

**Estudio de los efectos del insecticida Lorsban sobre las propiedades fisicoquímicas y microbiota del suelo, empleado para el cultivo de piña en el municipio de Lebrija Santander.**

Gonzalo Andrés Ariza Uribe

Id. 000272251

Universidad Pontificia Bolivariana – Seccional Bucaramanga

Ingeniería Ambiental

Bucaramanga

2018

**Estudio de los efectos del insecticida Lorsban sobre las propiedades  
físicoquímicas y microbiota del suelo empleado para el cultivo de piña en el  
municipio de Lebrija Santander.**

Gonzalo Andrés Ariza Uribe

Id. 000272251

Proyecto de grado presentado como requisito para optar al título de:

**INGENIERIA AMBIENTAL**

Director del Proyecto

PhD. María Irene Kopytko.

Universidad Pontificia Bolivariana

Ingeniería Ambiental

Bucaramanga

2018

## **Agradecimientos**

A mis padres por su apoyo incondicional, dedicatoria, enseñanzas y amor, que hicieron de mí la persona que soy hoy.

A mis hermanos por vivir junto a mí cada etapa de mi vida y ser un faro en momentos de dificultad.

A la docente María Irene Kopytko, por darme la oportunidad de hacer parte del presente proyecto de investigación, donde ella es la directora, así como de su excelente asesoría, apoyo y paciencia brindados durante todo el desarrollo de la tesis.

De igual forma, agradezco a las docentes Nohora Juliana Rueda y Martha Estévez por su apoyo constante e incondicional en el desarrollo del proyecto.

Así como a la señora Naidú, la cual mediante su apoyo y consejo durante el tiempo del estudio, me permitió desempeñarme adecuadamente como profesional y ser humano.

Finalmente agradezco a Alejandra Murcia y a las personas que me acompañaron durante cada momento vivido en el transcurso de mi carrera, cada experiencia recolectada y conocimiento adquirido.

De la misma manera agradezco a los maravillosos docentes y profesionales que hacen parte de la familia de la Universidad Pontificia Bolivariana y que contribuyeron considerablemente en mi formación personal y profesional.

## Tabla de Contenido

Introducción .....	12
1 Objetivos .....	13
1.1 Objetivo general .....	13
1.2 Objetivos Específicos.....	13
2. Marco Teórico.....	14
2.1 Generalidades del suelo.....	14
2.2 Formación del suelo. ....	14
2.3 Horizontes del suelo.....	15
1.3.1 Horizontes Superficiales. ....	16
1.3.2 Horizontes Subsuperficiales.....	17
2.4 Las propiedades fisicoquímicas del suelo. ....	18
2.4.1 Textura. ....	19
2.4.2 pH.....	20
2.4.3 Conductividad eléctrica (CE). ....	23
2.4.4 Humedad del suelo. ....	23
2.4.5 Densidad del suelo. ....	24
2.4.6 Porosidad del suelo.....	26
2.4.7 Permeabilidad o conductividad hidráulica. ....	26
2.4.8 Infiltración.....	28
2.4.9 Materia orgánica.....	28
2.4.10 Capacidad de intercambio Catiónico.....	29
2.4.11 Fosforo. ....	30
2.4.12 Nitrógeno.....	32
2.5 Propiedades microbiológicas del suelo. ....	34
2.5.1 Diversidad bacteriana en el suelo.....	35
2.6 Técnica de amplificación de cadenas de ADN (metagenómica).....	40

2.7 Técnica de secuenciación genética más empleada en la metagenómica. ....	41
2.8 Generalidades del cultivo de piña ( <i>Ananás comosus L.</i> ).....	44
2.8.1 Plagas que afectan el cultivo de piña ( <i>Ananás comosus L.</i> ).....	44
2.9 Insecticidas químicos utilizados en el cultivo de piña. ....	45
2.10 Generalidades del Lorsban 4EC.....	45
2.10.1 Antecedentes del uso de Clorpirifos.....	46
3. Metodología. ....	47
3.1 Determinación de las características fisicoquímicas iniciales y el análisis metagenómico del suelo, destinado para el cultivo de <i>Ananás comosus</i> en el municipio de Lebrija, Santander.....	48
3.2 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas en suelos cultivados con <i>Ananás comosus</i> , tras la aplicación del insecticida químico (Lorsban). ....	50
3.3 Análisis de los cambios microbiológicas presentes en el suelo cultivado con <i>Ananás comosus</i> , después de la aplicación del insecticida químico (Lorsban). ....	51
3.3.1 Extracción de ADN metagenómico.....	52
3.3.2 Secuenciación y ensamblaje del ADN metagenómico.....	52
3.3.3 Identificación y Cuantificación. ....	52
4. Datos y análisis. ....	53
4.1. Determinación de la caracterización fisicoquímica inicial y el análisis metagenómico del suelo, destinado para el cultivo de <i>Ananás Comosus</i> en el municipio de Lebrija, Santander. ....	53
4.1.1 Caracterización fisicoquímica inicial de los suelos B, C y FQ. ....	53
4.1.2 Análisis metagenómico inicial del suelo B, C y FQ. ....	56
4.2. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas en suelos cultivados con <i>Ananás Comosus</i> tras la aplicación del insecticida químico (Lorsban). ....	59
4.2.1 Textura ....	59
4.2.2 pH.....	60
4.2.3 Acidez y aluminio intercambiable.....	61
4.2.4 Conductividad Eléctrica. ....	63

4.2.5 Humedad Gravimétrica. ....	64
4.2.6 Densidad aparente. ....	66
4.2.7 Densidad real.....	66
4.2.9 Infiltración.....	67
4.2.10 Materia Orgánica.....	68
4.2.11 Carbono orgánico total.....	69
4.2.12 Capacidad de Intercambio Catiónico. ....	70
4.2.13 Fosforo total.....	71
4.2.14 Nitrógeno total.....	72
4.3. Análisis de los cambios microbiológicos presentes en el suelo cultivado con <i>Ananás Comosus</i> , después de la aplicación del insecticida químico (Lorsban).....	73
5. Conclusiones. ....	77
6. Recomendaciones. ....	79
Bibliografía. ....	80
Anexos.....	91

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Composición y Subclasificación de los horizontes O y A.....	16
<b>Tabla 2.</b> Características de los horizontes Subsuperficiales. ....	17
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de las partículas del suelo según el USDA. ....	19
<b>Tabla 4.</b> Clasificación del pH del suelo a temperatura estándar. ....	20
<b>Tabla 5.</b> Valores típicos de conductividad eléctrica en suelos.....	23
<b>Tabla 6.</b> Clasificación de la Humedad Gravimétrica aprovechable del suelo. ....	24
<b>Tabla 7.</b> Relación entre la densidad aparente y la porosidad total.....	25
<b>Tabla 8.</b> Clasificación y función de los poros del suelo según su tamaño.....	26
<b>Tabla 9.</b> Clasificación de la Conductividad Hidráulica. ....	27
<b>Tabla 10.</b> Clasificación de la velocidad de infiltración.....	28
<b>Tabla 11.</b> Interpretación del contenido de materia orgánica del suelo.....	29
<b>Tabla 12.</b> Estimación del valor del CIC según la textura y el porcentaje de arcilla del suelo. .....	30
<b>Tabla 13.</b> Criterios para determinar la calidad de un suelo con respecto al contenido de fosforo. .....	32
<b>Tabla 14.</b> Criterios para evaluar la fertilidad de un suelo con base en su contenido de nitrógeno total. ....	33
<b>Tabla 15.</b> Metodología empleada para la secuenciación metagenómica de una muestra ambiental por medio de marcadores genéticos (16S y 18S).....	41
<b>Tabla 16.</b> Cronograma de muestreo de suelos de interés.....	48
<b>Tabla 17.</b> Métodos empleados para la determinación de parámetros fisicoquímicos.....	49
<b>Tabla 18.</b> Caracterización fisicoquímica inicial de los suelos de interés.....	53

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representación del perfil de un suelo maduro. ....	15
<b>Figura 2.</b> Hidrólisis de las formas monoméricas del aluminio (Al).....	22
<b>Figura 3.</b> Distribución porcentual de las formas de Al a diferentes pH.....	22
<b>Figura 4.</b> Amplificación por PCR.....	42
<b>Figura 5.</b> Esquema de las zonas de estudio en la granja Bellavista. ....	47
<b>Figura 6.</b> Metodología empleada para el estudio metagenómico. ....	51
<b>Figura 7.</b> Secuencia metodológica para la extracción de ADN. ....	52
<b>Figura 8.</b> Filo y géneros microbiológicos iniciales presentes en el suelo B. ....	57
<b>Figura 9.</b> Filo y géneros microbiológicos iniciales presentes en el suelo C. ....	58
<b>Figura 10.</b> Cambio de la Textura para el suelo B en los muestreos M1, M3 y M5. ....	59
<b>Figura 11.</b> Cambio de la Textura para el suelo C en los muestreos M1, M3 y M5. ....	60
<b>Figura 12.</b> Cambio de la Textura para el suelo FQ en los muestreos M1, M3 y M5.....	60
<b>Figura 13.</b> Variación del pH en los suelos B, C y FQ a través de los respectivos muestreos.	61
<b>Figura 14.</b> Acidez y aluminio intercambiable de los suelos B, C y FQ.....	62
<b>Figura 15.</b> Variación de la conductividad eléctrica en los suelos B, C y FQ .....	63
<b>Figura 16.</b> Pérdida de humedad gravimétrica en el suelo B. ....	64
<b>Figura 17.</b> Pérdida de humedad gravimétrica en el suelo C. ....	65
<b>Figura 18.</b> Pérdida de humedad gravimétrica en el suelo FQ. ....	65
<b>Figura 19.</b> Densidad aparente de los suelos B, C y FQ en los muestreos realizados.....	66
<b>Figura 20.</b> Densidad real de los suelos B, C y FQ en los muestreos realizados. ....	67
<b>Figura 21.</b> Velocidad de infiltración de los suelos B, C y FQ en los muestreos realizados. ..	67
<b>Figura 22.</b> Porcentaje de Materia Orgánica de los suelos B, C y FQ en los muestreos realizados. .....	68
<b>Figura 23.</b> Carbono orgánico total de los suelos B, C y FQ en los muestreos realizados. ....	69
<b>Figura 24.</b> Capacidad de intercambio catiónico de los suelos B, C y FQ.....	70
<b>Figura 25.</b> Fosforo total en los suelos B, C y FQ.....	71
<b>Figura 26.</b> Nitrógeno total en los suelos B, C y FQ.....	72
<b>Figura 27.</b> Variación de los filo de los suelos B, C y FQ durante el muestreo M1, M2, M3 y M4.....	73
<b>Figura 28.</b> Variación de los géneros de los suelo B, C y FQ durante el muestreo M1 y M3. ..	75

## Lista de Anexos

<b>Anexo A.</b> Metodología para la extracción del ADN celular. ....	92
<b>Anexo B.</b> Reporte de los resultados obtenidos de los métodos de Bouyoucos y granulometría. .....	94
<b>Anexo C.</b> Ficha Técnica del Insecticida químico Lorsban. ....	96
<b>Anexo D.</b> Conversión de 1,1 y 3,5 meq Al <sup>+3</sup> /100g a ppm. ....	97
<b>Anexo E.</b> Ficha técnica del fertilizante triple 15. ....	98
<b>Anexo F.</b> Calculo de delta pH para determinación de tipo de capacidad de intercambio iónico. .....	100
<b>Anexo G.</b> Calculo para convertir mg de PO <sub>4</sub> / Kg y mg de NTK/ Kg a PPM. ....	101
<b>Anexo H.</b> Reporte de los filis bacterianos encontrados en los suelos B, C y FQ durante los muestreos M1, M2, M3 y M4. ....	102
<b>Anexo I.</b> Reporte de las abundancias de los géneros de las poblaciones microbianas encontradas en los suelos B, C y FQ durante los muestreos M1, M2, M3 y M4. ....	103

## RESUMEN GENERAL DE TRABAJO DE GRADO

**TITULO:** Estudio de los efectos del insecticida Lorsban sobre las propiedades fisicoquímicas y microbiota del suelo, empleado para el cultivo de piña en el municipio de Lebrija Santander.

**AUTOR(ES):** Gonzalo Andrés Ariza Uribe

**PROGRAMA:** Facultad de Ingeniería Ambiental

**DIRECTOR(A):** María Irene Kopytko

### RESUMEN

En el presente trabajo, se realizó un estudio del efecto del insecticida químico (Lorsban) sobre la microbiota y propiedades fisicoquímicas del suelo, utilizado para el cultivo de la piña. Inicialmente se delimitó el área de estudio en tres zonas que fue el suelo sin cultivo de piña ni fumigación, área sembrada con piña, pero no fumigada y la última, sembrada con piña y fumigada. Los análisis fisicoquímicos aplicaron métodos estándar y la metagenómica fue ejercida para la identificación de la microbiota en suelo. Se registraron bajos valores iniciales de pH (4,5 a 4,7) y elevada cantidad de aluminio intercambiable (3,5 a 1,3 meq/100g). La materia orgánica inicial presentó un rango de 1,7 a 2,5%, señalando un suelo poco fértil, acorde con los bajos valores de carbono orgánico total (0,61 a 0,98%), al igual que CIC (9,1 a 15,9), siendo nitrógeno total menor de 0,1% en todos los suelos analizados. Actinobacteria fue el filo predominante en este estudio y no se vio afectado mayormente en ninguno de los tres suelos de estudio. El cultivo de piña ejerció un efecto favorable para la calidad del suelo y las poblaciones microbianas. El suelo fumigado por el insecticida químico (FQ), demostró deterioro, manifestado por el cambio de textura de franco arcillo arenosa a franco arenosa y la disminución poblacional del género Streptomyces. El incremento de materia orgánica y carbono orgánico total en el suelo se asoció con la acumulación del insecticida químico en el suelo analizado.

### PALABRAS CLAVE:

Lorsban, Piña, Microbiota, Suelo

### V° B° DIRECTOR DE TRABAJO DE GRADO

## GENERAL SUMMARY OF WORK OF GRADE

**TITLE:** Study of the effects of the Lorsban insecticide on the physicochemical properties and microbiota of the soil, used for the cultivation of pineapple in the municipality of Lebrija Santander.

**AUTHOR(S):** Gonzalo Andrés Ariza Uribe

**FACULTY:** Facultad de Ingeniería Ambiental

**DIRECTOR:** María Irene Kopytko

### ABSTRACT

In the present work, was carried out a study of the effect of the chemical insecticide (Lorsban) on the microbiota and physicochemical properties of the soil, used for the cultivation of pineapple. Initially, the study area was delimited in three zones, which was the ground without pineapple cultivation or fumigation, an area planted with pineapple, but not fumigated, and the last one, planted with pineapple and fumigated. Physicochemical analyzes applied standard methods and metagenomics was applied to identify the microbiota in soil. Low initial values of pH (4.5 to 4.7) and high amount of exchangeable aluminum (3.5 to 1.3 meq / 100g) were recorded. The initial organic matter presented a range of 1.7 to 2.5%, indicating a low fertile soil, according to the low values of total organic carbon (0.61 to 0.98%), like CIC (9, 1 to 15.9), with total nitrogen less than 0.1% in all the analyzed soils. Actinobacteria was the predominant phylum in this study and was not affected mostly in any of the three study soils. Pineapple cultivation had a favorable effect on soil quality and microbial populations. The soil fumigated by the chemical insecticide (CF), showed deterioration, manifested by the change in texture from sandy clay loam to sandy loam and the population decrease of the Streptomyces genus. The increase of organic matter and total organic carbon in the soil was associated with the accumulation of the chemical insecticide in the analyzed soil.

### KEYWORDS:

Lorsban, Pineapple, Microbiota, Soil

V° B° DIRECTOR OF GRADUATE WORK

## Introducción

En Colombia, según el Ministerio de Agricultura, se produjo un aproximado de 950 mil toneladas de piña en 2018, siendo Santander y Norte de Santander las zonas de mayor producción nacional, con un valor cercano al 47% de hectáreas cultivadas.

El cultivo de piña tiene un tiempo medio de maduración de 18 meses (1,6 años) y el valor promedio de inversión de una hectárea durante este periodo varía en un rango de 14 a 35 millones de pesos. Durante la maduración del cultivo, éste puede llegar a ser afectado por diferentes plagas como *Dysmicoccus brevipes* (Piojo blanco), que promueven la disminución de la calidad y la marchitez de la fruta; afectando así la economía de los agricultores.

Para controlar la proliferación y los efectos perjudiciales de las diversas plagas que atacan el cultivo de piña, se utilizan diferentes insecticidas químicos como el Lorsban 4EC, cuyo ingrediente activo es el Chlorpyrifos. Este insecticida es organofosforado y está clasificado como moderadamente tóxico. A su vez, la Agencia de Licencias Ambientales (ANLA) registra al Chlorpyrifos con una baja movilidad y una vida media de 6 a 25 semanas; además de presentar una toxicidad para aves, peces, abejas y otros insectos benéficos.

A pesar de la efectividad que presenta el insecticida químico Lorsban en el control simultáneo del piojo blanco y la hormiga, cuya interacción es simbiótica, se desconoce el impacto tóxico que pueda tener esta sustancia en el suelo. Aunque no se han hallado registros en la literatura donde se analice el impacto generado por el uso del insecticida químico Lorsban sobre la población microbiana y el cambio en las propiedades que sufre un suelo destinado para el cultivo de piña (*Ananas comosus*), es necesario verificar el comportamiento de este producto.

Por lo tanto, se realizó un estudio del efecto del insecticida químico (Lorsban) sobre la microbiota y propiedades fisicoquímicas del suelo, utilizado para el cultivo de la *Ananás Comosus* (Piña) en el municipio de Lebrija, Santander. Para este propósito, se determinó la caracterización fisicoquímica inicial y el análisis metagenómico del suelo, destinado para el cultivo de *Ananás Comosus* en el municipio de Lebrija, seguido por la evaluación de las propiedades fisicoquímicas en suelos cultivados con piña tras la aplicación del insecticida químico (Lorsban). Finalmente, se analizó los cambios microbiológicos presentes en el suelo cultivado con *Ananás Comosus*, después de la aplicación del insecticida químico (Lorsban).

# 1 Objetivos

## 1.1 Objetivo general

- Realizar un estudio del efecto del insecticida químico (Lorsban) sobre la microbiota y propiedades fisicoquímicas del suelo, utilizado para el cultivo de la *Ananás Comosus* (Piña) en el municipio de Lebrija, Santander

## 1.2 Objetivos Específicos.

- Determinar la caracterización fisicoquímica inicial y el análisis metagenómico del suelo, destinado para el cultivo de *Ananás Comosus* en el municipio de Lebrija, Santander.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas en suelos cultivados con *Ananás Comosus* tras la aplicación del insecticida químico (Lorsban).
- Analizar los cambios microbiológicas presentes en el suelo cultivado con *Ananás Comosus*, después de la aplicación del insecticida químico (Lorsban).

## **2. Marco Teórico.**

### **2.1 Generalidades del suelo.**

El suelo es un sistema abierto, el cual se define como un cuerpo natural que está en constante interacción con su entorno. Está conformado por diferentes capas de minerales meteorizados, materia orgánica, aire, agua y microorganismos, que proporciona nutrientes, agua, oxígeno y sostén para las raíces de las plantas (FAO, 2018). Este sistema evoluciona constantemente hasta llegar a un equilibrio de condiciones ambientales y desde ese momento tiende a permanecer estable (Heredia, 2008).

El Suelo también da protección a los diferentes cuerpos de aguas superficiales y subterráneas, debido a que realiza una función filtrante al movimiento de diversas sustancias nocivas, que puedan alterar drásticamente estos cuerpos (Leal, 2011).

Sin embargo, las diferentes actividades antropogénicas han ocasionado la alteración de los diferentes componentes del suelo, afectando así la calidad del mismo. Esto representa una gran problemática para el sector agroindustrial en general, ya que conduce a la disminución de la productividad del suelo (Leal, 2011).

Para determinar la calidad del suelo y su grado de alteración, se debe realizar un estudio del medio, el cual establece los diferentes nutrientes del mismo, mediante el análisis de las características fisicoquímicas y la población microbiana. Este estudio permite evaluar las alteraciones de los nutrientes y componentes del suelo, posibilitando así, determinar el uso adecuado del medio para mejorar la calidad y productividad de los diferentes cultivos.

### **2.2 Formación del suelo.**

La formación del suelo está influenciada principalmente por diferentes factores como: clima, material parental, actividad biológica, topografía y tiempo, que determinan los diversos horizontes y utilidades del suelo (Hernández W, 2012).

La velocidad de formación y el tipo de suelo están influenciadas en gran parte por la intensidad y la variación de la temperatura y la precipitación. Estos parámetros también determinan la distribución de las diferentes especies vegetales y los procesos geomorfológicos del suelo.

El material parental es aquel soporte, de donde se ha formado gran parte del suelo debido a la meteorización de la roca madre. Esto se lleva a cabo mediante diversos procesos físicos y químicos que degradan progresivamente la roca, liberando así diversos elementos (SiO<sub>2</sub>, Al, Fe, Ca, Mg, K, Ti, Mn, Na, P y S) que determinan el tipo de suelo (Grant, 1989).

Las interacciones biológicas de los macro y microorganismos son de gran importancia, debido a que estos ayudan a transformar los sustratos del suelo durante la extracción de nutrientes necesarios para su ciclo de vida (Hernández W, 2012).

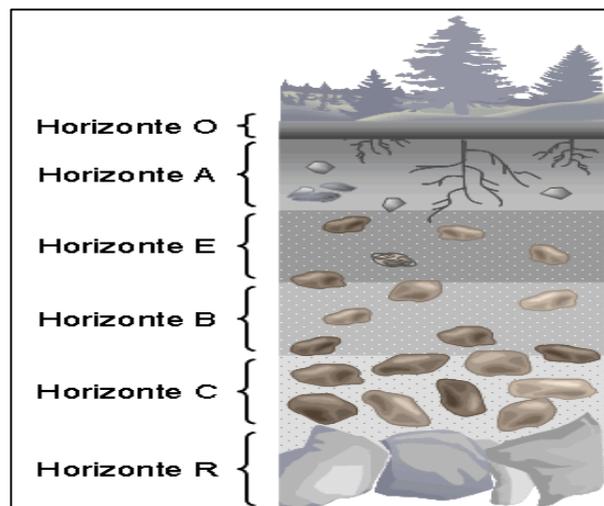
La topografía es dependiente en su totalidad del clima y de la naturaleza mineral del suelo; así como del relieve de la zona y el espesor del suelo, que a su vez también influyen en gran medida en el balance hídrico del mismo.

El tiempo como factor de formación del suelo es muy variable y depende indirectamente de las características botánicas, zoológicas, geológicas y geomorfológicas del terreno (Ulzurrun, 1995).

### 2.3 Horizontes del suelo.

Los horizontes son una serie de capas paralelas a la superficie del terreno que componen el perfil del suelo. Estos horizontes se clasifican en superficiales y sub superficiales, los cuales a su vez, se dividen en O, A, E, B, C, R (Gómez, 2012). Lo mencionado anteriormente, se ilustra en la Figura 1.

**Figura 1.** Representación del perfil de un suelo maduro.



**Fuente:** Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), 2007.

De acuerdo al Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) de México, cada capa del suelo posee diferentes propiedades tales como el color, textura, estructura, espesor, composición, consistencia y reacción. A continuación se especifican las características de cada uno de los horizontes (O, A, E, B, C y R) agrupados en superficiales y Subsuperficiales (INECC, 2007).

### 1.3.1 Horizontes Superficiales.

Los horizontes superficiales se caracterizan por ubicarse en la parte superior del perfil del suelo y por tener un alto contenido de materia orgánica, el cual va disminuyendo a medida que la profundidad del suelo aumenta. Los horizontes superficiales se dividen en 2, el horizonte O y el A. En la tabla 1 se ilustra la composición y la subclasificación de los horizontes O y A (Gómez, 2012).

**Tabla 1.** Composición y Subclasificación de los horizontes O y A.

Horizonte	Características	Subclasificación
O	Se caracteriza por tener un alto contenido de materia orgánica parcialmente descompuesta en forma de humus provenientes principalmente de residuos animal y vegetal.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Horizonte O1:</b> Cuando los residuos se pueden identificar.</li> <li>• <b>Horizonte O2:</b> Cuando el estado de degradación no posibilita la identificación de los restos.</li> </ul>
A	Es aquel donde se encuentra la capa mineral de la desintegración del material rocoso; se ubica después del horizonte O.	<b>Horizonte A1:</b> Capa que presenta una mezcla de mineral y humus.

Horizonte	Características	Subclasificación
	Debido a la mezcla de humus y mineral que genera la actividad biológica, este horizonte se caracteriza por poseer un color oscuro.	<b>Horizonte A2:</b> Zona con mayor lixiviación de arcillas de silicato, óxidos de aluminio y óxidos de hierro.

**Fuente:** Gómez, 2012.

Algunos de los suelos con un alto contenido de hojarasca, desechos animales y hongos con grado de degradación, poseen un horizonte O. El cual, se caracteriza por tener un elevado contenido de materia orgánica, con principios de degradación por parte de los microorganismos, los cuales reducen las grandes moléculas de desechos y hojas, por medio de su ciclo biológico, a otras más sencillas.

El horizonte A es aquel que se encuentra subsiguiente al O. Este primero se caracteriza por constituirse de una mezcla de humus, microorganismos y material mineral particulado. La actividad microbiana en este horizonte es máxima, ya que el número y variedad de organismos es mayor que en cualquier otro, además es donde hay mayor presencia radicular de las plantas (INECC, 2007).

### 1.3.2 Horizontes Subsuperficiales.

Son aquellos horizontes del suelo que no están expuestos en la superficie y cuya visualización se da únicamente mediante excavaciones. Se dividen en horizontes E, B, C y R. Esto se ilustra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Características de los horizontes Subsuperficiales.

Horizonte	Características
<b>E</b>	El horizonte E es una capa mineral que presenta lixiviación de diversos minerales. Además posee una alta disponibilidad de arena y limo; y una baja concentración de

Horizonte	Características
	arcillas de silicato, hierro (Fe) y aluminio (Al).
B	El horizonte B es la capa mineral en la cual se acumulan arcillas, óxidos de hierro, compuestos húmicos y cationes que se han lixiviado del horizonte A.
C	En el horizonte C se acumula el material parental que está parcialmente descompuesto (Regolita). Además presenta una acumulación de sílice, calcio, carbonatos y yeso.
R	Este horizonte está compuesto de lecho de roca en el que no hay presencia radicular.

