

Estudio de la microbiota y propiedades de un suelo fumigado con insecticidas.

Kopytko Maria¹, Martha Johana Estévez Gómez² Nohora Juliana Rueda Forero³ Miguel Orlando Suárez Barrera⁴

¹Universidad Pontificia Bolivariana (GINSa, Facultad de Ingeniería Ambiental)
maria.kopytko@upb.edu.co

² Universidad Pontificia Bolivariana (Estudiante de Maestría, Facultad de Ingeniería Civil)
martha.estevez@upb.edu.co

³ Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Medicina, Centro de Investigación MASIRA. Grupo de Investigación Biología Molecular y Biotecnología. Universidad de Santander, Campus Bucaramanga. Email

Juliana.forero@udes.edu.co

⁴ Facultad de Ciencias Exactas, Agropecuarias y Naturales. Programa de Microbiología Industrial. Universidad de Santander, Campus Bucaramanga.

Código del proyecto de investigación: 066-0118-2400

Convenio Interinstitucional y Tecnológico entre Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga y Universidad de Santander UDES.

Recibido mes día año

Resumen— El propósito de este proyecto fue analizar los cambios en las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de suelos, cultivados con piña y sometido a la fumigación con insecticida químico y biológico, en el municipio de Lebrija, Santander. Se demostró que los suelos fumigados con insecticidas aportan cambios significantes en algunas de las propiedades fisicoquímicas como el cambio de textura de Franco-arcilloso-arenoso a Franco arenoso del suelo fumigado con insecticida químico. Las propiedades fisicoquímicas iniciales de los suelos de interés presentaron condiciones ácidas con bajos valores de pH (4,25 a 4,65) y un nivel de aluminio intercambiable mayor a 1ppm, por lo que puede ejercer la toxicidad en estos suelos. La infiltración entre 175,85 y 397,57 cm/h y la densidad aparente de 1,64 g/cc, se ajusta al valor típico, para estos tipos de suelos agrícolas. Los bajos valores de carbono orgánico total (0,61% a 0,98%) y de la materia orgánica presente en un rango de 1,7% a 3,5%, junto con los bajos valores de nitrógeno total (420 a 476 mg NKT/Kg) señalan la necesidad de una fertilización constante de estos suelos, sometidos a un monocultivo. Los cambios en las características fisicoquímicas de los suelos no afectan notoriamente la distribución poblacional analizada mediante la metagenómica. Los Phylum Actinobacteria, Planctomycetes, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Firmicutes, Proteobacteria y Chloroflexi se identificaron como habitantes frecuentes de suelo y sus actividades se asocian a los ciclos biogeoquímicos y degradación de materia orgánica en lo que se presume es una composición típica de suelo cultivado con Ananás comosus. La microbiota descrita en el estudio, permanece durante la aplicación de los insecticidas a pesar de los cambios señalados en las propiedades fisicoquímicas del suelo, lo que sugiere que la prevalencia se deriva de las estructuras de resistencia e interacciones ecológicas dadas al interior de las poblaciones microbianas

Palabras clave: insecticidas, metagenómica, piña, suelo
Código JEL: Q

Abstract— *The purpose of this project was to analyze the changes in the physicochemical and microbiological properties of soils, cultivated with pineapple and subjected to fumigation with chemical and biological insecticide, in the municipality of Lebrija, Santander. It was demonstrated that the soils fumigated with insecticides contribute with significant changes in some of the physicochemical properties such as the change of texture from clay-loamy-sandy to sandy-loam soil fumigated with chemical insecticide. The initial physicochemical properties of the soils of interest presented acidic conditions with low pH values (4.25 to 4.65) and an exchangeable aluminum level greater than 1 ppm, which can exert toxicity in these soils. The infiltration between 175.85 and 397.57 cm/h and the apparent density of 1.64 g/cc, is adjusted to the typical value for these types of agricultural soils. The low values of total organic carbon (0.61% to 0.98%) and of the organic matter present in a range of 1.7% to 3.5%, together with the low values of total nitrogen (420 to 476 mg NKT/Kg) point out the need for constant fertilization of these soils. The changes in the physicochemical characteristics of the soils do not noticeably affect the population distribution analyzed by metagenomics. The Phylum Actinobacteria, Planctomycetes, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Firmicutes, Proteobacteria and Chloroflexi were identified as frequent inhabitants of soil and their activities are associated with the biogeochemical cycles and degradation of organic matter in what is presumed to be a typical composition of soil cultivated with Ananás comosus. The microbiota described in the study remains during the application of the insecticides despite the changes indicated in the physical-chemical properties of the soil, which suggests that the prevalence is derived from the resistance structures and ecological interactions given to the interior of the microbial populations.*

Keywords: *insecticide, metagenomics, pineapple, soil*

Code: *JEL:Q*

Introducción

Según la organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, la producción de piña a nivel mundial se calcula en 19'166.560 toneladas y a nivel de Colombia 512.496 toneladas al año. El cultivo de la piña en el departamento de Santander ha ocupado una superficie de 5.653 hectáreas que corresponde al 39,19% del territorio nacional (FINAGRO, 2013). A pesar de tener el liderazgo en este cultivo, en los años recientes se ha registrado un descenso en la producción de piña, debido a los elevados costos, correspondientes al uso de grandes cantidades de insecticidas químicos.

Considerando que los insecticidas químicos son sintetizados artificialmente sus estructuras químicas son desconocidas para los microorganismos, por lo cual no se degradan fácilmente y su permanencia ejerce acción toxica en los ecosistemas. En consecuencia, esto conllevaría a un deterioro de la calidad del suelo, impidiendo su uso agrícola.

En contraste, los insecticidas biológicos utilizan componentes naturales, que son compuestos sintetizados por la naturaleza. Por lo tanto, su impacto sobre el ecosistema, se espera, que sea menor que un impacto generado por insecticida químico. Desafortunadamente, hay pocos reportes en la literatura que confirman esta hipótesis y permiten ver la alteración específica de microbiota y cambio de propiedades fisicoquímicas en los suelos cultivados.

Se reconoce la gran importancia de las propiedades fisicoquímicas y de la microbiota en un suelo productivo. Los microorganismos juegan un papel importante en los ciclos biogeoquímicos y en las trasformaciones 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). Aunque el estudio de la diversidad

microbiana proporciona información muy útil, el método basado en el cultivo de las diferentes especies en el laboratorio, solo permite identificar muy bajo porcentaje de las mismas.

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). Aplicando la metagenómica se puede investigar cualquier comunidad microbiana directamente en su ambiente natural evitando aislar los microorganismos (Cueto et al., 2014). El procedimiento de la metagenómica consiste en la selección del nicho ambiental, luego el aislamiento del material genético de la muestra ambiental, seguido por la manipulación del material genético (Wilson & Piel, 2013).

En el presente proyecto se aplicó la metagenómica, para estudiar la población de microorganismos presentes en el suelo cultivado con la piña y sometido a la fumigación con insecticida químico y biológico, en el municipio de Lebrija, Santander. De igual manera se analizaron cambios en las propiedades fisicoquímicas del mismo suelo, después de la aplicación de los insecticidas de interés.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Realizar un estudio comparativo del efecto de un bioinsecticida y un insecticida químico sobre las propiedades fisicoquímicas y la microbiota de un suelo cultivado con Ananás comosus (Piña) del municipio de Lebrija, Santander.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar la caracterización fisicoquímica y análisis metagenómico inicial de suelo, destinado para el cultivo de Ananás comosus en el municipio de Lebrija, Santander.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas y los análisis metagenómicos en suelos cultivados con Ananás comosus (Piña) tras la aplicación de un bioinsecticida y un insecticida químico.
- Analizar los cambios presentes en el suelo cultivado con *Ananas comosus* tratado con el bioinsecticida y un insecticida químico

2. Revisión de la Literatura

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 propenso 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).

