zona decolorada alrededor de la colonia de aquellos aislamientos bacterianos que producen y liberan extracelularmente estas enzimas.

Con los resultados de los ensayos cualitativos de caracterización enzimática con implicancias en la colonización vegetal se calculó el **Índice de Caracterización Enzimática de Colonización (ICEC)** para cada aislamiento bacteriano, utilizando la siguiente ecuación:

$$ICEC_j = \frac{\sum a_{jk}}{n}$$

Donde:

a representa el resultado (negativo = 0; positivo = 1) del aislamiento **j** para la caracterización enzimática **k** (celulasa/pectinasa).

n representa el número de actividades enzimáticas determinadas (Si el aislamiento no creció en el medio de cultivo de la determinación en placa, se considera como no evaluado y no contribuye al valor de **n**).

2.3.2 Caracterización *in vitro* de mecanismos de promoción del crecimiento vegetal. Cálculo de índice IMPCV.

Los distintos aislamientos bacterianos de la colección se caracterizaron mediante ensayos *in vitro* específicos para determinar la capacidad de solubilizar fosfatos insolubles y/o fijar biológicamente el nitrógeno atmosférico. Con estos resultados se calcularon índices para comparar y seleccionar entre los distintos aislamientos a los más promisorios que puedan actuar como promotores del crecimiento vegetal (Vio, 2023).

- Solubilización de compuestos insolubles de fósforo

En un principio, se realizó la determinación cualitativa para identificar aquellos aislamientos bacterianos capaces de solubilizar compuestos insolubles de fósforo. El ensayo se realizó en placas de petri, por duplicado para cada aislamiento, utilizando el medio de cultivo denominado NBRIP, con fosfato tricálcico $Ca_3(PO_4)_2$ (Nautiyal, 1999), (ver composición de los medios de cultivo en [ANEXO 5](#)). Este medio de cultivo se visualiza blanquecino debido al fosfato tricálcico precipitado. Los diferentes aislamientos se inocularon en cada placa con un ansa en anilla a partir de un crecimiento en medio

de cultivo R₂A sólido y se mantuvieron en oscuridad a 30°C durante 5 días. Se consideró como resultado positivo a aquellos aislamientos que evidencien la formación de un halo transparente alrededor de su colonia, lo cual significa la solubilización del Ca₃(PO₄)₂ blanquecino. Por el contrario, se consideró un resultado negativo aquellos sin presencia de halo transparente. Los resultados positivos se diferenciaron visualmente en 3 categorías:

- “+”: halo de solubilización coincidente con el halo de crecimiento de la colonia (radio del halo igual al radio de la colonia)
- “++”: halo de solubilización poco mayor al halo de crecimiento de la colonia (radio del halo igual o menor a dos veces el radio de la colonia)
- “+++”: halo de solubilización mucho mayor al halo de crecimiento de la colonia (radio del halo mayor a dos veces el halo de la colonia).

Los aislamientos bacterianos con resultado “++” y “+++” se seleccionaron para realizar los ensayos cuantitativos en placa, utilizando el mismo medio de cultivo. Para estos ensayos, se procedió de la siguiente forma (este protocolo se observa en la siguiente [Figura 2.3.2a](#)):

1. Obtención de cultivos líquidos. Se cultivaron los aislamientos seleccionados en medio de cultivo R₂A líquido en erlenmeyers durante 48 horas a 30°C y agitación a 150 rpm.
2. Ajuste de la densidad óptica (DO). Se normalizaron todos los cultivos a una DO de 0,2. Para esto se midió en espectrofotómetro a longitud de onda de 560 nm la DO del cultivo de 48. Posteriormente se centrifugó y se resuspendió en el volumen calculado de solución fisiológica estéril según la ecuación:

$$Vol_{inicial} \times DO_{inicial} = Vol_{final} \times DO_{final}$$

3. Inoculación de las placas de petri. Se inoculó una gota de 20 µl de cada aislamiento en el centro de una placa de petri (por duplicado).
4. Incubación y lectura de resultados. Las placas se incubaron en oscuridad a 30°C por 120 h. Luego, se confirmó la presencia de un halo de solubilización alrededor de la colonia y se midió en cada placa el diámetro de la colonia (**D_c**) y el diámetro del halo de solubilización (**D_h**).

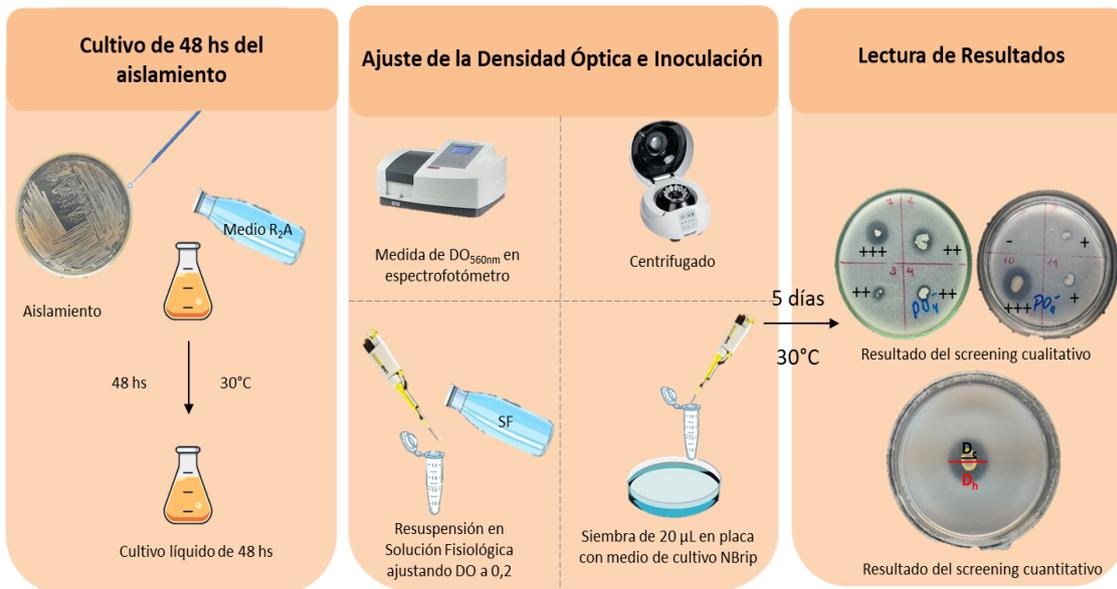


Figura 2.3.2a: Determinación cuali-cuantitativa de la capacidad de solubilizar fuente de fósforo insoluble.

Con el objetivo de comparar la capacidad solubilizadora de los diferentes aislamientos se calculó la **Eficiencia de Solubilización de Fósforo Insoluble (ESFI)** (modificado de Cisneros et al., 2017) en medio sólido, de acuerdo con la expresión:

$$ESFI_j = \frac{D_h - D_c}{D_c}$$

Donde:

D_c : diámetro de la colonia (mm). Promedio de los duplicados.

D_h : diámetro del halo de solubilización (mm). Promedio de los duplicados.

A Los aislamientos bacterianos con determinación cualitativa “+” se les asignó un valor de $ESFI = 0,10$.

El índice ESFI determina cuán grande es el halo solubilizador en referencia al crecimiento de su colonia, pudiendo obtener valores mayores que 1 en bacterias con gran capacidad de solubilizar fósforo. Para normalizar este índice a un rango entre 0-1, se calculó el índice de solubilización de fósforo (ISolP):

$$ISolP = \frac{ESFI_j}{ESFI_{m\acute{a}xima}}$$

- Fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBN)

Se realizó la determinación *in vitro* de la capacidad de FBN a través de la detección de crecimiento microbiano en medios de cultivo semisólidos sin contenido de fuente nitrogenada: LGI y NFb (Baldani et al., 2014).

Los medios de cultivo LGI y NFb semisólidos (ver composición de los medios de cultivo en ANEXO 5), se depositaron en frascos de 20 ml. Cada uno de los aislamientos, por duplicado, se inocularon con un ansa en punta en cada frasco conteniendo los distintos medios de cultivo semisólido y se incubó en oscuridad a 30°C durante 10 días. Luego de este tiempo registraron los resultados: se consideró resultado positivo a aquellos aislamientos que mostraron turbidez en la zona de inoculación en al menos uno de los medios de cultivo utilizados, evidenciando la capacidad de crecer utilizando el nitrógeno atmosférico como fuente de nitrógeno, asignando el valor 1 al índice FBN. Por el contrario, aquellos aislamientos que no mostraron una película de crecimiento en ninguno de los medios de cultivos utilizados se consideraron negativos, sin actividad de fijación biológica del nitrógeno, siendo FBN = 0. (El protocolo para este ensayo se observa en la Figura 2.3.2b)

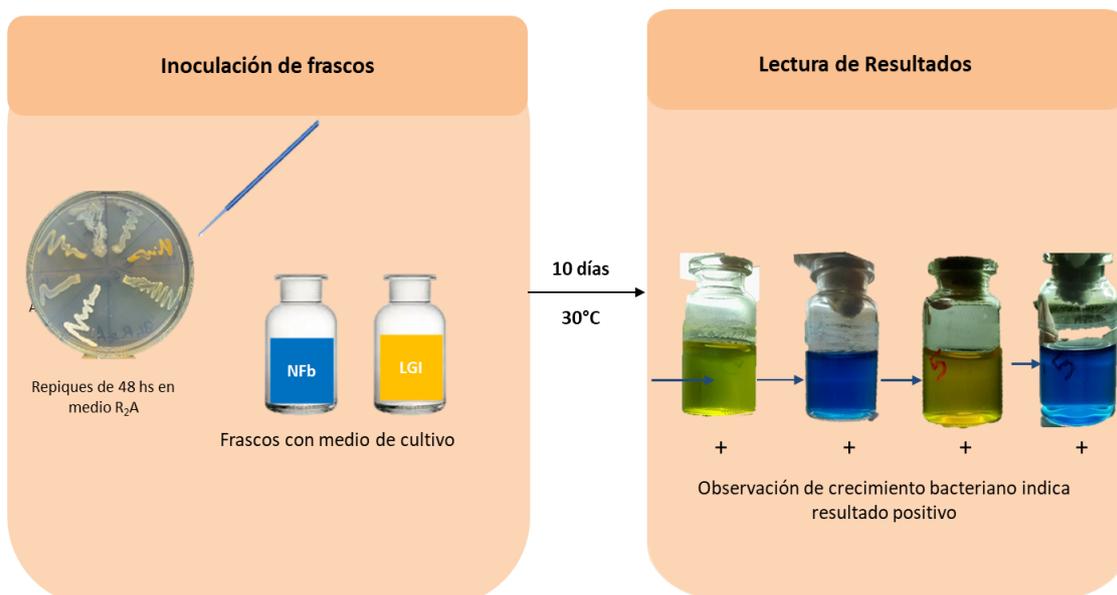


Figura 2.3.2b: Determinación cualitativa de la capacidad de fijar biológicamente el nitrógeno atmosférico.

Con los resultados de estas dos caracterizaciones *in vitro* (ISoIP y FBN) se calculó el Índice de mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (IMPCV), utilizando la siguiente ecuación matemática (Vio, 2023):

$$IMPCV_j = \frac{ISolP_j + FBN_j}{2}$$

Donde:

ISolP_j representa el valor del índice de solubilización de fósforo del aislamiento j.

FBN_j representa el resultado de la caracterización sobre la fijación biológica del nitrógeno del aislamiento j.

2.3.3 Determinación del potencial de biocontrol

Los aislamientos bacterianos se caracterizaron mediante ensayos *in vitro* específicos para determinar cualitativamente la capacidad de liberar al medio enzimas líticas que puedan intervenir en interacciones antagonistas bacteria-fitopatógeno. También se realizaron diferentes ensayos duales bacteria-fitopatógeno en placa de petri para determinar cuali-cuantitativamente su efecto antagonista contra 4 hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata* #25031 de la colección del Instituto de Investigación Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA); *Botrytis cinerea* LPSC-8, *Fusarium oxysporum* LPSC-1017, y *Sclerotinia sclerotiorum* LPS-28138, gentilmente cedidos por el Instituto de Botánica Carlos Spegazzini (La Plata, Argentina).

2.3.3.1 Determinación de enzimas líticas de efecto antagonista. Cálculo de índice ICEA.

Se realizaron ensayos *in vitro* en placas de petri con medios de cultivo específicos para determinar cualitativamente en los aislamientos bacterianos la producción de diferentes enzimas líticas extracelulares involucradas en interacciones antagonistas (Tariq et al., 2017). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, obteniéndose un resultado positivo/negativo para cada determinación, los cuales se utilizaron para el cálculo del Índice de Caracterización Enzimática Antagonista (**ICEA**).

- Determinación de proteasas

También llamadas peptidasas, son enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos presentes en las proteínas. En esta determinación se utilizó un medio de cultivo descrito por Dunne et al. (1997) compuesto por 50 g l⁻¹ de leche descremada en polvo y 10 g l⁻¹ de agar. Las bacterias se inocularon en placas de petri con este medio de cultivo y los resultados se obtuvieron luego de incubar las placas en oscuridad a 30°C durante 48 horas. Se consideraron como bacterias con actividad proteasa positiva aquellas que evidenciaron un halo transparente alrededor de su colonia, indicando la liberación extracelular de estas enzimas que degradan la caseína (principal proteína presente en

la leche). Por el contrario, un resultado negativo se atribuyó a la no formación del halo transparente circundante a la colonia bacteriana.

- Determinación de quitinasas

Estas enzimas son las encargadas de hidrolizar la quitina, un polímero de cadena larga con enlaces β -1,4 de N-acetilglucosamina. Para la determinación de aislamientos bacterianos capaces de producir quitinasa extracelular se utilizó quitina coloidal como fuente de carbono en el medio de cultivo (ver composición del medio de cultivo en [ANEXO 5](#)). Las placas se inocularon con los aislamientos bacterianos y se incubaron en oscuridad a 30°C durante 7 a 10 días. La actividad quitinasa positiva se determina por la aparición de una zona clara alrededor de la colonia (halo de degradación de quitina).

- Determinación de lipasas

Las lipasas catalizan la hidrólisis de acilglicerol de cadena larga. Para su determinación se utilizó el medio de cultivo descrito por Samad et al. (1989) (ver composición del medio de cultivo en [ANEXO 5](#)) y se dispuso en placas de petri. Las placas se inocularon con los diferentes aislamientos bacterianos, por duplicado, y se incubaron en oscuridad a 30°C durante 5 días. Los microorganismos considerados como positivos evidencian alrededor de su colonia un precipitado oscuro notorio a simple vista (monooleato de calcio), debido a la combinación del Ca^{+2} presente en el medio de cultivo y los ácidos grasos producto de la actividad de la enzima lipasa.

- Determinación de amilasas

Son enzimas responsables de hidrolizar los hidratos de carbono. Para la determinación se utilizó el protocolo descrito por Deb et al. (2013) (ver composición del medio de cultivo en [ANEXO 5](#)). Los aislamientos bacterianos se inocularon en las placas con medio de cultivo específico y se incubaron en oscuridad a 30°C durante 72 horas. Luego de este período, las placas se revelan mediante el agregado de solución de I_2/I^- (la misma que se empleó para la determinación de celulasas). El yodo reacciona con el almidón del medio de cultivo, intercalándose en su estructura helicoidal formando un complejo de color azul intenso. El resultado positivo se evidencia mediante una zona incolora alrededor de la colonia de crecimiento de aquellos aislamientos bacterianos que producen y liberan extracelularmente estas enzimas.

Con los resultados de los ensayos cualitativos sobre la caracterización de proteasas, quitinasas, lipasas y amilasas se calculó el Índice de Caracterización Enzimática

Antagonista (**ICEA**) para cada aislamiento bacteriano, utilizando la siguiente expresión matemática (Vio, 2023):

$$ICEA_j = \frac{\sum a_{jk}}{n}$$

Donde:

a representa el resultado (negativo = 0; positivo = 1) del aislamiento **j** para la caracterización enzimática **k**.

n representa el número de actividades enzimáticas determinadas (si el aislamiento no creció en el medio de cultivo de la determinación en placa, se considera como no evaluado y no contribuye al valor de **n**).

2.3.3.2 Ensayos de antagonismo contra hongos fitopatógenos. Cálculo de índices PICR e IPA.

Para evaluar la capacidad antagónica de los aislamientos bacterianos frente a hongos fitopatógenos se realizaron ensayos duales *in vitro* según la metodología descrita por Mokhtar & Dehimat (2015), con algunas modificaciones. Los hongos fitopatógenos utilizados fueron *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, y *Sclerotinia sclerotiorum*, de aquí en más denominados por las siglas **Aa**, **Bc**, **Fo** y **Ss**, respectivamente.

- Screening inicial: Ensayos Duales 4 vs 1

En primer lugar, se realizaron ensayos en placa enfrentando 4 aislamientos bacterianos a cada hongo fitopatógeno a modo de screening, para identificar potenciales aislamientos con efecto antagonista. Se utilizaron placas de petri con medio de cultivo Agar Papa Glucosado Britania®, donde se inocularon los distintos aislamientos bacterianos de 24h de crecimiento utilizando un ansa en anilla y el patógeno a partir de un disco micelial de 8 mm de diámetro con micelio desarrollado de 7 días. Placas inoculadas solo con el patógeno se utilizaron como controles. Se realizaron placas por duplicado y se incubaron en oscuridad a 30°C las placas con Aa y Fo; y a 26°C las placas de Bc y Ss. Los resultados se observaron cuando el patógeno en la placa control completó el crecimiento en toda la placa, lo que demoró 7 días en Aa, y Fo; y 10 días en Bc y Ss. Los aislamientos bacterianos se consideraron antagonistas positivos cuando se evidenció la detención del crecimiento del hongo en la zona de interacción hongo-bacteria. Se consideró como resultado negativo el crecimiento del hongo similar al

control o bien en caso de tomar contacto con la bacteria, observándose crecimiento o no por encima de la misma. (Este protocolo se puede evidenciar en la [Figura 2.3.3.2a](#)).