**Fuente:** Gómez, 2012; INECC, 2007.

La mayoría de los suelos maduros poseen los horizontes A, B y C. Por otro lado, suelos con menor desarrollo, tienden a carecer de algunos de ellos. Otros suelos poseen una pequeña capa orgánica llamada horizonte O, la cual está constituida por hojas, residuos animal y vegetal, hongos y diversos materiales orgánicos con indicios de descomposición (INECC, 2007).

#### **2.4 Las propiedades fisicoquímicas del suelo.**

Las propiedades fisicoquímicas del suelo son aquellas características que reflejan el comportamiento de los diferentes componentes del suelo en cuanto a la capacidad de retención de líquidos y nutrientes. Estas propiedades son determinadas por el tamaño de las partículas minerales (físicas) y la proporción de los distintos minerales y sustancias orgánicas que componen el suelo (químicas) (FAO, 2018).

Las propiedades físicas del suelo determinan la rigidez y la fuerza de sostenimiento, la penetración de las raíces, la aireación, capacidad de drenaje y almacenamiento de agua, la plasticidad y la disponibilidad de nutrientes.

Lo anteriormente mencionado es importante debido a que ayuda a comprender en qué medida y de qué forma influyen éstas en el crecimiento de las plantas y como pueden alterarse por la actividad humana.

Algunas de las características físicas del suelo son textura, humedad gravimétrica, densidad aparente y real, contenido de humedad, permeabilidad, infiltración y humedad volumétrica; las químicas serían el pH, la conductividad eléctrica, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico (CIC), fósforo y nitrógeno.

A continuación se describen algunas de las propiedades fisicoquímicas más importantes.

#### 2.4.1 Textura.

La textura determina la proporción en que se encuentran distribuidos los elementos que constituyen el suelo según su tamaño; arena, arcilla y limo (Rucks, 2004).

El procedimiento más utilizado para determinar esta distribución, es el análisis granulométrico o mecánico. También es posible emplear otro método, el cual se basa en la velocidad de caída de las partículas del suelo a través del agua.

La clasificación de las fracciones de las partículas del suelo según el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) se especifica en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Clasificación de las partículas del suelo según el USDA.

Fracción del Suelo	Diámetros Límites (mm)
Arena	2 – 0,05
Limo	0,05 – 0,002
Arcilla	< 0,002

**Fuente:** USDA, 2014.

La determinación de la distribución porcentual de las partículas del suelo es importante, porque según esta se puede establecer diferentes aspectos que influyen directamente en la fertilidad del suelo; como lo es la disponibilidad de nutrientes y la retención de agua (FAO, 2018).

En los reportes de literatura se indica la relación que presentan diferentes tipos de suelo con las propiedades fisicoquímicas. Así los suelos arenosos se pueden asociar con escasos nutrientes, una alta tasa de infiltración y por ende, una baja retención de agua, lo que lo hace un suelo de baja productividad. De igual manera los suelos limosos, debido a que poseen partículas de menor tamaño, tienden a ser más fértiles que los suelos arenosos, más fáciles de laborar y poseen un mayor porcentaje de materia orgánica, lo que representa un incremento en la disponibilidad de nutrientes. Finalmente, los suelos arcillosos se caracterizan por tener una alta disponibilidad de nutrientes, capacidad de retención de agua y poco drenaje, lo que los clasifica como suelos fértiles pero difíciles de trabajar (FAO, 2018).

Es por esto que el suelo que representa una mayor rentabilidad de producción agrícola, sería aquel cuyas fracciones predominantes sean el limo y la arcilla, ya que tendría capacidades de retención y permeabilidad más estables, junto con una mayor disponibilidad de nutrientes.

#### 2.4.2 pH

La acidez del suelo se determina mediante la medición de la concentración de los iones  $H^+$  en la solución acuosa del suelo y su resultado se expresa mediante el parámetro llamado potencial hidrogeno (pH) (Espinosa, 1999).

La medición del pH del suelo permite deducir la presencia o ausencia de diversos compuestos tales como el carbonato de calcio y el aluminio bioasimilable, los cuales influyen notablemente en la actividad biológica del suelo (Gómez, 2012). Tal es el caso de un pH ácido, que según el USDA, puede ser un indicador del exceso de aplicación de Nitrógeno o pérdida del mismo por lixiviación (USDA, 1999).

La escala de pH va desde 0 a 14, tomando el valor de 7.0 como neutro (igual número de iones  $H^+$  y  $OH^-$ ), mientras que los valores menores a 7 indican un medio ácido y los mayores a este indican un medio básico. Lo mencionado anteriormente se cumple si la temperatura es estándar (25°C). En la tabla 4 se ilustra la clasificación del pH del suelo (Espinosa, 1999).

**Tabla 4.** Clasificación del pH del suelo a temperatura estándar.

Valor	Clasificación
< 4,5	Extremadamente ácido

Valor	Clasificación
4,6 – 5,0	Muy fuertemente ácido
5,1 – 6,0	Medianamente ácido
6,1 – 6,5	Ligeramente ácido
6,6 – 7,3	Neutro
7,4 – 7,8	Ligeramente alcalino
7,9 – 8,4	Medianamente alcalino
8,5 – 9,0	Fuertemente alcalino
>9,0	Muy fuertemente alcalino

**Fuente:** González J, 2014.

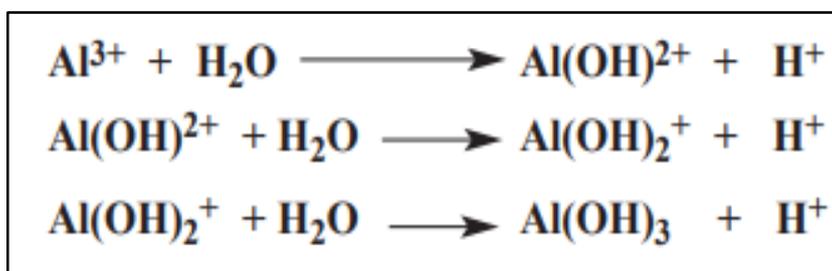
Debido a que los ácidos débiles se disocian en concentraciones muy bajas de  $H^+$ , se define el pH en forma logarítmica, lo cual significa que cada unidad que cambie el pH determina un incremento de 10 veces en la cantidad de acidez o basicidad del suelo (Rucks, 2004).

Esto indica que un suelo con pH de 5.0 posee 10 veces más iones  $H^+$  activos que otro con pH de 6.0 (Rucks, 2004). Lo anterior es de importancia debido a que este parámetro controla los microorganismos que se encuentran en este medio y se encargan de mineralizar la materia orgánica.

El pH también influye en la concentración de fósforo, iones de  $Al^{+3}$ , la CIC y por consiguiente, la fertilidad del suelo. Además permite determinar el uso más conveniente para la aplicación de fertilizantes y otros insumos de uso constante en la actividad agroindustrial (Barbaro, 2014). Según Espinosa J y sus colaboradores (1999) a un pH inferior a 5,5 los iones de aluminio ( $Al^{+3}$ ) del suelo aumentan su concentración a medida que el pH disminuye, ya que estos iones de  $Al^{+3}$  son desplazados de los minerales arcillosos del medio por otros cationes; lo que hace que el Aluminio se hidrolice (reaccione con las moléculas de agua presentes en el suelo) y forme complejos monoméricos y poliméricos hidroxialumínicos.

En la Figura 2, se evidencian las reacciones hidrolíticas del  $\text{Al}^{3+}$ .

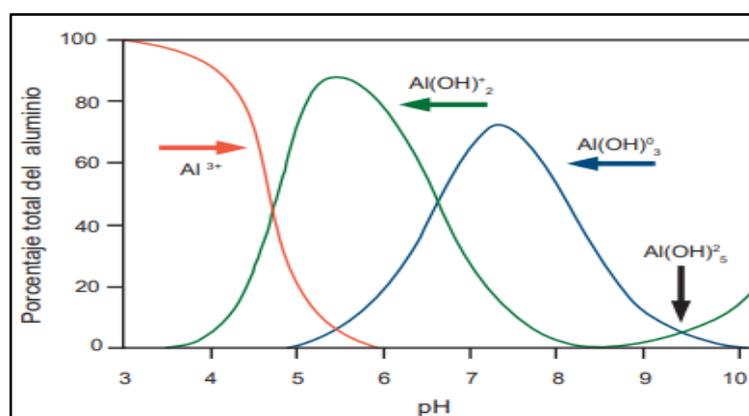
**Figura 2.** Hidrólisis de las formas monoméricas del aluminio (Al).



**Fuente:** Espinosa J. 1999.

Según la Figura 2, todas las reacciones de hidrolisis del aluminio liberan iones hidrogeno ( $\text{H}^+$ ), lo que aumenta la acidez del suelo. Este incremento de acidez promueve una mayor presencia de  $\text{Al}^{3+}$  que posteriormente volvería a reaccionar. La Figura 3 describe el comportamiento de las diferentes especies monoméricas del Al con base al pH del suelo.

**Figura 3.** Distribución porcentual de las formas de Al a diferentes pH



**Fuente:** Espinosa J; 1999.

En la Figura 3, se observa que a un  $\text{pH}=3$  la concentración de aluminio trivalente está en un 100% y va disminuyendo este porcentaje hacia un pH correspondiente a 5,5; cuando inicia la formación de los complejos de aluminio. Las elevadas concentraciones ( $>1\text{ppm}$ ) de  $\text{Al}^{3+}$  están asociadas a efectos tóxicos sobre las plantas, afectando su desarrollo, inhibiendo la división celular y causando deficiencias de fósforo e impidiendo la absorción de calcio, magnesio y potasio (Espinosa, 1999).

### 2.4.3 Conductividad eléctrica (CE).

La conductividad eléctrica es el parámetro que mide la concentración de sales solubles en el suelo. Esto determina la capacidad de un material para conducir una corriente eléctrica a través de éste, por lo que al obtenerse un valor alto en esta variable, demostraría una alta presencia de sales en el suelo (Barbaro, 2014).

Según el estudio de Lorena Bárbaro y sus colaboradores (2014), el valor de CE debería ser bajo en el suelo ( $\leq 1$  ds/m) ya que esto facilita un buen manejo de la fertilización y la disminución de problemas fitotóxicos en los cultivos.

El valor de CE se puede incrementar debido a la presencia de fertilizantes insolubles, introducidos en exceso o por un elevado valor de la capacidad de intercambio catiónico (CIC).

Los valores típicos de conductividad eléctrica para suelos según Elena Martínez (2014) se resumen en la tabla 5.

**Tabla 5.** Valores típicos de conductividad eléctrica en suelos.

CE (dS/m)	Clasificación
<2	No salino
2 – 4	Ligeramente salino
4 – 8	Salino
>8	Muy salino

**Fuente:** Martínez, 2014.

Como se observa en la tabla 5, los suelos con una conductividad eléctrica menor a 2 dS/m, se clasifican como no salinos; sin embargo, la literatura reporta que los valores de C.E  $\geq$  a 1dS/m pueden ocasionar problemas fitotóxicos en las plantas (Barbaro, 2014).

### 2.4.4 Humedad del suelo.

Según el manual de procedimientos analíticos de Flores y sus colegas (2010), la humedad del suelo es la masa de agua contenida por unidad de masa de sólidos del mismo. Este parámetro

influye directamente en la densidad aparente, espacio poroso y compactación. La humedad del suelo está influenciada a su vez por diversas variables tales como clima, vegetación y la profundidad del suelo (Flores, 2010).

La humedad del suelo puede ser gravimétrica o volumétrica (con base a masa o volumen respectivamente). La primera mide la proporción de agua por unidad de suelo seco y permite determinar la cantidad de agua disponible para las plantas; mientras que la humedad gravimétrica permite calcular el contenido de agua presente en una determinada profundidad del suelo (IGAC, 2011).

De acuerdo con el Instituto Geográfico Agustín Codazzi (2011), los valores de retención de humedad en el suelo poseen una estrecha relación con el contenido de arcilla, tipo de mineral, estructura, contenido de materia orgánica, permeabilidad, drenaje interno y con la microporosidad del suelo. En la tabla 6 ilustra la interpretación de la humedad gravimétrica del suelo.

**Tabla 6.** Clasificación de la Humedad Gravimétrica aprovechable del suelo.

Porcentaje de Humedad Gravimétrica	Clasificación
< 10	Muy baja
10 – 15	Baja
15 – 20	Media
20 – 25	Alta
>25	Muy alta

**Fuente:** Albán, 2006.

La humedad gravimétrica del suelo tiende a ser mayor en suelos con predominancia de arcilla, debido a que el espacio poroso es menor, la presencia de materia orgánica es mayor y por ende, la permeabilidad es menor que la de un suelo con predominancia de arena (Castro, 1998).

#### **2.4.5 Densidad del suelo.**

La densidad del suelo es la masa total de sólidos por volumen y se divide en real y aparente. Este parámetro influye en la porosidad y la distribución del tamaño de partículas. Además, da a conocer las condiciones de compactación, disponibilidad de agua y oxígeno del suelo (Carvajal, 1997).

La densidad real hace referencia a la relación entre el volumen y la masa de partículas del suelo, tomando en cuenta la fracción mineral y orgánica del medio sin incluir los espacios porosos. Esta aumenta con la profundidad del suelo (IGAC, 2011).

Así mismo, si un suelo no posee proporciones significativas de minerales pesados y su porcentaje de M.O no supera el 1%, la densidad real tiende a tomar un valor cercano a 2,65 g/cm<sup>3</sup> (Rucks, 2004).

La densidad aparente es la relación del peso del suelo seco con el volumen total del suelo, teniendo en cuenta los espacios porosos del mismo. Este parámetro es inversamente proporcional al porcentaje de la porosidad total; esto indica que entre mayor sea la densidad aparente, menor será la porosidad total, por lo que la compactación del suelo será mayor y por consiguiente la disponibilidad de agua, oxígeno y la penetrabilidad de las raíces se verán disminuidas (Rucks, 2004). Además, el valor de densidad aparente disminuirá a medida que el valor de materia orgánica del suelo aumente (Osman 2013).

El conocimiento de estas propiedades permite analizar la compactación del suelo y el peso de la capa arable. En la tabla 7 ilustra la relación entre la densidad aparente y la porosidad total.

**Tabla 7.** Relación entre la densidad aparente y la porosidad total.

Densidad aparente (g/cm <sup>3</sup> )	Porosidad Total (%)
< 1,0	>63
1,0 – 1,2	55-62
1,2 – 1,4	47 – 54
1,4 – 1,6	40 – 46
1.6 – 1,8	32 – 39
> 1,8	< 31

**Fuente:** Ramírez 1997.

Como se evidencia la tabla 7, los suelos con densidades aparentes entre los rangos (<1,0 y 1,5 gr/cm<sup>3</sup>) se caracterizan por tener un porcentaje de porosidad alta, es decir, que no son compactados y poseen característica de ser disgregables. De igual manera poseen una alta proporción de materia orgánica a medida que la densidad aparente sea menor. De lo contrario,

un suelo con una densidad aparente entre  $>1,4 \text{ gr/cm}^3$ , indica que este posee una alta compactación y por ende una baja materia orgánica (Castro, 1998).

#### 2.4.6 Porosidad del suelo.

La porosidad del suelo es el espacio que hay entre el material sólido del suelo (Flores, 2010). Según su tamaño los poros poseen una clasificación y una función (Ver tabla 8).

**Tabla 8.** Clasificación y función de los poros del suelo según su tamaño.

Poros del suelo		
Tamaño (micras)	Clasificación	Función
$\geq 60$	Grandes o macroporos	Permite la conducción del aire y el agua
60 – 10	Medianos o mesoporos	Permiten la conducción del agua.
9 – 0,2	Pequeños o microporos	Almacenamiento del agua disponible para las plantas.

**Fuente:** Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC), 2011

La porosidad se puede relacionar también con la actividad biológica, cual depende de la disponibilidad de agua y aire en el suelo.

#### 2.4.7 Permeabilidad o conductividad hidráulica.

La conductividad hidráulica o permeabilidad, es la capacidad del suelo para conducir el agua o el aire a través del medio. Esta propiedad es directamente proporcional a la infiltración y a la porosidad; por lo que un suelo con predominancia de arenas, tendrá una mejor permeabilidad que otro con abundancia de arcillas. La permeabilidad también está influenciada por la estructura del suelo, ya que si ésta es laminar, los espacios porosos aumentan, sin embargo esto restringe la circulación del agua (Steer, 2008). Este parámetro depende de la porosidad total, del contenido de humedad y de la distribución del tamaño de los poros.

La permeabilidad o conductividad hidráulica se clasifica midiendo el tiempo que tarda un determinado volumen de agua en pasar a través de una muestra de suelo. De acuerdo al tiempo que gaste el agua en atravesar la estructura del suelo, se halla un índice de permeabilidad que permite la clasificación de la muestra.

En la tabla 9, se relaciona la conductividad hidráulica o permeabilidad con su interpretación.

**Tabla 9.** Clasificación de la Conductividad Hidráulica.

Permeabilidad (cm/hora)	Clasificación
< 0,1	Muy lenta
0,1 – 0,5	Lenta
0,5 – 1,6	Moderadamente lenta
1,6 – 5,0	Moderada
5,0 – 12,0	Moderadamente rápida
12,0 - 18	Rápida
> 18	Muy rápida

**Fuente:** Steer, 2008.

Este parámetro es importante en el desarrollo de los microorganismos y plantas, las cuales no logran asimilar adecuadamente el agua y los nutrientes si la permeabilidad es alta (IGAC, 2011). Los suelos arenosos debido al tamaño de sus partículas y la presencia de los espacios porosos, tienden a tener una mayor permeabilidad.

Es por esto, que comprender los valores de la permeabilidad es importante, ya que permite conocer el movimiento del agua dentro de la estructura del suelo y así diseñar un sistema adecuado de riego para maximizar el crecimiento o desarrollo de los cultivos. En el caso donde se necesita o en suelos de baja permeabilidad.

#### 2.4.8 Infiltración.

La infiltración es la cantidad de agua que recorre la estructura del suelo por unidad de tiempo bajo condiciones de campo y este parámetro disminuye a medida que el volumen de agua que haya entrado aumente (IGAC, 2011).

El método empleado mayormente para conocer la capacidad de infiltración de un suelo es el del procedimiento de los cilindros infiltrómetros, el cual consiste en incrustar uno de estos a unos centímetros de profundidad y depositar dentro del cilindro un volumen conocido de agua y determinar el tiempo que esta se tarda en penetrar la columna de suelo (IGAC, 2011).

La interpretación de este método se ilustra en la tabla 10.

**Tabla 10.** Clasificación de la velocidad de infiltración.

Infiltración (cm/h)	interpretación
< 0,1	Muy lenta
0,1 – 0,5	Lenta
0,5 – 2,0	Moderadamente lenta
2,0 – 6,3	Moderada
6,3 – 12,7	Moderadamente rápida
12,7 – 25,4	Rápida
> 25,4	Muy rápida

**Fuente:** Steer, 2008.

El proceso de infiltración del agua es de gran importancia para la agricultura, debido a que este proceso permite estimar la disponibilidad del líquido para los microorganismos y plantas; además, una infiltración moderada ayuda a reducir la erosión del suelo (González, 2014).

#### 2.4.9 Materia orgánica.

La materia orgánica (M.O) está asociada a la concentración de nutrientes del suelo, los cuales pueden ser nitrógeno, fósforo, azufre, boro y molibdeno. Estos elementos son necesarios para el adecuado crecimiento de las plantas. Debido a esto, es importante determinar su concentración para así plantear estrategias de manejo adecuado del suelo (IGAC, 2011).

El incremento de cargas negativas del suelo (asociadas a las arcillas) propicia una mayor concentración de cationes, que al momento de mineralizarse la materia orgánica, aportan nutrientes para los microorganismos y las plantas. Es por esto que los suelos con predominancia de arcillas, tienden a tener una mayor concentración de M.O que otros suelos con abundancia de arena o limo (IGAC, 2011).

Algunos de los principales beneficios que otorga la materia orgánica al suelo tras su descomposición en moléculas más simples, es la adición de partículas reducidas que forman agregados, adecuada infiltración, buena aireación, el aumento de la disponibilidad de nutrientes para los macro y microorganismos del medio (IGAC, 2011).

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, se evidencia la importancia de este parámetro para determinar la productividad del suelo, ya que se asocia directamente con la fertilidad del medio.

En la tabla 11, se ilustra la clasificación según el contenido de la materia orgánica del suelo, según la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales de México (SEMARNAT).

**Tabla 11.** Interpretación del contenido de materia orgánica del suelo.

Clasificación	Contenido de M.O (%)
Muy bajo	<0,5
Bajo	0,6 – 1,5
Medio	1,6 – 3,5
Alto	3,6 – 6,0
Muy alto	>6,0

**Fuente:** SEMARNAT, 2006.

#### 2.4.10 Capacidad de intercambio Catiónico.

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) se define como la capacidad que tiene el suelo para retener cationes intercambiables. Este parámetro está influenciado directamente por la fracción de arcilla y materia orgánica contenida en el suelo; ya que ambas poseen cargas negativas en sus superficies que son las que retienen los cationes ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,

Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y los vuelven solubles para que sean absorbidos por las plantas y los microorganismos (IGAC, 2011).

Según Carvajal y sus colaboradores (1997), los valores de pH afectan directamente la CIC; ya que un aumento en el pH, desencadena un incremento en las cargas negativas del suelo, debido a la precipitación del aluminio (Al<sup>3+</sup>) y la disminución en la concentración de H<sup>+</sup>, provocando el aumento del CIC (Carvajal, 1997).

La capacidad de intercambio catiónico, es una propiedad del suelo, la cual depende de la textura y del porcentaje de materia orgánica del mismo. Esto indica que entre mayor sea el contenido de arcilla y M.O del suelo, mayor será la CIC (Carvajal, 1997). El estimado de la cantidad de cationes intercambiables en el suelo se ilustra en la tabla 12.

**Tabla 12.** Estimación del valor del CIC según la textura y el porcentaje de arcilla del suelo.

Tipo de suelo	% Arcilla	CIC (meq/100g)
Arenoso	< 10%	10
Franco	10 – 30 %	15
Arcilloso	> 30%	20

**Fuente:** Martínez E, 2014.

#### 2.4.11 Fosforo.

El fosforo (P) es uno de los elementos esenciales para el desarrollo de las plantas, ya que juega un papel vital para la síntesis de ácidos nucleicos, fosfolípidos, vitaminas y enzimas; además de ser de importancia en la transferencia de energía, la síntesis de proteínas, los procesos respiratorios y de división celular. Este elemento también promueve la formación y crecimiento radicular (IGAC, 2011).

En el suelo hay 2 formas de fosforo: fosforo orgánico e inorgánico. La forma orgánica del fosforo en el suelo es aquella que se encuentra en la descomposición del humus y la materia orgánica, y sus niveles pueden variar de 0 a 0,2%. Por otro lado, el fosforo inorgánico, está conformado por compuestos con el hierro, aluminio, calcio y flúor. Esto es importante, ya que el incremento de los elementos mencionados anteriormente, como el aluminio, provocan un

mayor aumento en la formación de fosforo inorgánico, haciendo que las concentraciones de fosforo biodisponible se reduzcan (Fernández, 2006).

El fosforo disponible para las plantas ( $P_2O_5$ ) es muy escaso y se deriva de la descomposición de la materia orgánica y de los materiales provenientes de la descomposición de la roca madre. Esto se lleva a cabo mediante procesos de oxidación de la materia orgánica (M.O), los cuales son realizados por microorganismos presentes en el suelo; permitiendo de esta manera que las formas reducidas de M.O como el humus, sean absorbidas por las superficies minerales del suelo e impidan la formación de complejos estables del fosfato, los cuales no son aprovechables por las plantas. A su vez, las bacterias también llevan a cabo la mineralización de fosforo orgánico mediante una enzima llamada fosfatasa que ayuda a descomponer la materia orgánica (Herrero, 2004).

Cuando un suelo presenta acidez, los fosfatos reaccionan con hierro y aluminio solubles para formar nuevas formas fosfatadas con bajas solubilidades, por lo que el P obtiene una baja movilidad. Por otro lado, además de que las formas minerales de este elemento no son solubles, no existe una manera eficaz en que los iones de fosfato dihidrógeno ( $H_2PO_4^-$ ) sean absorbidos por las plantas y microorganismos en forma de iones intercambiables sobre la arcilla o el humus, por lo que el fosforo que es utilizado por las plantas, proviene principalmente de la descomposición de la materia orgánica (IGAC, 2011).

El aprovechamiento de fosforo orgánico es posible mediante la simbiosis de micorrizas entre las plantas y algunas especies de hongos, los cuales pueden llegar a suministrar cerca del 50% de fosforo que la planta requiere.

Por otro lado, aquellos compuestos fosfatados que son insolubles, son inmovilizados dentro de los microorganismos y solo vuelven al suelo luego de que estos perecen (IGAC, 2011).

Las sustancias como el humus y otros aniones orgánicos simples que se generan de la degradación de la materia orgánica, son absorbidos por las superficies minerales del suelo y compite con los iones fosfatos al impedirle formar complejos más estables con los coloides inorgánicos (Fernández, 2006).

Una fertilización constante de fosforo superior a las necesidades del cultivo, ocasionaría una acumulación del elemento en el medio, debido a la baja movilidad de este en el suelo, lo cual llevaría a que los iones fosfatos no podrían ser absorbidos por las raíces de las plantas cuando

estos se encuentren separados por una distancia mayor a 2 mm. Lo mencionado anteriormente, es importante en el diseño del plan de fertilización, ya que una cantidad considerable del abono que se le añade a los cultivos no será asimilado por las plantas y solo ocasionará un enriquecimiento en las reservas del suelo (Herrero, 2004).

En la tabla 13 se ilustran los valores de fósforo que permiten determinar la calidad de un suelo.

**Tabla 13.** Criterios para determinar la calidad de un suelo con respecto al contenido de fósforo.

Calidad del suelo	Fósforo (ppm)
Bajo	<5,5
Medio	5,5 – 11
Alto	>11

**Fuente:** Normas Oficiales Mexicanas (NOM), 2002.

#### 2.4.12 Nitrógeno.

El nitrógeno es uno de los elementos que presenta mayor limitante en suelo y en la producción de los cultivos, debido a que la molécula  $N_2$  es inerte y posee una gran estabilidad a causa de su enlace triple. Esta forma natural del nitrógeno atmosférico no puede ser asimilada por la planta directamente, es por esto que depende principalmente de la fijación simbiótica y asimbiótica que ejecutan las bacterias fijadoras de nitrógeno, las cuales realizan un proceso de simbiosis con las plantas y le suministran la mayoría del nitrógeno que estas necesitan. A pesar de lo mencionado anteriormente, la planta también posee la capacidad de asimilar el nitrógeno que se precipita disuelto en el agua de lluvia (IGAC, 2011).

