

Identificación de microorganismos asociados al suelo, sustrato y agua de un sistema productivo de *Cannabis sativa* L.

Identification of microorganisms associated with the soil, substrate and water of a *Cannabis sativa* L. production system.

Manuel Alfonso Patiño Moscoso¹

Gustavo Adolfo Rodríguez Yzquierdo¹; Mónica Betancourt Vásquez¹

Recibido para publicación: 25 de mayo de 2022 - Aceptado para publicación: 03 de junio de 2022

RESUMEN

El cultivo de cannabis medicinal ha tomado una gran importancia en los últimos años en Colombia y en otros países de Latinoamérica. Dadas las características de producción del cultivo, que se basa fundamentalmente en modelos orgánicos, es importante conocer los microorganismos que acompañan el sistema de producción y sus posibles implicaciones en el manejo. En este trabajo se aislaron y caracterizaron los microorganismos en las diferentes fases de producción de un cultivo de cannabis en alta densidad: plantulación, o áreas de propagación, lotes de producción y las áreas de poscosecha (presecado de flor); en cada una de estas áreas se tomaron muestras de: suelo, sustratos y agua y se identificaron los microorganismos presentes, por siembra directa en medios de cultivos, empleando identificación microscópica y caracterización molecular. Se encontró una alta diversidad en todas las áreas de producción y se evidenció que los microorganismos benéficos (*Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp.) aplicados al sistema productivo ayudan a regular las poblaciones de los microorganismos en el suelo y en los sustratos. Se identificó que la perlita y la fibra de coco favorecen el desarrollo de las poblaciones de microorganismos solubilizadores de fósforo y fijadores de nitrógeno y que la producción de compost a partir de los desechos del cultivo es fitosanitariamente seguro. No se identificó en ninguna de las muestras evaluadas poblaciones de patógenos en niveles que pudieran explicar la presencia de enfermedades en el cultivo.

Palabras clave: Microorganismos; Cannabis; Suelo.

ABSTRACT

Cultivation of medicinal cannabis has become important in recent years in Colombia and other Latin American countries. Considering the production characteristics of the crop, which is fundamentally based on organic models, it is important to know the microorganisms associated with the production system and their possible implications for management. In this research, microorganisms were isolated and characterized in different growth phases of a high-density cannabis crop: planting, or propagation areas, production areas, and postharvest areas (pre-drying flowering). Samples of soil, substrates and water were taken, and the present microorganisms were identified by direct sowing in culture media, using microscopic identification and molecular characterization. A high diversity was found in all production areas, and it was evidenced that beneficial microorganisms (*Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp.) applied to the production system regulate the microorganism populations in soil and substrates. It was identified that perlite and coconut fiber allow increasing populations of phosphorus solubilizing and nitrogen fixing microorganisms. Compost from crop remains is safe at a sanitary level. No pathogen populations at disease levels for the crops were identified in samples.

Key words: Microorganisms; Cannabis; Soil.

Cómo citar

Patiño, M. M., Rodríguez, G. A. y Betancourt, V. M. 2022. Identificación de microorganismos asociados al suelo, sustrato y agua de un sistema productivo de *Cannabis sativa* L. Temas Agrarios 27(1): 272-286.
<https://doi.org/10.21897/rta.v27i1.3111>



Temas Agrarios 2022. Este artículo se distribuye bajo los términos de la Licencia Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.es>), que permite copiar, redistribuir, remezclar, transformar y crear a partir del material, de forma no comercial, dando crédito y licencia de forma adecuada a los autores de la obra.

INTRODUCCIÓN

En Colombia el cultivo de Cannabis (*Cannabis sativa* L.) con fines medicinales representa una alternativa productiva muy importante para Colombia, la cual se encuentra enmarcada en la Ley 1787 de 2016. Antes del año 2000 el uso lícito del cannabis estaba limitado a la investigación científica. Sin embargo, a partir de esa fecha muchos países desarrollaron legislaciones para aprobar su uso medicinal, generando un aumento considerable de la producción. Para el año 2000 la producción mundial se estimó en 1,4 toneladas (ton), mientras que para el año 2017 se registraron 406,1 ton (Ramírez, 2019).