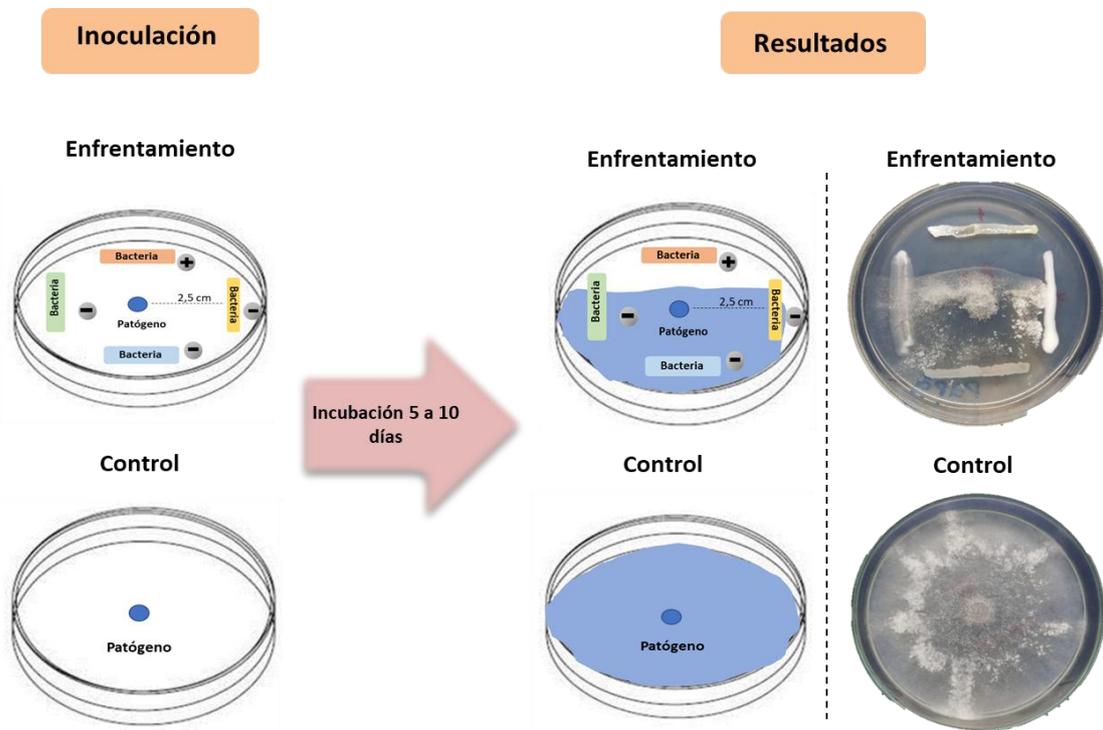


Figura 2.3.3.2a: Esquema de inoculación de placas y lectura de resultados positivos y negativos en ensayos 4 vs 1 para evaluación de antagonismo de los aislamientos bacterianos contra hongos fitopatógenos.

- Ensayos Duales 1 vs 1 y cálculo de PICR

Los aislamientos con resultado positivo en los ensayos 4 vs 1 fueron utilizados para realizar ensayos en placa en cultivos duales 1 vs 1 contra cada hongo que se evidenció antagonismo positivo. El protocolo del ensayo fue el mismo que el descrito previamente para los ensayos 4 vs 1, pero con el arreglo espacial en la placa distanciando al hongo de la bacteria a 5cm entre sí. Las placas inoculadas solo con el patógeno se utilizaron como controles. Se realizaron placas por duplicados y se incubaron en las condiciones y tiempos descrito previamente para cada hongo. Los resultados se observaron cuando el patógeno en la placa control alcanzó los 5 cm que lo separan de la bacteria. (Este protocolo se puede observar en la [Figura 2.3.3.2b](#)).

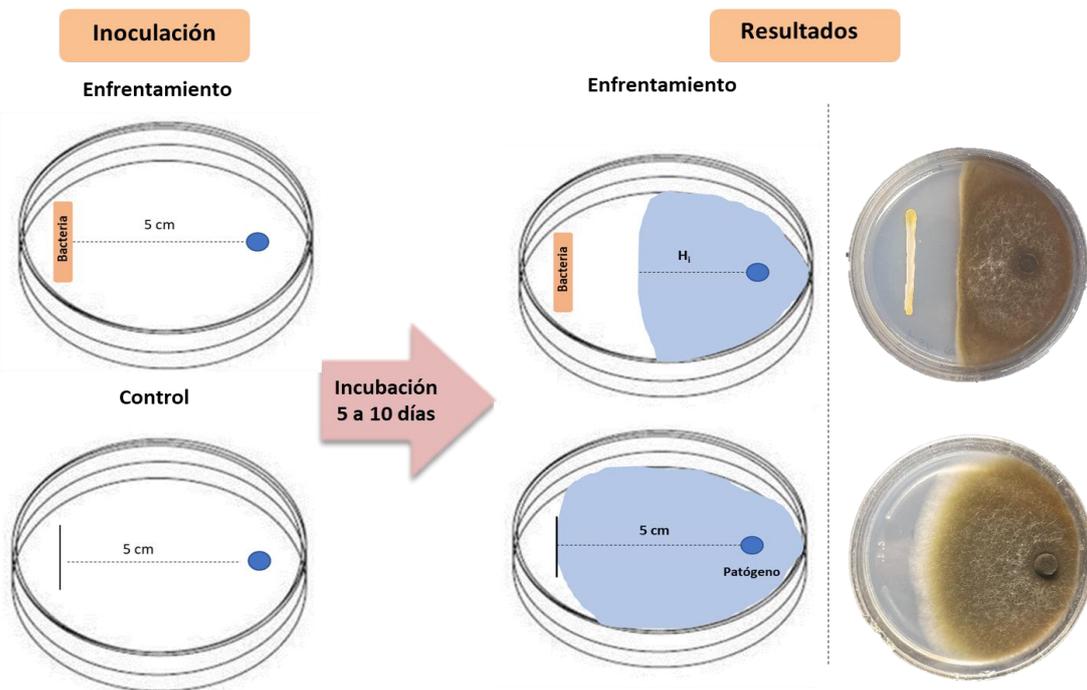


Figura 2.3.3.2b: Esquema de inoculación de placas y lectura de resultados en ensayos 1 vs 1 para evaluación de antagonismo de los aislamientos bacterianos contra hongos fitopatógenos.

Al final del ensayo se midió el halo de crecimiento radial del patógeno (H_i) (Figura 2.3.3.2b) en todas las placas de cultivo dual y controles (H_i control = 50 mm), desde el centro del disco miceliar utilizado como inóculo hasta el borde de la colonia del hongo en dirección perpendicular a la inoculación de la bacteria. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (**PICR**) de cada aislamiento bacteriano para cada hongo fitopatógeno ensayado empleando la siguiente ecuación (Vio, 2023):

$$PICR_{ij} = \frac{H_{i\ control} - H_{ij}}{H_{i\ control}}$$

Donde:

H_{ij} : Crecimiento radial del hongo fitopatógeno i desde el centro del disco de inóculo hasta el borde de crecimiento en dirección hacia la bacteria j . H_i control = 50 mm.

Se calculó un **PICR** para cada aislamiento bacteriano j respecto a cada hongo i , considerando la existencia de actividad antagonista cuando se inhibió el crecimiento radial del fitopatógeno en al menos un 20% ($PICR=0,2$) respecto al control. Para el cálculo se utilizaron las medidas de halos promedio (H_i) de los ensayos *in vitro* 1 vs 1. El índice PICR varía entre 0 (antagonismo negativo o nulo) y 1 (máximo nivel de inhibición del crecimiento del patógeno).

- Cálculo de índice de potencial antagonismo - IPA

Como índice resumen de la caracterización enzimática relacionada a antagonismo y los ensayos duales *in vitro* de los aislamientos bacterianos de la colección contra los 4 hongos fitopatógenos ensayados se calculó el **Índice de Potencial Antagonista (IPA)**. Este índice se modificó de forma tal que pondera el ensayo de antagonismo en placa por brindar resultados de interacción específica. El índice varía entre 0 (sin actividad enzimática de antagonismo y sin inhibición del crecimiento radial contra los hongos testeados) y 1 (máxima actividad enzimática de antagonismo y máxima inhibición del crecimiento radial contra todos los hongos testeados) (Vio, 2023).

$$IPA_j = \frac{ICEA + (2 \times PICR_{prom})}{2}$$

Donde:

ICEA_j: Índice de caracterización enzimática de antagonismo del aislamiento **j**.

PICR_{prom}: Porcentaje de Inhibición Radial promedio del aislamiento **j**.

2.3.4 Cálculo de índices combinados de colonización, promoción del crecimiento vegetal y potencial antagonismo; Selección de aislamientos en base a índices.

Partiendo de la premisa de que es condición necesaria la colonización de un microhábitat para poder ejercer un efecto, ya sea de promoción del crecimiento vegetal o de antagonismo contra patógenos, es que se combinaron los índices de caracterización enzimática de colonización (ICEC) con los de promoción de crecimiento y con los de potencial antagonismo, para obtener una valoración completa de cada uno de los aislamientos bacterianos de la colección. Posteriormente, estos índices serán utilizados para realizar comparativas entre los aislamientos bacterianos y fundamentar la selección de aquellos con mayor potencial promotor del crecimiento vegetal y antagonismo.

- **Índice de Potencial Promotor del Crecimiento Vegetal (IPPCV):**

Combinando los resultados del índice de caracterización enzimática de colonización (ICEC) y los resultados de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (IMPCV), se calculó el Índice de Potencial Promotor del Crecimiento Vegetal para cada aislamiento bacteriano de la colección, el cual pondera los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal determinados, empleando la siguiente ecuación (Vio, 2023):

$$IPPCV_j = \frac{ICEC_j + (2 \times IMPCV_j)}{2}$$

▪ **Índice de Potencial Biocontrol (IPB):** Combinando los resultados del índice de caracterización enzimática de colonización (ICEC) y los resultados del potencial antagonismo (IPA), se calculó el Índice de Potencial Biocontrol para cada aislamiento bacteriano de la colección empleando la siguiente ecuación (Vio, 2023):

$$IPB_j = \frac{ICEC_j + IPA_j}{2}$$

2.4 ENSAYO *IN VIVO* EN ESQUEJES DE *CANNABIS SATIVA* L.

A partir de los índices *IPPCV* e *IPB* se seleccionaron 2 aislamientos bacterianos para utilizarlos como inoculantes experimentales y evaluar su potencial promoción del crecimiento vegetal en el enraizamiento de esquejes de *Cannabis sativa* L.

El ensayo *in vivo* se realizó en el invernadero del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), el cual cuenta con temperatura (24°C) y fotoperíodo artificial controlado (16h luz/ 8h oscuridad).

Como material vegetal para la obtención de esquejes se utilizaron plantas madre de 8 meses de edad que se cultivaron en el invernadero del CINDEFI, en macetas de 20 L con sustrato comercial Vita Flor Light Mix (Terrafertil®).

→ Diseño Experimental: se utilizó un diseño monofactorial completamente aleatorizado con 4 tratamientos: un control no inoculado; dos tratamientos inoculados cada uno con cada aislamiento bacteriano seleccionado de la colección de cannabis; un tratamiento inoculado con una mezcla de 2 PGPB comerciales (*Paraburkholderia tropica* y *Gluconacetobacter diazotrophicus*). Para cada tratamiento se realizaron dos réplicas, resultando en un ensayo con 8 unidades experimentales de 17 esquejes cada una.

→ Obtención de esquejes: Se obtuvieron esquejes de 10 cm de largo a partir de 10 plantas madres: los esquejes se clasificaron según fueran obtenidos de la región apical, media o basal de las ramas y a su vez por el grosor el del tallo principal. Cada esqueje contó con 3 nudos por debajo del ápice, dejando 1 hoja entera en el ápice y 1 o 2 hojas

por debajo con los folíolos recortados a la mitad (para evitar una evapotranspiración excesiva del esqueje) (Figura 2.4a). Dada la heterogeneidad entre los mismos, las distintas categorías de esquejes se repartieron equitativamente entre las distintas unidades experimentales del ensayo buscando una mayor uniformidad entre ellas.

→ Obtención de los cultivos bacterianos y los bioinsumos experimentales: Tanto los 2 aislamientos bacterianos seleccionados de la colección de cannabis, así como las 2 cepas PGPB comerciales, se cultivaron en medio de cultivo LGI (ANEXO 5) líquido en oscuridad a 30°C y agitación a 150 rpm durante 48h. Se realizó el recuento de UFC por ml mediante la técnica de recuento en placa y se midió el pH del cultivo bacteriano resultante. Los bioinsumos experimentales se obtuvieron realizando una dilución 1:3 de los cultivos bacterianos (1 parte de cultivo bacteriano + 2 partes de agua destilada en el caso de los tratamientos de la colección de cannabis; 1 parte de cada cultivo bacteriano + 1 parte de agua destilada en el caso del tratamiento con las dos cepas comerciales).

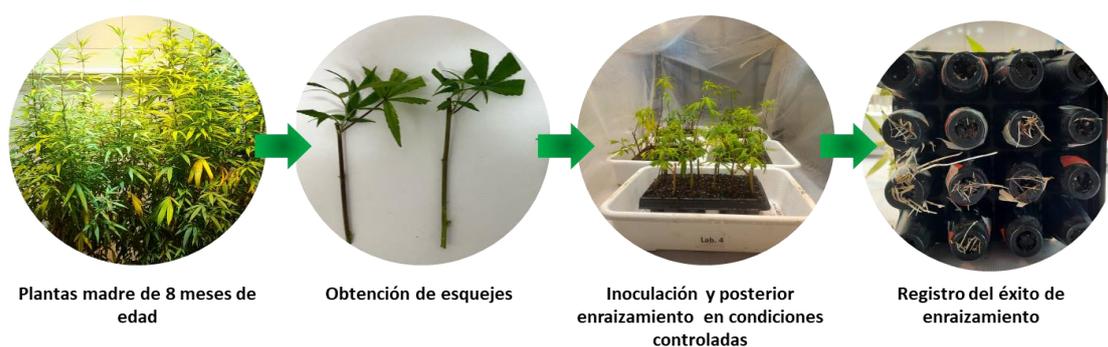


Figura 2.4a: Esquema de ensayo in vivo de enraizamiento de esquejes de cannabis inoculados con bioinsumos bacterianos a base de PGPB.

→ Inoculación y condiciones de enraizamiento: Los esquejes se plantaron en bandejas multicelda (20 ml por celda) rellenas con sustrato comercial VitaFlor Light Mix (Terrafertil®). La inoculación se realizó agregando 1 ml del bioinsumo experimental en la base de cada esqueje. Para el tratamiento sin inocular, se agregó el mismo volumen de agua destilada. Los esquejes se mantuvieron en condiciones controladas en el invernadero del CINDEFI, en cámaras construidas con nylon cristal de 200 micrones para mantener una humedad relativa ~ 90%, hasta el momento de la evaluación de distintos parámetros del crecimiento (Figura 2.4a).

→ Evaluación del ensayo: a fin de evaluar el potencial efecto de promoción del crecimiento de los aislamientos bacterianos, así como de las cepas comerciales

utilizadas para inocular los distintos esquejes, se realizaron las siguientes observaciones:

- *Velocidad de enraizamiento*: desde el día 7 después de la inoculación y hasta el día 19 post-inoculación, se observó la parte de debajo de las bandejas multicelda para detectar raíces salientes (Caplan et al., 2018), registrándose el número de esquejes de cada tratamiento que mostraba esta característica. El éxito de enraizamiento se calculó como el porcentaje de esquejes con raíces salientes por debajo de la celda en cada tratamiento.
- *Número total de esquejes enraizados*: Para cada unidad experimental se descalzaron el 100% de los esquejes y se registró el total de ejemplares enraizados.
- *Calidad de enraizamiento*: de cada unidad experimental se tomaron aleatoriamente 10 esquejes enraizados, se lavaron las raíces para descartar la totalidad del sustrato dejando las raíces limpias, y se los clasificó de acuerdo al sistema radical generado en 3 categorías cualitativas: pobre enraizamiento, buen enraizamiento, enraizamiento abundante.

3. RESULTADOS

3.1 AISLAMIENTOS BACTERIANOS: RECUENTO POBLACIONAL Y GENERACIÓN DE LA COLECCIÓN.

A partir de las muestras de rizosfera, raíz, tallo, hoja e inflorescencia de plantas de cannabis fue posible obtener satisfactoriamente un gran número y diversidad de colonias bacterianas en las distintas placas con medio de cultivo para heterótrofos.

La desinfección superficial de órganos vegetales fue satisfactoria ya que, si bien se ajustaron algunas de las variables del protocolo de desinfección en algunos casos, en todos los órganos vegetales se logró que no hubiera crecimiento bacteriano en los controles de desinfección, lo que evidencia que los crecimientos bacterianos observados como resultado del macerado y plaqueo de estas muestras vegetales provienen del interior de dichos órganos, considerando que son bacterias endófitas.

3.1.1 Recuento poblacional

Los resultados del recuento poblacional bacteriano totales y endófitos (en UFC g⁻¹) se detallan para cada microhábitat en la [tabla A1.a](#) en el [ANEXO 1](#), y se resumen en la [Figura 3.1.1a](#).

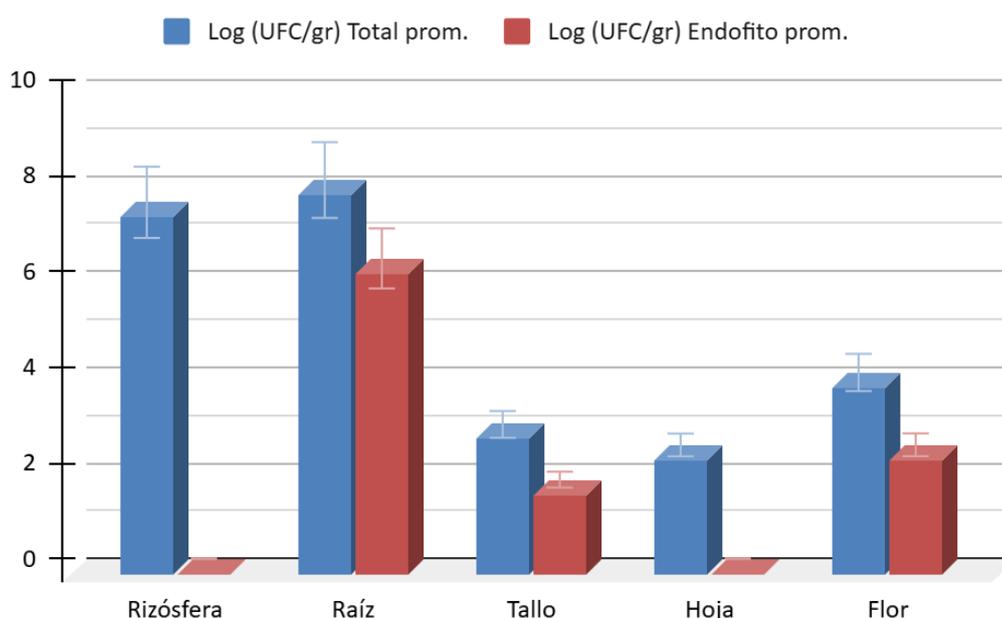


Figura 3.1.1a: Gráfico de barras indicando los microhábitats y su correspondiente valor de Log UFC g⁻¹ totales promedio y endófitos promedio.