El nitrógeno igualmente puede sufrir procesos de mineralización y desnitrificación. El primer proceso se lleva a cabo cuando los microorganismos transforman los compuestos orgánicos en inorgánicos como: la forma de nitrógeno amoniacal, de nitritos y nitratos ( $NH_4^+$ ,  $NO_2^-$  y  $NO_3^-$ ). Este proceso consta de 3 etapas:

- **Aminización:** Etapa mediante el cual se producen aminas y aminoácidos a partir de la descomposición de proteínas y diversos compuestos nitrogenados que realizan los microorganismos heterótrofos.

- **Amonificación:** Etapa en la cual se adquiere el amoniaco a partir de la transformación de las aminas y aminoácidos resultantes del proceso de Aminización, mediante la intervención de algunas bacterias del género *Bacillus*, *Clostridium* y *Pseudomonas*; así como de especies de hongos (*Aspergillus* y *Actonomycetos*).
- **Nitrificación:** En esta etapa el amoniaco es oxidado en nitratos. Inicialmente el  $\text{NH}_4^+$  es transformado en  $\text{NO}_2^-$  debido a la intervención de las bacterias nitrosomonas, hongos (*Aspergillus* y *Penicillum*), *Nocardia* y *Streptomices*. Posteriormente el  $\text{NO}_2^-$  se oxida en  $\text{NO}_3^-$  mediante la acción de las bacterias nitrobacter.

Finalmente en el proceso de desnitrificación los nitratos son empleados como fuente de oxígeno por parte de algunos microorganismos (*Achromobacter*, *Bacillus*, *Alcaligenas*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Flavobactertum*, *Halobactertum*, *Hipomicrobium*, *Rhizoblum* y *Micrococcus*) y así el  $\text{N}_2$  es liberado nuevamente a la atmosfera. A este suceso se le conoce como la volatilización del nitrógeno (IGAC, 2011).

Establecer la concentración de nitrógeno en el suelo es importante, debido a que este elemento limita el crecimiento de la piña y es una variable que determina el rendimiento de la planta, debido a que esta, utiliza el N para sus procesos de síntesis proteica y este proceso a su vez, depende de los carbohidratos disponibles, la temperatura, la intensidad luminosa y la concentración de  $\text{CO}_2$ . Además, el nitrógeno es importante en el desarrollo vegetativo de la planta, debido a que es uno de los principales constituyentes de clorofila, proteínas, ácidos nucleicos y auxinas (Py, 1968, tomado de Lòpez J, 2016).

Algunos de los valores de nitrógeno total que permiten evaluar la fertilidad de un suelo están presentes en la tabla 14.

**Tabla 14.** Criterios para evaluar la fertilidad de un suelo con base en su contenido de nitrógeno total.

Clasificación de la fertilidad del suelo según el contenido de Nitrógeno	Nitrógeno total (%)
Extremadamente pobre	<0,032
Pobre	0,032 – 0,063
Medianamente pobre	0,064 – 0,095
Medio	0,096 – 0,126

Clasificación de la fertilidad del suelo según el contenido de Nitrógeno	Nitrógeno total (%)
Medianamente rico	0,127 – 0,158
Rico	0,159 – 0,221
Extremadamente rico	> 0,221

**Fuente:** Fernández L. 2006.

Los bajos niveles de nitrógeno en los suelos donde se cultiva la piña, causan clorosis en el follaje, hojas angostas y en menor cantidad, plantas más pequeñas y de menor crecimiento, bajando así la calidad de la producción (Py, 1968, tomado de López J, 2016).

Además, la carencia de este elemento en el suelo puede afectar el crecimiento microbiano, los cuales no presentarían un desarrollo óptimo. Por otro lado, el exceso de este elemento tendría un efecto de desarrollo acelerado en el crecimiento y descomposición de estas poblaciones de microorganismos. Adicionalmente, se liberaría parte del nitrógeno aprovechable al medio en forma de gas, lo cual indicaría la pérdida de este elemento valioso al cultivo (Fernández, 2006).

## 2.5 Propiedades microbiológicas del suelo.

Los microorganismos juegan un papel importante en los ciclos biogeoquímicos y en las transformaciones de los procesos de humificación y mineralización de la materia orgánica. Un ejemplo de esto son las bacterias, las cuales se encargan de transformar químicamente diferentes compuestos a formas asimilables para las plantas (Hernández, 2010); (Carvajal, 1997).

Tal es el caso de las bacterias *Thiobacillus thiooxidans*. *T. nove/luso* *T. thiopams*. *T. denitriflCans*, las cuales transforman compuestos de azufre; *Bacilos*. *Pseudomonas*. *Clostrldlum*. *Nitrosomonas*. *Nitrobacter*. *Achromobacter*, encargadas de transformar y fijar los compuestos de nitrógeno. Por último, diferentes especies de bacterias (no especializadas) se encargan de solubilizar los compuestos fosfatados mediante asociaciones con las raíces de las plantas y algunos hongos (micorrizas), los cuales le aportan cerca del 50% del requerimiento de fósforo de la planta (Carvajal, 1997).

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, es de importancia conocer la diversidad microbiana presente en el suelo. Sin embargo, los métodos para cultivar las diferentes especies en el laboratorio solo permite el estudio de un bajo porcentaje (<1%). Para poder contrarrestar

el déficit de especies microbiológicas que se pueden estudiar, se ha desarrollado la técnica de amplificación de genes ribosomales o ADN (Metagenómica) (Hernández, 2010).

### **2.5.1 Diversidad bacteriana en el suelo.**

El suelo es considerado como un albergue de microorganismos, ya que la literatura reporta que el espacio estimado que ocupa la microbiota viva es menor al 5% del espacio total. La ubicación de la mayoría de los microorganismos se da principalmente en las zonas de agregados con materia orgánica acumulada, llamada rizosfera (Tilak, 2005).

Las plantas influyen fuertemente en la diversidad y abundancia de las bacterias del suelo, debido a las numerosas sustancias que exudan sus raíces. De esta forma, la comunidad bacteriana que se desarrolla en la rizosfera depende de la naturaleza, tipo de suelo y las concentraciones de los componentes orgánicos expulsados por las plantas. A pesar de lo mencionado anteriormente, hay poblaciones bacterianas que se denominan de vida libre, ya que no dependen de las sustancias generadas por las raíces de las plantas para su supervivencia (Tilak, 2005).

Algunos de los filos de bacterias más abundantes en el suelo son *Actinobacterias*, *Acidobacterias*, *Proteobacterias*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Chloflexi*, *Gemmationadetes*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes* y *Thermotogae*.

#### **2.5.1.1 Actinobacterias.**

*Actinobacterias* (*Actinomicetos*), se caracterizan por ser Gram positivas, aerobias y anaerobias; crecen entre temperaturas de 25°C a 30°C y son poco ácido-tolerantes, por lo que requieren un pH neutro para su máximo crecimiento. Sin embargo, se ha documentado que crecen en un rango de pH entre 5,0 y 9,0 (El-Tarabily, 2006; Franco 2008; Jayasinghe, 2008). También se resalta la capacidad de resistencia a altas concentraciones de aluminio (Suela, 2013).

Las poblaciones de *Actinobacterias* se reducen a medida que baja la humedad relativa, pH, disponibilidad de nutrientes en el suelo y contenido de materia orgánica; sin embargo, pueden aumentar su abundancia en un clima tropical (Shrivastava, 2008; Jayasinghe, 2008; Ventura, 2007).

Estas bacterias desempeñan un rol indispensable en el ciclo de compuestos orgánicos, ya que median en la degradación de la materia orgánica y la producción de pigmentos fundamentales (melanina) relacionados con el ácido húmico del suelo (Gomes, 1996).

Uno de los géneros que más se destaca dentro del filo *Actinobacteria*, es *Streptomyces*, el cual se caracteriza por desarrollarse óptimamente en rangos de temperatura entre 28 a 30 °C y en una humedad alta; además de participar activamente en procesos de degradación y mineralización de materia orgánica en el suelo. También desempeñan un papel importante en la formación de humus (Sánchez, 2009).

Otro género perteneciente a este filo, es *Conexiobacter*, el cual se caracteriza por ser estrictamente aerobio y crecer de forma óptima en rangos de pH entre 7 y 7,5; al igual que en rangos de temperatura entre 28 a 37 °C (Monciardini, 2003). También poseen la capacidad de reducir el nitrato a nitrito e hidrolizar los carbohidratos, por lo que probablemente puedan contribuir al ciclo del carbono del suelo (Monciardini, 2003; Rüdiger, 2010; Tamae, 2012).

#### **2.5.1.2 Acidobacteria.**

Las bacterias pertenecientes al filo *Acidobacteria*, comparten rasgos genómicos con diferentes miembros de los filo *Proteobacteria* y *Cyanobacteria*. Estos rasgos genómicos revelan el uso de diversas fuentes de carbono que van desde azúcares simples hasta sustratos más complejos como hemicelulosa, celulosa y quitina (Ward, 2009).

Según la literatura, *Acidobacterias* se ven afectadas por las propiedades fisicoquímicas del suelo como el pH, carbono orgánico, nitrógeno total, el fósforo, el nitrato, el amonio, la humedad y la relación de C/N del suelo; sin embargo, se destaca que el contenido de nitrógeno en el suelo afecta directamente la abundancia poblacional de este filo. A pesar de lo mencionado anteriormente, estas bacterias poseen la capacidad de adaptarse fácilmente a condiciones bajas de nutrientes y pH (3,0 a 6,5) (Naether, 2012; Ward, 2009).

A pesar de que no son capaces de fijar nitrógeno, por la carencia de la enzima nitrogenasa, si pueden reducir los nitratos y nitritos al asimilarlos. Además estas bacterias pueden comportarse como intermediarios en la captura de metales del suelo (Ward, 2009).

También se resalta la presencia de genes orientados a la síntesis de celulosa y una variedad de clase de nuevas proteínas de alto peso molecular excretadas por estas bacterias, que sugiere un

potencial para la resistencia a la desecación, la formación de biopelículas y la contribución a la estructura del suelo. A su vez, la literatura sugiere que las *Acidobacterias* contribuyen al adecuado funcionamiento del ciclo del carbono en el suelo.

Dentro de este filo, se destaca un género de reciente descubrimiento, el cual es *Candidatus Koribacter*. Este género se caracteriza por ser acidófilo, heterótrofo aeróbico gramnegativo, altamente encapsulado y crecer en un rango de temperatura entre 4 a 37 °C. Además es capaz de oxidar CO y degradar polímeros complejos de las plantas (Sait, 2002)

Otro género que también es de reciente descubrimiento y pertenece al filo *Acidobacteria*, es *Candidatus de Solibacter*. Este género se caracteriza por ser moderadamente acidófilo, heterótrofo versátil y por reducir los nitratos en nitritos, sin embargo no participa en la fijación ni en la desnitrificación de N<sub>2</sub>. También tiene el potencial de degradar polisacáridos, pectinas y hemicelulosas, haciendo que las bacterias de este género participen en la oxidación del carbono orgánico (Rawat, 2012; KEGG, 2019).

### **2.5.1.3 Proteobacterias.**

Las bacterias del filo *Proteobacterias* son Gram negativas, con una notable presencia de lipopolisacáridos en su membrana celular; poseen formas muy variables, en las que se pueden encontrar desde bacilos hasta Coccus simples. Varias de estas bacterias poseen movilidad gracias a flagelos (Rocha, 2015). También se caracterizan por ser muy sensibles a las disminuciones de pH y alteraciones en la relación Carbono – Nitrógeno del suelo. Esto indica que estas bacterias tienden a presentar una menor población en suelos ácidos y con baja cantidad de nutrientes (Hermans, 2016).

### **2.5.1.4 Verrucromicrobia.**

El filo *Verrucromicrobia* se describió recientemente, por lo cual no hay una información suficiente que describa su función en el suelo. Sus primeras descripciones datan del 2001 a 2004 (Stevens, 2017). Este filo es considerado como un bioindicador en los cambios de la fertilidad del suelo, ya que son muy sensibles a las variaciones repentinas en las concentraciones de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, pH, CIC, contenido de materia orgánica y humedad. Esto indica que el crecimiento de las poblaciones de *Verrucromicrobia* se ve limitado por los parámetros anteriormente mencionados y que el

aumento de su población puede asociarse a un incremento en la fertilidad del suelo o su afectación (Navarrete, 2015).

En el filo *Verrucromicrobia* se destaca el género *Chthoniobacter*, el cual también es de reciente descubrimiento (2004) y se encuentra principalmente en la biomasa vegetal, por lo que probablemente sea participe en la transformación del carbono orgánico (Kant, 2011). Las bacterias pertenecientes a este género se caracterizan por crecer entre rangos de pH de 4 a 7 y de temperatura entre 25 a 34 °C. También se resalta que las mayoría de bacterias de este género son estrictamente aerobias y que degradan azúcares, polímeros de azúcar y piruvato, pero no ácidos orgánicos (Sangwan, 2004).

#### **2.5.1.5 Firmicutes.**

Las bacterias pertenecientes al filo *Firmicutes*, se caracterizan por tener la capacidad de formar endosporas aerobias, las cuales les permite resistir el calor, la radiación, acción desinfectante, rayos ultra violeta (UV) y desecación. Esto les confiere la capacidad de sobrevivir a una gran variedad de estas bacterias en condiciones fisicoquímicas en el suelo, que serían adversas para otros microorganismos. Además poseen enzimas que permiten degradar los glucanos (Azúcares), materia orgánica y compuestos de celulosa.

Dentro del filo *Firmicutes* se destaca el género *Bacillus*, el cual se caracteriza por promover el crecimiento vegetal a través de la solubilización de fósforo y la producción de sustancias como el ácido indol acético, que regula el crecimiento de microorganismos patógenos (Corrales, 2017).

#### **2.5.1.6 Planctomycetes**

Las bacterias del filo *Planctomycetes* se caracterizan por tener compartimentación celular, paredes celulares sin peptidoglicanos, presencia de lípidos inusuales como esteroides y ladderana. Algunas especies como la *Anammox*, se especializan en la oxidación de amonio en condiciones anaerobias (Fuerst, 2017). La literatura también reporta un potencial de las bacterias *Planctomycetes* para la degradación de materia orgánica polimérica y la producción de gas N<sub>2</sub> a partir de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NH<sub>4</sub> (Ivanova 2018; Kirkpatrick, 2006).

El género *Isosphaera*, perteneciente al filo *Planctomycetes*, es de reciente descubrimiento y se destaca por ser estrictamente aerobio, termófilo, inmóvil y generalmente no filamentoso

(Wang, 2002). Además tienen la capacidad de ser ácido tolerantes, resistiendo valores de pH de hasta 3,6 y también pueden resistir temperaturas entre los 10 a 30 °C, siendo el rango de temperatura óptimo para su crecimiento de 25 a 28 °C (Kulichevskaya, 2012).

#### **2.5.1.7 Chloroflexi**

El filo *Chloroflexi* es un grupo de bacterias que en su mayoría no son cultivables por métodos tradicionales, por lo que aún se desconoce la variabilidad de especies y potencial en diferentes roles ecológicos. Sin embargo, el pequeño grupo de bacterias cultivables ha permitido identificar las siguientes características: son aerobias aerobios y termófilos anaeróbicos, fotótrofos anoxigénicos filamentosos, anaeróbicos respiradores de organohalidos, reductores de hidrocarburos clorados y fermentadores anaerobios (Cantera, 2014; Krzamarzick, 2011).

Las bacterias del filo *Chloroflexi* pueden respirar organohaluros y se distribuyen ampliamente como parte de los ecosistemas terrestres no contaminados y se correlacionan con la fracción de carbono orgánico total (COT) presente como organoclorados, y aumentan en abundancia mientras se decloran los organoclorados. Estos hallazgos sugieren que *Chloroflexi* tendrían una importante participación en el ciclo del cloro biogeoquímico (Krzamarzick, 2011).

#### **2.5.1.8 Gemmatimonadetes.**

El filo *Gemmatimonadetes* contiene solo una especie nombrada y descrita, *Gemmatimonas aurantiacus*. Esta bacteria es un heterótrofo aeróbico gram-negativo. Se encuentran en suelos áridos, lo que sugiere una adaptación a ambientes de baja humedad. Por lo que las mayores abundancias relativas de *Gemmatimonadetes* se observan durante períodos de humedad más baja del suelo (DeBruyn, 2011).

Los miembros del filo *Gemmatimonadetes* constituyen un promedio del 2% (rango, 0 a 4%) de las comunidades bacterianas del suelo (DeBruyn, 2011).

La literatura ha reportado mayores abundancias relativas de *Gemmatimonadetes* en suelos cerca de pH neutro que en suelos ácidos, lo que sugiere que después de la humedad, el pH puede actuar como una restricción secundaria en *Gemmatimonadetes* en el suelo (DeBruyn, 2011).

### **2.5.1.9 Spirochaetes.**

El filo *Spirochaetes* son bacterias heterótrofas de forma helicoidal, Gram-negativas, aerobias y facultativas anaerobias. Además pueden interactuar de forma simbiótica con organismos como termitas para descomponer compuestos orgánicos complejos presentes en el suelo. El pH óptimo de estas bacterias están entre el intervalo de 6,0 a 7,0; pH el cual se encuentra en el tracto digestivo de las termitas y su temperatura óptima es de 30 °C (Dröge, 2006).

Existen gran variedad de espiroquetas adaptadas a todo tipo de ambientes, desde vida libre flageladas hasta parásitos de insectos y animales, aunque todas son quimiorganotrofas. Algunas especies de *Treponema* viven en el rumen del estómago de una vaca, donde descomponen la celulosa y otros polisacáridos vegetales difíciles de digerir para su huésped (Dröge, 2006).

### **2.5.1.9 Bacteroidetes.**

El grupo Bacteroidetes se caracteriza por ser bacterias Gram negativas y anaerobias, con una diversa distribución en suelos, sedimentos terrestres y marinos y en el tracto digestivos de animales (Francois 2011). Estas bacterias no pueden sobrevivir en el medio, ya que como se mencionó anteriormente, son estrictamente anaerobias.

### **2.5.1.10 Thermotogae.**

Son bacterias termófilas e hipertermófilas, aerobias y Gram negativas. Se caracterizan por tener la capacidad de envolver sus células en una membrana exterior adicional, lo que les permite tolerar cambios en oxígeno, pH y salinidad. También pueden reducir la cistina, tiosulfato y compuesto de hierro azufre (Göker, 2014).

## **2.6 Técnica de amplificación de cadenas de ADN (metagenómica).**

La metagenómica es aquella ciencia que estudia el metagenoma de un nicho particular, es decir que analiza el ADN genómico de una comunidad completa (Hernandez, 2010). El metagenoma es el conglomerado total de ADN que se encuentra en una muestra ambiental. Esto involucra el material genético de las células vivas, el ADN de las especies microbianas en estado de latencia, muertas y el ADN extracelular.

Tomando en cuenta lo anterior, se comprende que la metagenómica es la ciencia en la cual intervienen diversas técnicas moleculares con el fin de estudiar comunidades microbianas en cada uno de sus ambientes naturales sin tener que realizar un aislamiento, cultivo u observaciones previas de dichos organismos (Balagurusamy, 2014). Esto imparte una clara ventaja de esta ciencia sobre los métodos tradicionales de análisis microbiológicos, ya que en estos últimos solo es posible analizar menos de 1% de los microorganismos presentes en una muestra de suelo, siempre y cuando estos hayan sido previamente aislados y cultivados en el laboratorio, mientras que las técnicas moleculares utilizadas en la metagenómica, posibilita el estudio de diversas familias microbiológicas presentes en una muestra ambiental (Kato, 2015).

Una de las principales funciones de la metagenómica es la de reconstruir el metabolismo de los diversos organismos que componen la comunidad mediante la secuenciación molecular, y así lograr predecir los roles funcionales de estos en sus ecosistemas (Hernandez, 2010).

## 2.7 Técnica de secuenciación genética más empleada en la metagenómica.

Los diversos estudios empleados alrededor de la ciencia de la metagenómica pretenden caracterizar la estructura taxonómica de una o varias comunidades microbiológicas. La técnica más empleada es mediante el uso de un gen marcador, este es el 16S ARNr para células procariontas y el 18S ARNr para células eucariotas

En la tabla 15 se ilustra la metodología empleada para la caracterización de comunidades microbiológicas de una muestra ambiental mediante el uso de marcadores genéticos (16S y 18S ARNr) y el uso de secuenciación aleatoria.

**Tabla 15.** Metodología empleada para la secuenciación metagenómica de una muestra ambiental por medio de marcadores genéticos (16S y 18S).

Actividad	Especificación
Procesamiento de la muestra	Extracción de ADN
	Purificación de ADN
	Verificación de ADN por espectrofotometría
	Amplificación de ADN por PCR

Actividad	Especificación
Identificación del metagenoma	Secuenciación por plataforma Illumina
	Análisis de las secuencias obtenidas

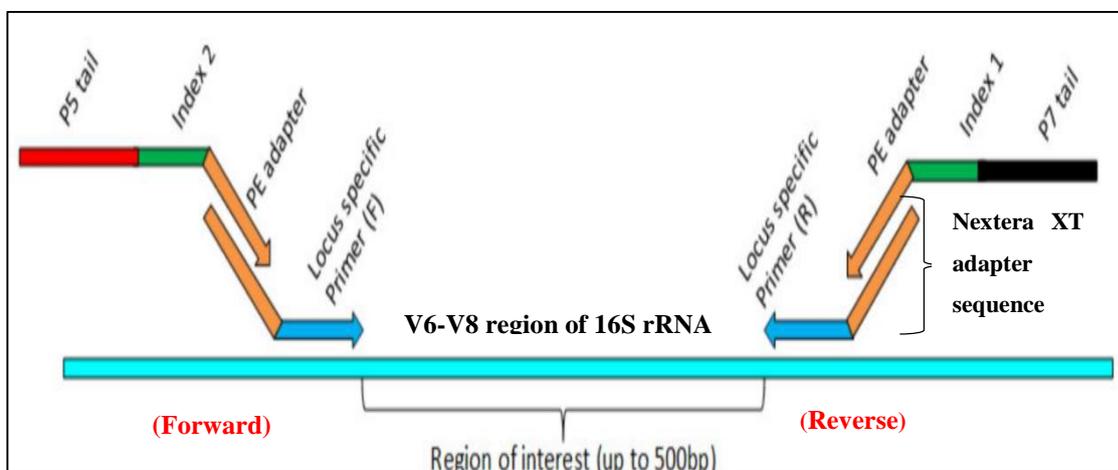
**Fuente.** Hernández-León (2010); Roberto D. (2014).

Posterior a la recolección de la muestra de interés, se procede a realizar la extracción del ADN mediante un Kit de DNA. Luego se procede a purificar las muestras.

Después la muestra se somete a un estudio de espectrofotometría, para verificar así la presencia única de cadenas de ADN y descartar alguna otra sustancia que pueda alterar el estudio. Posterior a esto, al ADN extraído se le debe suministrar amplicones por reacción de cadena polimerasa (PCR) para que así se generen las piezas de ADN del gen 16S y 18S. Para la amplificación de gen ARNr 16S de la región V3-V4, se emplean los oligonucleótidos (primers) 27F 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' y 1492R 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'; para el gen 18S se utilizarán los primers ITS1F / ITS2 (Gardes & Bruns, 1993) Forward primer (ITS1f) AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC GG CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA; Reverse primer (ITS2) CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT NNNNNNNNNN CG GCTGCGTTCTTCATCGATGC (Hernandez, 2010). Al obtener los amplicones se empiezan a secuenciar por el método Illumina.

El procedimiento de amplificación por PCR se evidencia en la Figura 4.

**Figura 4.** Amplificación por PCR.



**Fuente.** Illumina, 2018.

Para llevar a cabo la amplificación por PCR, inicialmente se debe aislar el gen de interés 16S ribosomal (16Sr), el cual posee 1500 pares de bases (pb). Posterior a esto se determina la región de mayor provecho para el estudio, dentro del gen; las regiones utilizadas generalmente son las V3 – V4 y V6 – V8. Para llevar a cabo la amplificación del área de interés, se adicionan 2 adaptadores (primers), los cuales marcan el inicio y el final de la región a amplificar. Luego se adiciona el adaptador PE, que permite unir los primers con el index y el P# Tail; este adaptador es de importancia, ya que permite la lectura de las secuencias por parte de la plataforma Illumina MiSeq. Después se adiciona el adaptador index, el cual determina el sentido de las lecturas de las bases nitrogenadas de la región de interés. Finalmente se adiciona el adaptador P# Tail, que contiene la información específica de la muestra, como ubicación y nombre (Illumina, 2018).

La secuenciación por el método Illumina MiSeq arroja diversas lecturas metagenómicas de cada muestra. Posteriormente las secuencias se comparan con las diferentes bases de datos para encontrar similitudes y así poder identificar los géneros microbiológicos y su abundancia.

El proceso de secuenciación de las regiones del gen 16Sr varían dependiendo de las diferentes plataformas disponibles en el mercado; las cuales pueden ser: Roche454 (FLX454+), Illumina MiSeq, AB Solid, Ion Proton (Ion Torrent) y PacBio RS II. Dentro de las plataformas de secuenciación existentes, se destaca Illumina MiSeq, debido a que presenta un bajo margen de error en las lecturas de datos (<1%), bajo costo por Gigabyte de información, simple, escalable y un alto rendimiento (Ari, 2016).

Según Hernández y sus colegas (2010) para posibilitar la creación de las bibliotecas o bancos de clonas, los genes ribosomales 16S se clonan en vectores o plásmidos y son transferidos a bacterias huésped que contienen las secuencias del gen 16S de diversos microorganismos. Esto posibilita el análisis de cada una de las secuencias previamente clonadas.

Al aplicar lo mencionado anteriormente se obtiene diversas secuencias de ADNr 16S de diferentes microorganismos que son reportadas en distintas bases de datos tales como GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y el Ribosomal Database Project (RDP).

Al filtrar las bases de datos de las secuencias filogenéticas por el MG-RAST, se pueden presentar fillos o géneros que comparten una identidad genética muy alta con otros o que por lo contrario, no poseen semejanza en su material genético con algún otro filo o género registrado

en las bases de datos de las diferentes bibliotecas; aun así comparten un porcentaje de ADN del orden de las bacterias o de determinado filo o género, por lo que se les otorga la clasificación de derivados o candidatos de bacteria o determinado filo o género.