Las plantas de cannabis contienen varios tipos de cannabinoides, dentro de los más conocidos están: tetrahidrocannabinol (THC), y el cannabidiol (CBD). Mientras que el THC tiene efectos psicoactivos el CBD tiene nula o baja psicoactividad; pero tiene un alto potencial para el manejo y la disminución del dolor asociado a diferentes enfermedades en humanos (Zuardi, 2006, André *et al.*, 2016, Sharafi *et al.*, 2019,) y por esta razón, su cultivo empieza a expandirse rápidamente en Colombia y en otros países del mundo (Adesina, *et al.*, 2020).

El Cannabis con fines medicinales puede ser cultivado a libre exposición o en condiciones protegidas. Sin embargo, para la producción de aceites u otros derivados farmacéuticos a base de cannabidiol es muy común que se usen espacios controlados que permiten regular parámetros ambientales como: luz (cantidad y calidad), temperatura, humedad relativa, fotoperiodo y el nivel de dióxido de carbono, implicados directamente en los niveles y concentración del CBD. Además, para masificar los procesos de producción en general se utilizan cultivos a alta densidad y ciclos continuos, con manejos intensivos en condiciones controladas (Chandra *et al.*, 2020).

Este tipo de sistemas de producción en condiciones intensivas y controladas, tienen como desventaja que favorecen la aparición de plagas y enfermedades, las cuales pueden volverse endémicas, debido a la alta uniformidad genética y a las condiciones favorables climáticas para el desarrollo de patógenos foliares y del suelo (Chandra *et al.*, 2010, Chandra, *et al.*, 2011). Para el caso de Cannabis esta condición es muy limitante, debido a que existen numerosos reportes que indican que las aplicaciones de plaguicidas pueden afectar la acumulación y calidad de contenidos de CBD o pueden generar contaminaciones de metales pesados en las inflorescencias afectando el uso y consumo para los humanos (Montoya *et al.*, 2020, Amendola *et al.*, 2021), lo cual limita y dificulta considerablemente el manejo agronómico y sanitario de los cultivos.

Muchos de los sistemas productivos de cannabis requieren una fase previa en la multiplicación del material vegetal denominada comúnmente plantulación, en esta etapa se requieren sustratos para la propagación del material vegetal en forma asexual y es una fase crítica por las posibles pérdidas que ocurren debido a problemas sanitarios. De igual modo, en condiciones protegidas, durante la fase de trasplante, se emplean sustratos como lana de roca o fibra de coco en mezcla con abonos orgánicos y suelo (Chandra *et al.*, 2020; Punja, 2021). Las características microbiológicas de estos sustratos pueden tener efectos en el tipo de patógenos o plagas presentes en los cultivos y, por lo tanto, determinar su composición microbiológica es importante dentro del manejo integrado del sistema (Punja, 2021).

Los microorganismos presentes se convierten en un componente fundamental del funcionamiento de un sistema productivo. Las plantas exhiben una diversa gama de interacciones con estos organismos que habitan en el suelo,

que abarcan un gran rango de posibilidades ecológicas (competitivas, explotadoras, neutrales, comensales, mutualistas) (Jacoby *et al.*, 2017). Por lo tanto, es necesario comprender la comunidad de microorganismos presentes en el suelo y sustratos para desarrollar estrategias de prevención y control más eficientes (Zheng *et al.*, 2020). Por su parte, la calidad del agua en sistemas intensivos de cannabis es un elemento primordial para; por una parte, contar con una adecuada eficacia de los controladores biológicos que normalmente son aplicados, y por otra, evitar dispersión de problemas sanitarios por el uso de aguas de inadecuada calidad en términos de presencia de microorganismos patogénicos en labores tales como riego o aplicación de bioinsumos al cultivo (Sutton *et al.*, 2006, Punja, 2021).