- El mayor recuento poblacional bacteriano se observa en los microhábitats subterráneos (recuento total de raíz y rizosfera), decreciendo los niveles poblacionales bacterianos en los tejidos vegetales aéreos de cannabis.
- Respecto a la endosfera de los tejidos vegetales, se encontraron poblaciones de bacterias endófitas significativamente menores a las poblaciones totales de cada microhábitat.
- No se logró realizar un recuento de bacterias endófitas provenientes de muestras de hoja: con el protocolo inicial, los controles de desinfección superficial resultaron satisfactorios, pero no hubo crecimiento bacteriano a partir del plaqueo del macerado del tejido foliar. Por este motivo, se ensayaron protocolos de desinfección disminuyendo la concentración de desinfectante. Sin embargo, no se logró obtener un resultado satisfactorio.
- Por otro lado, el protocolo de desinfección superficial de muestras de tallo también se modificó en el transcurso de los resultados que se observaron ya que inicialmente tampoco se observó crecimiento a partir del plaqueo del macerado de tejidos. Finalmente, se encontró que utilizando NaClO al 12% v/v durante 3 minutos se lograba obtener aislamientos bacterianos con un control de desinfección satisfactorio.

3.1.2 Selección de Morfotipos, Aislamiento y Generación de la Colección

Para el aislamiento y generación de la colección de bacterias, se utilizaron las mismas placas de petri de los recuentos bacterianos (Figura 3.1.2a).

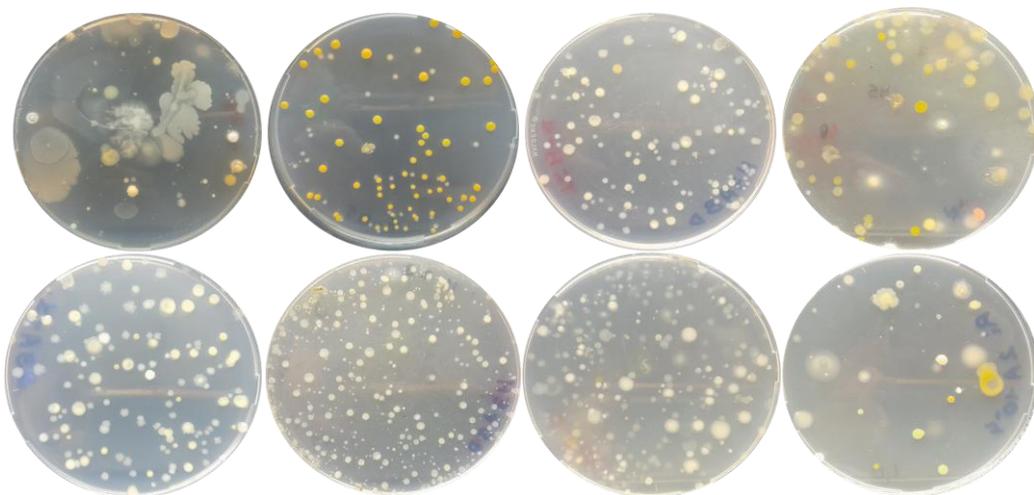


Figura 3.1.2a: Fotografía de algunas de las placas de petri correspondientes a las colonias obtenidas de las muestras de rizosfera, raíz, tallo, hoja y flores de *Cannabis sativa* L. var. Charlotte Angel's.

En total se seleccionaron 63 morfotipos a partir de todas las muestras, los cuales se aislaron y se conservaron como cultivos puros para conformar la colección de bacterias. En la [Figura 3.1.2b](#) se muestra el número de aislamientos bacterianos por cada microhábitat.

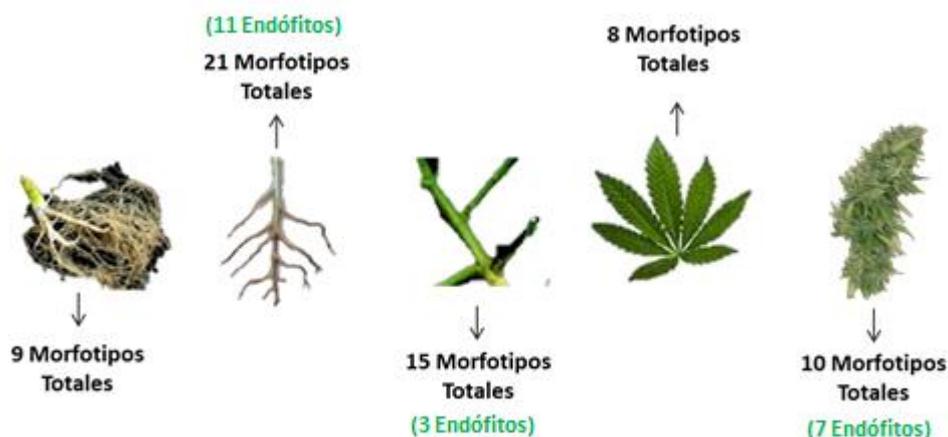


Figura 3.1.2b: Número de aislamientos bacterianos obtenidos de cada microhábitat que conforman la colección de bacterias asociadas a plantas de *Cannabis sativa* L.

En la [Tabla A1.b](#) en el [ANEXO 1](#) se encuentra el listado completo y detallado de morfotipos aislados especificando su microhábitat de origen y si es de tejidos desinfectados superficialmente o no.

Todos los morfotipos seleccionados se pudieron aislar correctamente, guardar en R₂A con 20% glicerol en freezer a -80°C, y ser cultivados posteriormente para su caracterización.

3.2 ASIGNACIÓN TAXONÓMICA DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS

Se lograron identificar taxonómicamente 57 de los 63 aislamientos bacterianos de la colección a nivel de género, cuyos resultados detallados se encuentran en la [Tabla A2.a](#) del [ANEXO 2](#). En total se encontraron 14 géneros diferentes, de los cuales los géneros con mayor cantidad de representantes fueron (en orden decreciente): *Bacillus*, *Pseudomonas*, y *Burkholderia*, *Paraburkholderia*, *Kosakonia*, *Pantoea* y *Microbacterium* (ya en menor cantidad respecto a los dos primeros) ([Figura 3.2a](#)).

asignacion taxonomica

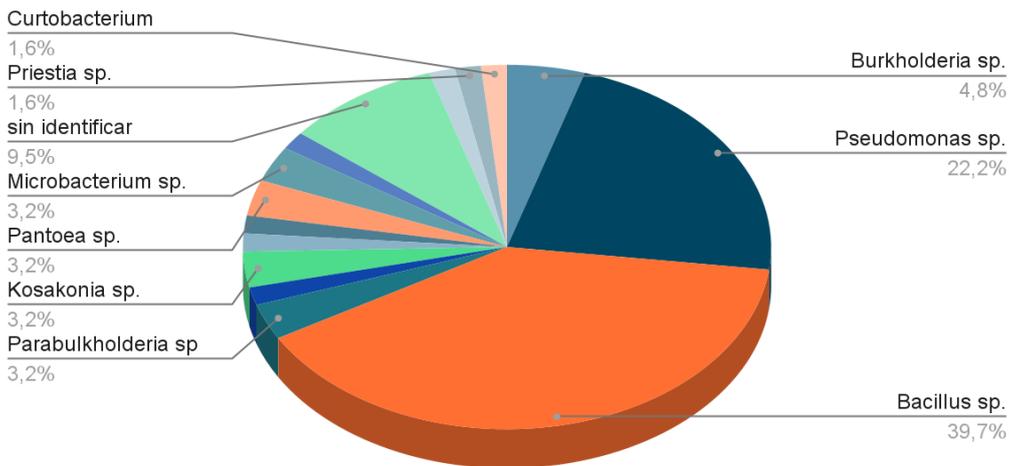


Figura 3.2a: Porcentaje de los diferentes géneros obtenidos de la identificación taxonómica de los aislamientos bacterianos de la colección de cannabis.

Si clasificamos los diferentes géneros bacterianos de la colección según su microhábitat de origen (Figura 3.2b), se puede observar que *Bacillus* es el género que predomina en todos los microhábitats a excepción de la raíz donde predomina principalmente el género *Pseudomonas*. Además, se visualiza una mayor diversidad de géneros bacterianos asociados a los microhábitats subterráneos y de tallo respecto a los de hoja e inflorescencia.

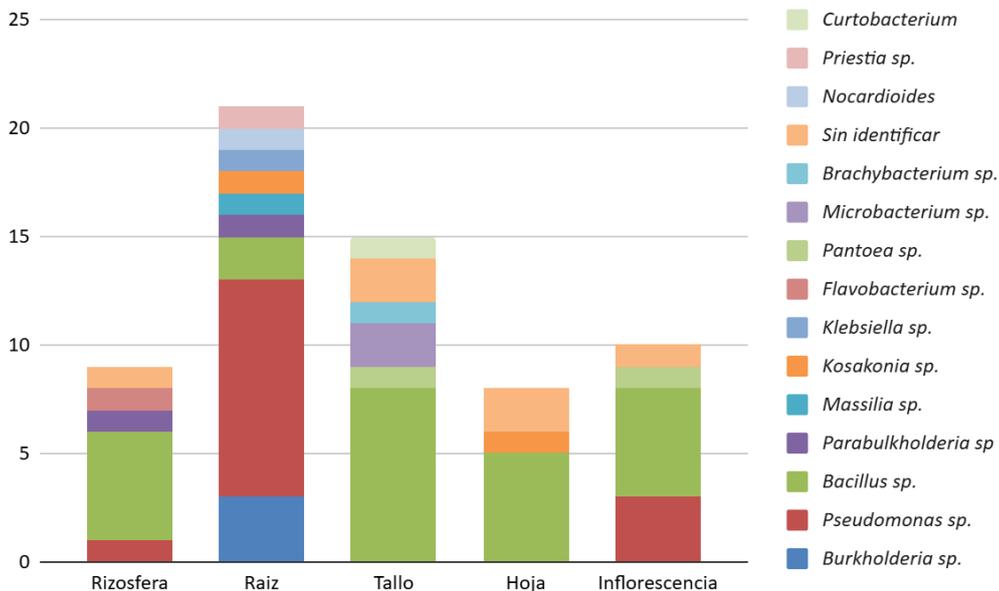


Figura 3.2b Número de aislamientos de cada genero bacteriano para cada microhábitat.

3.3 CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS ASOCIADOS A CANNABIS.

3.3.1 Caracterización de enzimas líticas asociadas a la colonización vegetal y cálculo de ICEC.

Fue posible caracterizar a todos los aislamientos bacterianos de la colección respecto a la producción de enzimas líticas celulasas y pectinasas, habiendo obtenido un 41,27% y 28,57% de aislamientos positivos para dichas actividades, respectivamente (Figura 3.3.1a). Los resultados detallados de estos ensayos se muestran en la Tabla A3.a del ANEXO 3.

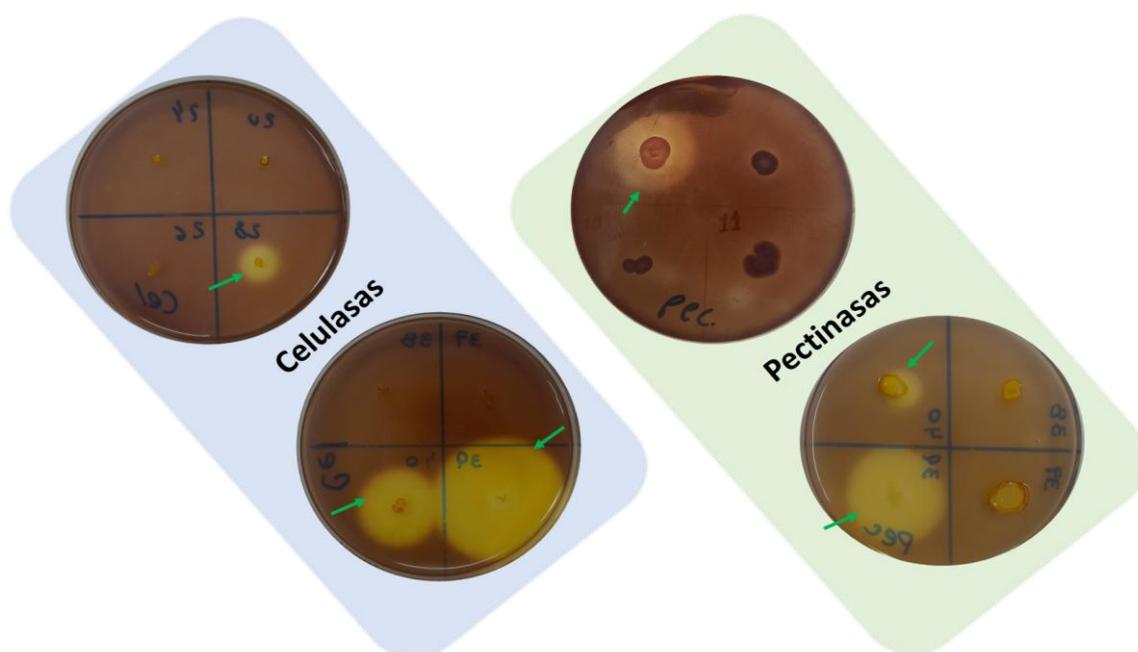


Figura 3.3.1a: fotografías de algunos de los resultados de las determinaciones enzimáticas relacionadas a la capacidad de colonización de los distintos aislamientos bacterianos de la colección. Las flechas verdes indican resultados positivos.

Si ordenamos los resultados positivos de cada actividad según los microhábitats de origen de los distintos aislamientos (Figura 3.3.1b), se observa una mayor actividad celulasa y pectinasa en los aislamientos de rizosfera, luego en orden decreciente tallo, inflorescencia, hoja y por último raíz.

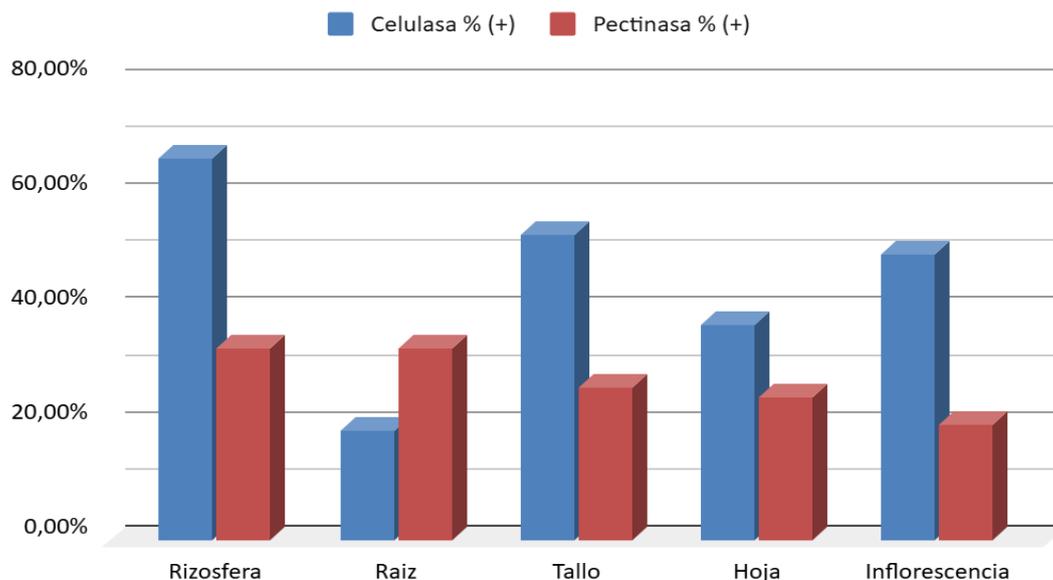


Figura 3.3.1b: Gráfico de barra que muestra los % de resultados positivos para las pruebas de celulasa y pectinasa en función del microhábitat de origen.

Se obtuvieron mayor cantidad de resultados positivos para el ensayo de celulasa que para el de pectinasa excepto en raíz que sucede lo opuesto.

Si se ordenan los resultados según el género asignado a cada aislamiento bacteriano (Figura 3.3.1c) se observa que en 8 de los 14 géneros que componen la colección bacteriana hay un resultado positivo en al menos una de las actividades enzimáticas determinadas. *Bacillus* es el género con mayor cantidad de resultados positivos, seguido por el género *Pseudomonas*.

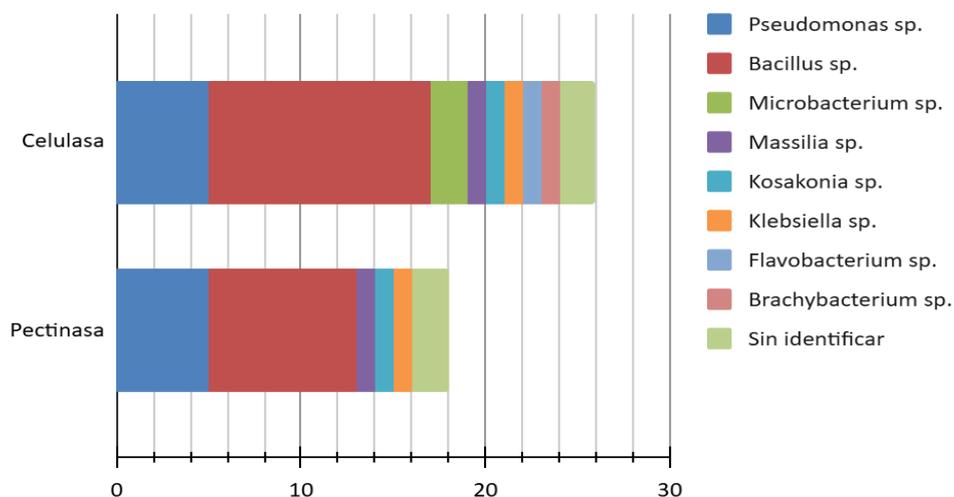


Figura 3.3.1c: gráfico de barra que muestra los resultados positivos para las pruebas de celulasa, pectinasa que obtuvieron los diferentes aislamientos en función del género.

Del total de la colección, solo 13 aislamientos bacterianos, entre ellos 6 del género *Bacillus* y 2 del género *Pseudomonas*, arrojaron un resultado positivo para ambas actividades enzimáticas y, por ende, obtuvieron un Índice de Caracterización Enzimática de Colonización (**ICEC**) igual a 1 ([tabla 3.3.1a](#)). De los aislamientos mencionados en dicha tabla, 4 de ellos son aislados de tejidos internos: los aislamientos **R5**, **R9**, **I6** y **T15**.

Tabla 3.3.1a: se muestran los aislamientos con mejores ICEC (igual a 1) especificando sus respectivos géneros.