Tal es el caso del género “Candidato de Koribacter”, el cual se presume que se clasifica así, debido a que presenta una identidad genética muy alta con este género, pero no lo suficiente para entrar dentro de este, por lo que presumiblemente se considera que pueden llegar a compartir ciertas características como la de ser un grupo de bacterias acidófilas, heterótrofas, aerobias, Gram-negativas, altamente encapsuladas y cuya población varía dependiendo de la diversos azúcares, polímeros de azúcar y ácidos orgánicos (Sait, 2002).

A pesar de que los estudios sobre este filo son relativamente nuevos (1991), se destaca la presencia de este en suelos con una alta acidez, por lo que se presume que son tolerantes a ambientes con pH muy bajos (Sait, 2002)

## **2.8 Generalidades del cultivo de piña (*Ananás comosus L.*)**

La planta *Ananás comosus L.* pertenece a la familia de las Bromeliáceas de tipo herbáceo y perenne. Sus raíces proceden de la parte inferior del tallo y se desarrollan en los próximos 15 centímetros del horizonte del suelo, haciéndolas superficiales (Dane, 2016). La piña puede desarrollarse de forma óptima entre los 50 a 600 msnm, sin embargo, al darse en mayores alturas, el fruto es proclive a ser más ácido. Por lo general, el cultivo requiere una temperatura entre los 20 a 30 °C, un requerimiento mínimo de 50 mm de agua por planta al mes y un suelo franco con un intervalo de pH entre 5-6, un contenido de materia orgánica entre 5 a 10% y una concentración de fósforo de 20 a 50 mg/L (CENTA, 2011; Molina, 2012).

### **2.8.1 Plagas que afectan el cultivo de piña (*Ananás comosus L.*)**

Las principales plagas que afectan al cultivo de piña son *Pseudococcus maritimus* (Queresa harinosa), *Saissetia coffeae* (Queresa hemisférica), *Metamasius hemipterus L.* (perforador de los frutos), *Trigona spinipes* (abeja), *Techla basilides* (Broca de la piña), *Techla basilides*, *Techla basilides* (Mosca de los frutos de la piña) asociada a manchas de los frutos o con galerías), los Hongos *Fusarium sp* y *Penicillium sp* y *Dysmicoccus brevipes* (Cochinilla o piojo blanco) (Arellano G, 2015). Esta última se destaca debido a que mantiene una relación simbiótica con las hormigas, lo cual le permite a la Cochinilla beneficiarse del desplazamiento

que le brindan las hormigas y estas a su vez se alimentan de las excretas que produce esta plaga luego de alimentarse de la piña (Jiménez, 1999).

El piojo blanco de la piña pertenece al orden *Homópteros* y a la familia *Pseudococcidae*. Este artrópodo se alimenta del cultivo de piña mediante la absorción de la sabia en las hojas y a su vez, permite la acción de patógenos tales como *Fusarium moniliforme* y *Penicillium foniculosum*, produciendo así diversas enfermedades. Estas se evidencian con la aparición de las manchas negras y las formaciones de costras epidérmicas o internas, que se manifiestan mediante la aparición de franjas rojas, negras y verdes, finalizando con la marchitez de la planta (Arellano G, 2015; Vargas E. 2009).

## **2.9 Insecticidas químicos utilizados en el cultivo de piña.**

Para controlar la proliferación y los efectos nocivos de las diferentes plagas que afectan al cultivo de piña, se utilizan diferentes insecticidas químicos como el Lorsban 4EC, Diazinon, Vexter 4EC, Rimon Duo y Eredamix 247 SC (ICA, 2018). Estos insecticidas poseen diferentes grupos químicos, tales como: organofosforados (Lorsban, Diazinon y Vexter), Benzimidazoles y Piretroides (Rimon Duo), Neonicotinoide y Piretroide (Eredamix).

A pesar de que varios insecticidas comparten un mismo grupo químico, las características que estos poseen para contrarrestar la actividad de las diferentes plagas presentes en el cultivo de piña pueden variar. Tal es el caso del Diazinon, que se caracteriza por la inhibición de la colinesterasa y por ende altera la transferencia de impulsos nerviosos del insecto (ANLA, 2012); o el Lorsban y el Vexter, los cuales inhiben la enzima acetilcolinesterasa, ocasionando la excesiva transmisión de impulsos nerviosos (ANLA, 2011); (ANLA, 2011).

Por otro lado, el insecticida Rimon Duo se caracteriza por impedir la biosíntesis de quitina de los insectos y la alteración del sistema nervioso central (ANLA, 2012). Finalmente el producto Eredamix, ocasiona un bloqueo irreversible de los receptores nicotínicos postsinápticos de acetilcolina e interrumpe la transmisión de los impulsos nerviosos, causando una pérdida de control muscular al insecto (ANLA, 2017).

## **2.10 Generalidades del Lorsban 4EC.**

Según la compañía química Dow Agrosciences de Colombia S.A, la cual distribuye el Lorsban 4EC, este producto es un acaricida en forma de suspensión concentrada que actúa mediante ingestión, contacto e inhalación de los insectos, ya sea en su etapa adulta o larvar. La materia

activa de este insecticida es clorpirifos, el cual representa cerca del 48% de la composición del producto.

El Lorsban es un acaricida de alto control de plagas durante una vida media de 6 a 25 semanas y posee una mediana fotoestabilidad y resistencia al lavado. Es utilizado para el control de plagas en cultivos de algodón, maíz, café, papa y piña. Sin embargo presenta una alta toxicidad para aves, peces, abejas y otros insectos benéficos (ANLA, 2011).

### **2.10.1 Antecedentes del uso de Clorpirifos.**

Para determinar la influencia del insecticida Lorsban sobre los ecosistemas y las diversos microorganismos que habitan en estos, se han hecho diversos estudios a lo largo del mundo sobre las alteraciones biológicas y fisicoquímicas que conlleva el uso de la sustancia activa de este producto (Clorpirifos), la cual representa cerca del 48 % de este insecticida.

Giménez y Penna (2004) analizaron los efectos de diferentes concentraciones de Clorpirifos sobre la lombriz de tierra (*Lumbricus Terrestris*), teniendo en cuenta la variación de peso, actividad individual y supervivencia de los individuos. Al finalizar el estudio, se concluyó que el uso de Clorpirifos en las dosis recomendadas para el control de los insectos presentes en el suelo, no afecta la supervivencia, desplazamiento o alimentación de *L. Terrestris*.

Cocca C. y sus colegas (2015) estudiaron los efectos de Clorpirifos (CPF) sobre las personas, mediante modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. Como resultado, demostraron que el CPF no solo inhibe la enzima acetilcolinesterasa en los insectos, como describe la literatura referente a la sustancia, sino que también se comporta como un disruptor endocrino modulando la acción de los estrógenos y alterando la normal estructura del tejido mamario; facilitando así la aparición del cáncer de mama.

Los diferentes estudios realizados alrededor del mundo se centran en el impacto contaminante que el Clorpirifos genera en los humanos y en los macroorganismos del medio ambiente. Sin embargo, se destaca la falta de investigaciones respecto al comportamiento de la microbiota del suelo frente a la constante presencia de los residuos del clorpirifos en el medio; lo cual es de suma importancia para aumentar la productividad del suelo y los cultivos.

### 3. Metodología.

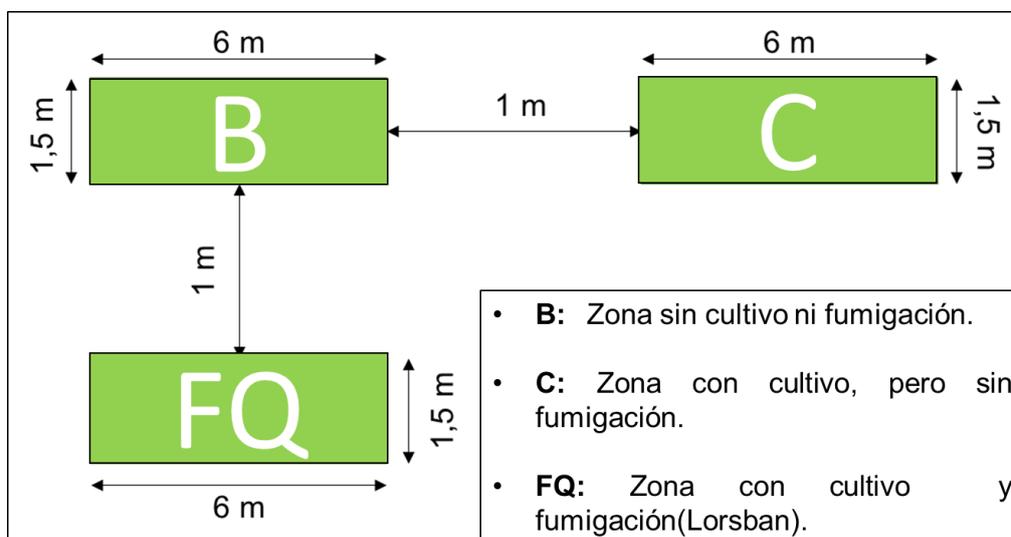
El proyecto se realizó en convenio con la Universidad De Santander (UDES), donde se desarrollaron las pruebas microbiológicas en Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular. En la Universidad Pontificia Bolivariana-Bucaramanga, en el laboratorio de suelos se efectuaron los análisis fisicoquímicos y en laboratorio de Estudios Ambientales se analizaron los parámetros de nitrógeno total (NTK) y fosforo total. La parte experimental de campo se llevó a cabo en la granja Bellavista del municipio de Lebrija-Santander, donde al inicio se delimitó el área de estudio en 3 zonas, con las mismas dimensiones de 6m de largo x 1,5m de ancho.

La primera zona se denominó el blanco (B), que fue el suelo sin cultivo de piña ni fumigación. La siguiente zona llamada control (C), fue sembrada con piña, pero no se le aplicó el insecticida químico (Lorsban). La última zona fue sembrada con piña y fumigada con el insecticida químico (FQ) tras 4 semanas del sembrado y posteriormente una vez al mes durante 8 meses. El proceso de fumigación se realizó de 5:00 a 6:00 pm, aplicando las instrucciones adjuntas al insecticida Lorsban 4EC.

Todas las áreas descritas anteriormente han recibido el mismo tratamiento del riego con agua cruda, manejo tradicional de cultivo y la adición de fertilizante mineral (triple quince) el día 10 de febrero y 10 de marzo.

En la figura 5 se ilustra la distribución de las áreas experimentales descritas anteriormente.

**Figura 5.** Esquema de las zonas de estudio en la granja Bellavista.



**Fuente.** Autor.

### 3.1 Determinación de las características fisicoquímicas iniciales y el análisis metagenómico del suelo, destinado para el cultivo de *Ananás comosus* en el municipio de Lebrija, Santander.

La toma de muestras de suelo se realizó en cada una de las áreas, tras dos semanas de haber sembrado la piña, aplicando la guía de muestreo según IHOBE (1998). Según esta metodología en cada área se recolectaron 4 sub muestras de manera aleatoria, todas a 15 cm de profundidad de suelo. Las sub muestras se almacenaron en las bolsas tipo ziplock y se rotuló debidamente. Posteriormente fueron transportadas en la nevera de icopor hasta el laboratorio de suelos de la Universidad Pontificia Bolivariana, donde fueron procesadas.

Este proceso se repitió al mes y a los 8 meses de haberse iniciado la siembra. En la tabla 16 se especifica el cronograma de muestreo de suelos de interés.

**Tabla 16.** Cronograma de muestreo de suelos de interés.

Fecha	Muestreo	Observaciones
9 Febrero de 2018	Muestra 1 (inicial)	Toma de muestra del suelo B,C, FQ y la fumigación posterior del suelo FQ con Lorsban
10 Febrero de 2018	Muestra 2	Toma de muestra del suelo B,C, FQ
9 Marzo de 2018	Muestra 3	Toma de muestra del suelo B,C, FQ y la fumigación posterior del suelo FQ con Lorsban
10 Marzo de 2018	Muestra 4	Toma de muestra del suelo B,C, FQ
5 Octubre de 2018	Muestra 5	Toma de muestra del suelo B,C, FQ

**Fuente:** Autor.

Una vez en el laboratorio, las sub muestras de suelos fueron mezcladas, homogenizadas y secadas a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente se realizó el análisis

fisicoquímico por triplicado para cada una de las zonas de muestro y se promediaron los resultados.

En la tabla 17 se reportan los métodos empleados para la determinación de parámetros fisicoquímicos en las muestras de suelo recolectadas.

**Tabla 17.** Métodos empleados para la determinación de parámetros fisicoquímicos.

Parámetro fisicoquímico	Método
pH	*NTC 5264
Conductividad Eléctrica	NTC 5596
Acidez y aluminio Intercambiable	NTC 5263
Textura (Bouyoucos/ Granulometría)	*ASTM WK38106 / NTC 1522
Curva de pérdida de humedad	NTC 947-1
Densidad aparente	NTC 237
Densidad real	ASTM 2216
Permeabilidad e Infiltración	ASTM D2434-68 / ASTM D3385 - 09
Materia Orgánica	*I.V.N.E – 121- 07
Capacidad de Intercambio Catiónico	NTC5268
Fosforo total	*SM 4500-P-B,E
Nitrógeno total	SM 4500
Carbono Orgánico Total	NTC 5403

**Fuente.** Departamento de agricultura de Estados Unidos (USDA), 2014. NTC: Normas Técnicas Colombianas; ASTM: American Society of Testing Materials; I.N.V: Instituto Nacional de Vías; SM: Standard Methods.

El criterio para la selección de los parámetros fisicoquímicos fue la calidad y productividad del suelo, utilizado en cultivo de piña.

El pH fue analizado debido a que este parámetro es importante en el cultivo de piña, siendo el rango de 5,0 y 5,8 recomendado por la literatura (DANE-ENA, 2015).

La medición de la conductividad se relaciona con la cantidad de sales presentes en el suelo, donde una gran concentración de éstas puede inhibir el crecimiento de las plantas y el buen desarrollo de los microorganismos.

El análisis de la textura del suelo se realizó para determinar el porcentaje y la distribución de las partículas del suelo con diámetro menor a 2 mm y así poder relacionarlo con la permeabilidad e infiltración, la humedad, la porosidad total y la densidad del mismo. Esto permite conocer el porcentaje de agua y sus posibles vías de movilización dentro de la estructura del suelo. Así mismo, se puede asociar con el oxígeno disuelto presente en los poros del suelo, necesario para la estabilidad y supervivencia de las diferentes especies microbiológicas.

La materia orgánica, carbono orgánico total y la capacidad de intercambio catiónico inciden sobre la disponibilidad de nutrientes y de esta manera la fertilidad del suelo.

De la misma forma la cantidad de fósforo y nitrógeno, marcan la productividad del mismo, por lo cual es importante saber los cambios de estos parámetros en el transcurso del tiempo experimental en campo.

Cabe resaltar que todos los análisis fisicoquímicos del presente capítulo son realizados en condiciones iniciales.

La metodología de análisis microbiológicos iniciales y finales fue la misma y se detalla en el capítulo 3.3 del presente documento.

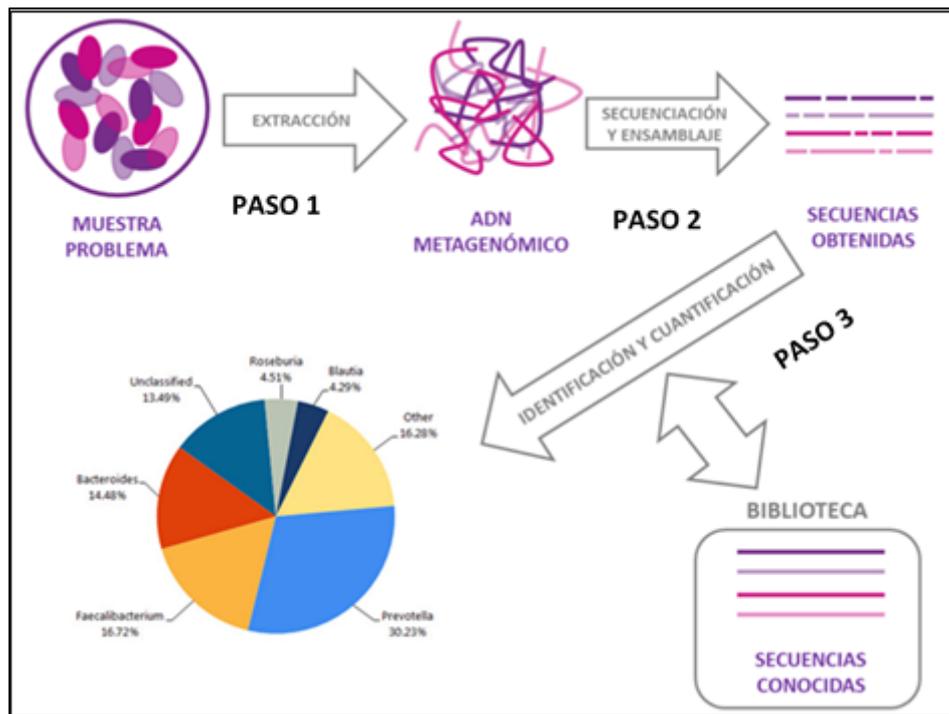
### **3.2 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas en suelos cultivados con *Ananás comosus*, tras la aplicación del insecticida químico (Lorsban).**

El cultivo de la piña se realizó en área de suelo C y FQ y a un mes de haber sembrado se realizó el primer muestreo de suelos en B, C, FQ para establecer condiciones iniciales. La fumigación se efectuó únicamente en la zona FQ. Todos los análisis fisicoquímicos realizados fueron iguales que al inicio, aplicando la misma metodología.

### 3.3 Análisis de los cambios microbiológicas presentes en el suelo cultivado con *Ananás comosus*, después de la aplicación del insecticida químico (Lorsban).

El análisis metagenómico del suelo se realizó al inicio y al final del estudio. En la figura 6 se indica la metodología empleada para el estudio metagenómico.

**Figura 6.** Metodología empleada para el estudio metagenómico.



**Fuente.** Cutrina F. 2016.

El proceso de muestreo de suelo se realizó en los mismos sitios seleccionados para análisis fisicoquímicos. Cada muestra se tomó en tubo Falcón de 50ml, los cuales se almacenaron en una nevera portátil, refrigerada a una temperatura aproximada de 0 - 4°C, la cual se transportó hasta la Universidad de Santander (UDES-Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología), donde fue almacenada a -80°C hasta su posterior análisis.

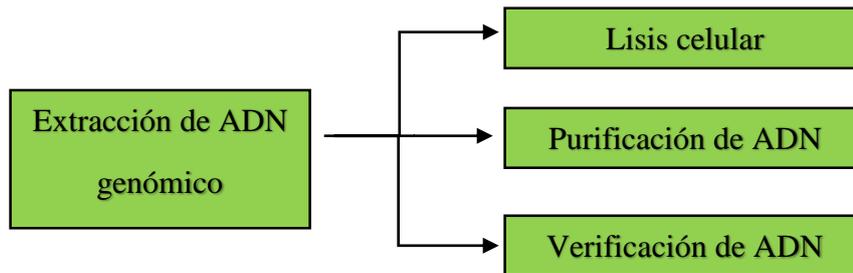
El análisis metagenómico de suelo de interés implicó el desarrollo de 3 pasos, de los cuales el primero fue la extracción del ADN de cada muestra problema. Posteriormente se realizó la secuenciación y ensamblaje de las cadenas de ADN previamente extraídas, para así formar unas secuencias de bases nitrogenadas. Finalmente se identificaron los géneros microbianos presentes en las muestras analizadas.

La metodología empleada en cada uno de los pasos, se especifica a continuación.

### 3.3.1 Extracción de ADN metagenómico.

El protocolo de extracción que se empleó fue el E.Z.N.A Soil DNA Kit de la empresa OMEGA BIO-TEK, donde la secuencia de pasos empleados se ilustra en el anexo A y se resumen en la figura 7.

**Figura 7.** Secuencia metodológica para la extracción de ADN.



**Fuente.** Omega Bio-Tek. 2016

### 3.3.2 Secuenciación y ensamblaje del ADN metagenómico.

Debido a la falta de los equipos adecuados para los procesos de secuenciación y ensamblaje de ADN, se tomó la decisión de enviar el material de análisis a la empresa MacroGen en Corea del Sur. Esta empresa desarrolló los procesos anteriormente mencionados siguiendo la metodología estandarizada de Illumina, creando así las secuencias de bases nitrogenadas necesarias para la identificación de los géneros de microorganismos presentes en las muestras.

### 3.3.3 Identificación y Cuantificación.

Una vez obtenida las secuenciaciones se procesaron a través de las herramientas informáticas: FastQC, Trimmomatic y Usearch, las cuales permiten la verificación de la calidad de las muestras, eliminación de secuencias técnicas y emparejamiento y anotación de las secuencias respectivas.

## 4. Datos y análisis.

A continuación se reportan los datos recolectados en el desarrollo de los objetivos planteados para este proyecto y su respectivo análisis.

### 4.1. Determinación de la caracterización fisicoquímica inicial y el análisis metagenómico del suelo, destinado para el cultivo de *Ananás Comosus* en el municipio de Lebrija, Santander.

Seguidamente se depositan los resultados de la caracterización fisicoquímica y microbiológica de los suelos de interés.

#### 4.1.1 Caracterización fisicoquímica inicial de los suelos B, C y FQ.

En la tabla 18 se muestran los valores iniciales de los parámetros fisicoquímicos de los suelos B, C y FQ.

**Tabla 18.** Caracterización fisicoquímica inicial de los suelos de interés.

Parámetro fisicoquímico	Suelo B		Suelo C		Suelo FQ	
pH	4,7		4,2		4,5	
Conductividad Eléctrica	0,6 dS/m		0,5 dS/m		0,5 dS/m	
Acidez Intercambiable	3,3 meq/100g		3,2 meq/100g		2,9 meq/100g	
Aluminio Intercambiable	3,5 meq/100g		3,1 meq/100g		1,3 meq/100g	
Textura (Bouyoucos)	Arena	68,72%	Arena	68,72%	Arena	66,67%
	Arcilla	26,00%	Arcilla	23,33%	Arcilla	25,15%
	Limo	5,28%	Limo	7,95%	Limo	8,19%

Parámetro fisicoquímico	Suelo B		Suelo C		Suelo FQ	
	Franco Arenoso	Arcillo	Franco Arenoso	Arcillo	Franco Arenoso.	Arcillo
Humedad gravimétrica	Día	% Humedad	Día	% Humedad	Día	% Humedad
	1	2,4 %	1	3,7 %	1	7,0 %
	2	2,0%	2	2,9%	2	4,3%
	3	1,4%	3	2,4%	3	3,6%
	4	1,1%	4	0,9%	4	1,7%
Densidad aparente	1,6 g/cm <sup>3</sup>		1,6 g/cm <sup>3</sup>		1,6 g/cm <sup>3</sup>	
Densidad real	2,02 g/cm <sup>3</sup>		2,02 g/cm <sup>3</sup>		2,22 g/cm <sup>3</sup>	
Infiltración	268,94 cm H <sub>2</sub> O/h		175,85 cm H <sub>2</sub> O/h		397,57 cm H <sub>2</sub> O/h	
Materia Orgánica	1,7%		2,5%		2,5%	
CIC	12,4 meq/100g		9,1 meq/100g		15,9 meq/100g	
Fosforo total	120 mg PO <sub>4</sub> /Kg		104 mg PO <sub>4</sub> /Kg		123 mg PO <sub>4</sub> /Kg	
Nitrógeno total	448 mg NTK/Kg		476 mg NTK/Kg		448 mg NTK/Kg	
Carbono Orgánico Total	0,72 %		0,61 %		0,98 %	

**Fuente:** Autor.

Los suelos B, C y FQ presentaron el pH inicial semejante con una variación de valores entre 4,5 a 4,7 siendo este rango típico para zonas tradicionalmente utilizada para el cultivo de la piña en el municipio de Lebrija (CORPOICA, 1997).

La conductividad eléctrica de estos suelos oscila entre 0,5 a 0,6 dS/m, lo cual permite clasificarlo como un suelo no salino.

La alta acidez de los tres suelos, correspondiente a un intervalo de 2,9 a 3,3 meq/100g se relaciona con un registro de pH bajo y representa una alerta para la disponibilidad de aluminio intercambiable, cual en estas condiciones puede conllevar un efecto toxico para las plantas.

El análisis de la textura de los tres suelos, coincide con el porcentaje de arena, limo y arcilla, siendo la diferencia entre 2 a 15% la variación presentada entre los reportes del método de Bouyoucos y granulométrico (Ver anexo B). Según estos resultados, la textura de todos los suelos se clasifica como franco arcillo arenoso al inicio del proceso experimental. Estos resultados coinciden con la alta infiltración, densidad aparente, baja densidad real y bajo contenido de la materia orgánica obtenida en el presente estudio y propiciada por el elevado contenido de arenas.

La pérdida de la humedad gravimétrica esta correlacionada con la infiltración y la textura del suelo, donde los resultados señalan la coherencia entre estos parámetros. Como se puede observar en la tabla 18, los altos valores de infiltración relacionados con el alto porcentaje de arenas, propician un bajo porcentaje de humedad inicial.

Al comparar los suelos B, C y FQ se evidencia la importancia del cultivo para la retención de la humedad, por lo cual el área B (sin cultivo) tiene menor porcentaje de humedad inicial que las C y FQ, ambas cultivadas. Se destaca el valor de porcentaje de humedad en el suelo FQ, cual se ubica en la parte baja de la inclinación del terreno, presentada en las áreas experimentales.

Las densidades aparentes iniciales en las áreas experimentales son iguales para los tres suelos, pero sus altos valores pueden ocasionar dificultades en el crecimiento radicular, cual es muy sensible a los factores fisicoquímicos del medio (USDA, 1999).

La densidad real de los tres suelos representa valores bajos correlacionados con el bajo porcentaje de las arcillas presentes en estos suelos.

La infiltración de los tres suelos es alta, siendo más significativa en el suelo FQ, lo cual se puede atribuir a su ubicación en la parte baja del terreno.

El porcentaje de la materia orgánica para el suelo B fue 1,7 %, lo cual representa un bajo nivel, siendo los suelos C y FQ, que representan un nivel medio de materia orgánica, correspondiente a 2,5%. Estos valores iniciales, están correlacionados con el porcentaje de carbono orgánico total, el cual es mayor para estos dos suelos. Adicionalmente, los resultados de porcentaje de

materia orgánica en los suelos del municipio de Lebrija, obtenidos por CORPOICA, coinciden con los valores presentados en este informe (CORPOICA 1997).