La caracterización de estos microorganismos, acompañada de un diagnóstico acertado de los agentes causales de las enfermedades, así como su posible fuente de ingreso en todas las etapas de producción, cosecha y postcosecha, contribuyen significativamente a la generación de estrategias encaminadas al mejoramiento de la eficiencia productiva, el aseguramiento de la calidad y la inocuidad del producto. Así mismo es necesario caracterizar y comprender las funcionalidades y asociaciones de los microorganismos potencialmente benéficos presentes en las diferentes fases productivas y los insumos empleados en ellas, con el fin de mejorar las prácticas agrícolas, el desempeño agronómico de los materiales y el rendimiento en la cantidad y calidad de cannabinoides (Taghinasab y Jabaji, 2020).

Por lo anteriormente señalado, el objetivo del este trabajo fue aislar, caracterizar, identificar y conservar microorganismos asociados al suelo, sustratos y aguas en un sistema productivo de cannabis con fines farmacéuticos, con el fin de avanzar en el entendimiento de lo que significan las comunidades de microorganismos presentes para la producción integrada y eficiente de este cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en un cultivo del departamento de Antioquia, caracterizado por su producción bajo invernadero, en suelo suplementado con materia orgánica y en altas densidades. El cultivo de cannabis bajo invernadero, en general se caracteriza por tener diferentes etapas en la producción: plantulación, o áreas de propagación, lotes de producción y las áreas de poscosecha (presecado de flor), en cada una de estas áreas se tomaron muestras de: suelo, sustratos y agua, mensualmente por un periodo de 12 meses, con el fin de caracterizar los microorganismos presentes y su relación con la presencia de enfermedades en el cultivo o el establecimiento de los organismos benéficos aplicados en el sistema.

Para el caso de suelo, se tomaron muestras compuestas provenientes de las áreas de producción; cada submuestra correspondió a 10 gramos por planta, tomada a nivel radicular y al azar dentro de la plantación, para un total de 100 gramos que se evaluaron en cada muestreo. Dado que las muestras fueron tomadas en diferentes momentos y tiempos de producción, para el caso de suelos se tuvieron dos tipos de muestras: a) suelos recién inoculados que se utilizaban para la preparación de sustratos (la inoculación consistía en una aplicación de benéficos a base de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp., con un protocolo confidencial de la empresa y suelos de las áreas de producción que podían recibir aplicaciones de organismos benéficos u otros productos según el estado del cultivo y la presencia de plagas y enfermedades.

Para el caso de sustratos se tomaron en las áreas de plantulación, muestras directamente de los sacos que se usaban para rellenar las bandejas. El sustrato estaba compuesto por turba, fibra de coco, perlita y compost en relación (1:1:1:0,5). Las muestras de agua se tomaron de las distintas fuentes de riego, en momentos diferentes de un día de trabajo.

En la finca en evaluación se preparaba compost a partir de los desechos de la misma planta de cannabis (podas de formación, podas sanitarias y residuos de cosecha), más la adición de organismos benéficos (organismos eficientes y *Trichoderma* spp.) y por lo tanto, era importante conocer si el compost podría tener implicaciones en la dispersión de enfermedades dentro del cultivo. Se tomaron muestras del compost provenientes de diferentes partes de la pila; teniendo cuidado de tomar siempre de aquellas que habían culminado su proceso de maduración y empezaban usarse para la preparación de sustratos o enmiendas orgánicas. Cada muestra estaba compuesta de 10 submuestras de 100 gramos, para un total de 1 kilo de muestra de trabajo. Se tomaron muestras en cuatro momentos diferentes que corresponden en adelante a las muestras de Compost 1 a 4.

Cada material fue procesado de manera diferencial como se describe a continuación.

Procesamiento de muestras

Suelo, compost y sustratos:

Se suspendió 1 g de la muestra en 9 ml de solución salina NaCl al 0,85%. La suspensión se dejó en agitación durante 1 hora para posteriormente realizar diluciones seriadas. De las diluciones 10^{-2} a 10^{-5} se sembraron 100 μ L por caja por triplicado en medios Potato Dextrosa Agar (PDA) + Tritón (100 μ L/L) + Cloranfenicol (- 0,05 g/L) para hongos, Agar Nutritivo para bacterias, tripticasa de soya para actinomicetos, Ashby (bacterias presuntivas fijadoras de nitrógeno) y SMRS (bacterias presuntivas solubilizadoras de fósforo) (Becerra *et al.*, 2011; Betancur, 2018; López *et al.*, 2010).