Aislamiento	Género
R5	<i>Massilia</i>
R9	<i>Pseudomonas</i>
R17	<i>Klebsiella</i>
Rh6	<i>Bacillus</i>
Rh7	<i>No identificado</i>
Rh8	<i>Bacillus</i>
I6	<i>Bacillus</i>
I10	<i>Pseudomonas</i>
H1	<i>Kosakonia</i>
H8	<i>Bacillus</i>
T8	<i>Bacillus</i>
T11	<i>No identificado</i>
T15	<i>Bacillus</i>

3.3.2 Caracterización respecto de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal y cálculo del IMPCV.

- Determinación cuali-cuantitativa de solubilización de fósforo insoluble

Se logró caracterizar a todos los aislamientos bacterianos respecto a su capacidad *in vitro* de solubilizar fosfato tricálcico insoluble, obteniendo un total de 48 aislamientos (76,19% de la colección bacteriana generada) con capacidad de solubilizar fosfato tricálcico. Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla A3.b](#) del [ANEXO 3](#).

Los aislamientos que mostraron esta capacidad de solubilizar fosfato tricálcico se clasificaron en 3 categorías en base al tamaño del halo de solubilización y el tamaño de

su colonia bacteriana en la placa, donde se encontró que 26 aislamientos (41,27% de la colección) mostraron un halo de solubilización similar al tamaño de su colonia (+), 13 aislamientos (20,63% de la colección) mostraron un halo de solubilización dos veces más grande que su colonia (++), y 9 aislamientos (14,29% de la colección) mostraron un halo mayor a dos veces el tamaño de su colonia (+++).

Si observamos estos resultados, clasificados según el microhábitat de origen de cada aislamiento (Figura 3.3.2a), el mayor % de resultados positivos se obtuvieron en hoja, luego en orden decreciente en raíz e inflorescencia (con el mismo % de resultados positivos pero repartidos de diferente manera), después tallo y por último rizosfera.

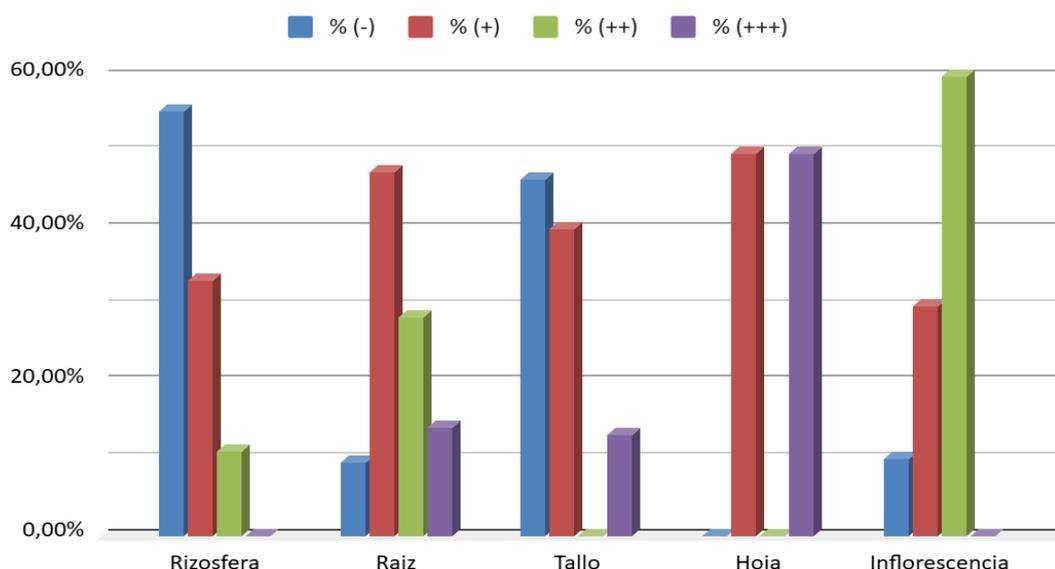


Figura 3.3.2a: Se muestran los % de resultados positivos obtenidos de la prueba de solubilización de fósforo para los diferentes aislamientos en función del microhábitat.

En la Figura 3.3.2b se discriminan los distintos aislamientos bacterianos de resultados positivos para esta actividad según su asignación taxonómica.

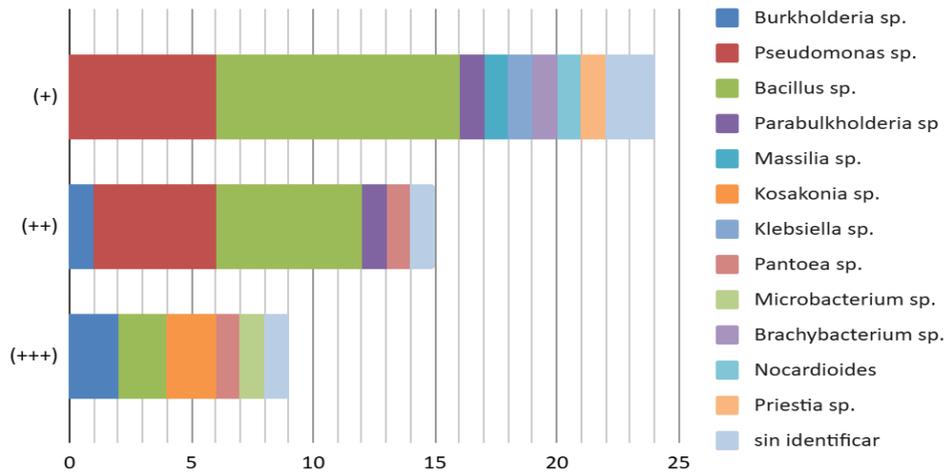


Figura 3.3.2b: Se muestran los diferentes resultados positivos de la prueba de solubilización de fósforo para los diferentes aislamientos en función del género.

- Se encontró que 12 de los 14 géneros dieron resultados positivos en este ensayo de los cuales *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* fueron los que presentaron mayor cantidad de los mismos.

- Aislamientos de los géneros *Burkholderia*, *Kosakonia*, y *Bacillus* fueron los que mostraron mayor capacidad de solubilizar fosfato tricálcico (+++) en el medio de cultivo ensayado.

El ensayo cuantitativo realizado con los aislamientos bacterianos con categoría de solubilización “++” y “+++” evidenciaron varios aislamientos con interesantes eficiencias de solubilización, incluso un aislamiento que no se logró identificar taxonómicamente cuyo halo de solubilización triplicó el radio de su propia colonia bacteriana ([Figura 3.3.2c](#)).

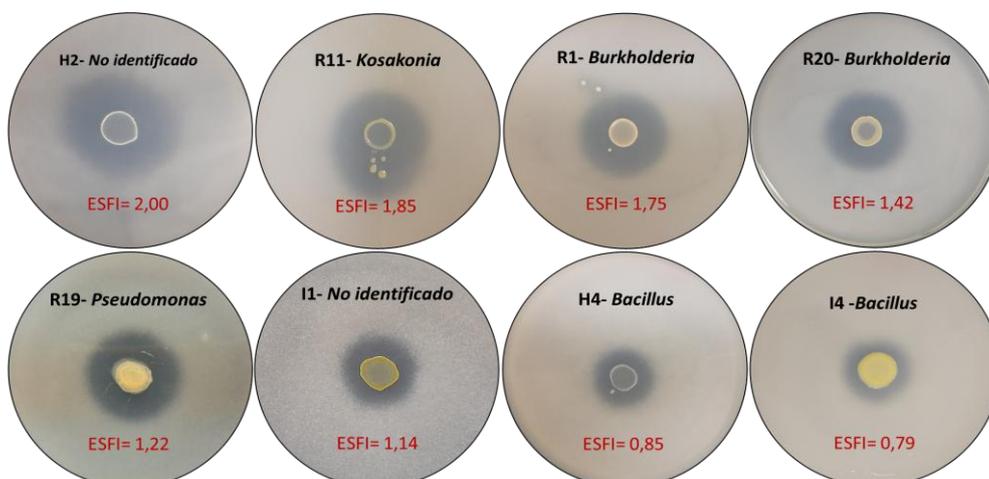


Figura 3.3.2c: Fotografías de los 8 aislamientos bacterianos con mayor eficiencia de solubilización de fosfato tricálcico en las determinaciones cuantitativas en placas de petri, especificando sus géneros y ESFI calculada.

- Del total de la colección, se encontraron 6 aislamientos bacterianos que obtuvieron una eficiencia de solubilización mayor al 100%, dos de ellos sin identificar taxonómicamente, y el resto pertenecientes a los géneros *Kosakonia*, *Burkholderia* (2) y *Pseudomonas*.

- Determinación de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno atmosférico

Se logró caracterizar a todos los aislamientos bacterianos respecto a su capacidad *in vitro* de fijar biológicamente el nitrógeno atmosférico, obteniendo un total de 44 aislamientos (69,84% de la colección bacteriana generada) con esta capacidad. Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla A3.c](#) del [ANEXO 3](#).

En la [Figura 3.3.2d](#) se observan algunos ejemplos de aislamientos bacterianos que dieron resultados positivos para la prueba de FBN.



Figura 3.3.2d. Fotografías del ensayo de fijación biológica de nitrógeno, mostrando resultados de aislamientos bacterianos que dieron positivos a la prueba, es decir, mostraron un halo de turbidez resultado del crecimiento bacteriano en los medios de cultivo sin fuente nitrogenada (medio NFB de color azul y medio LGI de color amarillo).

En la [Figura 3.3.2e](#) se comparan entre los resultados de las pruebas de FBN para los diferentes aislamientos en función del microhábitat.

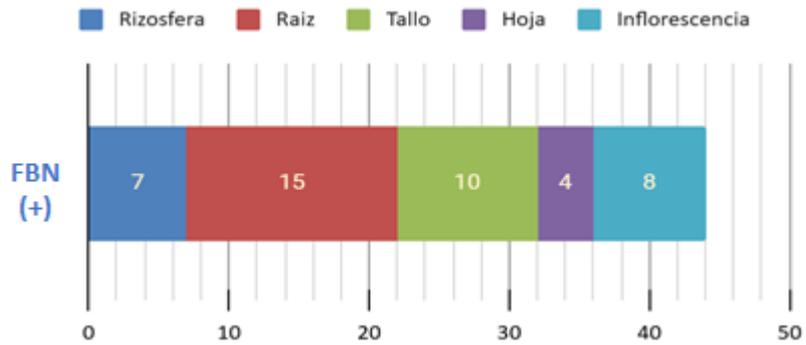


Figura 3.3.2e. Número de aislamientos con resultados positivos de las pruebas de FBN para los diferentes microhábitats.

- La mayor cantidad de resultados positivos se obtuvieron en raíz, luego en orden decreciente en tallo, inflorescencia, rizosfera y por último hoja.

En la [Figura 3.3.2f](#) se comparan entre los resultados de las pruebas de FBN para los diferentes aislamientos en función del género.

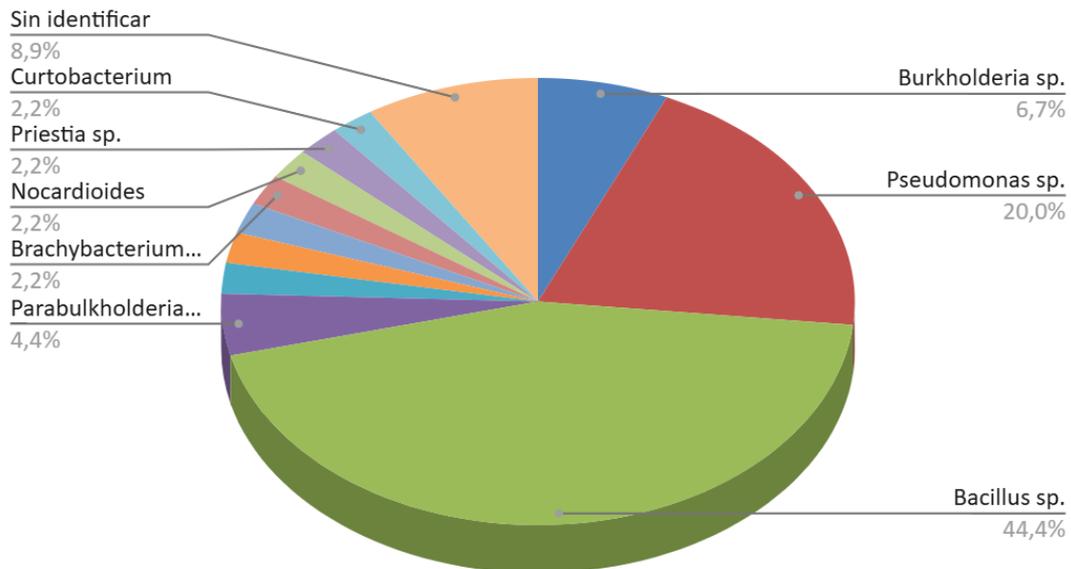


Figura 3.3.2f: Se muestran los resultados positivos de las pruebas de FBN para los diferentes aislamientos en función del género.

- un total de 11 de los 14 géneros dieron resultados positivos en este ensayo, siendo en orden decreciente *Bacillus*, *Pseudomonas*, y *Burkholderia* los géneros con mayor cantidad de aislamientos con resultado positivo.

- Cálculo del Índice IMPCV.

Con los resultados de los ensayos de solubilización de fósforo insoluble y fijación biológica del nitrógeno atmosférico se calculó el Índice de Mecanismos de Promoción del Crecimiento Vegetal (**IMPCV**) (ver resultados detallados en [Tabla A3.d del ANEXO 3](#)).

Se encontró que 5 aislamientos bacterianos de la colección obtuvieron un índice mayor a 0,75 ([Tabla 3.3.2a](#)),

Tabla 3.3.2a. se muestran los aislamientos que obtuvieron mayor índice IMPCV (mayor a 0,75) especificando el género.

Aislamiento	Género	IMPCV
R1	<i>Burkholderia</i>	0,94
R20	<i>Burkholderia</i>	0,86
R21	<i>Burkholderia</i>	0,86
R19	<i>Pseudomonas</i>	0,81
I1	<i>Sin Determinar</i>	0,79

- Los aislamientos con mayor IMPCV fueron obtenidos de tejidos radicales de plantas de cannabis (4, uno de ellos de endosfera – R1) y uno obtenido de la endosfera de inflorescencia (I1), y pertenecen al género *Burkholderia* (3) y *Pseudomonas* (1). Uno de ellos no logró ser identificado taxonómicamente.

3.3.3 Caracterización de aislamientos bacterianos respecto a su potencial antagonismo contra hongos fitopatógenos.

3.3.3.1 Determinación de enzimas líticas de efecto antagonista. Cálculo de índice ICEA.

Se logró caracterizar *in vitro* a todos los aislamientos bacterianos de la colección en relación a la producción extracelular de enzimas líticas con efecto antagonista, obteniendo un total de:

- 27 aislamientos (42,86% de la colección bacteriana generada) con actividad proteasa

- 31 aislamientos (49,21% de la colección bacteriana generada) con actividad lipasa
- 11 aislamientos (17,46% de la colección bacteriana generada) con actividad amilasa
- Ningún aislamiento bacteriano con actividad quitinasa.

Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla A3.e](#) del [ANEXO 3](#).

En la [Figura 3.3.3.1a](#) se observan las placas de petri con los medios de cultivo específicos para la determinación de las distintas actividades enzimáticas, señalando con flechas de color verde ejemplos de actividad enzimática positiva y flechas de color rojo ejemplos de actividad enzimática negativa.

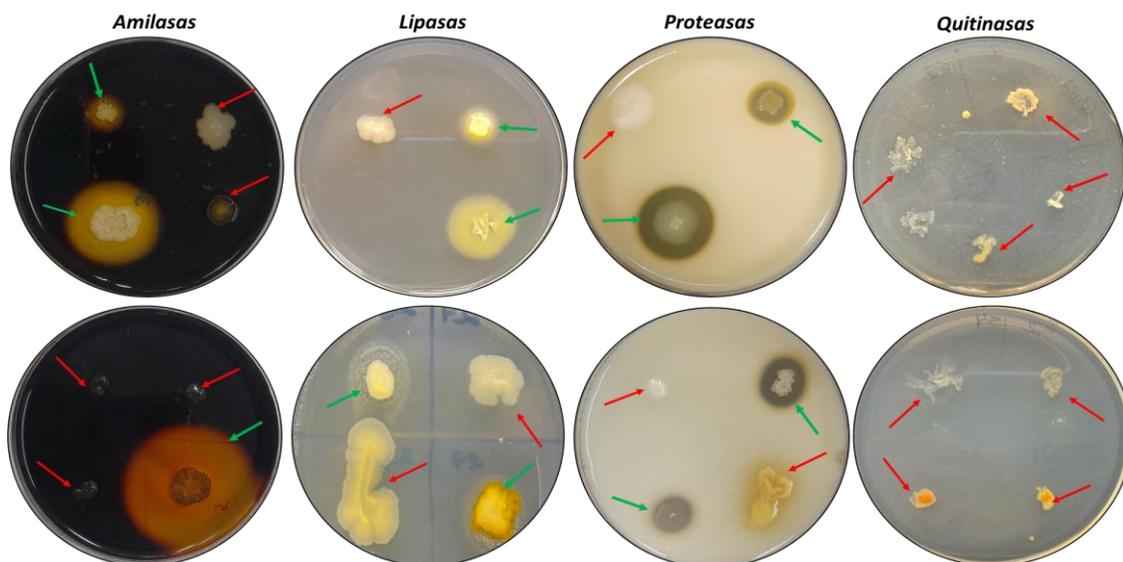


Figura 3.3.3.1a: Fotografía de las placas de petri al momento de la lectura de resultados de las determinaciones de actividad enzimática de los distintos aislamientos bacterianos de la colección. Las flechas color verde y rojas indican resultados positivos y negativos respectivamente.

Si se analizan los resultados positivos de las distintas actividades enzimáticas según el microhábitat de donde se obtuvieron los aislamientos ([Figura 3.3.3.1b](#)) se puede observar que en todos los microhábitats se encuentran aislamientos con estas actividades líticas.