La capacidad de intercambio catiónico para los suelos de interés, se ubica entre valores de 9,1 meq/100g para el suelo C a 15,9 para el suelo FQ, lo cual es coherente, con el bajo porcentaje de la materia orgánica y carbono orgánico total.

Los valores de fósforo presentes en los tres suelos, representan valores muy altos en contraste con la concentración de nitrógeno en estas mismas áreas, lo cual indica la necesidad de una corrección mediante una fertilización adecuada, para un desarrollo óptimo del cultivo de piña.

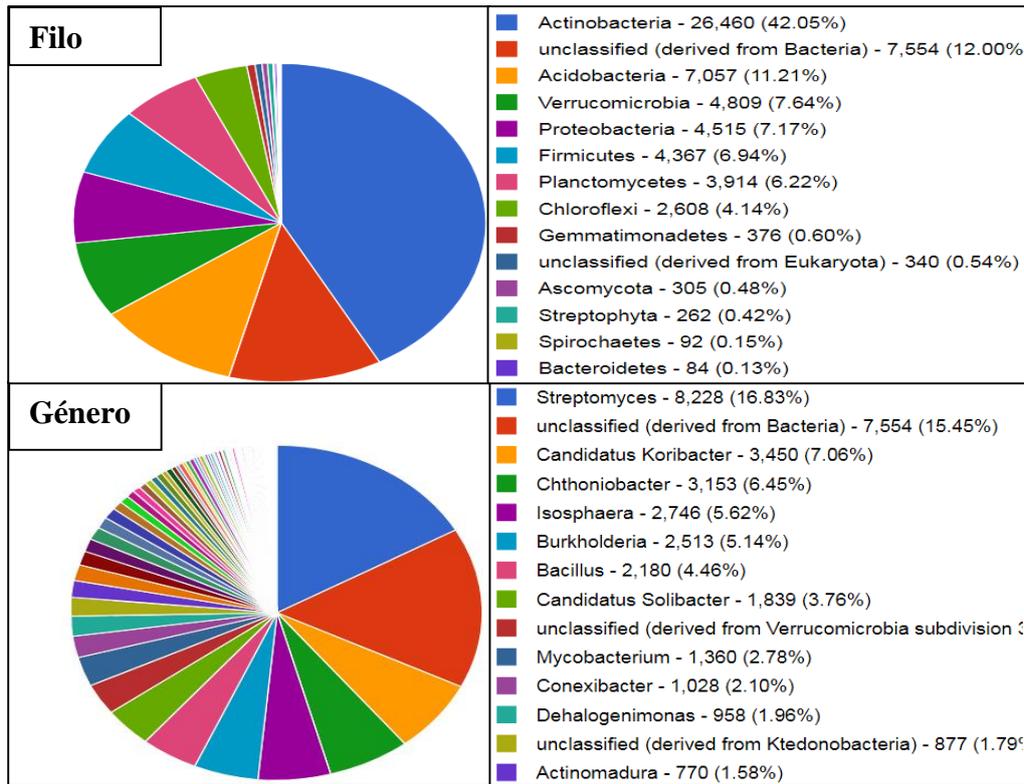
#### **4.1.2 Análisis metagenómico inicial del suelo B, C y FQ.**

Los filos identificados en este estudio, no cuentan con información de caracterización, pues en su mayoría no se han aislado y cultivado en laboratorio, por lo tanto los resultados que se presentan a continuación representan un aporte para indicar su existencia en la microbiota asociada al cultivo de piña en presencia de insecticidas organofosforados, especialmente porque no hay información en la literatura.

Debido a que área del suelo FQ no fue fumigada al tomar la muestra inicial, los reportes de familias y géneros microbianos y su correspondiente población en esta zona, son iguales que en el suelo C (con cultivo y sin fumigación).

En las figuras 8 y 9 se ilustran las familias y géneros de las poblaciones bacterianas presentes en los suelos B y C respectivamente.

**Figura 8.** Filo y géneros microbiológicos iniciales presentes en el suelo B.



**Fuente:** Autor.

En la figura 8, se puede visualizar la presencia de 14 filos y 14 géneros de bacterias predominantes en el suelo B, al inicio del proceso experimental. Entre ellos, los filos con el mayor porcentaje de abundancia son *Actinobacteria* (42%), secuencias sin clasificar derivadas de bacterias (SCB) (12%), *Acidobacteria* (11,21%), *Verrucomicrobia* (7,64%) y *Proteobacteria* (7,17%).

La denominación SCB, probablemente se presentó debido a que al comparar los datos de las secuencias con los registrados en las bases de datos, no se pudo definir filos para las secuencias que se agruparon en esta denominación; debido a que a la falta de información sobre muchos filos microbianos del suelo.

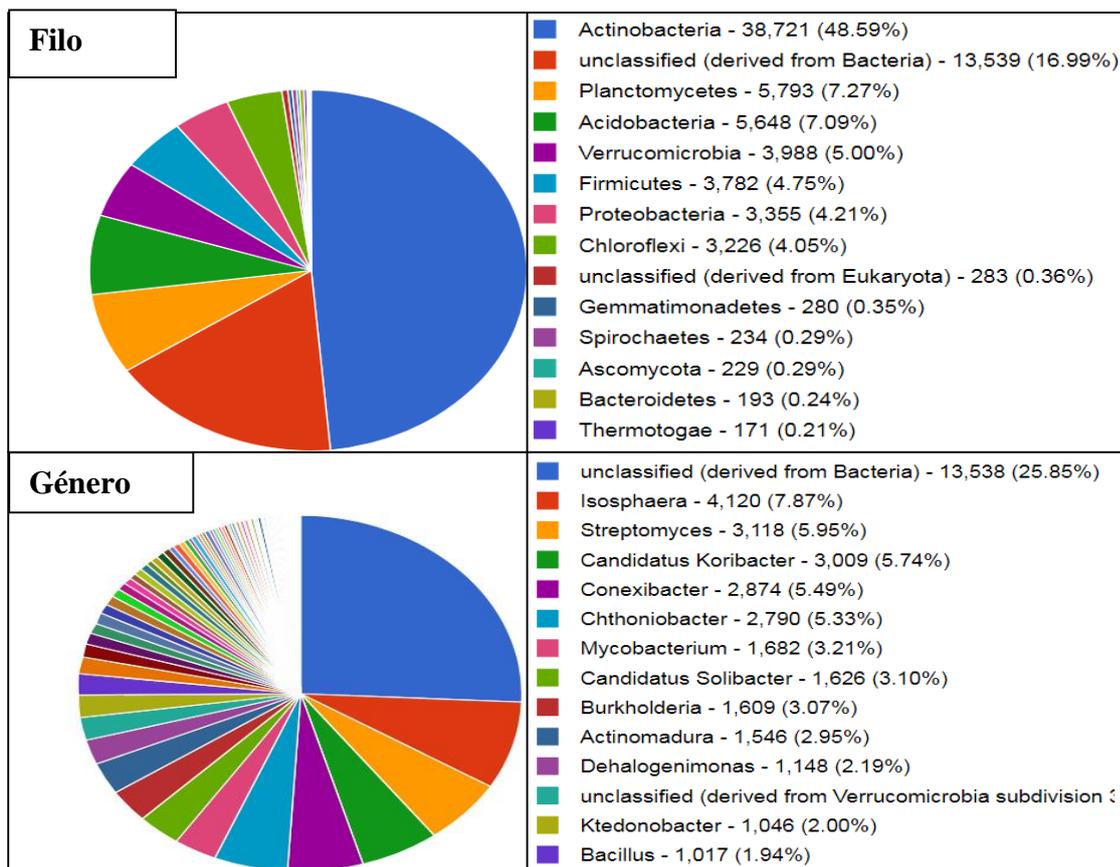
Los géneros bacterianos que fueron más abundantes son: *Streptomyces* (16,83%), SCB (15,45%), candidato de *Koribacter* (7,06%), *Chthoniobacter* (6,45%), *Isosphaera* (5,62%).

La clasificación de un género como candidato se debe a la alta coincidencia genética que presenta con esta variedad- Tal es el caso de candidato de *Koribacter* y *Solibacter*. El primer

género, se identifica de esta forma, debido a que comparte una gran similitud con el género *Koribacter*; mientras que el segundo poseen esta semejanza con el género *Solibacter*.

En la figura 9 se ilustra los filos y géneros microbiológicos iniciales del suelo C.

**Figura 9.** Filo y géneros microbiológicos iniciales presentes en el suelo C.



**Fuente:** Autor.

Como se ilustra en la figura 9, la identificación de ADN en el suelo C muestra la predominancia de 14 filos y 14 géneros de bacterias, de los cuales los filo que reflejaron mayor abundancia poblacional fueron; *Actinobacteria* (48,59%), Sin clasificar derivados de bacterias (SCB) (16,99%), *Planctomycetes* (7,27), *Acidobacteria* (7,09%) y *Verrucomicrobia* (5,0%).

En la figura 8 y 9 se puede observar que tanto en el suelo B como en el C se presentan los mismos filos y géneros de bacterias, sin embargo la abundancia de estos es variada, siendo el suelo C el que presenta una mayor proliferación en la cantidad de los filos con respecto al suelo B. Probablemente esto se debe a la presencia del cultivo de piña y a las interacciones que se presentan entre la rizósfera de las plantas y la actividad bacteriana, donde se puede propiciar

una mejora en el aprovechamiento de los diferentes nutrientes que necesitan tanto la planta como los microorganismos (Tilak, 2005).

Los principales géneros reportados en el suelo C fueron: SCB (25,85%), *Isosphaera* (7,87%), *Streptomyces* (5,95%), *Candidatus Koribacter* (5,74%), *Conexibacter* (5,49%), *Chthoniobacter* (5,33%), *Mycobacterium* (3,21%), *Candidatus Solibacter* (3,10%), *Burkholderia* (3,07%), *Actinomadura* (2,95%), *Dehalogenimonas* (2,19%), *Ktedonobacter* (2,0 %) y *Bacillus* (1,94%). Comparado con el suelo B, que no tenía piña, se nota que hay un efecto de bioaumentación en el suelo C que favorece algunos microorganismos en particular, ya que en ciertos géneros del control como *Isosphaera*, *Planctomycetes*, *Acidobacterias*, *Conexibacter*, *Mycobacterium* y *Actinomadura* presentaron una mayor abundancia.

Las propiedades fisicoquímicas iniciales del suelo C con respecto al suelo B indican condiciones de mayor pobreza para el desarrollo de los microorganismos, lo cual se refleja en la reducción respectiva de la abundancia del filo *Verrucromicrobia*, el cual sugiere un empobrecimiento del área C.

#### 4.2. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas en suelos cultivados con *Ananás Comosus* tras la aplicación del insecticida químico (Lorsban).

##### 4.2.1 Textura

En las figuras 10,11 y 12 se presenta los triángulos texturales para los suelo B, C y FQ paras muestras M1, M3 y M5.

**Figura 10.** Cambio de la Textura para el suelo B en los muestreos M1, M3 y M5.



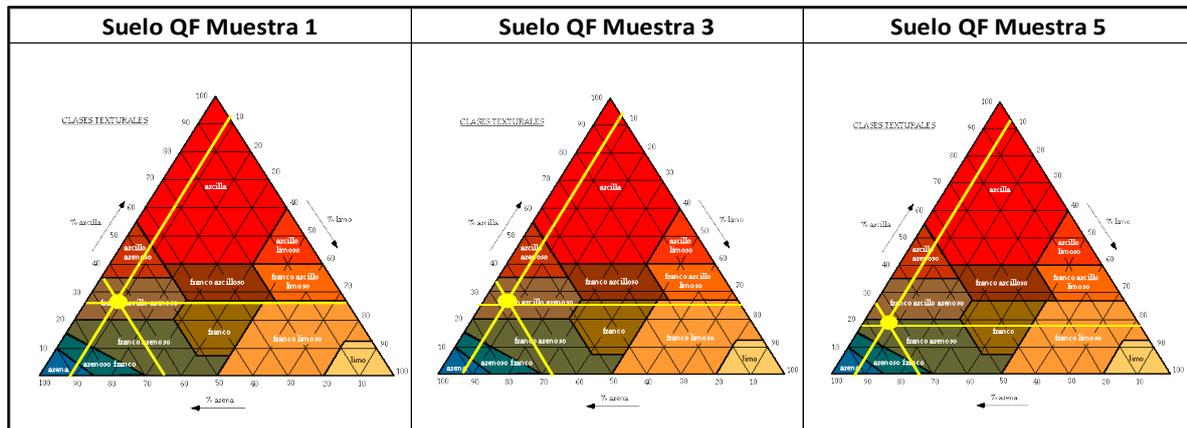
Fuente: Autor.

**Figura 11.** Cambio de la Textura para el suelo C en los muestreos M1, M3 y M5.



**Fuente:** Autor.

**Figura 12.** Cambio de la Textura para el suelo FQ en los muestreos M1, M3 y M5.



**Fuente:** Autor.

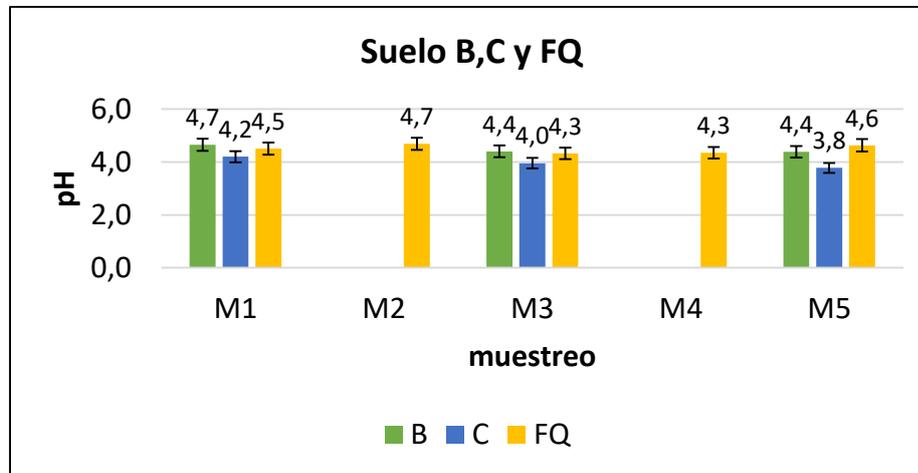
En transcurso de tiempo de experimentación, se observa un cambio en la textura de Franco arcillo arenoso en el suelo C y FQ a franco arenosos, lo cual se podría explicar por la actividad agrícola y la fumigación correspondiente. Aunque el cambio de la textura de estos suelos indica su empobrecimiento, el alto porcentaje y buen drenaje favorece el crecimiento radicular lo cual favorece el cultivo de la piña (Peña, 1996).

#### 4.2.2 pH

Según la literatura los valores óptimos de pH para el cultivo de la piña están en un intervalo de 4 a 5,8, siendo los valores superiores a 6, causantes de desórdenes fisiológicos en el crecimiento de la planta, debido a la disponibilidad de metales como el hierro, zinc y manganeso, así como la deficiencia del elemento boro (Duque, 1995).

En la figura 13 se reportan resultados recolectados del pH de los suelos de interés en el intervalo de tiempo de experimentación.

**Figura 13.** Variación del pH en los suelos B, C y FQ a través de los respectivos muestreos.



**Fuente:** Autor.

En la figura 13 se observa una variación de los valores de pH en un rango de 3,8 y 4,7 entre el muestreo 1 y 5, realizados en campo. A medida que transcurre el tiempo de experimentación, el suelo C tiende a reducir el valor de pH, mientras que el suelo B lo mantiene. Considerando que el suelo C está sembrado con la piña y el suelo B no, se puede atribuir la acidificación de suelo al cultivo de la piña.

Aunque el suelo C en el quinto muestreo presentó un leve descenso del valor de pH (3,8), los demás se encuentran en un rango recomendable de este parámetro para el cultivo de piña.

Los pH de suelo FQ presentan mayores valores, lo cual se puede atribuir a la adición del insecticida, debido a que la fórmula química puede incluir sustancias que aumentan este parámetro. Desafortunadamente el fabricante no especifica el contenido de los aditivos de este producto comercial (Ver anexo C).

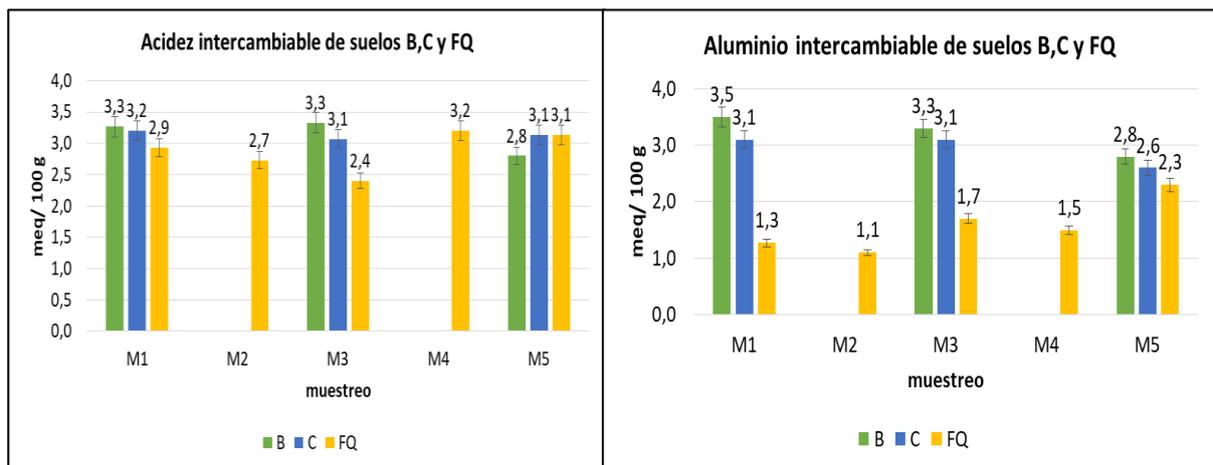
#### **4.2.3 Acidez y aluminio intercambiable.**

Los bajos valores de pH en el suelo se relacionan con su alta acidez y la disponibilidad del aluminio intercambiable, el cual puede ejercer un efecto fitotóxico sobre las plantas. La literatura reporta un límite correspondiente a un pH =5.5, por debajo del cual el aluminio se solubiliza y puede ser absorbido por las plantas, alterando su crecimiento (Kochian et al. 2005).

Las investigaciones en el tema indican que cuando hay menos de 1 ppm de aluminio soluble en el suelo, la saturación de este elemento es menor de 60%, lo cual introduce una tolerancia moderada de este metal para las plantas (IGAC, 1986).

Los cambios de valores de acidez y aluminio intercambiable en los suelos de interés, se visualizan en la figura 14.

**Figura 14.** Acidez y aluminio intercambiable de los suelos B, C y FQ.



**Fuente:** Autor.

En la figura 14 se observa la alta acidez para los 3 tipos de suelo analizados, que oscila entre el valor de 2,4 a 3,3 meq/100g. Lo cual muestra coherencia con los bajo valores de pH registrados para estos suelos. Nuevamente se destaca el comportamiento del suelo FQ, cuya acidez es menor de los suelos B y C, debido a los altos valores de pH que se generan por la adición de sustancias tales como ácido bencenosulfónico, 2-metilpropan-1-ol, nafta, 1,2,4-trimetilbenceno, mestileno, cumeno y xileno que componen el insecticida químico (Dow AgroSciences, 2014)

Así mismo se puede observar un correlación entre altos valores de acidez y la cantidad de aluminio intercambiable elevada, que se presenta en los suelo B y C. De lo contrario, el suelo FQ demuestra menor disponibilidad de aluminio intercambiable por su menor acidez y pH más elevado.

Aun así, los valores de aluminio intercambiable, expresados en ppm, llegan un valor máximo de 315 ppm, que corresponde a 3,5 meq/100g para el suelo B en el tercer muestreo, indicando disponibilidad de este elemento para las plantas y su posible afectación. Comparando este

resultado con los valores típicos, recolectados por CORPOICA-SENA para el municipio de Lebrija, que es de 4,9 meq/100g, representa un nivel más bajo (3,5 meq/100g) (Ver anexo D).

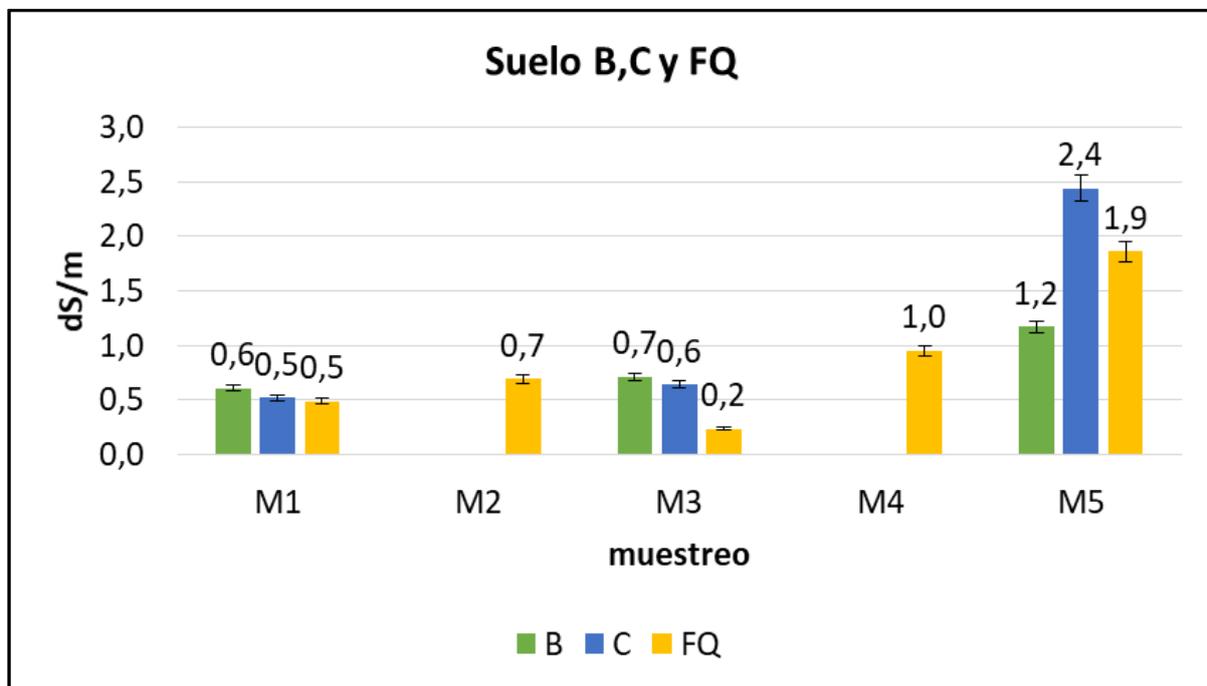
#### 4.2.4 Conductividad Eléctrica.

La literatura reporta la importancia de la conductividad eléctrica (C.E) para la identificación de las sales solubles presentes en el suelo, así como el cambio de este parámetro a medida que progresa el cultivo. Estos cambios pueden ser causados por:

- El uso de fertilizantes de liberación lenta como el triple quince (Ver anexo E).
- La tasa de asimilación del fertilizante superior a la de la lixiviación y absorción, lo cual genera un remanente.
- Características químicas del mismo fertilizante (alta CIC).

En la figura 15 se ilustra la variación de la conductividad eléctrica en los suelos B, C y FQ a través del tiempo de experimentación.

**Figura 15.** Variación de la conductividad eléctrica en los suelos B, C y FQ



**Fuente:** Autor.

El máximo valor de C.E obtenido (2,4 dS/m), corresponde al suelo C, lo cual coincide con un menor pH registrado para este suelo en el muestreo 5. Por lo anterior, se puede relacionar alta concentración de los iones  $H^+$  presentes en este suelo, con su elevada conductividad. Esta

relación se puede evidenciar en el suelo B donde se presenta un gradual descenso del pH simultáneo con el leve aumento de la conductividad.

El suelo FQ presenta una fluctuación de CE, la cual puede explicarse por la adición del insecticida, el cual introduce en su fórmula gran cantidad de aditivos (55%), como lo son emulsificantes, surfactantes y distintos iones, los cuales inciden sobre la conductividad y el cambio de pH. (Ver anexo C). Por lo tanto, tras la fumigación del suelo FQ, se observa el incremento de la conductividad y su posterior disminución en los periodos sin la adición del producto químico.

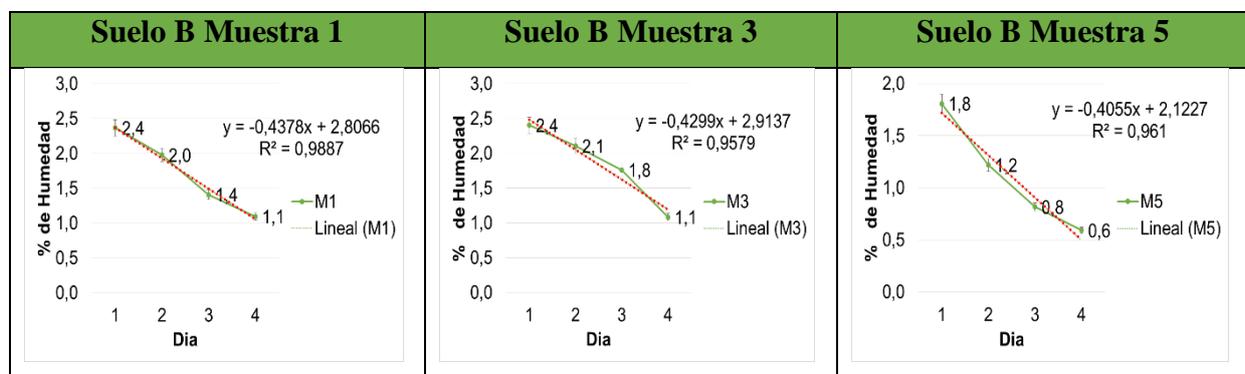
Teniendo en cuenta la relación de la conductividad con el nivel de salinidad presente en el suelo, los valores superiores a 1 dS/m pueden dificultar el manejo de la fertilización y generación de problemas fitotóxicos en los cultivos, caso que se puede dar en los suelos de interés, a partir del cuarto muestreo, en el cual los valores de C.E superan el límite recomendado por la literatura (Barbaro, 2014).