Agua: Las muestras de agua tomadas, fueron procesadas en diluciones 100 a 10^{-2} , las cuales se sembraron por triplicado en medio PDA + Tritón + Cloranfenicol y Agar Nutritivo (100 μ L por caja).

Estas se incubaron en oscuridad a 25°C durante 7 días. Día en el cual se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia en cada una de las diluciones. Se realizaron improntas de los aislamientos fúngicos, puros para observar al microscopio estructuras características de los hongos (Langvad, 1980). Se realizó además Tinción de Gram a los aislamientos bacterianos (O'Toole, 2016).

Caracterización de los aislamientos

Las colonias puras de cada uno de los aislamientos fueron caracterizadas morfológicamente (macroscópica y microscópica) y molecularmente. Se realizó extracción de ADN siguiendo la metodología propuesta por Griffith y Shaw, (1998) para hongos y el Kit UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit para bacterias (Mobio Technologies Inc.). Posteriormente se realizó amplificación por PCR empleando los primeros ITS1F-ITS4 (ITS1-F 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' y ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para hongos y 27F-1492R (27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') para bacterias. Las secuencias resultantes fueron comparadas con la región ITS1-5.8S-ITS2 (hongos) y del Gen ARNr 16s (bacterias) correspondiente de las secuencias de la Base de datos GenBank del Centro Nacional para La Información Biotecnológica (NCBI).

Los biotipos de hongos y bacterias se encuentran actualmente conservados en medio PDA y Agar nutritivo a 4°C (3 copias de cada aislamiento) y en Crioviales en solución de crioconservación (Glicerol 20% y Peptona al 0.5%) a 80°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras Compost 1 y Compost 2 presentaron la mayor concentración de hongos totales, en el orden de los 3 a 5 millones de UFC por gramo de sustrato. Así mismo la

muestra de Compost 3 al momento de su recolección evidenció la mayor concentración de bacterias mesófilas con aproximadamente 124 millones de UFC por gramos de sustrato. La muestra de Compost 4 mostró una disminución significativa de la concentración de hongos y bacterias totales (Tabla 1 y Figura 1).

Los análisis microbiológicos indicaron la presencia de bacterias en el sustrato perlita, y de hongos y bacterias en la muestra de coco, lo cual puede considerarse normal, dado que los proveedores del material no garantizan su esterilización, por lo tanto, este tipo de sustratos pueden contener importantes concentraciones de microorganismos.

Adicionalmente diversos reportes indican que es frecuente encontrar hongos y bacterias lignocelulolíticas capaces de degradar la fibra de coco, o incluso estar presentes de forma latente mediante estructuras de resistencia (endosporas para el caso de bacterias como bacilos y cocobacilos) a la espera de condiciones adecuadas para su crecimiento (Gupta *et al.*, 2016). Los datos encontrados, parecen indicar que la fibra de coco, la turba y el compost, están contribuyendo significativamente en el enriquecimiento de la microbiota benéfica en las mezclas de suelo inoculado con poblaciones de solubilizadores de fósforo y fijadores de nitrógeno. Probablemente las condiciones de escasas de nutrientes en el sustrato de coco favorecen la selección de este tipo de microorganismos benéficos (Filippidou *et al.*, 2016).