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, 2015). Esta última se destaca por la relación simbiótica con las hormigas, los cuales transportan la Cochinilla, trasladándola de una planta a la otra y a su vez se alimentan de las excretas que produce piojo blanco (Jiménez, 1999).

El *Dysmicoccus brevipes* de la piña pertenece al orden *Homópteros* y a la familia *Pseudococcidae* siendo la principal plaga presente en los cultivos de la piña en municipio de Lebrija, Santander.

Este insecto 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, manifestadas por la aparición de color rojizo de las hojas con manchas negras y formaciones de costras epidérmicas o internas, finalizando con la marchitez de la planta (Arellano, 2015; Vargas, 2009).

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), Benzoinureas 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); De igual manera el insecticida Lorsban y el Vexter, inhiben la enzima acetilcolinesterasa, ocasionando la excesiva transmisión de impulsos nerviosos (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 nicotinérgicos postsináptico de acetilcolina e interrumpe la transmisión de los impulsos nerviosos, causando una pérdida de control muscular al insecto (ANLA, 2017).

Mediante la Resolución No. 1231 del 5 de diciembre de 2013 se prohibió uso agrícola de producto formulado FURADAN® 3, cual tradicionalmente se aplicaba en los cultivos de la piña en el

municipio de Lebrija, por lo cual se utiliza actualmente un insecticida llamado Lorsban 4EC formulado a partir del ingrediente activo clorpirifos, el cual representa cerca del 48% de la composición del producto.

Según la compañía química Dow Agrosiences de Colombia S.A, la cual distribuye el Lorsban 4EC, el producto suministra 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).

2.1. Antecedentes del uso de Clorpirifos.

Para determinar la influencia del insecticida Lorsban sobre los ecosistemas y los diversos microorganismos que habitan en estos, se han hecho diversos estudios sobre las alteraciones biológicas y fisicoquímicas que conlleva el uso de la sustancia activa de este producto.

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 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.

2.2. Uso de los bioinsecticidas para el control de las plagas.

Considerando que los insecticidas químicos representan un peligro a largo plazo para el medio ambiente, se denomina esta clase de productos Contaminantes Orgánico-Persistentes (COP) y actualmente se encuentran prohibidos por el Convenio de Estocolmo, que ingresó en vigor en mayo de 2004 doce productos químicos prohibidos (Red de Acción en Plaguicidas del Reino Unido, 2009). Por esta razón, se cree necesario reemplazar los insecticidas químicos por productos naturales, como lo son los insecticidas biológicos que contribuyen con el medio ambiente, debido a su composición orgánica.

En la actualidad se han utilizados varios insecticidas biológicos para controlar diferentes clases de plagas, catalogándolos como una alternativa más amigable, que un químico para el ambiente. Entre estos, se encuentra el insecticida Azadirachtin, que es utilizada para regular el crecimiento de los insectos, interfiriendo con la hormona mudadora ecdisoma. Así mismo, también se ha utilizado bacterias como *Bacillus Thuringiensis*, que son patógenos para algunos insectos (Castro, 1994).

En el estudio realizado por Vindas, A., & Blanco, H. (2013), se evaluaron 6 productos para el control de *Dysmicoccus brevipes* en piña, entre los cuales se destacó el jabón líquido y extracto botánico, debido a que presentaron una eficiencia semejante al insecticida químico sintetizado (diazinón y carbaril), indicando un alto potencial para el control de *Dysmicoccus brevipes*.

De la misma manera, se demostró que un insecticida biológico constituido del extracto de ajo y cebolla tiene la misma capacidad que un insecticida químico (clorpirifos) para combatir la plaga de *D. brevipes* en un cultivo de rambután. Los resultados obtenidos en este estudio reportan la eficiencia del insecticida químico de 96.91% y del biológico de 96.41, siendo la mejor relación beneficio/costo el insecticida biológico de extracto de ajo y cebolla (Romero M., 2017).

Uno de los bioinsecticidas que ha presentado alto rendimiento en la eliminación de los dos insectos (hormiga y piojo blanco) simultáneamente, se basa en dos componentes que son capsaicina y nicotina. La capsaicina tiene la capacidad de causar trastornos digestivos de insectos como la hormiga, hasta que el insecto evite alimentarse (Casanova, 2002). El otro es el extracto de tabaco, nicotina, cual actúa como una sustancia toxica de contacto e ingestión eliminando el piojo blanco. Actualmente el producto se encuentra en proceso de patentación (Kopytko & Mujica, 2007).

Aunque se ha demostrado la eficiencia de los insecticidas biológicos sobre la eliminación de las plagas que atacan los cultivos, no existen investigaciones sobre los efectos microbiológicos y fisicoquímicos que puede ocasionar estos productos sobre la microbiota y propiedades del suelo.

3. Metodología

El proyecto se desarrolló en el Laboratorio de suelos de la Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga, donde se realizaron las mediciones de las propiedades fisicoquímicas del suelo, excepto de los análisis de carbono orgánico, fosforo total y nitrógeno total, cuales fueron desarrollados por el Laboratorio de Estudios Ambientales de la Universidad Pontificia Bolivariana. El Análisis microbiológico se ejecutó en el Laboratorios de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad de Santander (UDES). Las pruebas de campo se efectuaron en la finca Granjas de Bellavista en el municipio de

Lebrija, Santander, donde el área estudiada se dividió en 4 cuadrantes de igual tamaño de 6 m x 1,5 m cada uno. Cada sector fue sembrado con 30 plantas distribuidas en 5 filas con 6 plantas cada una. Para fines experimentales se tuvo en cuenta suelo denominado blanco (B), cual fue el área sin siembra de piña y sin la fumigación, suelo denominado control (C), que fue el área con siembra de piña, pero sin fumigación. Los experimentos con la fumigación de la piña se realizaron en otros dos cuadrantes de tierra, ambas sembradas con la piña, donde en uno de ellos se aplicó insecticida químico (FQ) y en otro biológico (FB). Los insecticidas utilizados fueron: Lorsban 4EC como un producto químico aplicado en una concentración de 5% y bioinsecticida basado en el extracto de nicotina y capsaicina con una proporción optimizada mediante el diseño experimental factorial. Las cuatro áreas seleccionadas recibieron igual manejo en cuanto a riego y fertilización, utilizando para este propósito agua lluvia y abono mineral triple quince (15-15-15), cual se aplicó al final de cada mes, iniciando el proceso a un mes de haber sembrado la piña.

En la tabla 1 se resumen las actividades realizadas en áreas experimentales

Tabla 1. Resumen de las actividades realizadas en áreas experimentales.

Muestreos	Actividades
Muestreo 1 (M1)	• Toma de muestra inicial suelos B, C, FB y FQ. • Fumigación de FB y FQ.
Muestreo 2 (M2)	• Toma de muestra de suelos FB y FQ. • Fertilización de todos los suelos después del muestreo.
Muestreo 3 (M3)	• Toma de muestra suelos B, C, FB y FQ. • Fumigación de FB y FQ.
Muestreo 4 (M4)	• Toma de muestra de suelos FB y FQ. • Fertilización de todos los suelos después del muestreo.
Muestreo 5 (M5)	• Toma de muestra suelos B, C, FB y FQ.

Fuente: Autores.