#### 4.2.5 Humedad Gravimétrica.

Las curvas de pérdida de humedad permiten determinar la cantidad de agua que se requiere a diario para el riego con el fin de garantizar el adecuado desarrollo del cultivo y los microorganismos presentes en el suelo.

En la figura 16,17 y 18 se reportan los datos de perdida de humedad de los suelos B, C y FQ.

**Figura 16.** Perdida de humedad gravimétrica en el suelo B.

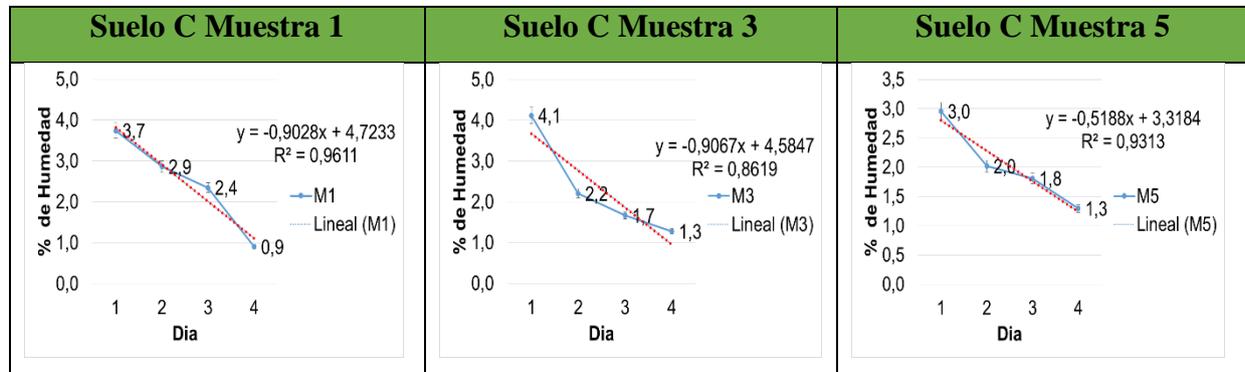


**Fuente:** Autor.

En la figura 16 se observa una tendencia lineal de pérdida de humedad gravimétrica cuyo coeficiente de correlación lineal  $R^2$  corresponde a valores de 0.98, 0.95 y 0.96 respectivamente,

lo cual permite su aplicación para el cálculo de la cantidad de agua de riego necesaria para el cultivo de piña. Adicionalmente se observa una pérdida de humedad más rápida en la muestra 1 que en la 5, debido a que en esta última ya se presentó un aumento del porcentaje de arenas.

**Figura 17.** Pérdida de humedad gravimétrica en el suelo C.

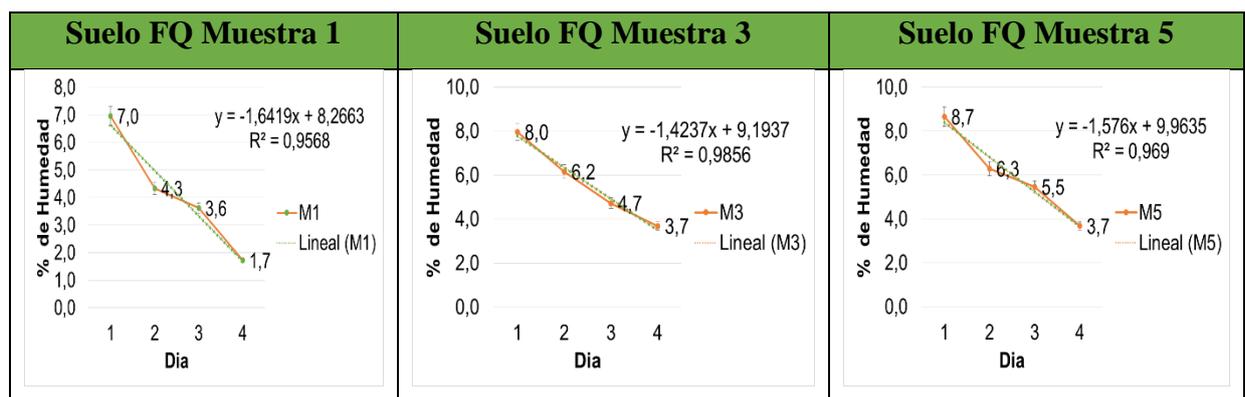


**Fuente:** Autor.

En la figura 17 se pueden observar que los 3 muestreos se ajustan a una tendencia lineal con un coeficiente de correlación lineal de 0,96, 0,86 y 0,93 para la muestra 1, 3 y 5 respectivamente.

El suelo C presentó un valor mayor en el porcentaje de humedad del primer día de la muestra 1, que el suelo B, lo cual se podría deber a la presencia de la piña.

**Figura 18.** Pérdida de humedad gravimétrica en el suelo FQ.



**Fuente:** Autor.

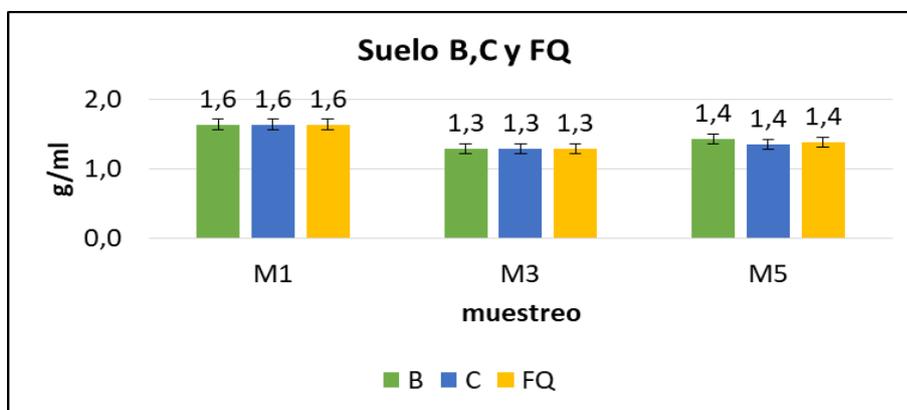
De la misma manera como en las figuras anteriores, el coeficiente de correlación lineal presenta valores de 0,95, 0,98 y 0,96 para las muestras de suelo FQ respectivas, lo cual permite la aplicación de la curva para el cálculo del volumen de agua necesaria para riego de cultivo.

Al comparar el porcentaje de humedad que contiene el suelo FQ en la primera, tercera y quinta muestra al primer día con los suelos B y C, se destaca una gran diferencia, con valores que oscilan entre 7 y 8,7 en este suelo. Esto se puede deber a su ubicación al final de la pendiente del terreno y la actividad agrícola realizada en este.

#### 4.2.6 Densidad aparente.

En la figura 19 se presentan los resultados de densidad aparente de los suelos B, C y FQ durante los muestreos realizados.

**Figura 19.** Densidad aparente de los suelos B, C y FQ en los muestreos realizados.



**Fuente:** Autor.

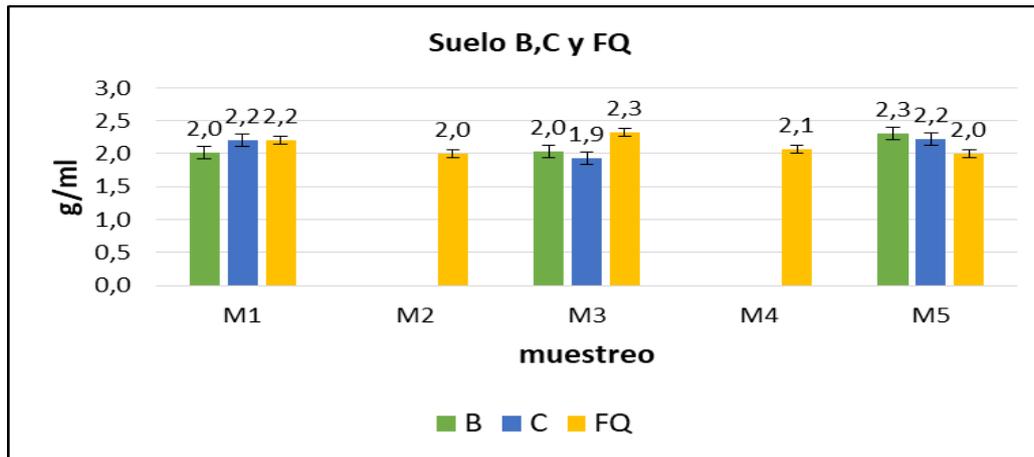
Independientemente del muestreo realizado, se observa un registro de la densidad aparente igual para los 3 suelos. De la misma manera se puede ver un descenso del valor inicial de este parámetro a través del tiempo de la experimentación de 1,6 en el primer muestro a 1,4 g/ml en el ultimo. Este cambio en el espacio interlineal de valores esta coherente con la textura franco arcillosa arenosa que presenta todos los suelos (USDA, 1999).

La densidad inicial de los suelos correspondiente a 1,6 g/ml es propia para un suelo arenoso, sin embargo según el USDA (1999), este valor de densidad para un suelo franco-arcillo-arenoso puede llegar a afectar el crecimiento radicular. A pesar de lo mencionado anteriormente, la literatura reporta este tipo de suelo tiende a una buena infiltración, aireación y porosidad.

#### 4.2.7 Densidad real

En la figura 20 se reportan los datos de densidad real de los suelos B, C y FQ.

**Figura 20.** Densidad real de los suelos B, C y FQ en los muestreos realizados.



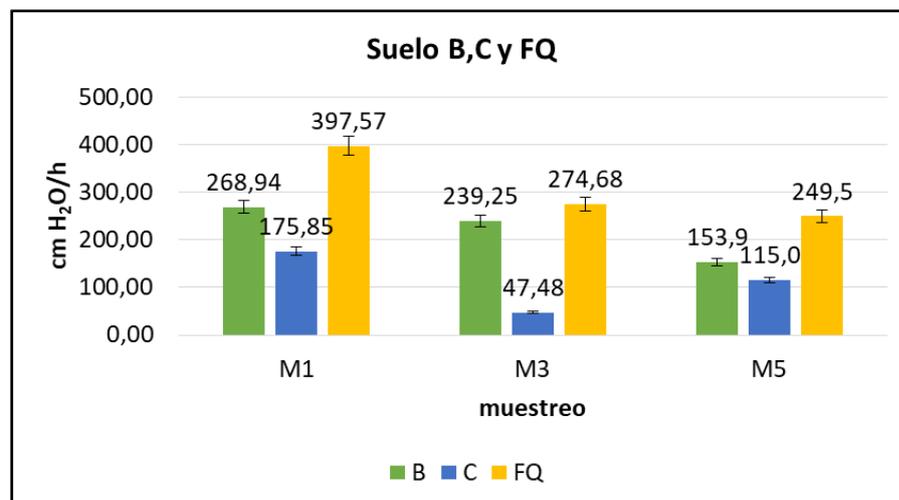
**Fuente:** Autor.

Los valores de la densidad real de los suelos de interés, se mantienen a través del tiempo de experimentación, en un rango de 1,9 a 2,3 g/ml, lo cual esta coherente con el tipo de textura que presentan estos suelos y se ubica dentro del intervalo que se reporta en la literatura para estos suelos.

#### 4.2.9 Infiltración

Los valores de velocidad de infiltración del agua a través del suelo B, C y FQ se ilustran en la figura 21.

**Figura 21.** Velocidad de infiltración de los suelos B, C y FQ en los muestreos realizados.



**Fuente:** Autor.

En la figura 21 se destaca el comportamiento del suelo FQ, presentando una infiltración muy rápida, cual va descendiendo a medida que transcurre el tiempo de experimentación, durante el cual se hace la fumigación. Los valores de infiltración para este suelo, indican un deterioro paulatino del mismo, debido a que su comportamiento se asemeja a un suelo arenoso franco (Castro, 1998). Teniendo esto en cuenta, se puede destacar el efecto desfavorable que ejerce la fumigación con un producto químico sobre este parámetro.

El suelo B presenta una tendencia similar al FQ, demostrando un descenso de la infiltración en tiempo con la diferencia de tener menores valores de este parámetro pero típicos para el suelo arenoso (Castro, 1998).

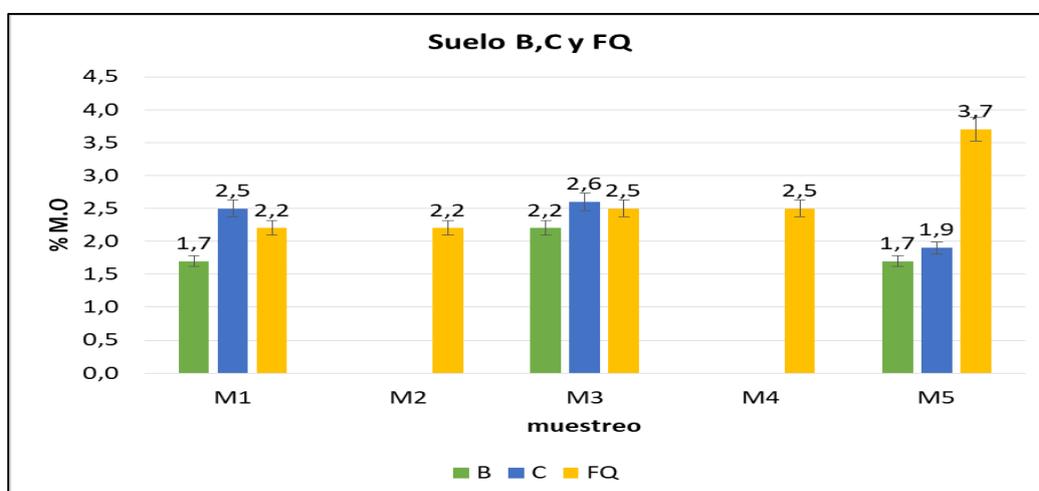
Los menores valores de la infiltración corresponden al suelo C, el cual presenta fluctuaciones de este parámetro de 47,48 a 175,85 cm H<sub>2</sub>O/h, clasificando este suelo con una permeabilidad muy alta y asociada con un suelo arenoso (Castro, 1998).

#### 4.2.10 Materia Orgánica

A pesar de que la materia orgánica indica la fertilidad del suelo, también se puede relacionar con el carbono orgánico total, cual representa la parte de suelo mineral y no disponible para los microorganismos y la planta cultivada.

En la figura 22 se reportan los resultados del porcentaje de la materia orgánica de los suelos B, C y FQ.

**Figura 22.** Porcentaje de Materia Orgánica de los suelos B, C y FQ en los muestreos realizados.



**Fuente:** Autor.

En la figura 22 se destaca el comportamiento de suelo FQ, cual presenta un aumento significativo de la materia orgánica, correspondiente a 3,7% en el muestreo 5 realizado a 8 meses después de haber sembrado la piña, cual fue fumigada una vez al mes durante este tiempo. Este aumento podría presentarse por la adición constante de una sustancia química, cual posee diversos compuestos de carbono. De esta manera se podría señalar la acumulación del insecticida químico en área fumigada.

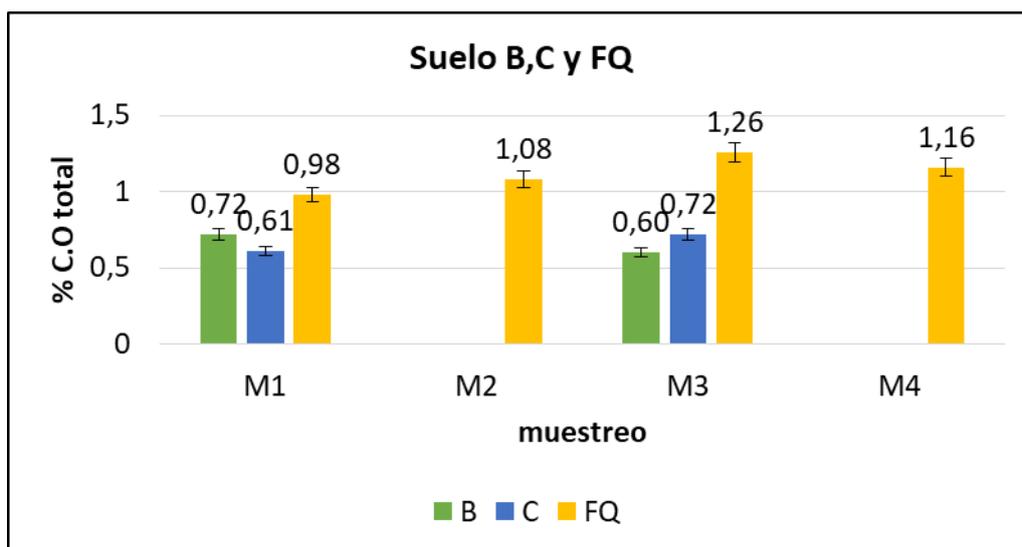
En el municipio de Lebrija, los suelos presentan un porcentaje de la materia orgánica del orden de 2,6%, lo cual coincide con el rango de valores obtenidos para los suelos de interés, con la excepción de FQ anteriormente analizado.

#### 4.2.11 Carbono orgánico total

El análisis de carbono orgánico total en el suelo, representa información importante para estimar el porcentaje del sustrato que se puede mineralizar y acumular. Por lo anterior se puede relacionar este parámetro con el porcentaje de la materia orgánica en el suelo que se puede acumular por su limitada mineralización (IGAC, 2011).

El porcentaje de carbono orgánico total hallado en los suelos B, C y FQ se ilustran en la figura 23.

**Figura 23.** Carbono orgánico total de los suelos B, C y FQ en los muestreos realizados.



**Fuente:** Autor.

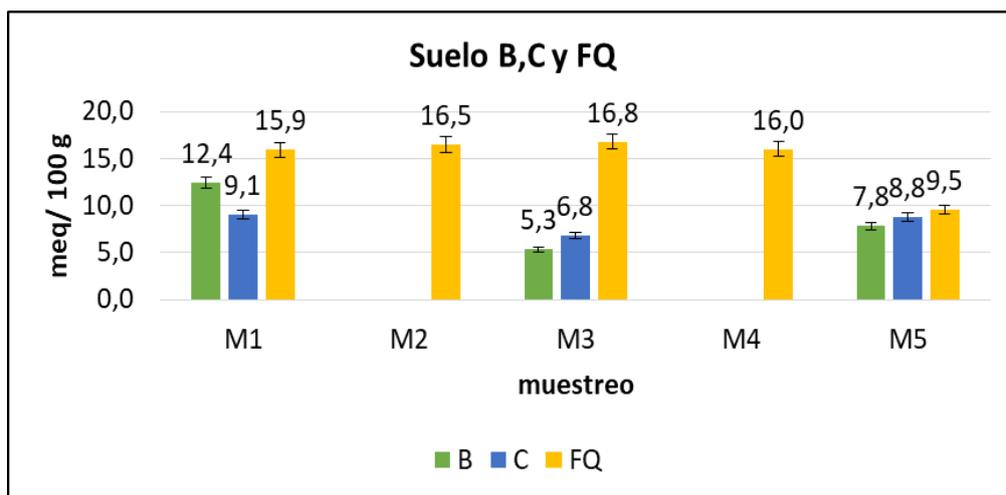
En la figura 23 se observa la tasa más alta de aumento de carbono orgánico total en el suelo FQ. La constante fumigación de este suelo puede ir acumulando el insecticida químico utilizado en este proceso, lo cual tiene correlación con la materia orgánica no mineralizada.

#### 4.2.12 Capacidad de Intercambio Catiónico.

La capacidad de intercambio catiónico (CIC), se relaciona con el porcentaje de la materia orgánica y del carbono orgánico total, señalando la mayor fertilidad de un suelo a medida que crece este valor. De igual manera representa la cantidad de iones presentes en un suelo que pueden ser asimilados por las plantas.

La capacidad de intercambio catiónico de los suelos B, C y FQ se ilustran en la figura 24.

**Figura 24.** Capacidad de intercambio catiónico de los suelos B, C y FQ.



**Fuente:** Autor.

Todos los suelos de interés son intercambiadores catiónicos, debido a que el terreno presenta una predominancia de cargas negativas (Ver anexo E).

En la figura 24 se destaca el comportamiento del suelo FQ, cual en comparación con el suelo B y C, presenta mayores valores de este parámetro para todas las muestras analizadas. Esto se puede atribuir a la ubicación de este suelo en la parte más baja del área experimental, permitiendo acumulación de agua y en ella de los iones. Lo anterior se puede relacionar con la cantidad de porcentaje de humedad inicial de los suelos B, C y FQ, siendo este último con mayor valor reportado en las figuras 16,17 y 18. Igualmente la fumigación con el insecticida químico agrega los componentes de carácter iónico que se detectan mediante análisis de CIC.

Todos los suelos presentan las fluctuaciones de CIC que pueden atribuirse a una fertilización constante de estos suelos y una introducción significativa de los iones esenciales de  $K^+$  y  $Mg^{+2}$  en un 15 y 2% respectivamente, para garantizar el crecimiento y productividad del cultivo. (Ver anexo E).

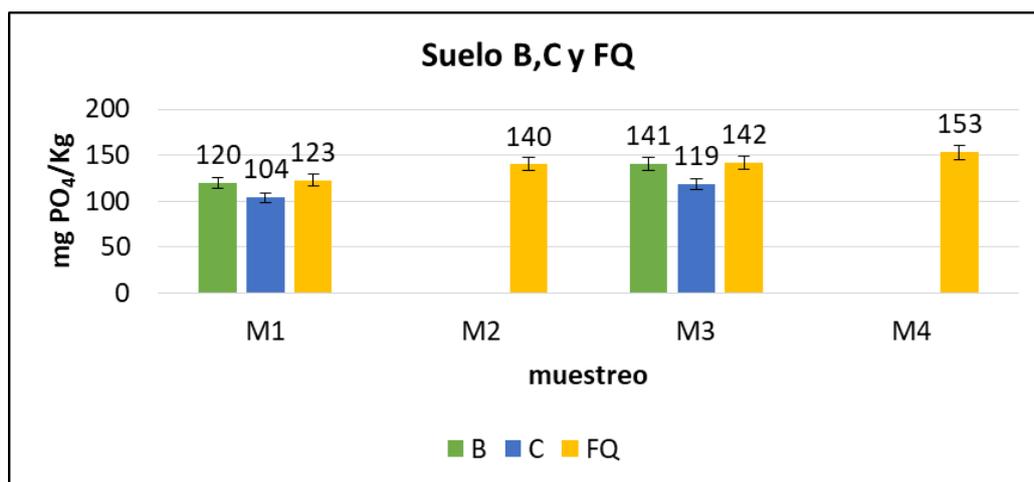
Adicionalmente se observa un decrecimiento en los valores de CIC al final del proceso experimental con respecto a la muestra inicial en todos los suelos de interés. Esto se puede deber a la disminución progresiva del contenido de arcilla y delta de pH en las áreas de estudio, lo cual desencadenó una reducción en las cargas negativas del terreno que afectaron de forma perjudicial la CIC.

#### 4.2.13 Fosforo total

El fosforo es un elemento esencial para el crecimiento de la planta y muy escaso en el suelo. Generalmente, sus bajos valores, se deben corregir en el suelo por la adición de los fertilizantes. Según Castro (1998) los valores que superan los 30 ppm de fosforo son suficientes para las necesidades de un cultivo.

En la figura 25 se aprecia los valores de fosforo total en los suelos B, C y F.

**Figura 25.** Fosforo total en los suelos B, C y FQ



**Fuente:** Autor.

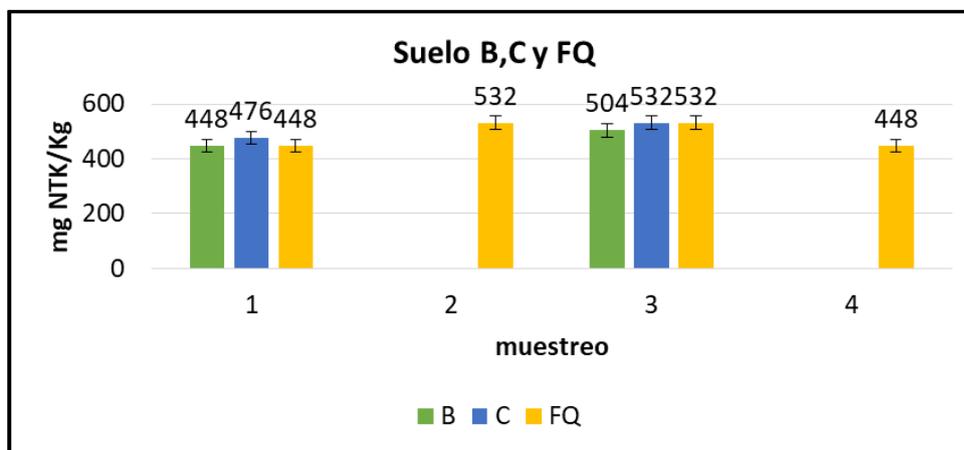
Los valores de fosforo presentes en forma de  $PO_4^{-3}$  oscilan entre 104 y 153 mg  $PO_4/Kg$  correspondiente a 78,9 ppm y 116,13 ppm de  $P_2O_5$  respectivamente (Ver Anexo G). Esto indica

alto contenido de este elemento, lo cual no requiere corrección por la deficiencia. Mas sin embargo, la constante fertilización con el producto triple quince y el bajo requerimiento de fosforo para este cultivo, genera una acumulación de residuo de fosforo en los suelos analizados.

#### 4.2.14 Nitrógeno total

En la figura 26 se encuentran los valores de nitrógeno total de los suelos B, C y FQ.