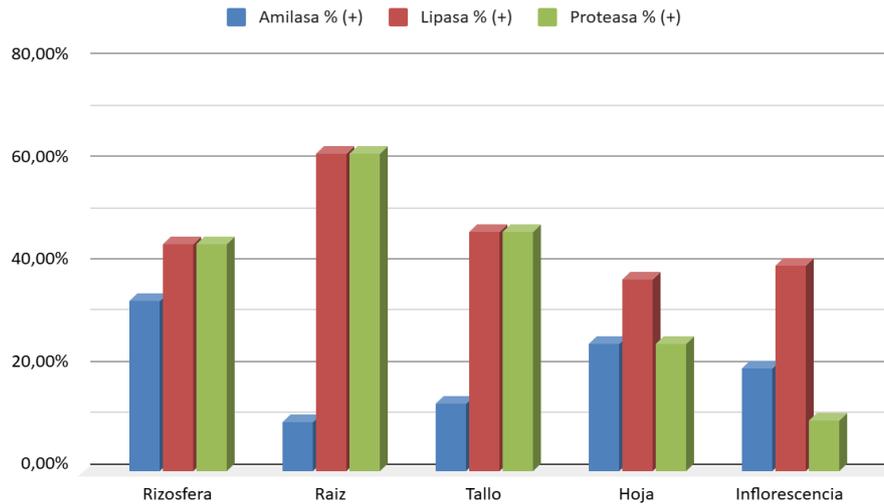
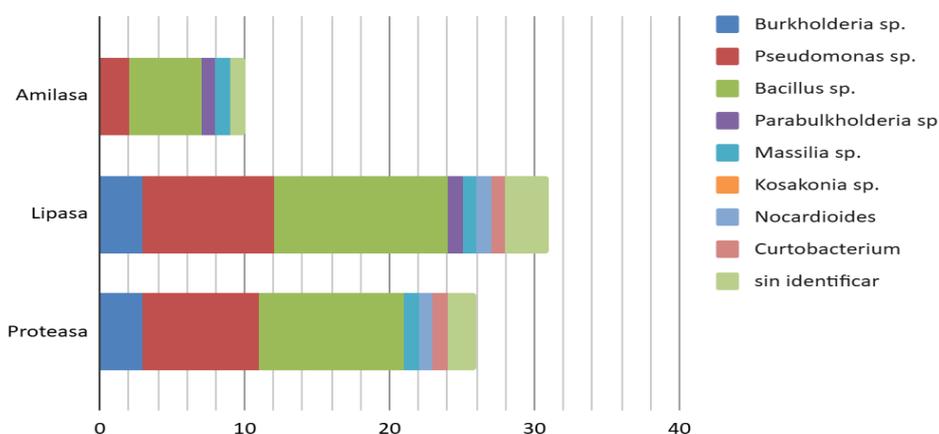


Figura 3.3.3.1b: Se muestran los % de resultados (+) de los ensayos de amilasa, lipasa y proteasa respectivamente para los diferentes aislamientos en función del microhábitat.

- En general para todos los ensayos enzimáticos, los microhábitats subterráneos mostraron mayor actividad lítica (excepto amilasa en raíz), aunque en los órganos aéreos también se observaron altos porcentajes de actividad enzimática positiva.
- La actividad lítica que lidera dentro de los aislamientos de la colección es la de lipasa, seguida de cerca por la de proteasa; en menor medida amilasa con proporciones significativamente menores. No se encontró actividad quitinasa en ningún aislamiento bacteriano.

Respecto a los géneros bacterianos asociados a las distintas actividades enzimáticas evaluadas ([Figura 3.3.3.1c](#)) se encontró que la gran mayoría pertenecen al género *Bacillus* y *Pseudomonas*.



Figuras 3.3.3.1c: Se muestran los resultados positivos de los ensayos de amilasa, lipasa y proteasa respectivamente (no de quitinasa ya que no tuvo ningún resultado positivo) para los diferentes aislamientos en función del género.

Con estos resultados de actividad enzimática se calculó el Índice de Caracterización Enzimática de Antagonismo (ICEA), cuyos resultados detallados se encuentran en la [Tabla A3.e del ANEXO 3](#). Los aislamientos bacterianos con mejores ICEA (iguales a 0,75) se muestran en la [Tabla 3.3.3.1a](#), donde se aprecia que son 4 aislamientos bacterianos de los géneros *Bacillus* (2), *Pseudomonas* y *Massilia*; y dos de estos aislamientos fueron obtenidos de la endosfera de raíz (**R5** y **R9**).

Tabla 3.3.3.1.e: se muestran los aislamientos con mejores ICEA (iguales a 0,75) especificando sus géneros.

Aislamiento	Género
R5	<i>Massilia</i>
R9	<i>Pseudomonas</i>
Rh9	<i>Bacillus</i>
T6	<i>Bacillus</i>

3.3.3.2 Ensayos *in vitro* de antagonismo contra hongos fitopatógenos. Cálculo de índices PICR e IPA.

Se logró caracterizar *in vitro* a todos los aislamientos bacterianos de la colección en relación al antagonismo en enfrentamientos en placa contra los 4 hongos fitopatógenos elegidos para esta determinación: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Los resultados detallados para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla A3.e del ANEXO 3](#).

En la [Figura 3.3.3.2a](#) se muestra el % de antagonismo positivo del total de la colección para cada uno de los hongos fitopatógenos ensayados, observándose un mayor antagonismo contra *Alternaria* y *Sclerotinia*, y en menor medida *Botrytis* y *Fusarium*.

Los aislamientos que mostraron actividad antagonista mayormente provienen de los microhábitats subterráneos, principalmente de raíz de cannabis; la actividad antagonista de los aislamientos obtenidos de los microhábitats aéreos fue significativamente menor, incluso ninguno de los aislamientos del tallo mostró actividad antagonista ([Figura 3.3.3.2a](#)).

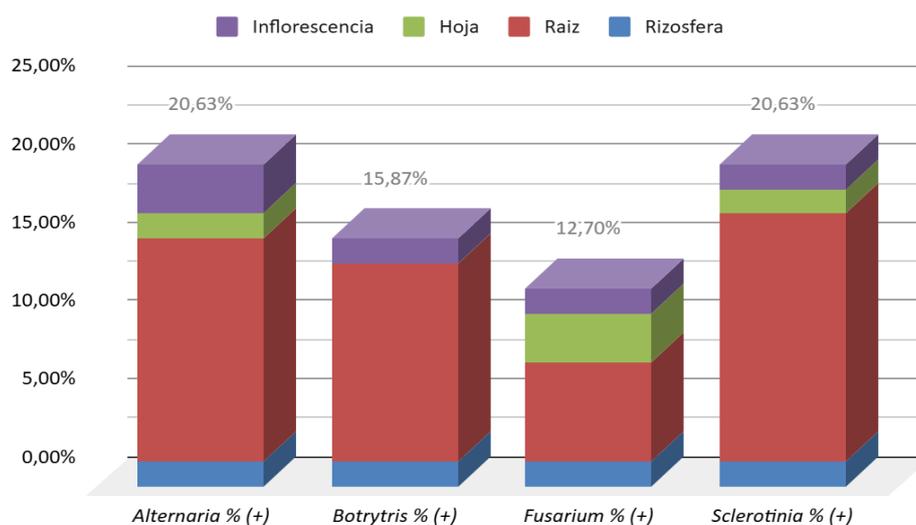


Figura 3.3.3.2a: Se observa el % de resultados positivos de las diferentes pruebas contra cada uno de los hongos para los diferentes aislamientos en función del microhábitat.

Los géneros más relevantes de la colección bacteriana que mostraron antagonismo contra los hongos fitopatógenos son *Pseudomonas*, mostrando una alta actividad contra *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*, y *Burkholderia* y *Bacillus* con similar actividad contra los 4 hongos fitopatógenos ensayados (Figura 3.3.3.2b).

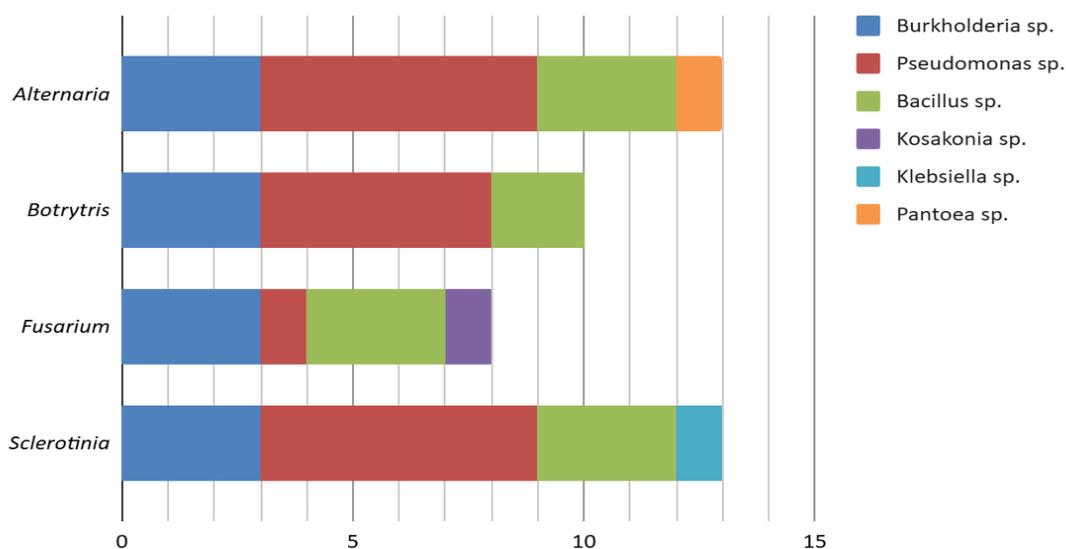


Figura 3.3.3.2b: Se muestran los resultados positivos de las diferentes pruebas contra cada uno de los hongos para los diferentes aislamientos en función del género.

En la [Figura 3.3.3.2c](#) se detallan los aislamientos con mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) para cada hongo fitopatógeno.

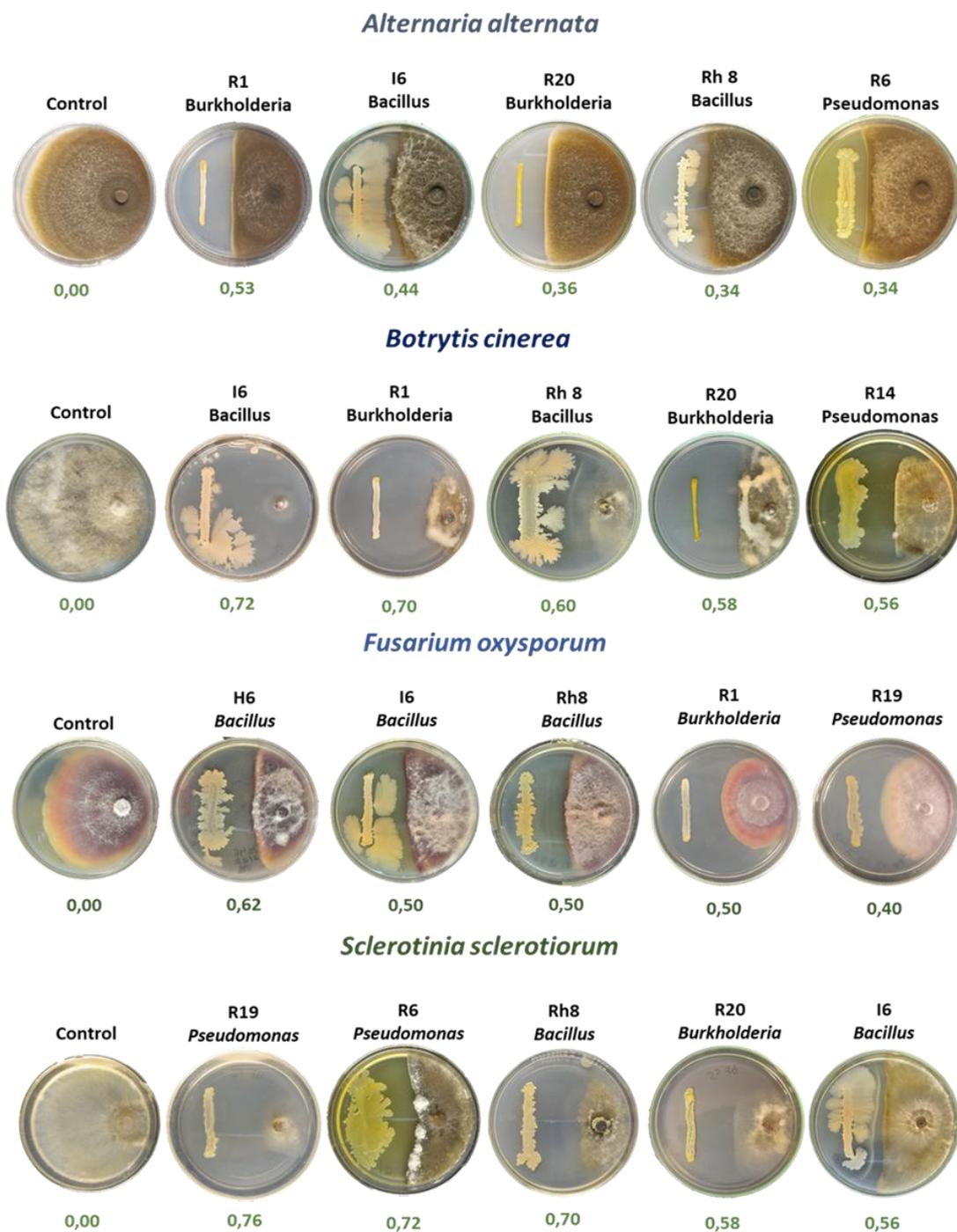


Figura 3.3.3.2c. Fotografía de los enfrentamientos en placa de los aislamientos bacterianos con mayor PICR contra los hongos fitopatógenos ensayados.

- Se puede observar en las fotografías una inhibición del crecimiento radial muy significativa respecto a las placas control de cada hongo, llegando a detener hasta un

76% del crecimiento normal del fitopatógeno (aislamiento R19 – *Pseudomonas*, contra *Sclerotinia sclerotiorum*).

- Los aislamientos R1 (endosfera), R19, R20, R21, Rh8, I6 (endosfera) y H6 mostraron antagonismo contra los 4 hongos fitopatógenos ensayados, pertenecientes a los géneros *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Burkholderia* y el resto *Bacillus* respectivamente, obteniendo un PICR promedio de 0,56; 0,49; 0,48; 0,48; 0,54; 0,56 y 0,45 respectivamente.

Con los resultados de la caracterización enzimática y los enfrentamientos duales en placa se calculó el Índice de Potencial Antagonismo (*IPA*) para cada aislamiento, detallado en la [Tabla A3.e](#) del [ANEXO 3](#). En la [Tabla 3.3.3.2a](#) se resumen los aislamientos con mayor IPA especificando sus géneros.

Tabla 3.3.3.2a. Aislamientos bacterianos con Índice de Potencial Antagonismo (IPA) mayor a 0,7.

Aislamiento	Género	IPA
I6	<i>Bacillus</i>	0,81
R1	<i>Burkholderia</i>	0,81
Rh8	<i>Bacillus</i>	0,79
R6	<i>Pseudomonas</i>	0,77
R19	<i>Pseudomonas</i>	0,74
R20	<i>Burkholderia</i>	0,73
R21	<i>Burkholderia</i>	0,73

- Se encontró que 7 de los 63 aislamientos (11% de la colección) obtuvo un IPA mayor a 0,7. Estos aislamientos se asociaron a los géneros *Burkholderia*, *Bacillus* y *Pseudomonas*.
- 3 de estos aislamientos fueron obtenidos de endosfera: **I6, R1 y R6.**

3.3.4 Cálculo de índices combinados de colonización, promoción del crecimiento vegetal y potencial antagonismo; Selección de aislamientos en base a índices.

Combinando los resultados de la caracterización enzimática relacionada a la colonización vegetal (*ICEC*) con los resultados de la caracterización de promoción del crecimiento vegetal y los resultados de la actividad de biocontrol de los diferentes aislamientos bacterianos, se calcularon los índices de Promoción del Crecimiento Vegetal (*IPPCV*) y de Potencial Biocontrol (*IPB*), respectivamente.

Los resultados detallados del IPPCV para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla A3.d](#) del [ANEXO 3](#). En la [Tabla 3.3.4a](#) se resumen los aislamientos bacterianos con mayor IPPCV, entre los cuales se distingue el género *Bacillus* (4) y *Pseudomonas* (2). De los aislamientos mencionados previamente, 4 de ellos fueron obtenidos de endosfera de raíz, tallo e inflorescencia: **R5, R9, T15 y I6**.

Tabla 3.3.4a. Detalle de los aislamientos bacterianos con mayor IPPCV (mayor o igual a 1) especificando el género y microhábitat.

Aislamiento	Género	IPPCV
Rh6	<i>Bacillus</i>	1,11
R5	<i>Massilia</i>	1,03
R17	<i>Klebsiella</i>	1,03
I6	<i>Bacillus</i>	1,03
I10	<i>Pseudomonas</i>	1,03
H8	<i>Bacillus</i>	1,03
T11	<i>Sin Determinar</i>	1,03
T15	<i>Bacillus</i>	1,03
R9	<i>Pseudomonas</i>	1,00
Rh7	<i>Sin Determinar</i>	1,00

Los resultados detallados del IPB para cada uno de los aislamientos se muestran en la [Tabla A3.e](#) del [ANEXO 3](#). En la [Tabla 3.3.4b](#) se detallan los aislamientos bacterianos con mayor IPB, donde se destaca que la mayoría de ellos pertenece al género *Bacillus*. De los aislamientos mencionados previamente, 3 de ellos fueron obtenidos de endosfera de raíz e inflorescencia: **R5, R9, e I6**.

Tabla 3.3.4b. Aislamientos bacterianos con mayor IPB (mayor a 0,65) especificando el género y microhábitat de donde fueron obtenidos.

Aislamiento	Género	IPB
I6	<i>Bacillus</i>	0,90
Rh8	<i>Bacillus</i>	0,89
H1	<i>Bacillus</i>	0,72
R5	<i>Massilia</i>	0,69
R9	<i>Pseudomonas</i>	0,69
R17	<i>Klebsiella</i>	0,69
T11	<i>Sin Determinar</i>	0,68

Finalmente, los 2 aislamientos bacterianos que se seleccionaron para el ensayo *in vivo* de enraizamiento de esquejes son:

- **Aislamiento I6:** Aislado de endosfera de inflorescencias, perteneciente al género *Bacillus*, es el que mayor valor de IPB de toda la colección con un valor de 0,90. A su vez, se trata de uno de los aislamientos de la colección que presenta un IPPCV con un valor de 1,025.
- **Aislamiento R1:** Perteneciente al género *Burkholderia* y aislada de endosfera de raíz. Si bien sus valores finales de IPB (0,40) y de IPPCV (0,9375) no se encontraron dentro de los valores más altos de la colección, esto es debido a que presenta un ICEC=0 (actividades celulasa y pectinasa negativas), se valoró su inclusión en el ensayo de enraizamiento *in vivo* en esquejes de cannabis debido a que presenta el valor de Índice de Potencial Antagonismo más alto de la colección (0,81) y a su vez el tercer valor más alto de la colección en Eficiencia de Solubilización de Fósforo Insoluble (1,75).

3.4 ENSAYO *IN VIVO* EN ESQUEJES DE *CANNABIS SATIVA* L.

Para evaluar el efecto promotor de los dos aislamientos bacterianos seleccionados de la colección de bacterias asociadas a plantas de cannabis, se llevó adelante un ensayo de enraizamiento de esquejes, con duplicados de los siguientes tratamientos:

- Tratamiento Control sin Inocular (**NI**)
- Tratamiento inoculado con el aislamiento I6 – *Bacillus* sp. (**I6**)
- Tratamiento inoculado con el aislamiento R1 – *Burkholderia* sp. (**R1**)
- Tratamiento inoculado con cepas comerciales *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Paraburkholderia tropica*. (**BG**)

Luego de 19 días de iniciado el ensayo, los esquejes se descalzaron y se lavaron las raíces para realizar la evaluación del ensayo (los resultados detallados se encuentran en el [Anexo 4](#), [Tabla A4.a](#), [Tabla A4.b](#)). El tratamiento que obtuvo un mayor porcentaje de esquejes enraizados fue el inoculado con el aislamiento bacteriano **R1 – *Burkholderia* sp.**, con un 91,2% ± 4,2% de los esquejes enraizados; en orden decreciente siguieron los tratamientos **BG** (88,2% de esquejes enraizados), **I6 – *Bacillus* sp.** (76,5% de esquejes enraizados) y **NI** (75,0% de esquejes enraizados).