3.1. Análisis de las propiedades físico químicas de suelo de interés.

Para la determinación de las propiedades fisicoquímicas de suelo se aplicó la guía metodológica, según la cual en cada área se tomó igual cantidad de submuestras de forma aleatoria (IHOBE, 1998). El cultivo y la fumigación se realizaron de la manera tradicional, como los agricultores actualmente lo desempeñan en el Municipio de Lebrija, Santander. La fumigación se aplicó de 6 a 8 pm, debido a que los insecticidas químicos y biológicos son fotosensibles y se degradan bajo acción de luz. Las aplicaciones se ejecutaron cada 30 días para el insecticida químico y cada 15 días para el insecticida biológico, evitando las condiciones climáticas de lluvia, las altas temperaturas, la aireación, con el fin de obtener

mayor concentración del insecticida en el cultivo. En la tabla 2 se reportan los parámetros fisicoquímicos analizados en este proyecto y los métodos aplicados para su determinación. Todos los análisis físicos químicos realizados se realizaron por triplicado, para el efecto de promediar los resultados. El criterio utilizado para la selección de los parámetros fisicoquímicos fue la calidad y productividad del suelo cultivado con piña. Por lo anterior la medición de pH, permitió verificar el cumplimiento de los valores reportados en la literatura para este cultivo (DANE-ENA, 2015). Adicionalmente la medición de pH en agua y KCl proporcionó la diferencia denominada ΔpH , cuyo valor negativo clasifica un suelo como intercambiador catiónico y valor positivo como intercambiador aniónico. Teniendo en cuenta que el fósforo influye en el crecimiento de las plantas y el desarrollo de los microorganismos, por esta razón se consideró este parámetro para su evaluación. El conocimiento de la textura del suelo permite determinar el porcentaje de la distribución de las partículas con diámetro menor a 2 mm, las cuales están relacionadas con la permeabilidad e infiltración, la humedad, la porosidad total, CIC, M.O. y la densidad. De esta manera permiten indicar el porcentaje de agua y las posibles vías de movilización de la misma dentro de la estructura del suelo, así como el oxígeno disuelto del mismo. Estos factores son de gran importancia para la estabilidad y supervivencia de las diferentes especies microbiológicas (IHOBE, 1998). La materia orgánica y la capacidad de intercambio deciden sobre la disponibilidad de nutrientes y de esta manera la fertilidad del suelo, como también la cantidad de fósforo y nitrógeno, los cuales marcan la productividad del mismo. En la tabla 2 se reportan los métodos aplicados para los análisis fisicoquímicos de suelo.

Tabla 2. Métodos empleados para la determinación de características fisicoquímicas

Parámetro fisicoquímico	Método
pH	NTC 5264
Conductividad Eléctrica	NTC 5596
Acidez intercambiable y Aluminio intercambiable.	NTC 5263
Textura (Granulometría y Bouyoucos)	ASTM WK38106 y 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 (M.O.)	Ignición INVE 121.
Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)	NTC5258
Fósforo total	SM 4500-P-B,E
Nitrógeno total	SM 4500
Carbono orgánico total (CO)	Colorimétrico, Walkley Black $K_2Cr_2O_7/H_2SO_4$

Fuente: Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), 2014.

3.2. Análisis de las propiedades microbiológicas del suelo de interés.

El muestreo de suelo para análisis microbiológico se realizó en los mismos sitios, donde se extrajo el suelo para análisis fisicoquímicos en cada área. Las muestras se tomaron por separado en tubos Falcón de 50 ml y se rotularon debidamente para ser transportadas en una nevera portátil, a una temperatura entre 0 a 4 °C hasta el Laboratorio de la Universidad de Santander de Biología Molecular y Biotecnología, donde se almacenó inmediatamente a -80°C para su posterior análisis. El procesamiento de cada muestra de suelo se inició por la mezcla de las submuestras y su homogenización mediante la maceración al igual como se procedió en análisis fisicoquímicos.

El análisis microbiológico de las muestras de suelo, comprendió aplicación de tres pasos de la metodología de metagenómica

, de los cuales primero fue la extracción del ADN de cada suelo (B, C, FB y FQ), seguido de la secuenciación, el ensamblaje de las cadenas extraídas de ADN y luego la identificación y cuantificación de los géneros microbianos presentes en cada suelo. (Hernández, 2010); (León, 2010). Para la extracción de ADN metagenómico se utilizó el protocolo de extracción E.Z.NA Soil DNA Kit de la compañía OMEGA BIO-TEK, siguiendo cada paso especificado por los fabricantes.

La secuenciación y desarrollo de librería constituye el mapeo físico de un genoma al nivel de pares de bases. Para este propósito se utilizó el fragmento 16S ribosomal, debido a que tiene menos variabilidad en las poblaciones. La secuenciación se ejecutó por el método de Illumina, cual se usa para la amplificación de áreas de interés los cebadores con Bakt_341F y Bakt_805R, que amplifican regiones internas del gen 16S. Finalmente se obtuvo las secuencias masivas para el total del ADN muestreado por Illumina. Los archivos generados se cargaron en los servidores de la empresa Macrogen y en el Servidor del Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la UDES.

Una vez se recibieron las secuencias se realizó verificación de calidad en el software FastQC. Y posteriormente se utilizó trimmomatic, para remover las secuencias técnicas de la secuenciación (indicadores, adaptadores y remanentes de cebadores).

Finalmente, el conjunto de datos se cargó en el software MG-Rast, el cual realizó el proceso de emparejado (Forward y Reverso) para obtener secuencias en promedio con 448+/-9 bases de longitud. Finalmente, el software reportó la anotación de los porcentajes de los niveles taxonómicos en dominio, Phylum, clase, orden, familia y género.

Considerando la magnitud de la información el análisis realizado para este proyecto se redujo el análisis para las secuencias obtenidas de Phylum y género.

4. Resultados

4.1 Propiedades fisicoquímicas iniciales en suelos de interés

En la tabla 3 se reportan los resultados de las propiedades físico químicas iniciales presentes en áreas experimentales de los suelo de interés.

Tabla 3. Propiedades físico químicas iniciales presentes en los suelos de interés.