**Figura 26.** Nitrógeno total en los suelos B, C y FQ



**Fuente:** Autor.

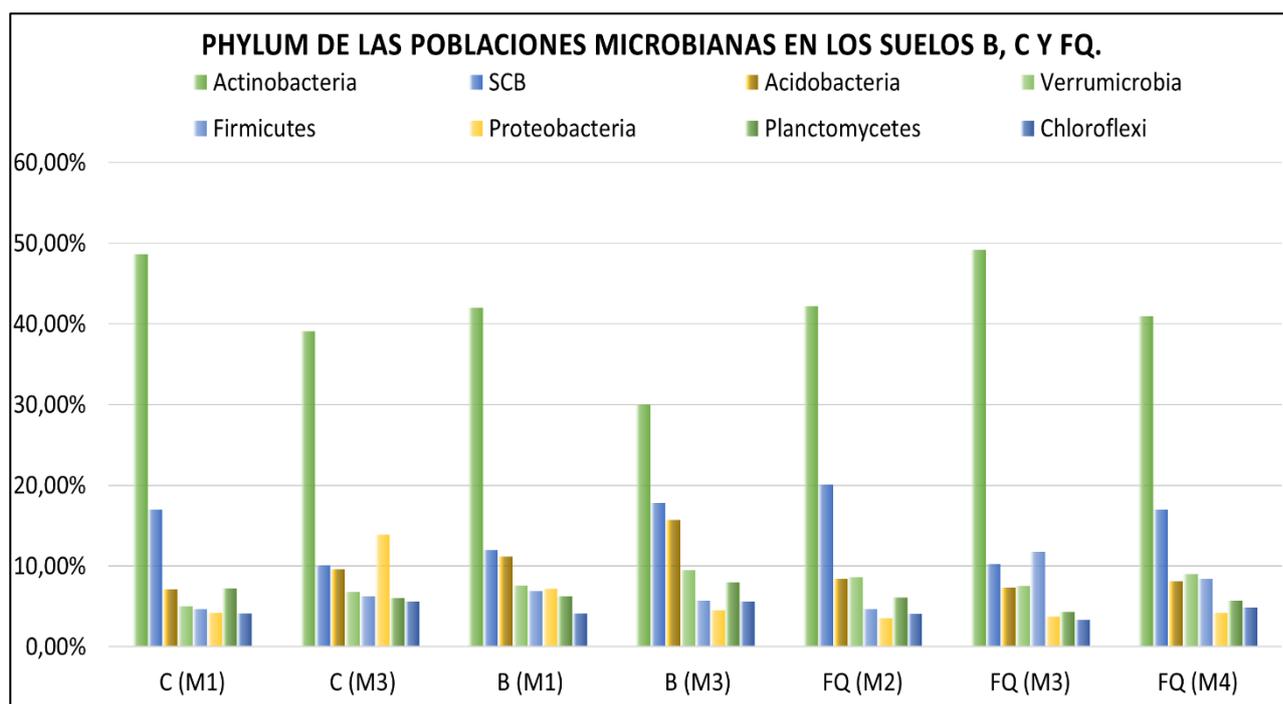
Al igual que la variación de la concentración del fósforo representado en la figura 25, el comportamiento del nitrógeno, presenta una fluctuación, que se puede explicar por una fertilización constante de este suelo. Sin embargo los valores que oscilan entre 448 a 532 mg NTK/Kg representan una deficiencia de este elemento en los suelos objeto de estudio.

Las bajas concentraciones de nitrógeno registradas en los suelos de interés, pueden ser explicadas por el largo historial de uso de estas tierras, que fueron cultivadas por años con piña. Esto se correlaciona con los reportes en la literatura, señalando que los suelos con plantaciones de piña tienden a registrar una notoria reducción del nitrógeno biodisponible (Py, 1968, tomado de López J, 2016).

### 4.3. Análisis de los cambios microbiológicos presentes en el suelo cultivado con *Ananás Comosus*, después de la aplicación del insecticida químico (Lorsban).

Los cambios en las poblaciones microbiológicas (filo y género) de los suelos B, C y FQ se evidencian en las figuras 27 y 28. La abundancia de los microorganismos están especificadas en los anexos H e I.

**Figura 27.** Variación de los filo de los suelos B, C y FQ durante el muestreo M1, M2, M3 y M4



**Fuente:** Autor.

Como se ilustra en la figura 27, el filo de bacterias con mayor presencia durante cada uno de los muestreos, en las áreas B, C y FQ, fue *Actinobacteria*. Este resultado posiblemente se debe a una alta acidez de los suelos analizados y la característica de este filo por presentarse en suelos ácidos, áridos y con escasez de nutrientes. También se resalta la sensibilidad que tienen estos microorganismos ante la disminución del pH y el contenido de humedad (Chanal, 2006; Cannon, 2007).

Durante los muestreos uno y tres del suelo B, se observa la disminución de la abundancia del filo *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Firmicutes* (Ver anexo I), siendo *Actinobacteria* y *Proteobacterias* las que presentaron mayor disminución en su población, pasando de 42,05 a 29,99 y 7,17% a 4,45% respectivamente. Este comportamiento en estos tres fillos se contrasta

con la leve disminución en el pH, CIC y carbono orgánico total, señalando la afectación de estos microorganismos por las condiciones del suelo descritas anteriormente.

También se puede resaltar que se presentó un ligero aumento en las poblaciones de SCB, *Acidobacteria*, *Verrucromicrobia* y *Planctomycetes* al mismo tiempo que disminuyó el pH de 4,7 a 4,4 y se incrementaron los valores de nitrógeno, fósforo y materia orgánica en el suelo, lo cual sugiere que estas poblaciones tienen un buen nicho de crecimiento bajo las diferentes condiciones fisicoquímicas que presentó el área B.

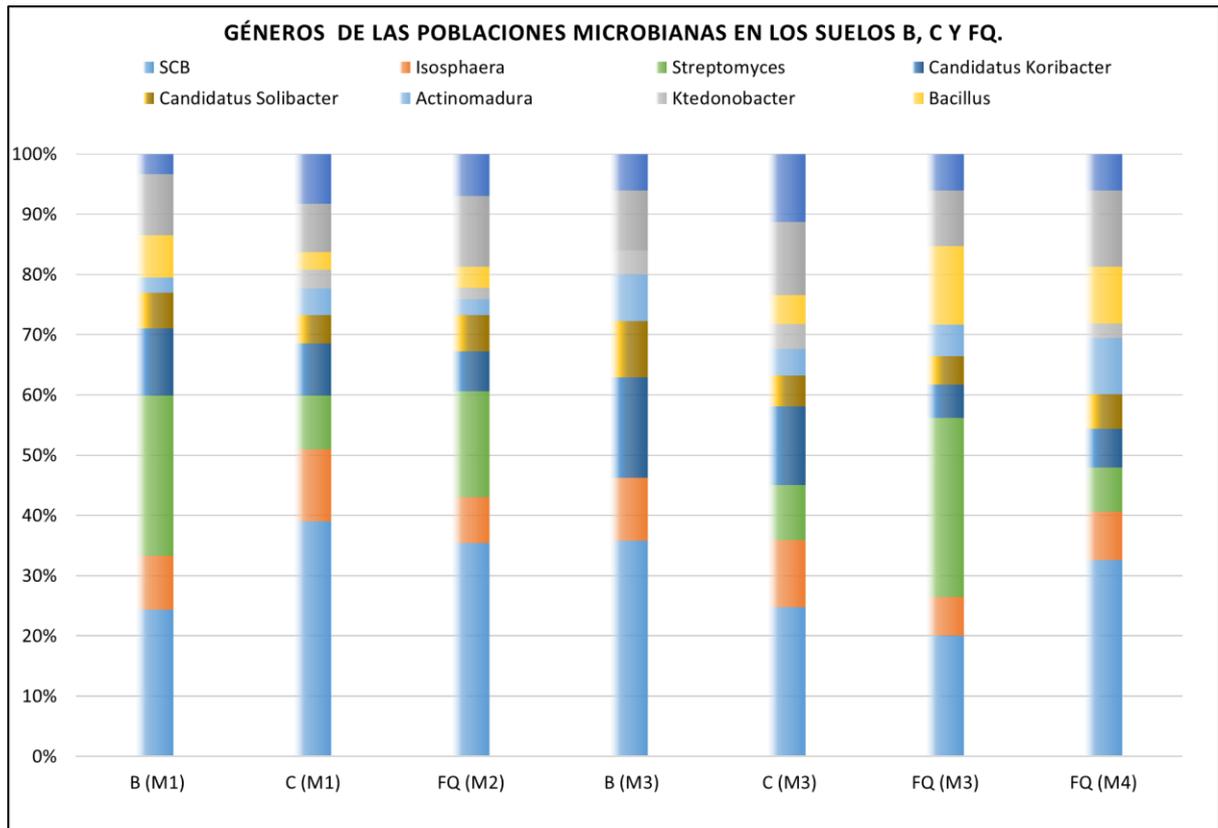
En un suelo que está cultivado con piña (Suelo C) se encuentran las siguientes características fisicoquímicas: pH (4,2 – 4,0), CIC (9,1 – 6,8), infiltración (175,85 – 47,48 cm H<sub>2</sub>O/h), nitrógeno (476 – 532 mg N/Kg), fósforo (104 – 109 mg PO<sub>4</sub>/Kg) y materia orgánica (2,5 – 2,6%); que al ser contrastadas con los microorganismos que se encuentran en este suelo, se observa que mientras que *Proteobacterias*, *Acidobacterias*, *Verrucromicrobia* y *Firmicutes* se ven favorecidas, *Actinobacteria*, *SCB*, *Planctomycetes* y *Bacterioidetes* disminuyen.

Finalmente, en un suelo cultivado con piña e inoculado periódicamente con el insecticida Lorsban (Suelo FQ) se evidencia una variación de los siguientes parámetros fisicoquímicos analizados durante el muestreo uno al dos: pH (4,5 a 4,7), fósforo (123 a 140 mg PO<sub>4</sub>/Kg), nitrógeno (448 a 532 mg N/Kg), CIC (15,9 a 16,5) y COT (0,98 a 1,08 %). En estas condiciones se favoreció el crecimiento de *Verrucromicrobia* y *Acidobacteria*, a diferencia de *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* y *Ascomycota* que disminuyeron.

Por otro lado, durante los muestreos tres y cuatro, se presentó una disminución en el CIC de 16,8 a 16,0 y en el COT de 1,26 a 1,16 %, al igual que un incremento en el fósforo de 142 a 153 mg PO<sub>4</sub>/Kg. En estas condiciones se beneficiaron los microorganismos *SCB*, *Verrucromicrobia*, *Acidobacterias*, *Chloroflexi*, *Proteobacterias* y *Planctomycetes*, caso contrario a lo ocurrido con *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Ascomycota* que redujeron sus poblaciones.

Al observar las variaciones en la abundancia de los filos del suelo FQ, se puede decir que la adición del insecticida químico provee, probablemente, una fuente de carbono y nutrientes al suelo, que favorecen los filos asociados a la fertilidad del mismo.

**Figura 28.** Variación de los géneros de los suelo B, C y FQ durante el muestreo M1 y M3.



**Fuente:** Autor.

Como se ilustra en la figura 28, dentro de los cambios que se evidenciaron en los principales géneros del suelo B durante los muestreos uno al tres, se destaca la reducción en la población de los géneros *Chthoniobacter* y *Streptomyces*. Este último paso de un 16,83% a un valor no detectable (Ver anexo I), lo cual posiblemente se debe a que los microorganismos pertenecientes a este género hayan entrado en un estado de resistencia como consecuencia de la disminución en la fertilidad y calidad del suelo. Además, el aumento del porcentaje de arenas y la alta infiltración, podrían haber facilitado el lavado y transporte del género *Streptomyces* a través del suelo.

Por lo contrario, los géneros *SCB*, *Candidato Koribacter*, *Isosphaera* y *Candidato Solibacter* presentaron un aumento en su población, probablemente por el incremento de algunos de los parámetros fisicoquímicos ligados a la fertilidad del suelo, tales como nitrógeno, fosforo y materia orgánica.

En el suelo C, se observó que las secuencias sin clasificar (SCB) y los géneros *Isosphaera* y *Streptomyces* presentaron una disminución en su población del tercer muestreo, con respecto al primero, debido al bajo contenido de nitrógeno y la disminución de pH en el suelo.

En contraste, los géneros Candidatos *Koribacter*, *Chthoniobacter* y *Conexiobacter*, incrementaron su abundancia, lo cual se puede asociar con el incremento en el nitrógeno (pese a estar en niveles muy bajos), fósforo, carbono orgánico total y materia orgánica.

En el suelo FQ, se evidencia que del primer al segundo muestreo, se presentó una disminución en la abundancia de los géneros *Isosphaera*, Candidatos *Koribacter* y *Conexiobacter*; posiblemente por la disminución en las concentraciones de fósforo y a la presencia del insecticida químico en el suelo, cual puede generar condiciones tóxicas para estos géneros.

Por otro lado, durante el mismo periodo de tiempo, los SCB y los géneros *Streptomyces*, *Chthoniobacter* y *Bacillus* presentaron un incremento en el suelo FQ, lo cual se podría relacionar con el aumento de nitrógeno, CIC, COT y pH.

Posteriormente del muestreo dos al tres del suelo FQ, se presentó la disminución de las SCB y los géneros *Chthoniobacter*, *Isosphaera* y Candidatos *Koribacter*. Este comportamiento se podría explicar por la alta acidez del suelo y el posible efecto tóxico del insecticida químico.

De lo contrario, el aumento en los géneros *Streptomyces* y *Bacillus* que son resistentes a una alta acidez en el suelo, podría explicarse por el aprovechamiento de los componentes del Lorsban por parte de estos.

Finalmente durante el cuarto muestro del suelo FQ, se ilustra una disminución de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*, destacándose la elevada pérdida de abundancia poblacional de este último. Lo mencionado anteriormente podría ser por superar la concentración asimilable del insecticida Lorsban. Esto permite identificar al género *Streptomyces* como el más sensible encontrado en el suelo FQ.

Contrario a lo indicado anteriormente, se evidencia un aumento en los SCB y los géneros *Chthoniobacter*, Candidatos *Koribacter* e *Isosphaera*; lo cual puede estar asociado al incremento de fósforo en el suelo.

## 5. Conclusiones.

Se realizó un estudio del efecto del insecticida químico (Lorsban) sobre la microbiota y propiedades fisicoquímicas del suelo, utilizado para el cultivo de la *Ananás Comosus* (Piña), demostrando la afectación del suelo fumigado con respecto a los suelos que no recibieron este tratamiento.

Los suelos objeto de estudio presentan bajos valores iniciales de pH que oscilan entre 4,5 a 4,7, lo cual coincide con su alta acidez (2,9 a 3,3 meq/100g) y elevada cantidad de aluminio intercambiable (3,5 a 1,3 meq/100g), cual en estas condiciones puede estar disponible, afectando el crecimiento del cultivo.

La textura inicial de los suelos analizados corresponde a franco arcillo arenoso, con alto porcentaje de arena, lo cual implica un bajo porcentaje de humedad de los tres suelos, correspondiente a 2,4 % para el suelo B, 3,7% para el suelo C y 7% para el suelo FQ y una alta velocidad de infiltración entre 8,8 y 19,9 cm/h. La densidad aparente y real representa valores típicos para el suelo de la región con la clasificación textural indicada.

Los valores iniciales de la materia orgánica en los suelos analizados, se ubican entre un rango de 1,7 a 2,5%, señalando un suelo poco fértil, acorde con los bajos valores de carbono orgánico total (0,61 a 0,98%) y de nitrógeno total menor de 0,1% para todos los suelos analizados. Aunque los valores de CIC iniciales de los suelos analizados representan un valor medio de este parámetro (9,1 a 15,9), estos pueden ser contrarrestados con una alta concentración de iones  $H^+$  y  $Al^{+3}$  intercambiable.

El suelo fumigado por el insecticida químico (FQ), demuestra señales de deterioro, manifestado por el cambio de textura de franco arcillo arenoso a franco arenoso, a pesar del significativo aumento de la materia orgánica y carbono orgánico total. El incremento de estos dos parámetros puede asociarse con la acumulación del insecticida químico, correlacionada con el aumento de la abundancia de la población microbiana, cual puede utilizar los componentes del Lorsban para su desarrollo.

La comparación de las poblaciones microbianas iniciales del suelo B y C, permite deducir que la presencia del cultivo de piña favorece la bioaumentación de los microorganismos, generando

un nicho de protección, alojamiento, exudados de la planta y nutrientes presentes en el suelo, lo cual indica la importancia de la relación entre propiedades fisicoquímicas, la rizósfera de la planta y los microorganismos presentes.

La disminución de *Streptomyces* en el suelo FQ puede ser relacionada con el efecto tóxico que ejerce el insecticida químico acumulado en este suelo.

Los cambios de concentración de aluminio intercambiable, el porcentaje de la materia orgánica y capacidad de intercambio catiónico inciden sobre la población de *Actinobacteria*, *Verrucromicrobia* y *Planctomycetes*.

*Actinobacteria* fue el filo predominante en este estudio y no se vio afectado mayormente en ninguno de los tres suelos, indistinto de las condiciones fisicoquímicas, de la presencia de pña y la adición del insecticida químico.

## **6. Recomendaciones.**

Debido a la importancia del cultivo de piña en el departamento de Santander y Colombia, se debería crear un programa de acompañamiento académico a la población rural, para optimizar la productividad de este fruto y el seguimiento de afectación de la población en la salud, por el uso intensivo del insecticida (Lorsban).

Se recomienda realizar el seguimiento de las propiedades fisicoquímicas a largo plazo para poder verificar los cambios en la población microbiana señalada en este proyecto.

Se recomienda rediseñar el proceso de fertilización de suelo de interés, para lograr el ajuste de exceso de fosforo y deficiencia de nitrógeno, con el fin de obtener mejores resultados en el cultivo.

Se recomienda ampliar el estudio con un análisis del cambio foliar de piña, durante el proceso de experimentación.

Considerando que el análisis metagenómico se realizó aplicando los software académicos disponibles gratuitamente (FastQC, Trimmomatic y Usearch), se sugiere comprar los software avanzados, para poder comparar los resultados y ampliar los análisis de información obtenida.

Se recomienda el mismo estudio para un suelo cultivado con la piña y fumigado con el bioinsecticida.

Las secuencias que hacen parte de SCB deben ser analizadas independientemente, para poder refinar el hallazgo de estas secuencias y así poder reclasificar estas secuencias.

## Bibliografía.

- Albán A. 2009. Índice preliminar de compactación y propiedades hidrológicas en suelos cálcicos bajo caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias-Palmira.
- Arellano, G., Vergara, C. & Bello, S. (2015). Plagas entomológicas y otros artrópodos en el cultivo de la piña (*Ananas comosus var. comosus (L.) Merr., Coppins & Leal*) en chanchamayo y satipo, departamento de Junín, Perú. *Ecología Aplicada*, 14(2), 175-189.
- Ari, S. and M. Arikian. 2016. Next generation Sequencing: Advantages, Disadvantages, and Future. *Plant Omics: Trends and Applications*. K.R. Hakeem, H. Tombuloglu and G. Tombuloglu. Cham, Springer International Publishing: 109-135.
- Astrid Naether, Bärbel U. Foessel, Verena Naegele, Pia K. Wüst, Jan Weinert, Michael Bonkowski, Fabian Alt, Yvonne Oelmann, Andrea Polle, Gertrud Lohaus, Sonja Gockel, Andreas Hemp, Elisabeth K. V. Kalko, Karl Eduard Linsenmair. 2012. Environmental Factors Affect Acidobacterial Communities below the Subgroup Level in Grassland and Forest Soils. *American Society for Microbiology*.
- Autoridad Nacional De Licencias Ambientales (ANLA). 2011. Resolución Numero 73. Dictamen Técnico Ambiental para el Producto Formulado Lorsban 4EC.
- Autoridad Nacional De Licencias Ambientales. 2011. Resolución Numero 70. Dictamen Técnico Ambiental para el Producto Formulado Vexter 550EC.
- Autoridad Nacional De Licencias Ambientales. 2012. Resolución Numero 0323. Dictamen Técnico Ambiental para el Producto Formulado Rimon Duo.
- Autoridad Nacional De Licencias Ambientales. 2017. Resolución Numero 01146. Dictamen Técnico Ambiental para el Producto Formulado Eredamix 247 SC.
- Barbaro A, Karlanian M y Mata D. 2014. Importancia del pH y la Conductividad Eléctrica en los sustratos para plantas. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina.

- Battistuzzi & Hedges 2008. A Major Clade of Prokaryotes with Ancient Adaptations to Life on Land. Multiple Evidence Supporting Two Major Groups of Eubacteria.
- Cantera A, Etchebehere C. 2014. Caracterización, aislamiento y filogenética de organismos del filo Chloroflexi. Obtenido de <https://goo.gl/n87LgQ>.
- Carvajal R. 1997. Propiedades Físicas, Químicas y Biológicas de los Suelos. Boletín informativo. SENA. Santa Fe de Bogotá. Obtenido de <https://goo.gl/5wPYFT>. Consultado en Septiembre de 2018.
- Castro H. 1998. Fundamentos para el conocimiento y manejo de suelos agrícolas. Ed Produmedios. ISBN: 9589340563.
- Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA), Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). 2011. Guía técnica del cultivo de piña. Programa MAG-CENTA-Frutales. Obtenido de: <https://goo.gl/ifiE58>.
- Chanal A, Chapon V, Benzerara K, Barakat M, Christen R, Achouak W, Barras F, 2006. Heulin T. The desert of tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria, *Environ Microbiol*, vol. 8 (pg. 514-525).
- Cocca, Claudia & Ventura, Clara & Núñez, Mariel & Randi, Andrea & Venturino, Andrés. (2015). El organofosforado clorpirifos como disruptor estrogénico y factor de riesgo para el cáncer de mama. 23. 142-152.
- Cannon SA, Lester ED, Shafaat HS, Obenhuber DC, Ponce A. 2007. Bacterial diversity in hyperarid Atacama Desert soils, *J Geophys Res*, vol. 112-G04S17.
- Corrales-Ramírez MSc, Lucía Constanza, Caycedo-Lozano, Liliana, Gómez-Méndez, María Angélica, Ramos-Rojas, Sonia Julieth, & Rodríguez-Torres, Jessica Natalia. (2017). *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *Nova*, 15(27), 46-65.
- DeBruyn J, Nixon L, Fawaz M, Johnson A, Radosevich M. 2011. Global Biogeography and Quantitative Seasonal Dynamics of Gemmatimonadetes in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (17) 6295-6300; DOI: 10.1128/AEM.05005-11.

- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). 2015. Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria. Número 54. Obtenido de <https://goo.gl/9VrH3a>.
- Díez de Ulzurrun, M. (1995). Contaminación y Depuración de Suelos. Instituto Tecnológico Geominero de España-Madrid. Pag 13, 14,17.
- Dow AgroSciences. 2013. Etiqueta web del Lorsban. Obtenido de <https://goo.gl/hv3crs>.
- Dröge S, Fröhlich J, Radek R, König H. 2006. *Spirochaeta coccoides* sp. nov., a Novel. Coccoid Spirochete from the Hindgut of the Termite *Neotermes castaneus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (1) 392-397; DOI: 10.1128/AEM.72.1.392-397.2006.
- Duque, E. 1995. Fertilización de la piña FEDECAFE Santa Fe de Bogotá pp.181-183.
- El-Tarabily KA & Sivasithamparam K (2006). Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry.* United Arab Emirates. (38):1505– 1520.
- Espinosa J y Molina E. 1999. Acidez y Encalado de los Suelos. International Plant Nutrition Institute. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica.
- Fernández L., Rojas N., Guadalupe T., Ramírez E., Zegarra H., Uribe R., Reyes R., Flores D., Arce J. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo. ISBN: 968-489-039-7.
- Ficha técnica del fertilizante Triple 15. Obtenido de <https://goo.gl/cnNF8d>.
- Flores L y Alcalá J. 2010. Manual de Procedimientos Analíticos. Laboratorio de Física de Suelos. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Instituto de Geología. México.
- Franco-Correa, M. 2008. Evaluación de Caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias con Hongos Formadores de Micorrizas. Universidad de Granada. Granada, España. 46-51.

- Francois T, Hehemann J, Rebuffet E, Czjek M, Gurvan M. 2011. Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. *Frontiers in microbiology*, 2, 93. doi:10.3389/fmicb.2011.00093. Obtenido de <https://goo.gl/DvF1Kc>.
- Fuerst Jhon. 2017. Microbial resources. Ch 1: Planctomycetes-new models for microbial cells and activities.
- Giménez, Rosana, Della Penna, Angela, & Odello, Ezequiel. (2004). Efectos tóxicos de los insecticidas clorpirifos y teflutrina sobre la lombriz de tierra (*Lumbricus terrestris* L.). *Agricultura Técnica*, 64(4), 347-352.
- Göker, M., Spring, S., Scheuner, C., Anderson, I., Zeytun, A., Nolan, M., Lucas, S., Tice, H., Del Rio, T. G., Cheng, J. F., Han, C., Tapia, R., Goodwin, L. A., Pitluck, S., Liolios, K., Mavromatis, K., Pagani, I., Ivanova, N., Mikhailova, N., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y. J., Jeffries, C. D., Rohde, M., Detter, J. C., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P., ... Lapidus, A. (2014). Genome sequence of the *Thermotoga thermarum* type strain (LA3(T)) from an African solfataric spring. *Standards in genomic sciences*, 9(3), 1105-17. doi:10.4056/sigs.3016383.
- Gómez M. 2012. Estudio comparativo de la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP`S) a través de la atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación en un suelo contaminado. Universidad Pontificia Bolivariana - Facultad de Ingeniería Ambiental.
- González J. 2014. Efecto del uso y ocupación en las propiedades físicas y químicas en un suelo del piedemonte llanero. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Ingeniería Civil y Agrícola.
- Grant, W.D y Long, P.E. 1989. *Microbiología Ambiental*. Zaragoza-España. Editorial Acriba S.A. p11.
- He S, Stevens SLR, Chan L-K, Bertilsson S, Glavina del Rio T, Tringe SG, Malmstrom RR, McMahon KD. 2017. Ecophysiology of freshwater verrucomicrobia inferred from metagenome-assembled genomes. *mSphere* 2:e00277-17.

- Heredia O, Fernández Cirelli. Septiembre 9 de 2008. Importancia de las propiedades de los suelos en la determinación del riesgo de contaminación de acuíferos. Cátedra de Edafología, Dpto. de Recursos Naturales y Ambiente, FAUBA. Av. San Martín 4453, 1417, Buenos Aires.
- Hermans SM, Buckley HL, Case BS, Curran-Cournane F, Taylor M, Lear G. 2017. Bacteria as emerging indicators of soil condition. *Appl Environ Microbiol* 83:e02826- 16.
- Hernández R, Santoyo G. 2010. Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. Laboratorio de Recombinación y Diversidad Genómica, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Ciudad Universitaria. *Phyton* (Buenos Aires), 79(2), 133-139.
- Hernández W.A. 2012. Efectos de la variación de la concentración del surfactante Triton X-100 en la remediación de una muestra de suelo contaminada con hidrocarburos a escala laboratorio, utilizando la técnica de remediación lavado de suelo. Universidad Pontificia Bolivariana - Facultad de Ingeniería Ambiental.
- Herrero M. 2004. Balance de Macronutrientes y Materia Orgánica en el Suelo de Agrosistemas Hortícolas con Manejo Integrado y Ecológico. Universidad de Valencia- Facultad de Farmacia.
- Hiromi Kato, Hiroshi Mori, Fumito Maruyama, Atsushi Toyoda, Kenshiro Oshima, Ryo Endo, Genki Fuchu, Masatoshi Miyakoshi, Ayumi Dozono, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masahira Hattori, Asao Fujiyama, Ken Kurokawa, and Masataka Tsuda. (2015). Time-series metagenomic analysis reveals robustness of soil microbiome against chemical disturbance. Universidad de Oxford.
- Illumina Miseq System. 2018. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Support-Illumina. Guide- 15044223-b. Obtenido de <https://goo.gl/vgpVnt>.
- Instituto Colombiano De Agricultura (ICA). 2018. Registros Nacionales De Plaguicidas Químicos de uso Agrícola. Obtenido de <https://goo.gl/PTiwNS>. Consultado en Septiembre de 2018.