Según se puede observar en la [Figura 3.4a](#), hacia el día 13 de plantados los esquejes, todos los tratamientos ya superaban el 50% de esquejes enraizados y con raíces salientes por debajo de la bandeja multicelda, siendo el tratamiento **NI** el que más

velozmente mostró un mayor porcentaje de esquejes con raíces salientes del envase. Sin embargo, hacia el final del ensayo, los tratamientos **R1 – *Burkholderia sp.*** y **BG** (cepas comerciales) superaron al tratamiento **NI** en el % de esquejes enraizados con raíces salientes por debajo del envase.

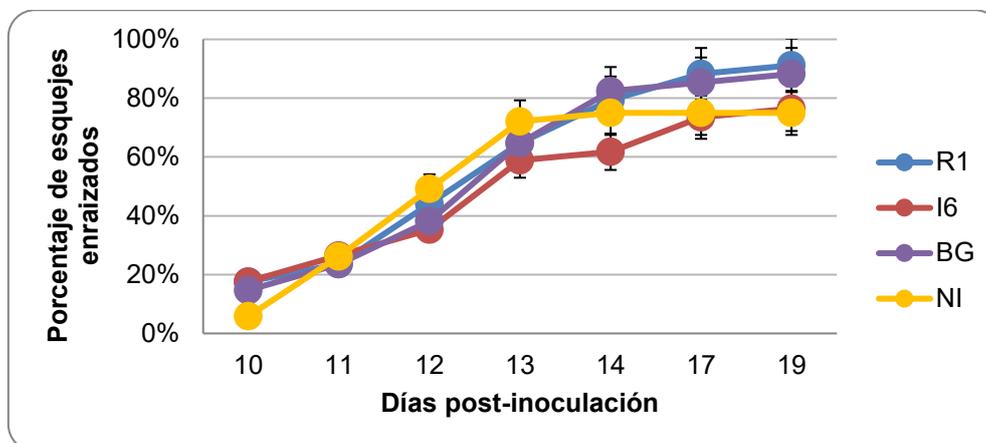


Figura 3.4a Porcentaje de esquejes enraizados según los días de iniciado el ensayo

Al analizar la calidad del sistema radical generado por los esquejes de los distintos tratamientos (**Figura 3.4b** y **Figura 3.4c**), se puede ver que los tratamientos con mayor porcentaje de esquejes con un enraizamiento abundante fueron el **NI** y el **R1 – *Burkholderia sp.*** (ambos con 35% de esquejes), seguido por **BG** (25%) y último **I6 – *Bacillus sp.*** (20%); sin embargo, también el tratamiento **NI** obtuvo un alto porcentaje de esquejes con pobre enraizamiento (30%), al igual que **I6 – *Bacillus sp.*** (45%) y **BG** (35%).



Figura 3.4b Categorías cualitativas de la calidad del sistema radical de los esquejes, y número de esquejes de cada tratamiento asociado a cada categoría.

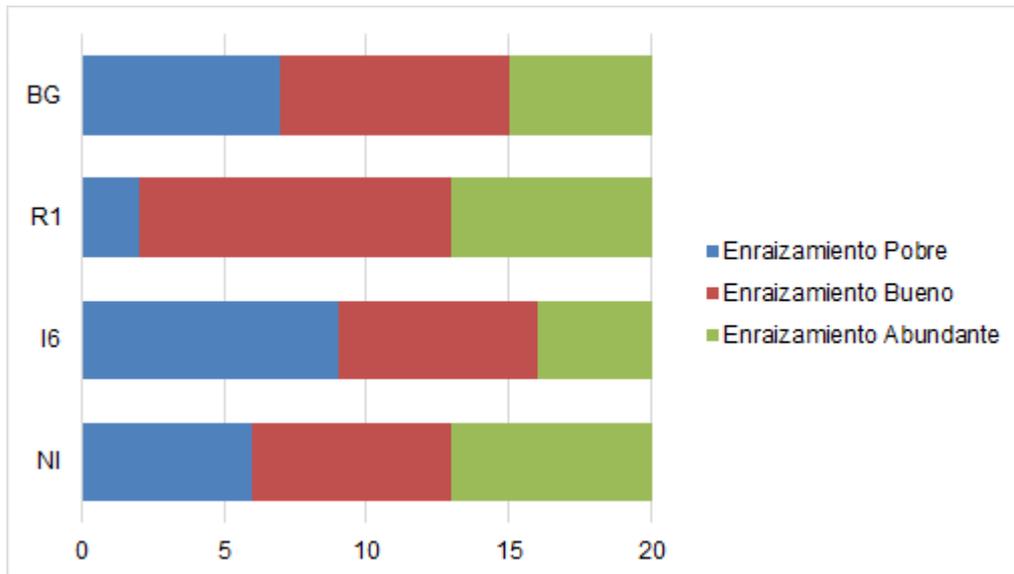


Figura 3.4c Número de esquejes de cada tratamiento asociado a cada categoría cualitativa de sistemas radicales

- ✓ Teniendo en cuenta el porcentaje de enraizamiento y la calidad del sistema radical generado en los esquejes, el tratamiento que mejores resultados obtuvo fue el inoculado con el aislamiento **R1 – *Burkholderia sp.***, dado el alto porcentaje de esquejes enraizados (+90%) y que la gran mayoría de estos (90%) mostraron un bueno-abundante sistema radical generado.
- ✓ En segundo lugar, la inoculación con cepas comerciales de *G. diazotrophicus* y *P. tropica* (tratamiento **BG**) también arrojó buenos resultados en cuanto a % de esquejes enraizados (88%), aunque muchos de estos mostraron un sistema radical pobre y debilitado (35%).
- ✓ Finalmente, la inoculación con el aislamiento **I6 – *Bacillus sp.*** mostró resultados muy similares al tratamiento control sin inocular (**NI**), tanto en % de esquejes enraizados (ambos ~75%) como en el agrupamiento por calidad del sistema radical.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La bioprospección microbiana, definida como la exploración de la biodiversidad en la búsqueda sistemática de microorganismos completos y/o componentes naturales con posibles usos para beneficio del ser humano en diferentes sectores (industrial, alimentario, cosmético, farmacéutico, agropecuario) (Castree, 2003), comprende las tareas de aislar, identificar, clasificar, y caracterizar a nivel bioquímico y genético a microorganismos con potencial uso biotecnológico. En este sentido, el presente Trabajo Final de Laboratorio de Procesos Biotecnológicos describe los ensayos de bioprospección bacteriana tomando como objeto de estudio a la diversidad de bacterias cultivables asociadas a distintos microhábitats subterráneos y aéreos de plantas de *Cannabis sativa* L. variedad Charlotte's Angel (quimiotipo III, ratio CBD-THC= 18:1), Fenotipo N° 2 (Banco de Semillas Dutch Passion, Holanda), en la búsqueda de bacterias que potencialmente puedan emplearse en el desarrollo de bioinsumos para el sector agrícola/hortícola.

- En resumen, se lograron aislar 63 bacterias asociadas a diferentes órganos de cannabis, de las cuales 21 aislamientos se obtuvieron de tejidos superficialmente desinfectados cuyos controles de desinfección superficial fueron satisfactorios, indicando el carácter endofítico de estos aislamientos en particular.

- La descripción taxonómica de la colección bacteriana generada en este trabajo coincide con los taxones bacterianos frecuentemente aislados de los entornos de las plantas, donde se describe a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* como ubicuos en comunidades microbianas tanto de suelo, así como de rizosfera, filosfera y endosfera de diversas plantas (Bulgarelli et al., 2013; Mongkoltharuk, 2012), así como al género *Pantoea* más vinculado a la colonización de órganos aéreos (Romero et al. 2016). En lo que respecta a trabajos realizados en plantas de cannabis, se encontró coincidencia con la bibliografía acerca de los géneros bacterianos aislados de los diferentes órganos vegetales (Bano et al., 2022; Scott et al., 2018; Taghinasab et al., 2020), con gran predominio de *Bacillus* y *Pseudomonas*, pero también con presencia de otros géneros como *Pantoea* y *Microbacterium*. Sin embargo, en el presente trabajo también se aislaron bacterias asociadas a los géneros *Burkholderia*, *Paraburkholderia*, *Kosakonia* y *Klebsiella*, entre otros, que no se han encontrado en los reportes bibliográficos relevados.

- La caracterización de aislamientos bacterianos de la colección generada en este trabajo coincide con la bibliografía que describe a los géneros *Bacillus*, *Burkholderia*,

Curtobacterium, *Pantoea*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, entre otros, como los más reportados por sus probadas propiedades promotoras del crecimiento vegetal (Arif et al, 2020; Gupta et al., 2021; Herrera-Quiterio et al., 2020; Santoyo et al., 2016). Incluso, muchos de estos géneros bacterianos han sido aislados de plantas de cannabis por diferentes grupos de investigación y caracterizados en relación a sus rasgos PGPB (Afzal et al., 2015; Corredor-Perilla et al., 2023; Scott et al., 2018), encontrando un alto grado de respuesta positiva a los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal evaluados, al igual que los resultados descriptos en el presente trabajo:

- ⊕ Un total de 9 aislamientos (14,3% de la colección), entre ellos algunos de los géneros *Burkholderia*, *Kosakonia*, y *Bacillus* mostraron una alta eficiencia de solubilización de fósforo (halo mayor a dos veces el tamaño de su colonia). Todos estos aislamientos se obtuvieron de los órganos vegetales de raíz, tallo y hoja.
- ⊕ Un total de 44 aislamientos (69,84% de la colección), entre ellos algunos de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, y *Burkholderia*, principalmente aislados de raíz, tallo y rizosfera, con capacidad de crecer fijando el nitrógeno atmosférico.

- Respecto a la caracterización de los aislamientos de la colección en relación a su capacidad antagonista contra hongos fitopatógenos, se encontró coincidencia con la bibliografía que describe a los géneros *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, entre otros, como agentes bacterianos de biocontrol, por evidenciar algún mecanismo que prevenga o disminuya el impacto de las enfermedades fúngicas y/o bacterianas en las plantas directamente a través de su interacción negativa hacia el fitopatógeno (Bonaterra et al., 2022; Kim et al., 2012). La bibliografía consultada acerca de trabajos realizados sobre plantas de cannabis (Afzal et al 2015; Corredor-Perilla 2023; Dumigan et al 2022; Scott et al 2018) demuestra la presencia de aislamientos bacterianos con capacidades antagonistas contra hongos fitopatógenos de diferentes géneros, entre ellos *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, entre otros, encontrando similitudes entre estos resultados y los descriptos en este trabajo de laboratorio:

- ⊕ Entre el 12% y el 20% de la colección mostró una interacción negativa directa contra los distintos hongos fitopatógenos ensayados, evidenciando la inhibición del crecimiento en los enfrentamientos en placa: en algunos casos la inhibición del crecimiento llegó a detener hasta un 76% el crecimiento control del fitopatógeno.

⊕ Se encontraron 7 aislamientos bacterianos relevantes, ya que mostraron antagonismo contra los 4 hongos fitopatógenos ensayados, con inhibiciones del crecimiento radial del orden del 45%-56%: principalmente son aislamientos de microhábitats subterráneos y asociados a géneros bacterianos *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Burkholderia*.

- Finalmente, la selección de dos aislamientos bacterianos de la colección generada en este trabajo y su utilización como bioinsumo experimental con el objetivo de mejorar el desarrollo radical en la propagación vegetativa de cannabis mediante esquejes mostró resultados positivos y alentadores: si bien se trata de un ensayo exploratorio y será necesario ahondar en los mecanismos de promoción del crecimiento involucrados en la interacción planta-bacteria, se evidenció que los esquejes inoculados con el cultivo bacteriano del aislamiento **R1 – *Burkholderia* sp.**, obtuvo el mejor porcentaje de esquejes enraizados (+90%) y que la gran mayoría de estos (90%) mostraron un bueno-abundante sistema radical generado, superando en estas mediciones al tratamiento control sin inocular (75% de esquejes enraizados y 70% de esquejes con bueno-abundante sistema radical).

A modo de conclusión final se puede destacar que las plantas de *Cannabis sativa* L. variedad Charlotte's Angel resultaron ser un reservorio natural de diversas bacterias cultivables, muchas de las cuales pudieron ser aisladas y caracterizadas, proporcionando así una colección bacteriana con numerosos representantes que poseen características beneficiosas para el crecimiento vegetal, muchas de éstas de carácter endófito lo cual le otorga un plus a la hora de la elección para el diseño de un bioinsumo agrícola. Sin embargo, es necesario resaltar la necesidad de continuar con la caracterización exhaustiva de la colección respecto a otros rasgos PGPB de importante como puede ser la capacidad de producir sideróforos, producción de fitohormonas (aspecto muy importante para la propagación vegetal a través de esquejes), seguridad biológica, y otros.

Con la realización de este Trabajo Final de Laboratorio de Procesos Biotecnológicos, además de alcanzar los objetivos de entrenamiento en laboratorio como requisito del trabajo final, en particular el diseño de experimentos, cultivo de plantas y microorganismos, procesamiento de datos y elaboración de informes, se construyó una colección bacteriana con características muy interesantes para su potencial uso como

bioinsumos agrícolas con posibilidad de evaluación no sólo en plantas de cannabis sino también en otros cultivos, que será conservada por el grupo de Microorganismos de Aplicación en Agricultura (MAALab) del CINDEFI. Sus capacidades de promoción del crecimiento de las plantas y biocontrol podrá ser investigado más a fondo para explotar al máximo su potencial biotecnológico.

ANEXO 1 – AISLAMIENTO BACTERIANO: RECuento POBLACIONAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS. COLECCIÓN DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS:

Tabla A1.a Recuento poblacional bacteriano para cada una de las muestras procesadas de cada microhábitat estudiado (tanto para muestras sin desinfección como muestras con previa desinfección).

Microhábitat	Desinfección	Recuento (UFC/gr)	Log (UFC/gr)
Rizosfera	-	2,88E+07	7,459
Rizosfera	-	2,70E+07	7,431
Raíz	Si	2,05E+05	5,312
Raíz	Si	1,71E+07	7,232
Raíz	No	1,66E+08	8,219
Raíz	No	4,00E+07	7,602
Tallo	Si	4,48E+01	1,651
Tallo	No	3,71E+02	2,569
Tallo	No	4,38E+02	2,641
Hoja	No	2,29E+02	2,359
Hoja	No	3,18E+02	2,502
Flor	Si	3,91E+02	2,592
Flor	Si	1,47E+02	2,166
Flor	No	1,90E+04	4,278
Flor	No	3,19E+03	3,503

Tabla A1.b: Listado total de aislamientos obtenidos y su microhábitat de origen especificando si es total (sin desinfección previa) o endófito (con desinfección previa).

Aislamiento	Microhábitat de Origen (total/endófito)	Aislamiento	Microhábitat de Origen (total/endófito)
R1	Endósfera de raíz	I3	Endósfera de inflorescencias
R2	Endósfera de raíz	I4	Endósfera de inflorescencias
R3	Endósfera de raíz	I5	Endósfera de inflorescencias
R4	Endósfera de raíz	I6	Endósfera de inflorescencias
R5	Endósfera de raíz	I7	Endósfera de inflorescencias
R6	Endósfera de raíz	I8	Asociada a inflorescencias
R7	Endósfera de raíz	I9	Asociada a inflorescencias
R8	Endósfera de raíz	I10	Asociada a inflorescencias
R9	Endósfera de raíz	H1	Asociada a hoja
R10	Endósfera de raíz	H2	Asociada a hoja
R11	Endósfera de raíz	H3	Asociada a hoja
R12	Asociada a raíz	H4	Asociada a hoja
R13	Asociada a raíz	H5	Asociada a Hoja
R14	Asociada a raíz	H6	Asociada a Hoja
R15	Asociada a raíz	H7	Asociada a Hoja
R16	Asociada a raíz	H8	Asociada a Hoja
R17	Asociada a raíz	T1	Asociada a Tallo
R18	Asociada a raíz	T2	Asociada a Tallo
R19	Asociada a raíz	T3	Asociada a Tallo
R20	Asociada a raíz	T4	Asociada a Tallo
R21	Asociada a raíz	T5	Asociada a Tallo
Rh1	Asociada a rizosfera	T6	Asociada a Tallo
Rh2	Asociada a rizosfera	T7	Asociada a Tallo
Rh3	Asociada a rizosfera	T8	Asociada a Tallo
Rh4	Asociada a rizosfera	T9	Asociada a Tallo
Rh5	Asociada a rizosfera	T10	Asociada a Tallo
Rh6	Asociada a rizosfera	T11	Asociada a Tallo
Rh7	Asociada a rizosfera	T12	Asociada a Tallo
Rh8	Asociada a rizosfera	T13	Endósfera de Tallo
Rh9	Asociada a rizosfera	T14	Endósfera de Tallo
I1	Endósfera de inflorescencias	T15	Endósfera de Tallo
I2	Endósfera de inflorescencias		

ANEXO 2 – IDENTIFICACIÓN DE CEPAS EN NCBI

Tabla A2.a: Resultado de la asignación taxonómica de los diferentes aislamientos bacterianos de la colección, indicando largo de secuencia, género y especie, porcentaje de identidad y número de acceso del mejor resultado del alineamiento con la base de datos del NCBI.