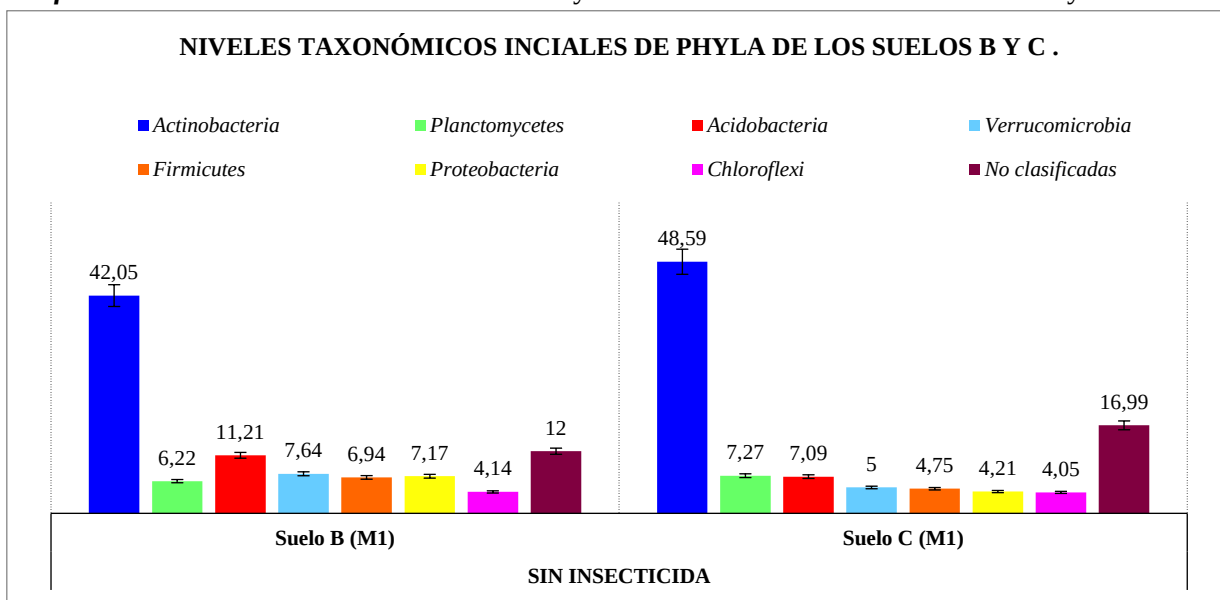
Parámetro fisicoquímico	Suelo B	Suelo C	Suelo FB	Suelo FQ
pH	4,7	4,2	4,4	4,5
ΔpH.	Intercambiador catiónico.	Intercambiador catiónico.	Intercambiador catiónico.	Intercambiador catiónico.
Conductividad Eléctrica	0,6 dS/m	0,5 dS/m	0,5 dS/m	0,5 dS/m
Acidez intercambiable	3,3 meq/100g	3,2 meq/100g	3,5 meq/100g	2,9 meq/100g
Aluminio intercambiable.	3,5 meq/100g	3,1 meq/100g	3,9 meq/100g	1,3 meq/100g
Textura (Granulometría y Bouyoucos)	Franco-arcilloso-arenoso	Franco-arcilloso-arenoso	Franco-arcilloso-arenoso	Franco-arcilloso-arenoso
Densidad aparente	1,64 g/cc	1,64 g/cc	1,64 g/cc	1,64 g/cc
Densidad real	2,02 g/ml	2,20 g/ml	2,0 g/ml	2,22 g/ml
Capacidad de Intercambio Catiónico	12,4 meq/100g	9,07 meq/100g	7,67 meq/100g	15,93 meq/100g
Materia Orgánica	1,7%	2,5%	2,3%	2,2%
Carbono Orgánico	0,72%	0,61%	0,96%	0,98%
Fosforo total	120 mg/PO4	104 mg/PO4	179 mg PO4/Kg	123 mg PO4/Kg
Nitrógeno total	448 mg NTK/Kg	476 mg NTK/Kg	420 mg NTK/Kg	448 mg NTK/Kg

Fuente: Autores.

4.2. Propiedades microbiológicas iniciales en suelos de interés

El suelo B no fue sembrado con la piña por lo que representó un control para este proceso y el suelo C inició con la siembra de piña, por lo cual sus condiciones iniciales fueron iguales que del suelo FB y FQ. En la gráfica 1 se reportan los Phyla en los suelos B y C con sus respectivos porcentajes de distribución de las secuencias analizadas.

Grafica 1. Distribución de secuencias de los Phyla identificados al inicio en los Suelos B y C.

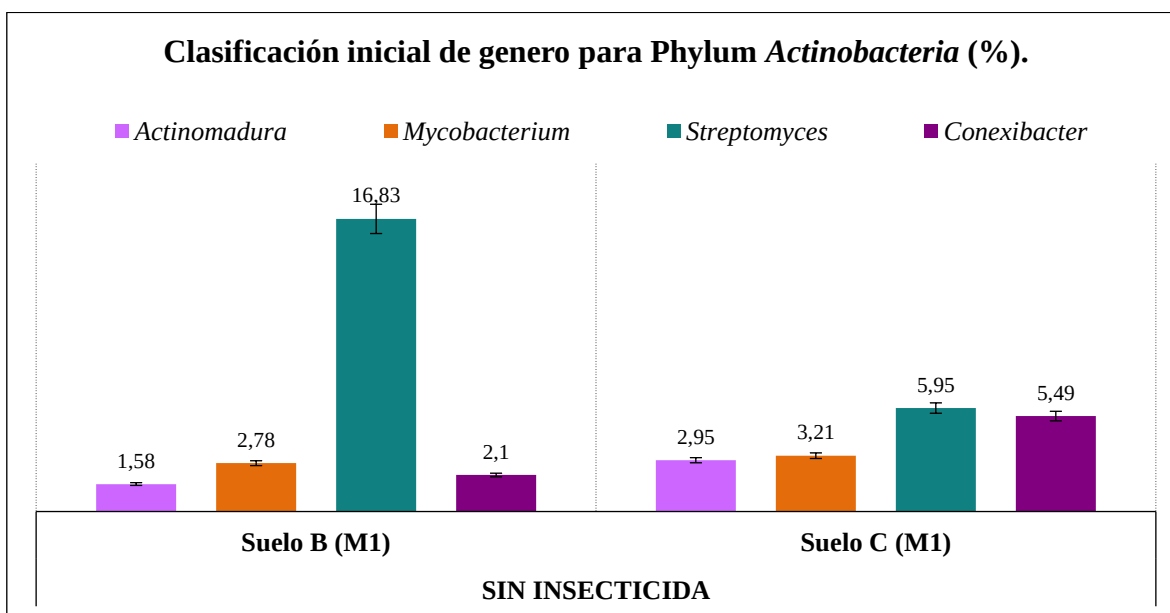


M1- muestra inicial

Fuente: Autores.

En la gráfica 2 se reportan los géneros presentes para el Phyla *Actinobacteria* en los suelos B y C con sus respectivos porcentajes de distribución de las secuencias analizadas.

Grafica 2. Distribución de secuencias de los Géneros del Phylum *Actinobacteria* en suelos B y C.

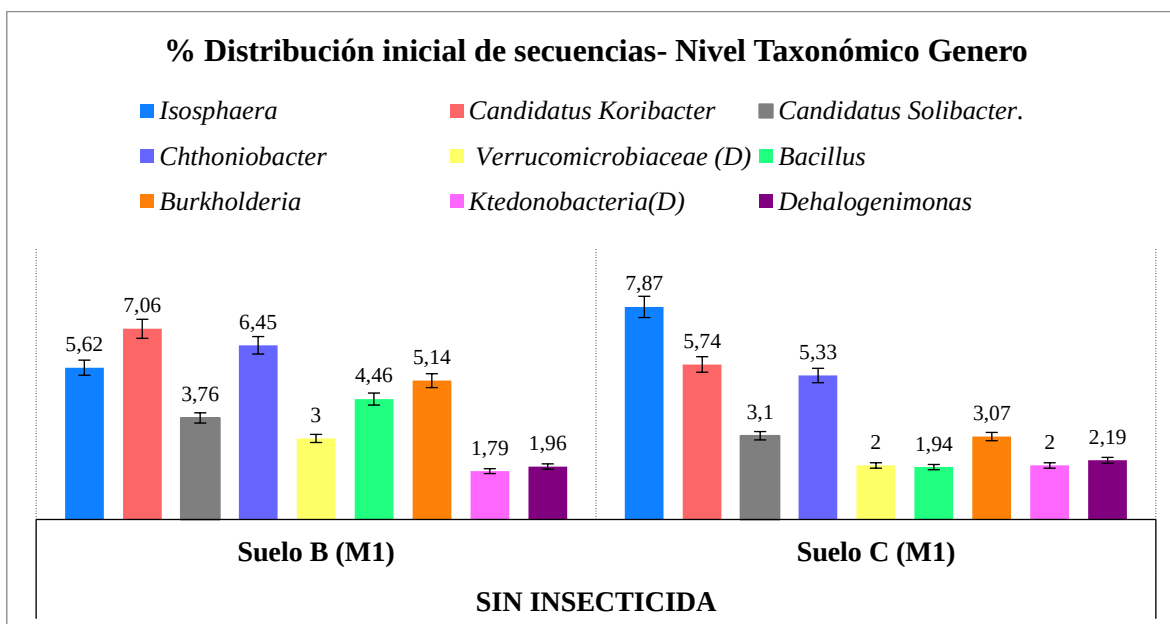


M1- muestra inicial

Fuente: Autores.