- Instituto Geológico Agustín Codazzi (IGAC). 1986. Estudio general de suelos del nororiente del Departamento de Nariño. Capítulo 4: Propiedades de los Suelos. Obtenido de <https://goo.gl/95Yztb>.
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). 2007. El suelo. Capítulo 1. Ciudad de México. Obtenido de <https://goo.gl/bBUU2H>. Consultado en Septiembre de 2018.
- Instituto Técnico Agustín Codazzi (IGAC). 2011. Suelos Departamentales. Propiedades de los suelo. Capítulo 4. Obtenido de <https://goo.gl/QgXBV6>. Consultado en Septiembre de 2018.
- Ivanova, A. A., Wegner, C.-E., Kim, Y., Liesack, W., & Dedysh, S. N. (2018). Metatranscriptomics reveals the hydrolytic potential of peat-inhabiting *Planctomycetes*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(6), 801–809.
- Jayasinghe, D. & Parkinson, D. 2008. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. *Applied Soil Ecology*. Canadá. (38): 109-118.
- Jiménez, J. 1999. Manual práctico para el cultivo de piña de exportación. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. Pág. 106- 109.
- K. V. B. R. Tilak, N. Ranganayaki , K. K. Pal , R. De , A. K. Saxena , C. Shekhar Nautiyal , Shilpi Mittal , A. K. Tripathi and B. N. Johri. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*, Vol. 89. No.1.10.
- KEGG genes. 2019. Candidatus Solibacter Usitatus. Obtenido de: <https://goo.gl/fBFHC3>.
- Kirkpatrick J, Oakley B, Fuchsman C, Srinivasan S, Staley J, Murray J. 2006. Diversity and Distribution of Planctomycetes and Related Bacteria in the Suboxic Zone of the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (4) 3079-3083; DOI: 10.1128/AEM.72.4.3079-3083.
- Kochian L, Hoekenga O, Pineros M (2004). How do plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology* 55: 459-493.

- Kochian L, Piñeros M, Hoekenga O (2005). The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil* 247: 175-195.
- Krzmarzick M, Crary B, Harding J, Oyerinde O, Leri A, Myneni S, Novak P. 2011. Natural Niche for Organohalide-Respiring Chloroflexi. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (2) 393-401; DOI: 10.1128/AEM.06510-11.
- Kulichevskaya, Irina & Ivanova, Anastasia & Belova, S.E. & Dedysh, Svetlana. (2012). A novel filamentous planctomycete of the *Isosphaera*-*Singulisphaera* group isolated from a Sphagnum peat bog. *Microbiology*. 81. 446-452. 10.1134/S0026261712040121.
- Leal M. 2011. Planteamiento de Alternativas Físico-Químicas para Remediación de Agua Subterránea y Suelos Contaminados con Hidrocarburos Apoyados en la Aplicación de Software Visual Modflow para un Área de Interés de Ecopetrol S.A. Universidad Pontificia Bolivariana. Facultad de Ingeniería Ambiental.
- López J. 2016. Determinación de los requerimientos nutricionales de la Piña variedad MD-2 en suelos ácidos del municipio de Santander de Quilichao. Universidad Nacional de Colombia. Palmira.
- Martínez E, Andrades M. 2014. Fertilidad del suelo y parámetros que la definen. Universidad de la Rioja. 29p.; v. digital. – (material didáctico. Agricultura y alimentación; 03). ISBN 978-84-695-9286-1.
- *Mol Biol Evol* (2009) 26 (2): 335-343. doi: 10.1093/molbev/msn247
- Molina, A. E, Instituto para la Innovación Tecnológica en Agricultura (INTAGRI). 2012. El manejo y la nutrición del cultivo de la piña. Obtenido de: <https://goo.gl/GpEMQi>.
- Monciardini P, et al. 2003. *Conexibacter woesei* gen. nov., sp. nov. a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class Actinobacteria. *Int J Syst Bacteriol.* 53:569-576.
- Monique Suela Silva, Alenir Naves Sales, Karina Teixeira Magalhães-Guedes, Disney Ribeiro Dias, and Rosane Freitas Schwan, 2013. Brazilian Cerrado Soil Actinobacteria Ecology. *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 503805, 10 pages.

- Nagamani Balagurusamy. 2014. *Metagenómica: Concepto y Aplicaciones en el Mundo Microbiano*. Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila.
- Navarrete, A. A., Soares, T., Rossetto, R., van Veen, J. A., Tsai, S. M., & Kuramae, E. E. (2015). Verrucomicrobial community structure and abundance as indicators for changes in chemical factors linked to soil fertility. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(3), 741-52.
- Normas Oficiales Mexicanas (NOM). 2002. Norma Oficial Mexicana que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreos y análisis. NOM-021-SEMARNAT-2000. Obtenido de: <https://goo.gl/AjXyBk>.
- Normas Técnicas Colombianas (NTC). 2017. Calidad del suelo: Determinación de la acidez, aluminio e hidrogeno intercambiables. Obtenido de <https://goo.gl/n8s2Zf>.
- Omega Bio-Tek. 2016. E.Z.N.A Soil DNA Kit- Protocol for Samples. Obtenido de <https://goo.gl/ZgUvDn>.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2018. Portal de suelos de la FAO- Definiciones. Obtenido de <https://goo.gl/GGLfVD>.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).1996. *Ecología y Enseñanza Rural. Estudio FAO Montes 131*. Obtenido de <https://goo.gl/gajooF>. Consultado en Septiembre de 2018.
- Osman KT. 2013. *Soils: principles, properties and management*. Dordrecht: Springer. 274 pp.
- Parveen Sangwan,Xiaolei Chen,Philip Hugenholtz,Peter H. Janssen. 2004. *Chthoniobacter flavus* gen. nov., sp. nov., the First Pure-Culture Representative of Subdivision Two, *Spartobacteria* classis nov., of the Phylum Verrucomicrobia. *Appl. Environ. Microbiol*, 70 (10) 5875-5881; DOI: 10.1128/AEM.70.10.5875-5881.
- Peña Arderi, H., Díaz Álvarez, J., & Martínez Rodríguez, T. (1996). *Fruticultura tropical. Primera parte*. Santafé de Bogotá D.C: Félix Varela.

- Pukall Rüdiger, et al. 2010. Complete genome sequence of *Conexibacter woesei* type strain (ID131577). *Standards in Genomic Studies*. 2:212-219.
- R. C. Gomes, A. S. Mangrich, R. R. R. Coelho, and L. F. Linhares, 1996. Elemental, functional group and infrared spectroscopic analysis of actinomycete melanins from Brazilian soils. *Biology and Fertility of Soils*, vol. 21, no. 1-2, pp. 84–88.
- Ravi Kant, Mark W. J. van Passel, Airi Palva, Susan Lucas, Alla Lapidus, Tijana Glavina del Rio, Eileen Dalin, Hope Tice, David Bruce, Lynne Goodwin, Sam Pitluck, Frank W. Larimer, Miriam L. Land, Loren Hauser, Parveen Sangwan, Willem M. de Vos, Peter H. Janssen, Hauke Smidt. 2011. Genome Sequence of *Chthoniobacter flavus* Ellin428, an Aerobic Heterotrophic Soil Bacterium. *Journal of Bacteriology*, 193 (11) 2902-2903; DOI: 10.1128/JB.00295-11.
- Rawat S, Mannisto M, Bromberg Y, Haggblom M. 2012. Comparative genomic and physiological analysis provides insights into the role of Acidobacteria in organic carbon utilization in Arctic tundra soils. *FEMS Microbiology Ecology*.
- Rocha G, Santoyo Y, Bustillos R, Muñoz J, Perez y Terron R, Muñoz A, Contreras J.L, Munive J.A. 2015. Los microorganismos del suelo y su importancia biotecnológica en la agricultura y el ambiente.
- Rucks L, García F, Kaplan A, Ponce de León J y Hill M. 2004. Propiedades físicas del suelo. Facultad de Agronomía de la Universidad de la República. Departamento de Suelos y Agua. Montevideo-Uruguay.
- Sait, M., P. Hugenholtz, and P. H. Janssen. 2002. Cultivation of globally-distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ. Microbiol.* 4:654-666.
- Sanchez J, Manteca A. 2009. *Streptomyces* Development in Colonies and Soils. Applied and Environmental Microbiology. American Society for Microbiology.
- Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Instituto Mexicano de Petróleo (IMP), Instituto Nacional de Ecología (INE). 2006. Manual de técnicas de

análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. ISBN 968-489-039-7. México D.F.

- Seki Tamae, et al. 2012. *Conexibacter arvalis* sp. nov., isolated from a cultivated field soil sample. *Int J Syst Bacteriol.* 24:222-234.
- Shrivastava S, D'Souza S & Desai P. (2008). Production of indole-3-acetic acid by immobilized actinomycete (*Kitasatospora* sp.) for soil applications. *Current Science. India.* (94):12.
- Steer I, Rodríguez L. 2008. Diagnóstico de la Infiltración y Permeabilidad en los Suelos de la Zona de Recarga del Acuífero Morroa en el Área Sincelejo, Corozal y Morroa. Universidad de Sucre. Sincelejo.
- Stefan Dröge, Jürgen Fröhlich, Renate Radek, Helmut König. 2006. *Spirochaeta coccoides* sp. nov., a Novel. Coccoid Spirochete from the Hindgut of the Termite *Neotermes castaneus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (1) 392-397; DOI: 10.1128/AEM.72.1.392-397.2006.
- United States Department of Agriculture (USDA). 1999. Guía para la Evaluación de la Calidad y Salud del Suelo. Obtenido de: <https://goo.gl/vrUWoD>.
- United States Department of Agriculture (USDA). 2014. Guía para la evaluación de la calidad y salud del suelo. Servicio de investigación agrícola y de conservación de recursos naturales.
- Vargas E. 2009. Validación de un Manejo Alternativo de Cochinilla (*Dysmicoccus brevipes*) en el Cultivo de Piña. Zona Norte de Costa Rica. Gef- Repcar.
- Ventura, M., Canchaya, A., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G., Chater, K. & Sinderen, D. 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* Alemania. (71): 495–548.
- Wang J, Jenkins C, Webb R, Fuerst J. 2002. Isolation of Gemmata-Like and Isosphaera-Like Planctomycete Bacteria from Soil and Freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 417-422; DOI: 10.1128/AEM.68.1.417-422.

- Ward, Naomi L., et al. 2009. Three Genomes from the Phylum Acidobacteria Provide Insight into the Lifestyles of These Microorganisms in Soils, *Applied and Environmental Microbiology*, 75:2046-2056.
- Dow AgroSciences de Colombia S.A. 2014. Hoja de seguridad del insecticida Lorsban 4EC. Obtenido de <https://goo.gl/eh7Ccg>.
- Alcaldía del Municipio de Lebrija-Santander. 2018. Economía-Sub sector Agrícola. Obtenido de <https://goo.gl/dsthcp>.

# **Anexos**

## **Anexo A. Metodología para la extracción del ADN celular.**

- Tamizar y pesar 0,7 – 0,98 gr de suelo.
- Agregar 1 ml de SLX.-Mlus Buffer y dejar en Vortex durante 10 minutos.
- Agregar 150 µl de DS-Buffer y dejar 5 minutos en el Vortex.
- Incubar a 70°C por 15 min y luego dejar en el Vortex por 5 min y luego otros 10 min.
- Centrifugar a 3000 g durante 15 min a temperatura ambiente.
- Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml.
- Adicionar 270 µl de P2 Buffer (-20°C) y dejar unos segundos en el Vortex para homogenizar.
- Enfriar la muestra durante 10 min y luego centrifugar a 35 mil g durante 10 min.
- Transferir sobrenadante.
- Agregar 800 µl de Isopropanol
- Centrifugar a 35000 g durante 15 a una temperatura de 4°C.
- Descartar sobrenadante.
- Dejar secar el pellet 1 o 2 min.
- Agregar 250 µl de Elution Buffer y poner unos segundos en el Vortex para homogenizar.
- Incubar durante 25 min a 70°C y luego dejar en el Vortex durante 15 a 25 min.
- Agregar 150 µl de CHTR y dejar unos segundos en el Vortex para homogenizar la muestra.
- Dejar a temperatura ambiente durante 2 a 5 min.
- Centrifugar a 35000 g durante 5 min.
- Transferir sobrenadante (400 µl).
- Agregar 900 µl de XP1 Buffer y dejar unos segundos en el Vortex.
- Transferir a la columna.
- Centrifugar a 10000 g durante 1 min a temperatura ambiente.
- Descartar filtrado.
- Agregar 500 µl de HBC Buffer.
- Centrifugar a 10000 g durante 1 min.

- Descartar filtrado.
- Realizar 2 lavados con etanol: uno con 750  $\mu$ l y centrifugar a 10000 g por 1 min y otro con 250  $\mu$ l y centrifugar por otro minuto.
- Centrifugar a 35000 g durante 2 min para eliminar el etanol.
- Transferir columna.
- Agregar 90  $\mu$ l de Buffer elución.
- Dejar a temperatura ambiente durante 2 min.
- Centrifugar a 35000 g por 1 min.
- Incubar a 70°C durante 2 min.
- Centrifugar a 35000 g durante 1 min y conservar a - 20°C.
- Verificar la concentración de 25  $\mu$ l/g de cada muestra en el espectrofotómetro.

**Anexo B. Reporte de los resultados obtenidos de los métodos de Bouyoucos y granulometría.**

Zona	Muestra	Bouyoucos		Granulometría		Variación del % arenas entre Bouyoucos y Granulometría
		% Arena	% Limo	% Arena	% Gravas	
B	M1	% Arena	68,72	% Arena	72,58	6,86
		% Limo	5,28	% Gravas	0,44	
		% Arcilla	26,00	% Finos	26,98	
	M3	% Arena	67,39	% Arena	60,05	7,34
		% Limo	10,61	% Gravas	0,00	
		% Arcilla	22,00	% Finos	39,95	
	M5	% Arena	70,67	% Arena	73,92	3,25
		% Limo	9,28	% Gravas	0,05	
		% Arcilla	20,06	% Finos	38,85	
C	M1	% Arena	68,72	% Arena	66,69	2,03
		% Limo	7,95	% Gravas	0,03	
		% Arcilla	23,33	% Finos	33,29	
	M3	% Arena	74,00	% Arena	59,89	14,11
		% Limo	5,33	% Gravas	0,03	
		% Arcilla	20,67	% Finos	40,09	
		% Arena	76,67	% Arena	61,11	15,56

Zona	Muestro	Bouyoucos		Granulometría		Variación del % arenas entre Bouyoucos y Granulometría
		% Limo		%Gravas		
FQ	M5	% Limo	5,28	%Gravas	0,00	
		%Arcilla	18,05	% Finos	38,89	
	M1	%Arena	66,67	%Arena	59,71	6,96
		% Limo	8,19	%Gravas	0,01	
		%Arcilla	25,15	% Finos	40,27	
	M3	%Arena	68,05	%Arena	61,90	6,15
		% Limo	7,28	%Gravas	0,10	
		%Arcilla	24,67	% Finos	38,00	
	M5	%Arena	72,67	%Arena	61,25	11,42
		% Limo	18,72	%Gravas	0,01	
		%Arcilla	8,61	% Finos	38,73	

**Anexo C. Ficha Técnica del Insecticida químico Lorsban.**



Dow AgroSciences

# Lorsban™

## 4 EC

### Etiqueta Web - Colombia

**INSECTICIDA AGRÍCOLA CONCENTRADO EMULSIONABLE - EC**

**COMPOSICIÓN GARANTIZADA:**

**INGREDIENTE ACTIVO:**

Clorpirifos: ..... 480 g/L  
0,0-diethyl 0-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate, de formulación a 20°C.

INGREDIENTES ADITIVOS: ..... c.s.p. 1 Litro

Registro Nacional ICA No. 1042  
Titular del Registro: Dow AgroSciences de Colombia S.A.

**FABRICADO Y FORMULADO POR:**

Dow AgroSciences de Colombia S.A.  
Planta de Mamonal Km 14 Vía Cartagena.  
Cartagena (095) 6888000

**DISTRIBUIDO POR:**

Dow AgroSciences de Colombia S.A.  
Diagonal 92 No. 17A-42 Piso 7°.   
Bogotá (091) 2196000

® ™ Marca de The Dow Chemical Company  
(“Dow”) o una compañía afiliada de Dow



**MODERADAMENTE PELIGROSO  
DAÑINO**

Rev. Ago/2013

**Anexo D. Conversión de 1,1 y 3,5 meq Al<sup>3+</sup>/100g a ppm.**

1,1 meq Al <sup>3+</sup> /100g	3,5 meq Al <sup>3+</sup> /100g
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 equivalente gramo de Al<sup>3+</sup> = <math>\frac{27}{3} = 9</math> g / eq-g</li> <li>• 1,1 meq-g * <math>\frac{1\text{eq-g}}{1000\text{meq-g}} = 0,0011</math> eq-g</li> <li>• 0,0011 eq-g * 9 gr / 1 eq-g = 0,0099g Al<sup>3+</sup> en 100 g de suelo</li> <li>• 0,0099g Al<sup>3+</sup>/100 g * <math>\frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} = 9,9</math> mg Al<sup>3+</sup>/100 g</li> </ul> <p>9,9 mg Al<sup>3+</sup> → 100 g de suelo  <b>X</b> → 1000 g suelo</p> <p><b>X</b> = 99 mg Al<sup>3+</sup>/Kg = <span style="border: 1px solid red; padding: 2px;">99 ppm</span></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 equivalente gramo de Al<sup>3+</sup> = <math>\frac{27}{3} = 9</math> g / eq-g</li> <li>• 3,5 meq-g * <math>\frac{1\text{eq-g}}{1000\text{meq-g}} = 0,0035</math> eq-g</li> <li>• 0,0035 eq-g * 9 gr / 1 eq-g = 0,0315 g Al<sup>3+</sup> en 100 g de suelo</li> <li>• 0,0315 g Al<sup>3+</sup>/100 g * <math>\frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} = 31,5</math> mg Al<sup>3+</sup>/100 g</li> </ul> <p>31,5 mg Al<sup>3+</sup> → 100 g de suelo  <b>X</b> → 1000 g suelo</p> <p><b>X</b> = 99 mg Al<sup>3+</sup>/Kg = <span style="border: 1px solid red; padding: 2px;">315 ppm</span></p>

**Anexo E. Ficha técnica del fertilizante triple 15.**

**FICHA TECNICA DEL PRODUCTO**  
**FERTILIZANTE VECOL 15-15-15-11S**



**IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO:**

**NOMBRE DEL PRODUCTO:** FERTILIZANTE VECOL 15-15-15-11S

**REGISTRO DE VENTA ICA No.** 9789 del 17 de abril de 2015.

**COMPOSICIÓN GARANTIZADA:**

Nitrógeno Total.....	15%
Nitrógeno Amoniacal.....	15%
Fósforo asimilable como (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ).....	15%
Potasio Soluble en Agua (K <sub>2</sub> O).....	15%
Azufre (S).....	11%

**CLASE DE PRODUCTO:** Fertilizado Compuesto Complejo Granulado.

**TIPO DE FORMULACIÓN:** Complejo NPK + Azufre para aplicación al suelo.

**PROPIEDADES DEL PRODUCTO FORMULADO:**



	Sólido granulado de color beige. Los gránulos de tamaño (POCT 21560.1, MKXA n.º 1104-00209438-105, MKXA n.º 1104-00209438-104): Por debajo de 1 mm como máximo 3%; 1-6 mm mínimo del 95%; menores de 6 mm 100%.
- Apariencia	
- Olor	Inodoro o débil olor
- Ph (solución 5%)	5,5-6,0
- Presión de Vapor	0,00147 Pa a 20 °C
- Densidad relativa	1,62 - 1,81 a 20 °C

**Anexo F. Calculo de delta pH para determinación de tipo de capacidad de intercambio iónico.**

- $\Delta\text{pH} = \text{pH}(\text{KCl}) - \text{pH}(\text{H}_2\text{O})$

Zona	Muestreo	pH (H <sub>2</sub> O)	pH(KCl)	ΔpH
B	M1	4,65	3,78	-0,87
	M2	4,40	3,56	-0,84
	M3	4,38	3,53	-0,86
C	M1	4,20	3,70	-0,50
	M2	3,96	3,32	-0,64
	M3	3,78	3,39	-0,38
FQ	M1	4,50	3,75	-0,76
	M2	4,68	3,80	-0,89
	M3	4,32	3,67	-0,65
	M4	4,35	3,56	-0,79
	M5	4,63	4,03	-0,60

**Anexo G. Calculo para convertir mg de PO<sub>4</sub>/ Kg y mg de NTK/ Kg a PPM.**

104 mg PO <sub>4</sub> / Kg	153 mg PO <sub>4</sub> / Kg
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\frac{31 \text{ g de P}}{95 \text{ g P}_2\text{O}_5} = 0,33</math></li> <li>• 104 mg PO<sub>4</sub>/ Kg * 0,33 = 34,32 mg P /kg</li> <li>• 34,32 mg P /kg = <span style="border: 1px solid red; padding: 2px;">34,32</span> ppm de P</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\frac{31 \text{ g de P}}{95 \text{ g P}_2\text{O}_5} = 0,33</math></li> <li>• 153 mg PO<sub>4</sub>/ Kg * 0,33 = 50,49 mg P /kg</li> <li>• 50,49 mg P /kg = <span style="border: 1px solid red; padding: 2px;">40,49</span> ppm de P</li> </ul>

448 mg NTK/ Kg	532 mg NTK / Kg
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>448 \text{ mg NTK/ Kg} * \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 0,448 \text{ g NTK/ Kg}</math></li> <li>0,448 g NTK → 1000 g de suelo</li> <li><b>X</b> → 100 g suelo</li> <li><b>X</b> = <span style="border: 1px solid red; padding: 2px;">0,0448 %</span> de N</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>532 \text{ mg NTK/ Kg} * \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 0,532 \text{ g NTK/ Kg}</math></li> <li>0,532 g NTK → 1000 g de suelo</li> <li><b>X</b> → 100 g suelo</li> <li><b>X</b> = <span style="border: 1px solid red; padding: 2px;">0,0532 %</span> de N</li> </ul>

**Anexo H. Reporte de los filos bacterianos encontrados en los suelos B, C y FQ durante los muestreos M1, M2, M3 y M4.**

	Control M1	Control M3	Blanco M1	Blanco M3	Quimico M2	Quimico M3	Quimico M4
■ Planctomycetes	7,27%	6,04%	6,22%	7,97%	6,10%	4,31%	5,70%
■ Streptophyta		0,13%	0,42%	0,44%	0,39%	0,27%	0,26%
■ Thermotogae	0,21%	0,33%			0,20%		
■ Bacteroidetes	0,24%		0,13%	0,27%		0,39%	0,16%
■ Ascomycota	0,29%	0,44%	0,48%	0,58%	0,21%	0,24%	0,12%
■ Spirochaetes	0,29%	0,48%	0,15%	0,23%		0,29%	0,22%
■ Gemmatimonadetes	0,35%	0,42%	0,60%	0,70%	0,47%	0,63%	0,60%
■ Chloroflexi	4,10%	5,62%	4,14%	5,60%	4,06%	3,30%	4,90%
■ Proteobacteria	4,20%	13,90%	7,20%	4,50%	3,50%	3,70%	4,20%
■ Firmicutes	4,70%	6,20%	6,90%	5,70%	4,70%	11,80%	8,40%
■ Verrucomicrobia	5%	6,80%	7,60%	9,50%	8,60%	7,50%	9%
■ Acidobacteria	7,10%	9,60%	11,20%	15,70%	8,40%	7,30%	8,10%
■ Secuencias Sin clasificar (SCS)					0,15%		
■ Sin clasificar - Eucariota (SCE)	0,36%	0,58%	0,54%	0,71%	0,44%	0,63%	0,47%
■ Sin clasificar - Bacteria (SCB)	17%	10,10%	12%	17,80%	20,10%	10,20%	17%

**Anexo I. Reporte de las abundancias de los géneros de las poblaciones microbianas encontradas en los suelos B, C y FQ durante los muestreos M1, M2, M3 y M4.**

	Suelo C (M1)	Suelo C (M3)	Suelo B (M1)	Suelo B (M3)	Suelo FQ (M2)	Suelo FQ (M3)	Suelo FQ (M4)
Lysinibacillus						2,64%	
Acidobacterium		2,35%		2,29%		1,62%	
Stacelibacter							
Conexibacter	5,49%	6,75%	2,10%	3,69%	5,30%	4,08%	4,32%
Micobacterium		2,97%	2,78%				
Chthoniobacter		7,28%	6,45%	6,09%	9,04%	6,16%	8,99%
Bacillus	1,94%	2,85%	4,46%		2,71%	8,72%	6,69%
Ktedonobacter	2%	2,49%		2,50%	1,43%		1,70%
Dehalogenimonas	2,19%	3,15%	1,96%	1,92%	2,34%	1,69%	2,43%
Actinomadura	2,95%	2,63%	1,58%	4,70%	1,98%	3,53%	6,65%
Burkholderia	3,07%	6,43%	5,14%			2,13%	3,02%
Candidatus Solibacter	3,10%	3,04%	3,76%	5,76%	4,64%	3,18%	4,07%
Micobacterium	3,21%			3,09%			1,50%
Conexibacter	5,33%						
Candidatus Koribacter	5,74%	7,81%	7,06%	10,19%	5,08%	3,70%	4,53%
Streptomyces	5,95%	5,48%	16,83%		13,45%	19,90%	5,23%
Isosphaera	7,87%	6,66%	5,62%	6,36%	5,84%	4,31%	5,66%
SCB	25,85%	14,83%	15,45%	21,94%	27,10%	13,40%	23,18%