Aislamiento	Longitud de Secuencia	Género	Especie	% de Identidad	Nro. de Acceso
R1	830	<i>Burkholderia</i>	<i>sp.</i>	100.00%	MG452786.1
R2	828	<i>Pseudomonas</i>	<i>sp.</i>	99,88%	DQ300313.1
R3	800	<i>Bacillus</i>	<i>sp.</i>	99.62%	OR131050.1
R4	820	<i>Paraburkholderia</i>	<i>sp.</i>	100.00%	MH844876.1
R5	810	<i>Massilia</i>	<i>sp.</i>	100.00%	PP837887.1
R6	810	<i>Pseudomonas</i>	<i>mediterranea</i>	100.00%	KF054768.1
R7	839	<i>Pseudomonas</i>	<i>mediterranea</i>	99.88%	CP102176.1
R8	838	<i>Pseudomonas</i>	<i>sp.</i>	100.00%	ON419205.1
R9	818	<i>Pseudomonas</i>	<i>sp.</i>	100.00%	ON419205.2
R10	839	<i>Bacillus</i>	<i>bacterium</i>	99,76%	MT799960.1
R11	598	<i>Kosakonia</i>	<i>sp.</i>	100.00%	KR189886.1
R12	850	<i>Priestia sp.</i>	<i>megaterium</i>	100.00%	KY316462.1
R13	819	<i>Pseudomonas</i>	<i>fulva</i>	99,88%	KT253977.1
R14	819	<i>Pseudomonas</i>	<i>sp.</i>	100.00%	ON419226.1
R15	810	<i>Pseudomonas</i>	<i>nitroreducens</i>	100.00%	MT472129.1
R16	808	<i>Nocardioides</i>	<i>sp.</i>	99, 88%	MT936121.1
R17	808	<i>Klebsiella</i>	<i>sp.</i>	100.00%	KF896101.1
R18	818	<i>Pseudomonas</i>	<i>sp.</i>	100.00%	MN944909.1
R19	829	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	100.00%	JQ659966.1
R20	789	<i>Burkholderia</i>	<i>sp.</i>	100.00%	AB921271.1
R21	819	<i>Burkholderia</i>	<i>sp.</i>	100.00%	AB921271.2
Rh1	839	<i>Paraburkholderia</i>	<i>phytofirmans</i>	99.76%	OQ236374.1
Rh2	799	<i>Flavobacterium</i>	<i>hauense</i>	98.12%	MW089115.1
Rh3	169	<i>Bacillus</i>	<i>sp.</i>	100.00%	KT957312.1
Rh4	819	<i>Pseudomonas</i>	<i>reinekei</i>	100.00%	LT838073.1
Rh5	839	<i>Bacillus</i>	<i>thuringiensis</i>	100.00%	CP050183.1
Rh6	829	<i>Bacillus</i>	<i>mobilis</i>	100.00%	MT515806.1
Rh7	Sin identificar				
Rh8	769	<i>Bacillus</i>	<i>anthracis</i>	100.00%	CP054816.1
Rh9	778	<i>Bacillus</i>	<i>thuringiensis</i>	100.00%	CP019230.1
I1	Sin identificar				
I2	869	<i>Bacillus</i>	<i>sp.</i>	100.00%	GU458276.1
I3	870	<i>Bacillus</i>	<i>sp.</i>	100.00%	MN410651.1
I4	843	<i>Pantoea</i>	<i>sp.</i>	100.00%	MT557009.1
I5	868	<i>Bacillus</i>	<i>sp.</i>	100.00%	KC466249.1
I6	758	<i>Bacillus</i>	<i>amyloliquefaciens</i>	99.87%	OL847641.1
I7	843	<i>Pseudomonas</i>	<i>sp.</i>	100.00%	KX645738.1
I8	779	<i>Bacillus</i>	<i>proteolyticus</i>	100.00%	MN448444.1
I9	850	<i>Pseudomonas</i>	<i>sp.</i>	100.00%	JX067668.1
I10	853	<i>Pseudomonas</i>	<i>oryzihabitans</i>	99.65%	PQ160418.1

Tabla A2.a (continuación)

Aislamiento	Longitud de Secuencia	Género	Especie	% de Identidad	Nro. de Acceso
H1	842	<i>Kosakonia</i>	<i>sp.</i>	100.00%	MN648222.1
H2	Sin identificar				
H3	Sin identificar				
H4	768	<i>Bacillus</i>	<i>velezencis</i>	99.87%	HQ238543.1
H5	160	<i>Bacillus</i>	<i>sp.</i>	100.00%	MT415999.1
H6	418	<i>Bacillus</i>	<i>amyloliquefaciens</i>	97.61%	JQ420832.1
H7	799	<i>Bacillus</i>	<i>sp.</i>	100.00%	MG470705.1
H8	829	<i>Bacillus</i>	<i>zanthoxyli</i>	100.00%	OQ410708.1
T1	818	<i>Bacillus</i>	<i>thuringiensis</i>	99.88%	MT799960.1
T2	810	<i>Brachybacterium</i>	<i>sp.</i>	100.00%	OP989961.1
T3	229	<i>Bacillus</i>	<i>sp.</i>	99.56%	MT664693.1
T4	819	<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	100.00%	OM981306.1
T5	778	<i>Microbacterium</i>	<i>sp.</i>	100.00%	MH127624.1
T6	635	<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	100.00%	MN966874.1
T7	779	<i>Bacillus</i>	<i>thuringiensis</i>	100.00%	CP050183.1
T8	839	<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	100.00%	HF584764.1
T9	Sin identificar				
T10	800	<i>Microbacterium</i>	<i>sp.</i>	100.00%	KR906156.1
T11	Sin identificar				
T12	838	<i>Pantoea</i>	<i>sp.</i>	99.88%	KY440053.1
T13	818	<i>Bacillus</i>	<i>zhangzhouensis</i>	100.00%	MW405674.1
T14	789	<i>Curtobacterium</i>	<i>sp.</i>	100.00%	MW131580.1
T15	838	<i>Bacillus</i>	<i>sp.</i>	99.76%	JQ943617.1

ANEXO 3 – CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS ASOCIADOS A CANNABIS.

Tabla A3.a: Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (actividades celulasa y pectinasa). Y resultados del ICEC

Aislamiento	Celulasa	Pectinasa	ICEC	Aislamiento	Celulasa	Pectinasa	ICEC
R1	(-)	(-)	0	I3	(+)	(-)	0,5
R2	(-)	(-)	0	I4	(-)	(-)	0
R3	(-)	(-)	0	I5	(-)	(-)	0
R4	(-)	(-)	0	I6	(+)	(+)	1
R5	(+)	(+)	1	I7	(+)	(-)	0,5
R6	(-)	(+)	0,5	I8	(-)	(-)	0
R7	(-)	(+)	0,5	I9	(+)	(-)	0,5
R8	(-)	(-)	0	I10	(+)	(+)	1
R9	(+)	(+)	1	H1	(+)	(+)	1
R10	(-)	(+)	0,5	H2	(-)	(-)	0
R11	(-)	(-)	0	H3	(-)	(-)	0
R12	(-)	(-)	0	H4	(-)	(-)	0
R13	(+)	(-)	0,5	H5	(+)	(-)	0,5
R14	(-)	(+)	0,5	H6	(-)	(-)	0
R15	(-)	(-)	0	H7	(-)	(-)	0
R16	(-)	(-)	0	H8	(+)	(+)	1
R17	(+)	(+)	1	T1	(+)	(-)	0,5
R18	(-)	(-)	0	T2	(+)	(-)	0,5
R19	(-)	(-)	0	T3	(-)	(-)	0
R20	(-)	(-)	0	T4	(+)	(-)	0,5
R21	(-)	(-)	0	T5	(+)	(-)	0,5
Rh1	(-)	(-)	0	T6	(-)	(+)	0,5
Rh2	(+)	(-)	0,5	T7	(-)	(-)	0
Rh3	(+)	(-)	0,5	T8	(+)	(+)	1
Rh4	(-)	(-)	0	T9	(-)	(-)	0
Rh5	(-)	(-)	0	T10	(+)	(-)	0,5
Rh6	(+)	(+)	1	T11	(+)	(+)	1
Rh7	(+)	(+)	1	T12	(-)	(-)	0
Rh8	(+)	(+)	1	T13	(-)	(-)	0
Rh9	(+)	(-)	0,5	T14	(-)	(-)	0
I1	(-)	(-)	0	T15	(+)	(+)	1
I2	(-)	(-)	0				

Tabla A3.b: Resultados de los ensayos de Solubilización de Fósforo, y resultados de ESFI e ISolp. (se utilizó el valor de ESFI del aislamiento H2 (2) para normalizar los ESFI y obtener los ISolp).

Aislamiento	Solub. de P.	ESFI	ISolp
R1	+++	1,75	0,88
R2	+	0,10	0,05
R3	++	0,36	0,18
R4	++	0,15	0,08
R5	+	0,10	0,05
R6	+	0,10	0,05
R7	+	0,10	0,05
R8	+	0,10	0,05
R9	-	ND	ND
R10	+	0,10	0,05
R11	+++	1,85	0,93
R12	+	0,10	0,05
R13	++	0,16	0,08
R14	+	0,10	0,05
R15	++	0,36	0,18
R16	+	0,10	0,05
R17	+	0,10	0,05
R18	-	ND	ND
R19	++	1,22	0,61
R20	++	1,42	0,71
R21	+++	1,42	0,71
Rh1	+	0,10	0,05
Rh2	-	ND	ND
Rh3	++	0,74	0,37
Rh4	-	ND	ND
Rh5	-	ND	ND
Rh6	++	0,45	0,23
Rh7	-	ND	ND
Rh8	++	0,43	0,22
Rh9	-	ND	ND
I1	++	1,14	0,57
I2	-	ND	ND
I3	++	0,75	0,38
I4	++	0,79	0,40
I5	++	0,5	0,25
I6	+	0,10	0,05
I7	++	0,78	0,39
I8	+	0,10	0,05
I9	++	0,15	0,08
I10	+	0,10	0,05
H1	+++	0,25	0,13
H2	+++	2,00	1,00
H3	+	0,10	0,05

Tabla A3.b (continuación)

Aislamiento	Solub. de P.	ESFI	ISolp
H4	+++	0,85	0,43
H5	+++	0,60	0,30
H6	+	0,10	0,05
H7	+	0,10	0,05
H8	+	0,10	0,05
T1	-	ND	ND
T2	+	0,10	0,05
T3	-	ND	ND
T4	+	0,10	0,05
T5	+++	0,10	0,05
T6	-	ND	ND
T7	+	0,10	0,05
T8	+	0,10	0,05
T9	-	ND	ND
T10	-	ND	ND
T11	+	0,10	0,05
T12	+++	0,44	0,22
T13	-	ND	ND
T14	-	ND	ND
T15	+	0,10	0,05

Tabla A3.c: Resultados de la prueba de Fijación Biológica de Nitrógenos junto al valor del índice de FBN para los diferentes aislamientos.

Aislamiento	FBN-LGI	FBN-Nfb	FBN
R1	+	+	1
R2	-	-	0
R3	-	+	1
R4	+	+	1
R5	+	+	1
R6	-	-	0
R7	-	-	0
R8	-	-	0
R9	+	+	1
R10	-	+	1
R11	-	-	0
R12	-	+	1
R13	+	+	1
R14	-	+	1
R15	+	-	1
R16	+	+	1
R17	+	+	1
R18	-	-	0

Tabla A3.c (Continuación)

Aislamiento	FBN-LGI	FBN-Nfb	FBN
R19	+	+	1
R20	+	+	1
R21	+	-	1
Rh1	+	+	1
Rh2	-	-	0
Rh3	+	-	1
Rh4	+	-	1
Rh5	+	-	1
Rh6	+	+	1
Rh7	+	+	1
Rh8	-	-	0
Rh9	+	+	1
I1	+	-	1
I2	+	+	1
I3	+	+	1
I4	-	-	0
I5	+	-	1
I6	-	+	1
I7	-	+	1
I8	+	+	1
I9	+	+	1
I10	+	+	1
H1	-	-	0
H2	-	-	0
H3	+	+	1
H4	-	-	0
H5	-	-	0
H6	+	+	1
H7	+	-	1
H8	+	+	1
T1	+	+	1
T2	+	+	1
T3	+	+	0
T4	+	-	1
T5	-	-	0
T6	+	+	1
T7	+	+	1
T8	-	-	0
T9	-	-	0
T10	+	-	1
T11	+	+	1
T12	-	-	0
T13	+	-	1
T14	+	-	1
T15	+	+	1

Tabla A3.d: Resultados caracterización de rasgos PGPB e índices IMPCV y IPPCV.

Aislamiento	ISolP	FBN	IMPCV	ICEC	IPPCV
R1	0,88	1	0,9375	0	0,9375
R2	0,05	0	0,025	0	0,025
R3	0,18	1	0,59	0	0,59
R4	0,08	1	0,5375	0	0,5375
R5	0,05	1	0,525	1	1,025
R6	0,05	0	0,025	0,5	0,275
R7	0,05	0	0,025	0,5	0,275
R8	0,05	0	0,025	0	0,025
R9	0,00	1	0,5	1	1
R10	0,05	1	0,525	0,5	0,775
R11	0,93	0	0,4625	0	0,4625
R12	0,05	1	0,525	0	0,525
R13	0,08	1	0,54	0,5	0,79
R14	0,05	1	0,525	0,5	0,775
R15	0,18	1	0,59	0	0,59
R16	0,05	1	0,525	0	0,525
R17	0,05	1	0,525	1	1,025
R18	0,00	0	0	0	0
R19	0,61	1	0,805	0	0,805
R20	0,71	1	0,855	0	0,855
R21	0,71	1	0,855	0	0,855
Rh1	0,05	1	0,525	0	0,525
Rh2	0,00	0	0	0,5	0,25
Rh3	0,37	1	0,685	0,5	0,935
Rh4	0,00	1	0,5	0	0,5
Rh5	0,00	1	0,5	0	0,5
Rh6	0,23	1	0,6125	1	1,1125
Rh7	0,00	1	0,5	1	1
Rh8	0,22	0	0,1075	1	0,6075
Rh9	0,00	1	0,5	0,5	0,75
I1	0,57	1	0,785	0	0,785
I2	0,00	1	0,5	0	0,5
I3	0,38	1	0,6875	0,5	0,9375
I4	0,40	0	0,1975	0	0,1975
I5	0,25	1	0,625	0	0,625
I6	0,05	1	0,525	1	1,025
I7	0,39	1	0,695	0,5	0,945
I8	0,05	1	0,525	0	0,525
I9	0,08	1	0,5375	0,5	0,7875
I10	0,05	1	0,525	1	1,025
H1	0,13	0	0,0625	1	0,5625
H2	1,00	0	0,5	0	0,5
H3	0,05	1	0,525	0	0,525
H4	0,43	0	0,2125	0	0,2125
H5	0,30	0	0,15	0,5	0,4

Tabla A3.d (Continuación).

Aislamiento	ISolP	FBN	IMPCV	ICEC	IPPCV
H6	0,05	1	0,525	0	0,525
H7	0,05	1	0,525	0	0,525
H8	0,05	1	0,525	1	1,025
T1	0,00	1	0,5	0,5	0,75
T2	0,05	1	0,525	0,5	0,775
T3	0,00	1	0,5	0	0,5
T4	0,05	1	0,525	0,5	0,775
T5	0,05	0	0,025	0,5	0,275
T6	0,00	1	0,5	0,5	0,75
T7	0,00	0	0	0	0
T8	0,05	0	0,025	1	0,525
T9	0,00	0	0	0	0
T10	0,00	1	0,5	0,5	0,75
T11	0,05	1	0,525	1	1,025
T12	0,22	0	0,11	0	0,11
T13	0,00	0	0	0	0
T14	0,00	1	0,5	0	0,5
T15	0,05	1	0,525	1	1,025

Tabla A3.e: Resultados de la caracterización en relación a la colonización vegetal (ICEC) y a la actividad antagonista (actividad amilasa, lipasa, proteasa y quitinasa; y inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos), y resultado de los índices ICEA, IPA e IPB para cada uno de los aislamientos bacterianos del cepario.

Aislamiento	ICEC	Ami	Lip	Prot	Quit	ICEA	PICR (Aa)	PICR (BC)	PICR (Fo)	PICR (Ss)	PICR prom	IPA	IPB
R1	0,00	(-)	(+)	(+)	(-)	0,75	0,53	0,70	0,50	0,50	0,62	1,00	0,50
R2	0,00	(-)	(-)	(+)	(-)	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,06
R3	0,00	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R4	0,00	(-)	(+)	(-)	(-)	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,06
R5	1,00	(+)	(+)	(+)	(-)	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,38	0,69
R6	0,50	(-)	(+)	(+)	(-)	0,50	0,34	0,50	0,00	0,72	0,52	0,77	0,64
R7	0,50	(-)	(+)	(+)	(-)	0,50	0,26	0,46	0,00	0,38	0,37	0,62	0,56
R8	0,00	(-)	(+)	(+)	(-)	0,50	0,30	0,48	0,00	0,55	0,44	0,69	0,35
R9	1,00	(+)	(+)	(+)	(-)	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,38	0,69
R10	0,50	(-)	(+)	(-)	(-)	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,31
R11	0,00	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R12	0,00	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R13	0,50	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25
R14	0,50	(-)	(-)	(+)	(-)	0,25	0,20	0,56	0,00	0,34	0,37	0,49	0,50
R15	0,00	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
R16	0,00	(-)	(+)	(+)	(-)	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,13
R17	1,00	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,38	0,38	0,38	0,69
R18	0,00	(-)	(+)	(+)	(-)	0,50	0,25	0,34	0,00	0,36	0,32	0,57	0,28
R19	0,00	(-)	(+)	(+)	(-)	0,50	0,30		0,40	0,76	0,49	0,74	0,37
R20	0,00	(-)	(+)	(+)	(-)	0,50	0,36	0,58	0,38	0,58	0,48	0,73	0,36
R21	0,00	(-)	(+)	(+)	(-)	0,50	0,36	0,58	0,38	0,58	0,48	0,73	0,36
Rh1	0,00	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Rh2	0,50	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25
Rh3	0,50	(-)	(+)	(+)	(-)	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,38
Rh4	0,00	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Rh5	0,00	(-)	(+)	(-)	(-)	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,06
Rh6	1,00	(-)	(+)	NC	(-)	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,63
Rh7	1,00	(+)	(-)	(+)	(-)	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,63
Rh8	1,00	(+)	(-)	(+)	(-)	0,50	0,34	0,60	0,50	0,70	0,54	0,79	0,89
Rh9	0,50	(+)	(+)	(+)	(-)	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,38	0,44
I1	0,00	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
I2	0,00	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
I3	0,50	(-)	(+)	(-)	(-)	0,25	0,10	0,00	0,00	0,00	0,10	0,23	0,36
I4	0,00	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,20	0,20	0,10
I5	0,00	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
I6	1,00	(+)	(-)	(+)	(-)	0,50	0,44	0,72	0,50	0,56	0,56	0,81	0,90
I7	0,50	(-)	(+)	(-)	(-)	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,31
I8	0,00	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
I9	0,50	(-)	(+)	(-)	(-)	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,31
I10	1,00	(+)	(+)	(-)	(-)	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,63
H1	1,00	(+)	(-)	(-)	(-)	0,25	0,00	0,00	0,32	0,00	0,32	0,45	0,72
H2	0,00	(-)	(+)	(-)	(-)	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,06

Tabla A3.e (Continuación)

Aislamiento	ICEC	Ami	Lip	Prot	Quit	ICEA	PICR (Aa)	PICR (BC)	PICR (Fo)	PICR (Ss)	PICR prom	IPA	IPB
H3	0,00	(-)	(+)	(-)	(-)	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,06
H4	0,00	(-)	(+)	(-)	(-)	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,06
H5	0,50	(+)	(-)	(-)	(-)	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,31
H6	0,00	(-)	(-)	(+)	(-)	0,25	0,30		0,62	0,44	0,45	0,58	0,29
H7	0,00	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
H8	1,00	(-)	(-)	(+)	(-)	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,56
T1	0,50	(-)	(+)	(-)	(-)	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,38
T2	0,50	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25
T3	0,00	N.C	(-)	(+)	(-)	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,08
T4	0,50	(-)	(+)	(-)	(-)	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,31
T5	0,50	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25
T6	0,50	(+)	(+)	(+)	(-)	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,38	0,44
T7	0,00	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T8	1,00	(+)	(-)	(+)	(-)	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,63
T9	0,00	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T10	0,50	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25
T11	1,00	(-)	(+)	(+)	(-)	0,50	0,00	0,00	0,00	0,10	0,10	0,35	0,68
T12	0,00	(-)	(-)	(-)	(-)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T13	0,00	(-)	(+)	(+)	(-)	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,13
T14	0,00	(-)	(+)	(+)	(-)	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,13
T15	1,00	(-)	(+)	(+)	(-)	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,63

ANEXO 4 – ENSAYOS IN VIVO

Tabla A4.a: Porcentaje de esquejes enraizados en función del tiempo en días post inoculación.