La gráfica 3 muestra los géneros relacionados con cada uno de los Phyla identificados con porcentajes de distribución menor al 7,87% (*Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Chloroflexi*).

Grafica 3. Distribución de secuencias de los Géneros en suelos B y C.



Fuente: Autores.

4.3. Verificación de los cambios en las propiedades fisicoquímicas del suelo de interés, después de ser sometido a la fumigación con un insecticida químico y biológico.

En la tabla 4 se resume los cambios fisicoquímicos presentes en los suelos de interés registrados al finalizar tiempo de experimentación.

Tabla 4. Cambios en las propiedades fisicoquímicas de suelos de interés.

Parámetros	Suelo B	Suelo C	Suelo FB	Suelo FQ
Textura	Suelo franco-arcilloso-arenoso	Suelo franco-arenoso.	Suelo franco-arcilloso-arenoso.	Suelo franco-arenoso.
Granulometría	Suelo bien gradado	Suelo bien gradado	Suelo bien gradado	Suelo bien gradado
pH en H₂O	4,38	3,78	3,87	4,63
pH en KCl	3,53	3,39	3,51	4,03
ΔpH	Intercambiador catiónico.	Intercambiador catiónico.	Intercambiador catiónico.	Intercambiador catiónico.

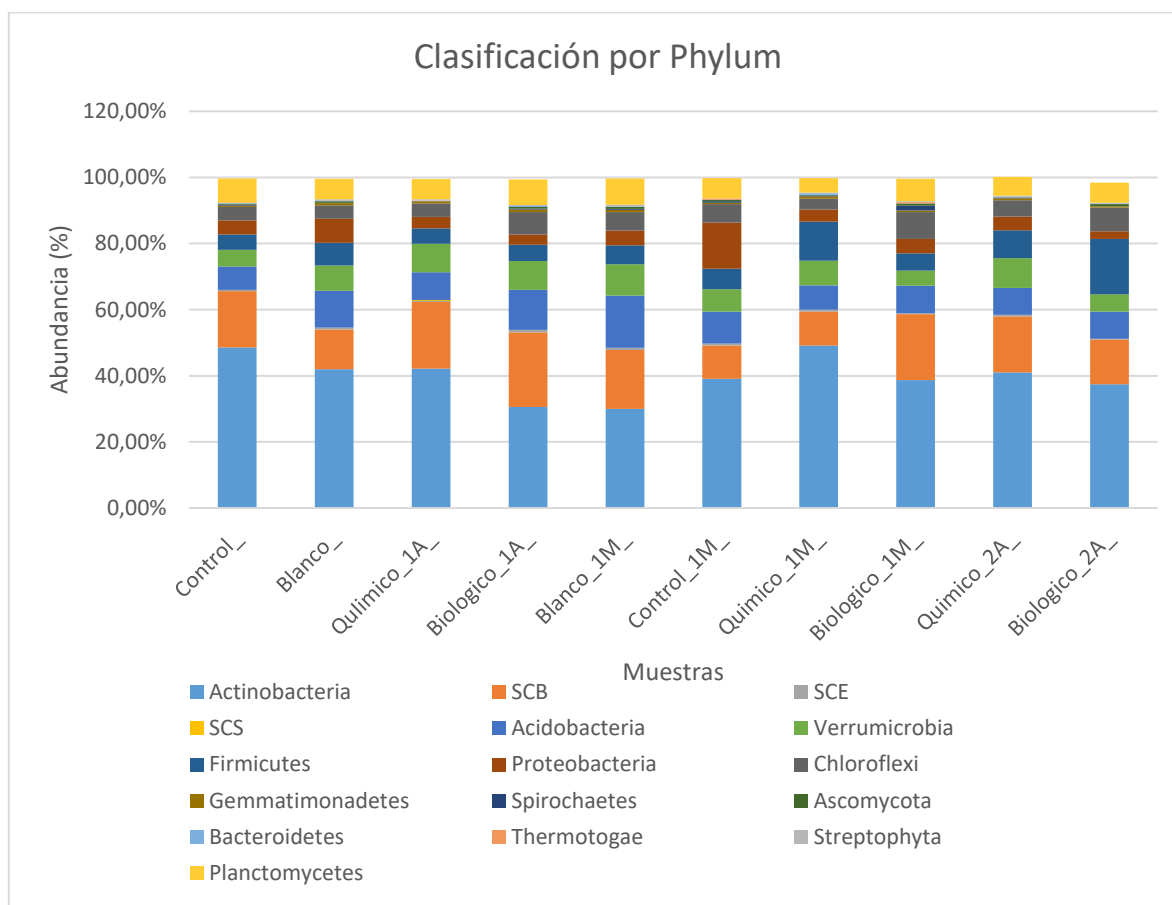
Parámetros	Suelo B	Suelo C	Suelo FB	Suelo FQ
Conductividad Eléctrica	1,17 dS/m	2,44 dS/m	1,82 dS/m	1,85 dS/m
Acidez	3,4 meq/100g	3,13 meq/100g	3,6 meq/100g	3,13 meq/100g
Aluminio intercambiable	2,8 meq/100g	3,3 meq/100g	3,1 meq/100g	2,3 meq/100g
Capacidad de Intercambio Catiónico	7,8 meq/100g	8,8 meq/100g	10,67 meq/100g	9,53 meq/100g
Densidad Aparente	1,43 g/cc	1,35 g/cc	1,52 g/cc	1,38 g/cc
Curva de la pérdida de humedad	Baja capacidad de retención de agua.	Capacidad media de retención de agua.	Capacidad media de retención de agua.	Capacidad media de retención de agua.
Materia orgánica	1,7%	1,9%	2,7%	3,7%
Carbono orgánico (CO)	0,6%	0,72%	0,74%	1,16%
Fosforo total	141 mg PO ₄ /Kg (Alto)	104 mg PO ₄ /Kg (Alto)	136 mg PO ₄ /Kg (Alto)	142 mg PO ₄ /Kg (Alto)
Nitrógeno Total	504 mg NTK/ Kg	532 mg NTK/ Kg	504 mg NTK/ Kg	532 mg NTK/ Kg

Fuente: Autores.

4.4. Verificación de los cambios en las propiedades microbiológicas del suelo de interés, después de ser sometido a la fumigación con un insecticida químico y biológico.

En la gráfica 4 se reportan los resultados de análisis microbiológico en el suelo en transcurso de experimentación en el campo.

Gráfica 4. Clasificación microbiológica por Phylum en las muestras de los suelos de interés



Control_(Suelo C); Blanco (Suelo B); Químico_1A_ (Suelo FQ; muestreo después de la primera aplicación insecticida químico); Biológico_1A_ (Suelo FB; muestreo después de la primera aplicación insecticida biológico); Blanco_1M_ (Tercer muestreo después de un mes); Control_1M_ (Tercer muestreo después de un mes); Químico_1M_ (Tercer muestreo después de un mes); Biológico_1M_ (Tercer muestreo después de un mes); Químico_2A_ (Después de la segunda aplicación de insecticida); Biológico_2A_ (Después de la segunda aplicación de bioinsecticida).

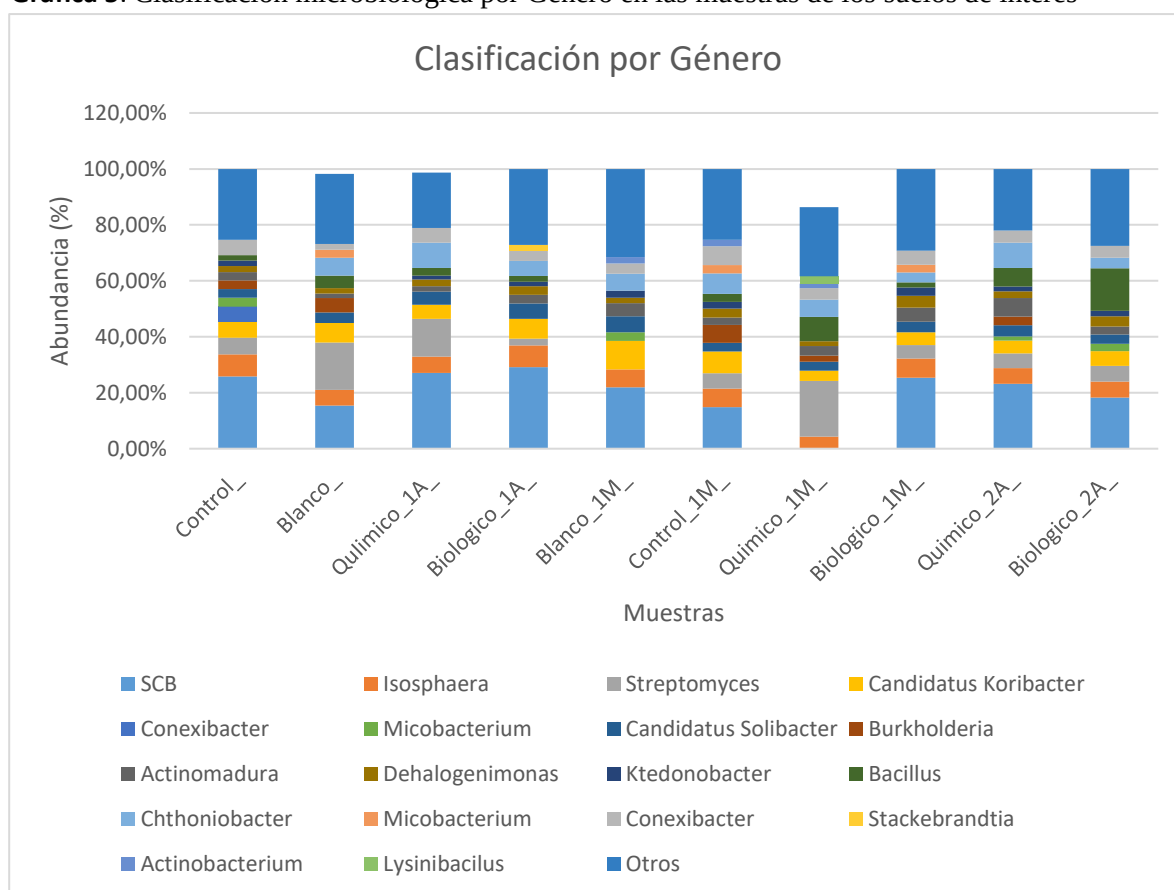
*SCB: Secuencias sin clasificar Bacteria.

*SCE: Secuencias sin clasificar Eucariota.

Fuente: Autores

En la gráfica 5 se ilustra la presencia de diferentes tipos de género a través de tiempo de experimentación en los suelos de interés.

Grafica 5. Clasificación microbiológica por Género en las muestras de los suelos de interés



Control_(Suelo C); Blanco (Suelo B); Químico_1A_ (Suelo FQ; muestreo después de la primera aplicación insecticida químico); Biológico_1A_ (Suelo FB; muestreo después de la primera aplicación insecticida biológico); Blanco_1M_ (Tercer muestreo después de un mes); Control_1M_ (Tercer muestreo después de un mes); Químico_1M_ (Tercer muestreo después de un mes); Biológico_1M_ (Tercer muestreo después de un mes); Químico_2A_ (Después de la segunda aplicación de insecticida); Biológico_2A_ (Después de la segunda aplicación de bioinsecticida).

*SCB: Secuencias sin clasificar Bacteria.

*SCE: Secuencias sin clasificar Eucariota.

Fuente: Autores

5. Discusiones de los resultados

4.1 Propiedades fisicoquímicas iniciales en suelos de interés

Las propiedades fisicoquímicas iniciales de los suelos de interés indicaron valores bajos de pH y alta acidez, lo cual genera la disponibilidad de aluminio intercambiable, así como su posible efecto tóxico que puede ejercer este ion presente en el suelo (Acevedo, 2004). El suelo C al igual que FB y FQ presenta menor pH que suelo B indicando que el cultivo de la piña acidifica el suelo.

La conductividad eléctrica inicial de los suelos B, C, FB y FQ con un valor de 0,6 dS/m a 0,5dS/m se ubicó en un intervalo de 0,35 a 0,65 dS/m lo cual puede clasificarlos como ligeramente salinos (Andrades & Martínez, 2014) y está correlacionado con su característica de ser intercambiadores catiónicos. Lo anterior tiene coherencia con los valores de CIC entre 15,93 meq/100g a 7,97 meq/100g y la materia orgánica reportada entre 2,5% a 1,7%, con los valores de carbono orgánico de 0,98% a 0,61%, catalogando los suelos B, C, FB y FQ como minerales con intermedio CIC.

La textura inicial de los cuatro suelos fue Franco-Arcilloso-Arenosa con porcentajes de arena entre 72,68 y 59,41, limos de 40,57 a 26,98 y gravas entre 0,44 y 0,01. Esto indica que los suelos B, C, FB y FQ no son compactos y pueden retener agua en la fracción de arcilla generando buenas condiciones de desarrollo de cultivo y de los microorganismos en el suelo.

La densidad aparente inicial correspondiente a 1,64 g/cc, supera el valor reportado en la literatura como un valor recomendable para un suelo agrícola, siendo la densidad real cercana al rango de 2,2 a 3,2 g/cc que reporta la literatura como una referencia para este tipo de suelo (USDA, 2014; FAO, 2018).

Los suelos B, C, FB y FQ presentan altos valores de fósforo y bajos de nitrógeno, lo cual requiere una corrección en los suelos con un fertilizante adecuado.

La pérdida de humedad analizada en condiciones de laboratorio a temperatura ambiente, fue más alta para los suelos FB y FQ que en los suelos B y C, siendo esta información importante para efectuar adecuado riego del cultivo.

4.2. Propiedades microbiológicas iniciales en suelos de interés

En la gráfica 1, se observa mayor porcentaje de distribución de las secuencias analizadas de *Actinobacteria* en el suelo C (48,59%) con respecto a suelo B (42,05%), lo cual se puede relacionar con la presencia del cultivo que favorece la actividad microbiana. En general este

grupo de microorganismos es característico para los suelos y representan entre el 20 y 60% de la población microbiana total edáfica y se asocia con los procesos de descomposición de materia orgánica, como la celulosa y la quitina, la transformación de materia orgánica y el ciclo del carbono, permitiendo el suministro de nutrientes al suelo así como la formación de humus. Para el phylum *Actinobacteria*, se identificaron cuatro géneros en los dos suelos, que corresponden a *Actinomadura*, *Mycobacterium*, *Streptomyces* y *Conexibacter* (Ver Gráfica 2). Se observó que en el Suelo C, hay mayor porcentaje de distribución de secuencias de estos géneros que en el suelo B, pero de este comportamiento se aparta el género de *Streptomyces* con un alto porcentaje de distribución de las secuencias correspondiente a 16,83% en el suelo B y mucho menor (5,95%) presente en el suelo C. Considerando que el suelo B tiene un valor de pH más alto (4,7) en comparación con el pH 4,2 correspondiente a suelo C, se cree que la disminución del pH afecta este grupo microbiano, caracterizado por crecer en un rango de pH entre 6,5 y 8,0 (Caceres, 2018)..