DPI	Día 7	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Día 17	Día 19
R1-1	5,88%	17,65%	17,65%	29,41%	58,82%	82,35%	94,12%	94,12%
R1-2	0,00%	17,65%	29,41%	58,82%	70,59%	76,47%	82,35%	88,24%
I6-1	0,00%	11,76%	11,76%	17,65%	41,18%	41,18%	64,71%	70,59%
I6-2	0,00%	23,53%	41,18%	52,94%	76,47%	82,35%	82,35%	82,35%
BG-1	0,00%	17,65%	17,65%	29,41%	64,71%	82,35%	88,24%	88,24%
BG-2	0,00%	11,76%	29,41%	47,06%	64,71%	82,35%	82,35%	88,24%
NI-1	0,00%	11,76%	41,18%	70,59%	94,12%	100,0%	100,0%	100,0%
NI-2	0,00%	0,00%	11,11%	27,78%	50,00%	50,00%	50,00%	50,00%

Tabla A4.b Categorías cualitativas de enraizamiento de los distintos esquejes: Pobre enraizamiento, enraizamiento regular y enraizamiento abundante.

Tratamientos	Pobre	Regular	Abundante
R1 BI 1-2	2	11	7
I6 BI 1-2	9	7	4
BG BI 1-2	7	8	4
NI BI 1-2	6	7	7

ANEXO 5 – MEDIOS DE CULTIVO

Tabla A5.a: Composición medio R₂A

Componente	Concentración (g/l)
Extracto de levadura	0,5
Proteasa peptona n°3	0,5
Peptona ácida de caseína	0,5
Glucosa	0,5
Almidón soluble	0,5
Piruvato de sodio	0,3
Fosfato di potásico	0,3
Sulfato de magnesio	0,05
Agar	15,0
pH final = 7,2	Ajuste final 6,5

Tabla A5.b: Composición del medio de cultivo para determinación de enzimas celulasas.

Componente	Concentración (g/l)
NaNO ₃	2,0
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
KCl	0,5
Peptona	0,2
Carboximetilcelulosa	2,0
Agar	15,0
pH ajustado = 5,5	

Tabla A5.c: Composición del medio de cultivo para determinación de enzimas pectinasas.

Componente	Concentración (g/l)
Pectina cítrica	10,0
K ₂ HPO ₄	2,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
Solución nutritiva (a)	1,0
Peptona	0,5
Extracto de Levadura	0,5
Agar	15,0
pH ajustado	= 5,5

(a): 5 mg l⁻¹ de FeSO₄.7H₂O; 1,6 mg l⁻¹ de MnSO₄.H₂O; 1,4mg l⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O; 2 mg l⁻¹ de CoCl₂.

Tabla A5.d: Composición medio CaCO₃

Componente	Concentración (g/l)
Glucosa	50
Glicerol	30
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
CaCO ₃	10
Extracto de levadura	5
Agar	14

Tabla A5.e: Composición del medio NBRIP

Componente	Concentración (g/l)
Glucosa	10
Ca₃(PO₄)₂	5
MgCl₂.6H₂O	5
MgSO₄.7H₂O	0,25
Kcl	0,2
(NH₄)SO₄	0,1
Agar	15
pH	6,5

Tabla A5.f: Composición del medio de cultivo LGI semisólido sin fuente nitrogenada

Componente	Concentración (g/l)
Sacarosa	5,0
K₂HPO₄	0,2
KH₂PO₄	0,6
MgSO₄.7H₂O	0,2
CaCl₂.2H₂O	0,02
NaMoO₄.2H₂O	0,002
Fe-EDTA 1,64% p/v	4,0 ml l-1
Azul de Bromotimol 0,5% en KOH 0,2N	5,0 ml l-1
Vitamina (10mg biotina + 20mg Piridoxina en 100ml AD)	1,0 ml l-1
Agar	1,8
Ajustar pH	a 6.0 - 6.2

Tabla A5.g: Composición del medio de cultivo NFb semisólido sin fuente nitrogenada

Componente	Concentración (g/l)
Ac. Málico	5,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,02
Fe-EDTA 1,64% [p/v]	4,0 ml l ⁻¹
KOH	4,5
Azul de Bromotimol 0,5% en KOH 0,2N	2,0 ml l ⁻¹
Micronutrientes	2,0 ml l ⁻¹
Agar	1,8
Ajustar pH a 6.5 - 6.8 con NaOH	

Tabla A5.h: Composición del medio de cultivo para determinación de enzimas quitinasas.

Componente	Concentración (g/l)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,7
K ₂ HPO ₄	2,7
KH ₂ PO ₄	0,3
NaCl	0,5
KCl	0,5
Extracto de Levadura	0,13
Quitina Coloidal en pasta (~97% H°)	4,5
Púrpura de Bromocresol	0,15
Agar	15,0
pH ajustado = 4,7	

Tabla A5.i: Composición del medio de cultivo para determinación de enzimas lipasas.

Componente	Concentración (g/l)
NaCl	5,0
CaCl₂	0,1
Peptona	10,0
Tween 80	10,0
Agar	15,0
pH ajustado	= 5,5

Tabla A5.j: Composición del medio de cultivo para determinación de enzimas amilasas.

Componente	Concentración (g/l)
Almidón soluble	10,00
CaCl₂	0,15
MgSO₄·7H₂O	0,50
NaCl	0,50
Peptona	5,00
Extracto de Levadura	2,00
Agar	15,0
pH ajustado	= 5,50

Tabla A5.k: Composición de la solución nutritiva Hoagland modificada para crecimiento de plantas.

Componente	Concentración (g/l)
KNO₃	0,50
KH₂PO₄	0,14
Ca₂(NO₃)₂·4H₂O	1,18
MgSO₄·7H₂O	0,49

Componente	Concentración (mg/l)
FeSO₄.2H₂O	3,00
H₃BO₃	2,86
MnCl₄.4H₂O	1,81
ZnSO₄.7H₂O	0,22
CuSO₄.5H₂O	0,08
Na₂Mo₄.2H₂O	2,00
EDTANa₂	3,73
Ajustar pH	a 6,5

Tabla A5.I: Composición del medio LGI

Componente	Concentración (g/l)
Glucosa	1,0
NaCl	5,0
Triptona	10,0
Extracto de levadura	5,0
Agar	15,0
pH final	6,0

BIBLIOGRAFÍA

Afridi MS, Javed MA, Ali S, et al. (2022) New opportunities in plant microbiome engineering for increasing agricultural sustainability under stressful conditions. *Front. Plant Sci.* 13:899464. doi:10.3389/fpls.2022.899464

Afzal, I.Z.; Iqar, I. (2015) Selective isolation and characterization of agriculturally beneficial endophytic bacteria from wild hemp using Canola. *Pak. J. Bot.* 2015, 5, 1999–2008.

Álvarez Trentini, G (3 de noviembre 2023). “*Cannabis Sativa. L para el futuro Argentino: EL CAÑAMO INDUSTRIAL - HORTICOLA*”. Expo Cannabis 2023. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca.

Ángeles López GE, Brindis F, Cristians Niizawa S, Ventura Martínez R. (2014). *Cannabis sativa L., una planta singular.* *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 45(4), 1-6.

Arif I, Batool M, Schenk PM. (2020) Plant Microbiome Engineering: Expected Benefits for Improved Crop Growth and Resilience. *Trends in Biotechnology*, 38(12), 1385–1396. doi:10.1016/j.tibtech.2020.04.015

Baldani JI, Reis VM, Videira SS, et al. (2014) The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, 384(1-2), 413–431. doi:10.1007/s11104-014-2186-6

Bano I, Tanveer S, Ali B. (2022) Plant Growth Promoting Potential of Rhizobacteria Isolated from *Cannabis Sativa* L. *Pak Euro Journal of Medical and Life Sciences*. Vol. 5 No. 2. Doi: 10.31580/pjmls.v5i2.2568

Barros-Rodríguez A, Rangseekeaw P, Lasudee K, et al. (2021) Impacts of Agriculture on the Environment and Soil Microbial Biodiversity. *Plants*, 10, 2325. doi:10.3390/plants10112325

Berg G, Rybakova D, Fischer D, et al. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103–. doi:10.1186/s40168-020-00875-0

Bonaterrea A, Badosa E, Daranas N, et al. (2022) Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. *Microorganisms* 10, no. 9: 1759. doi:10.3390/microorganisms10091759

Brunner TF. (1973) Marijuana in ancient greece and rome? The literary evidence. *Bull Hist Med.* 1973 Jul-Aug;47(4):344-55. PMID: 4589521.

Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, et al. (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 807–838. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120106.

Camp W.H. (1936) The antiquity of hemp as an economic plant *J. NY Bot. Gard* 37:110-4.

Caplan, D.; Dixon, M.; Zheng, Y. (2018) Optimal rate of organic fertilizer during the vegetative-stage for Cannabis grown in two coir-based substrates. *Hortscience Horts* 2017, 52, 1307–1312.

Castree N. (2003) Bioprospecting: from theory to practice (and back again). *Transactions of the Institute of British Geographers*, 28(1), 35–55. doi:10.1111/1475-5661.00076

Chopra I.C., Chopra R.N. (1957) The use of cannabis drugs in India. *Bull. Narc.* 9:4-29.

CONABIO. Ficha informativa. *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae). Marihuana, cáñamo. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/cannabaceae/cannabis-sativa/fichas/ficha.htm> . Acceso web: 01/03/2025

Corredor-Perilla IC, Cuervo Andrade JL, Olejar KJ, Park SH. (2023) Beneficial properties of soil bacteria from Cannabis sativa L.: Seed germination, phosphorus solubilization and mycelial growth inhibition of Fusarium sp. *Rhizosphere*, Volume 27, 2023, 100780. Doi: 10.1016/j.rhisph.2023.100780.

Deb P, Talukdar SA, Mohsina K, et al. (2013) Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from Bacillus amyloliquefaciens P-001. *Springer Plus*, 2(1), 154–. doi:10.1186/2193-1801-2-154

de-Bashan LE, Nannipieri P, Antoun H, et al. (2020) Application of beneficial microorganisms and their effects on soil, plants, and the environment: the scientific legacy of

Professor Yoav Bashan. Biology and Fertility of Soils, s00374-020-01466-9. doi:10.1007/s00374-020-01466-9

de Graaff MA, Hornslein NB, Heather L, et al. (2019) Chapter One - Effects of agricultural intensification on soil biodiversity and implications for ecosystem functioning: A meta-analysis Author links open overlay panel. *Advances in Agronomy*, 155, 1–44. doi:10.1016/bs.agron.2019.01.001

Dumigan CR, Deyholos MK. (2022) Cannabis Seedlings Inherit Seed-Borne Bioactive and Anti-Fungal Endophytic Bacilli. *Plants (Basel)*. 2022 Aug 15;11(16):2127. doi:10.3390/plants11162127.

Dunne C, Crowley JJ, Moenne-Loccoz Y, et al. (1997) Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology*, 143(12), 3921–3931. doi:10.1099/00221287-143-12-3921

FAO. (2015) Construyendo una visión común para la agricultura y alimentación. Principios y enfoques. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, ISBN: 978-92-5-308471-5

Fundación CANNA. Infografía de Cannabis sativa L. <https://www.fundacion-canna.es/8-datos-sorprendentes-sobre-la-botanica-del-cannabis>. Acceso web 01/03/2025

Gaoni Y, Mechoulam R. (1964) Isolation, structure, elucidation and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86:1646-7

Glick BR. (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 1–15. doi:10.6064/2012/963401

Godwin H. (1967) Pollen analytic evidence for the cultivation of cannabis in England. *Rev. Plaeobot. Palynol.* 4:71-80.

Goswami D, Thakkar IN, Dhandhukia P. (2016) Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1): 1127500. doi:10.1080/23311932.2015.1127500

Greydanus DE, Hawver EK, Greydanus MM, Merrick J. (2013) Marijuana: current concepts(+). *Front Public Health*. 2013 Oct 10;1:42. doi: 10.3389/fpubh.2013.00042.

Gupta R, Anand G, Gaur R, et al. (2021) Plant–microbiome interactions for sustainable agriculture: a review. *Physiol Mol Biol Plants*, 27, 165–179. doi:10.1007/s12298-021-00927-1

Herrera-Quiterio A, Toledo-Hernández E, Aguirre-Noyola JL, et al. (2020) Antagonic and plant growth-promoting effects of bacteria isolated from mine tailings at El Fraile, Mexico. *Revista Argentina de Microbiología*, S032575411930118X–. doi:10.1016/j.ram.2019.08.003

Kim HS, Mee KS, Ho WJ, et al. (2012) Identification and characterization of *Chryseobacterium wanjense* strain KJ9C8 as a biocontrol agent of *Phytophthora* blight of pepper. *Crop protection*, 32, 129–137. doi:10.1016/j.cropro.2011.10.018

Lyu D, Zajonc J, Pagé A, et al. (2021) Plant Holobiont Theory: The Phytomicrobiome Plays a Central Role in Evolution and Success. *Microorganisms*, 9, 675. doi:10.3390/microorganisms9040675

Mallory, E. B., y Griffin, T. S. (2007). Impacts of soil amendment history on nitrogen availability from manure and fertilizer. *Soil Science Society of America Journal*, 71(3), 964-973.

Meena RS, Kumar S, Datta R, et al. (2020) Impact of Agrochemicals on Soil Microbiota and Management: A Review. *Land*, 9(2), 34. doi:10.3390/land9020034

Ministerio de Economía, República Argentina (2024). “Informe de cadenas de valor: Cannabis medicinal y Cáñamo industrial”. Año 9, N° 75, Junio-2024. ISSN 2525-0221

Mongkolthanasak W (2012) Classification of Bacillus Beneficial Substances Related to Plants, Humans and Animals. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 22:1597-1604. doi:10.4014/jmb.1204.04013

Mokhtar & Dehimat (2015) Antagonism capability in vitro of *Trichoderma harzianum* against some pathogenic fungi. *AGRICULTURE AND BIOLOGY JOURNAL OF NORTH AMERICA*. Doi:10.5251/abjna.2012.3.11.452.460

Murillo N, Palioff C. (2021) Visión rural. Año XXVIII - No 139 SEPT. - OCTUBRE 2021 ISSN 0328-7009. Disponible online (ultimo acceso: Febrero 2025): https://inta.gov.ar/sites/default/files/inta_visionrural_139_0.pdf

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2017). The Health Effects of Cannabis and Cannabinoids: The Current State of Evidence and Recommendations for Research. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/24625>.

Nautiyal CS. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiol Lett, 170(1), 265–270. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x

O`Shaughnessy W.B. (1842) On the preparation of Indian hemp or gunjah. Trans. Med. Phys. Soc. Bombay 8:421-61.

Parkinson J. (1640) The theater of plantes, an universal and compleate herbal, T. Cotes, London.

Pertwee, R. G. (Ed.) (2014). Handbook of Cannabis. (1 ed.) OXFORD UNIV PRESS. Doi:10.1093/acprof:oso/9780199662685.001.0001

Porto de Souza Vandenberghe L, Blandon Garcia LM, Rodrigues C, et al. (2017) Potential applications of plant probiotic microorganisms in agriculture and forestry. AIMS Microbiology, 3(3): 629-648. doi:10.3934/microbiol.2017.3.629

Pretty J. (2008) Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. Phil.Trans. R. Soc., 363, 447–465. doi:10.1098/rstb.2007.2163

PubMed. Base de datos disponible en la página web del [National Center for Biotechnology Information \(NCBI\)](#). Fecha de búsqueda: 01/03/2025.

Reasoner DJ, Geldreich EE. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Applied and Environmental Microbiology, 49(1). doi:10.1128/aem.49.1.1-7.1985

Romero FM, Marina M, Pieckenstain FL. (2016) Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases. Research in Microbiology, S0923250815001977–. doi:10.1016/j.resmic.2015.11.001p

Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I. (2022) The Role of Microorganisms in the Evolution of Animals and Plants. Microorganisms, 10, 250. doi:10.3390/microorganisms10020250

Samad MYA, C.Nyonya AR, Abu Bakar S, et al. (1989) A plate assay for primary screening of lipase activity. Journal of Microbiological Methods, 9(1), 51–56. doi:10.1016/0167-7012(89)90030-

Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Orozco-Mosqueda MdC, et al. (2015) Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes. Microbiological Research, S094450131530029X–. doi:10.1016/j.micres.2015.11.008

Scott M, Rani M, Samsatly J, Charron JB, Jabaji S. (2018) Endophytes of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars: identification of culturable bacteria and fungi in leaves, petioles, and seeds Can. J. Microbiol., 64 (10) (2018), pp. 664-680, 10.1139/cjm-2018-0108

Singh BK, Trivedi P. (2017) Microbiome and the future for food and nutrient security. Microb. Biotechnol., 10, 50–53. doi:10.1111/1751-7915.12592.

Taghinasab M, Jabaji S. (2020) Cannabis Microbiome and the Role of Endophytes in Modulating the Production of Secondary Metabolites: An Overview. Microorganisms, Mar 2;8(3):355. doi: 10.3390/microorganisms8030355.

Tariq M, Noman M, Ahmed T, et al. (2017) Antagonistic features displayed by Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Review. J Plant Sci Phytopathol., 1: 038-043. DOI: 10.29328/journal.jpsp.1001004

Vio SA. (2023) Microbiota bacteriana asociada al cultivo de tomate: caracterización y selección de bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Tesis doctoral, Doctorado en Ciencias Exactas – Área Química, Universidad Nacional de La Plata. Doi: 10.35537/10915/150979