En la gráfica 3, se observa que el cultivo de la piña favorece desarrollo de *Planctomycetes* (*Isosphaera*) y *Chloroflexi* (*Ktedonobacteria* y *Dehalogenimonas*), donde los géneros asociados a cada phylum, mostraron mayor porcentaje de distribución en el suelo C en comparación con el suelo B.

4.3. Verificación de los cambios en las propiedades fisicoquímicas del suelo de interés, después de ser sometido a la fumigación con un insecticida químico y biológico.

En la tabla 4 se observa un cambio importante en la textura del suelo FQ, cual de su clasificación inicial franco-arcilloso-arenosa llegó ser franco arenoso, después de un periodo de 8 meses de fumigación con Lorsban, realizado con frecuencia una vez al mes. Comparado esto con el suelo FB, cual fue fumigado con el bioinsecticida cada dos semanas durante el mismo tiempo, se puede visualizar que el producto biológico no alteró la textura de suelo. Los suelos sembrados con la piña (C, FB) han presentado una disminución de pH con la excepción de suelo FQ, cual dentro de la fórmula química del insecticida posee las sustancias amortiguadoras, cuales permiten una nivelación de este parámetro. La conductividad eléctrica del suelo B fue menor que en suelo C sembrado con la piña, en el cual la actividad microbiana está posiblemente asociada con la rizósfera de las plantas y puede introducir sustancias de carácter iónico, resultado de metabolismo bacteriano. Adicionalmente, en los suelos FQ y FB esta producción de cationes o aniones puede ser contrarrestada con los iones contrarios presentes en la fórmula de producto, por lo cual fue menor que en suelo de referencia (C).

La capacidad de Intercambio catiónico en los suelos cultivados con piña osciló entre 8,8 meq/100g y 10,67 meq/100g, lo cual aunque superior que en el suelo B, sin cultivo, se mantuvo en rango de fertilidad baja. Este resultado está coherente con el reporte de materia orgánica y es típico para la zona de muestreo.

Es interesante comportamiento de carbono orgánico, cual aumenta su porcentaje en los suelos fumigados, siendo más alto en el suelo FQ. Es posible que los dos insecticidas se acumulan constantemente, pero el suelo FB demuestra una probable biodegradación al tener un valor más bajo de carbono orgánico que FQ.

El comportamiento de nitrógeno total y fósforo está relacionado con la actividad agrícola y constante fertilización.

4.4. Verificación de los cambios en las propiedades microbiológicas del suelo de interés, después de ser sometido a la fumigación con un insecticida químico y biológico.

En la gráfica 4 se evidencia presencia de los Phylas identificados en las condiciones iniciales del estudio (*Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Chloroflexi* indicando que los insecticidas químico y biológico aplicados no alteraron la riqueza bacteriana en general. De igual manera como en análisis inicial, se puede observar gran porcentaje de *Phylum Actinobacteria*, cuales se mantiene en el suelo después de la fumigación pero, a medida que transcurre el tiempo se puede observar disminución del porcentaje de distribución (aproximadamente 10%) de este Phylum en los suelos B y C. En contraste el suelo FB aumenta este porcentaje mientras que suelo FQ lo mantiene igual con respecto a la muestra inicial. Considerando que estos microorganismos se caracterizan por los amplios hábitats que abarcan, principalmente los suelos de cultivos, cumpliendo funciones de vital importancia para el desarrollo de la planta, suministrando los nutrientes y permitiendo la formación de humus, así como aumentando la diversidad microbiana en la rizosfera (Ranjani, 2016) es importante evidenciar su permanencia en estos suelos. Un significativo porcentaje de bacterias presentan phylum sin clasificar. Esto se debe a que la técnica de metagenómica permite identificar un gran número de bacterias, cuales no han sido aún aislados y cultivados para ser estudiados a nivel de laboratorio. Al igual que el *Phylum Actinobacteria*, las *Acidobacterias* fueron elevados en las muestras analizadas. Estos microorganismos tiene la capacidad de desarrollarse en cualquier tipo de hábitats, en especial en los suelos, llegando a representar el 52% de la comunidad bacteriana total (Dumbar *et al.*, 2002). Para determinar su ecología y actividad ha sido necesario el uso de herramientas metagenómicas, esto debido a las dificultades presentadas durante su cultivo en el laboratorio (Eichorst, 2011; Navarrete, 2013). Se han caracterizado por emplear el carbono presente en el medio para sus actividades metabólicas, su asimilación de nitrógeno y por participar en el metabolismo del hierro, además tienen efectos antimicrobianos, favoreciendo a ciertas comunidades microbianas y las plantas (Mendes, 2014). Por su amplia capacidad de degradación de polisacáridos, se denominan degradadores de materia orgánica, incluyendo la quitina, la celulosa y el xilano (Dumbar, 2002).

En la gráfica 5 se puede observar que el suelo FQ, evidencia disminución de los géneros *Isosphaera*, *Candidatos Koribacter* y *Conexiobacter* después de aplicar la fumigación, lo cual se podría relacionar con las condiciones tóxicas que imparte el insecticida. 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 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 toxico 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.

Se destaca un significativo aumento de *Bacillus* en la última muestra del suelo FB un día después de la fumigación del bioinsecticida (1,89% a 15,26%). Esto podría indicar asimilación de componentes del bioinsecticida como fuentes de carbono primario para su metabolismo. Diferentes estudios demuestran que el género *Bacillus* cumple funciones que ocasionan una conservación y equilibrio del suelo causando el crecimiento vegetal de los suelos erosionados. Por lo anterior, *Bacillus* es uno de los principales biorremediadoras en este tipo de suelos en la agricultura. Adicionalmente, debido a la capacidad de solubilización de fosfatos, cual logra la liberación de iones de fosfato permite la asimilación de estos iones para el crecimiento de la planta. El crecimiento de esta especie es óptimo en pH ácidos-neutros y se desarrolla en diferentes temperaturas lo cual concuerda con el pH de este suelo 3,9 en M5 (Corrales, 2014).

Conclusiones

Los suelos fumigados con insecticidas aportan cambios significantes en algunas de las propiedades fisicoquímicas con respecto a las condiciones que se reportaron al inicio. Se destaca el cambio de textura de Franco-arcilloso-arenoso a Franco-arenoso del suelo fumigado con insecticida químico, cual se deteriora a través de constantes aplicaciones de Lorsban 4 EC. En contraste la textura de suelo fumigado con bioinsecticida se mantiene la misma durante el tiempo de experimentación.

Las propiedades fisicoquímicas iniciales de los suelos de interés indican condiciones acidas con bajos valores de pH (4,25 a 4,65) y un nivel de aluminio intercambiable mayor a 1ppm, lo cual señala que se puede ejercer la toxicidad de este ion en el suelo. Los bajos valores de carbono orgánico total (0,61% a 0,98%) y de la materia orgánica presente en un rango de 1,7 % a 2,5 %, junto con los bajos valores de nitrógeno total (420 a 476 mg NKT/Kg), señalan

los suelos de baja fertilidad con la necesidad de una fertilización constante.

A través de análisis de carbono orgánico total en el suelo FQ, cual aumenta su concentración de un valor inicial de 0,98% a 3,7%, se deduce la acumulación de Lorsban 4 EC en este suelo a través de su constante fumigación al igual que en el suelo FB, cual presenta cambio de este parámetro de 0,96% a 2,7%.

Los microorganismos identificados en las muestras analizadas sugieren una población poco diversa, y constante a lo largo del estudio de los Phyla, eso quiere decir que la aplicación del insecticida químico y/o biológico no incide sobre la presencia o ausencia de las poblaciones señaladas.

Los cambios en las características físico químicas del suelo no afectan notoriamente la distribución poblacional a lo largo del estudio. Los Phylum *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Chloroflexi* son habitantes frecuentes de suelo y sus actividades se asocian a los ciclos biogeoquímicos y degradación de materia orgánica en lo que se presume es una composición típica de suelo cultivado con *Ananás comosus*.

Para la microbiota descrita en el estudio de los Phylas, no hay variación alguna posterior a la aplicación de los insecticidas a pesar de los cambios señalados en las propiedades físico-químicas del suelo, lo que sugiere que la prevalencia se deriva de las estructuras de resistencia e interacciones ecológicas dadas al interior de las poblaciones microbianas.

El análisis metagenómico demostró que la microbiota encontrada en los suelos de interés corresponde a microorganismos presentes en el suelo y cuyo nicho ecológico se asocia a los procesos de descomposición, reciclaje de nutrientes y formación del suelo, pero no se evidencia la diferencia notoria entre los suelos fumigados con los insecticidas evaluados.

Recomendaciones y limitaciones

Se recomienda realizar una metagenómica funcional, para generar más información sobre el comportamiento de los microorganismos y sus efectos, para aportar al manejo de las condiciones agro ecológicas asociadas al cultivo.

Se recomienda ampliar el estudio a otros suelos, con cultivos diferentes e involucrar otras disciplinas para tener panorama completo de un cultivo y evaluar los procesos de metagenómica del suelo en un tiempo más largo que en este estudio.

Se sugiere para el análisis metagenómico el uso y aplicación de diferentes bases de datos para refinar la identificación de Phylum y géneros.

Referencias Bibliográficas

Acevedo, O. (2007). *Aluminio, un indicador de calidad ambiental, en suelos de carga variable*. México: UAEH.edu. Disponible en: https://www.uaeh.edu.mx/nuestro_alumnado/icbi/doctorado/documentos/Aluminio%20un%20indicador%20de%20calidad.pdf

Andrades, M., Martínez, M., 2014. Fertilidad del Suelo y Parámetros que lo definen- Material Didáctico Agricultura y Alimentación, Universidad de la Rioja, 3ª ed. Iberus p 18.

Arellano, G., Vergara, C. & Bello, S. (2015). Plagas entomológicas y otros artrópodos en el cultivo de la piña (*Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merr., Coppens & Leal) en chanchamayo y satipo, departamento de Junín, Perú. *Ecología Aplicada*, 14(2), 175-189.

Autoridad Nacional De Licencias Ambientales (ANLA). 2011. Resolución Numero 73. Dictamen Técnico Ambiental para el Producto Formulado Lorsban 4EC.

Autoridad Nacional De Licencias Ambientales (ANLA). 2011. Resolución Numero 70. Dictamen Técnico Ambiental para el Producto Formulado Vexter 550EC.

Autoridad Nacional De Licencias Ambientales (ANLA). 2012. Resolución Numero 0323. Dictamen Técnico Ambiental para el Producto Formulado Rimón Duo.

Autoridad Nacional De Licencias Ambientales (ANLA). 2017. Resolución Numero 01146. Dictamen Técnico Ambiental para el Producto Formulado Eredamix 247 SC.

Casanova, H. (2002). Insecticide formulations based on nicotine oleate stabilized by sodium caseinate. *Journal of agricultural and food chemistry*. 6389-6394.

Caceres, I., Snini, S., Puel, O., Mathieu, F., 2018. *Streptomyces roseolus*, A Promising Biocontrol Agent against *Aspergillus Flavus*, the Main Aflatoxin B₁ Producer. *Toxins*, disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6267218/>

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>

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.

Corrales, L., Arévalo, Z., & Moreno, V. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *SciELO*, 12, pp. 68-79.

Cueto, M.; Fuente, N. & Luévanos, M. (2014). Metagenómica: concepto y aplicaciones en el mundo microbiano. México. Cuerpo Académico Ciencias Biológicas Aplicadas Recuperado

de

https://www.researchgate.net/publication/301890708_Metagenomica_Concepto_y_Aplicaciones_en_el_Mundo_Microbiano

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>.

Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). 2015. Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria. Número 54. Obtenido de <https://goo.gl/9VrH3a>.

DANE. (12 de 2016). Principales características del cultivo de la Piña. Boletín mensual Insumos y Factores Asociados a la Producción Agropecuaria, pág. 54.

Dunbar J, Barns SM, Ticknor LO, Kuske CR. 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl Environ Microbiol* 6: 3035-3045

FAO. (2018). Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Obtenido de <http://www.fao.org>

Fondo para el Financiamiento del Sector Agropecuario (FINAGRO). (2013). *Piña: superficie cosechada, producción y rendimiento*. Bogotá. FINAGRO Recuperado de https://www.finagro.com.co/sites/default/files/node/basic-page/files/pina_-_anuario_2013_aprobado.pdf

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.

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.

IHOBE. (1998). Guía metodológica para la investigación de la contaminación del suelo. En S. p. ambiental. Reprografía LANKOPI, S.A.

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.

Jiménez, J. 1999. Manual práctico para el cultivo de piña de exportación. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. Pág. 106- 109.

Kopytko, M., & Mujica, L. (2007). Bioinsecticida alternativa para eliminación de piojo blanco en cultivos de piña. *Universitas Científica*, 20-25.

León, H., Sepulveda, V., & Monqueda, O. (2010). Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Revista internacional de botánica experimental*, 133-139.

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>.

Mujica, L (2008).” Estudio del efecto de la nicotina y capsaicina como bioinsecticida, para la disminución progresiva de *Dysmicoccus Brevipes* en cultivos de piña, en la finca Bonanza del Municipio de Giron, Santander.Universidad, Trabajo de Grado, Pontificia Bolivariana-Seccional Bucaramanga.

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.

Ranjani Anandan, Dhanasekaran Dharumadurai y Gopinath Ponnusamy Manogaran (11 de febrero de 2016). Una introducción a Actinobacteria, Actinobacteria, Dharumadurai Dhanasekaran y Yi Jiang, IntechOpen, DOI: 10.5772 / 62329.

Red de Acción en Plaguicidas del Reino Unido. (2009). Catálogo de listas de plaguicidas que identifican aquellos asociados con impactos particularmente dañinos para la salud o el medio ambiente. Uruguay: RAPAL: La Lista de Listas 3^{ra} ed.

Romero, M. (2017). Efecto de productos químicos y orgánicos para el control de cochinilla harinosa, (*Dysmicoccus brevipes*,*Pseudococcidae*) en rambutan,nuevo prograso, san marcos. Guatemala: Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas.

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.

Vindas, A., & Blanco, H. (2013). Control de *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: *Pseudococcidae*),. *Agronomía Costarricens*, 103-111.

Wilson, M. C., & Piel, J. (2013). Metagenomic approaches for exploiting uncultivated bacteria as a resource for novel biosynthetic enzymology. *Chemistry & Biology*, 20(5), 636–647.