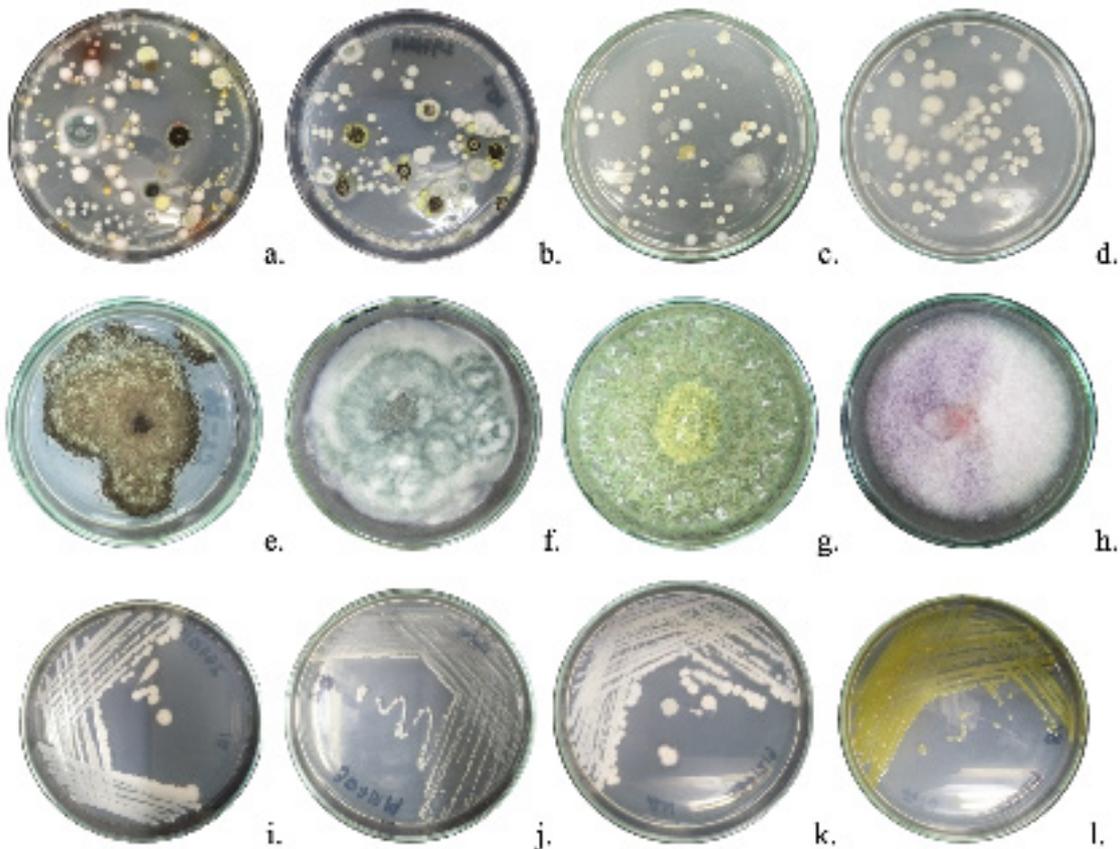


Figura 1. Crecimiento de algunos hongos y bacterias aisladas de sustratos y aguas en sistema productivo de Cannabis medicinal. A. UFC de hongos en Compost 2 b. UFC de hongos en fibra de coco c. UFC de bacterias en mezcla de suelo inoculado d. UFC de bacterias en perlita e. Colonia de *Aspergillus niger* f. Colonia de *Penicillium roseomaculatum* g. Colonia de *Trichoderma longibrachiatum* h. Colonia de *Fusarium oxysporum* i. Colonia de *Bacillus pumilus* j. Colonia de *Lysinibacillus sphaericus* k. Colonia de *Bacillus aerius* l. Colonia de *Lysinibacillus fusiformis*.

Las muestras de Compost 1 y Compost 2, evidenciaron la mayor diversidad de hongos con 7 biotipos diferentes y la muestra de Compost 3, mostró la mayor diversidad de bacterias con 6 biotipos caracterizados (Tabla 2 y Tabla 3). Ya que el compostaje es un proceso biológico llevado a cabo por microorganismos, estos hallazgos parecen ser coherentes e indicadores de un proceso adecuado de

compostaje que está favoreciendo la riqueza de diferentes especies (Cao *et al.*, 2019). El mayor porcentaje de aislamientos obtenidos correspondió a *Penicillium* y *Lysinibacillus*; organismos ubicuos, presentes en gran diversidad de ambientes igual a lo descrito por Christian *et al.*, 2019, Yadav *et al.*, 2017.). (Tabla 2 y Tabla 3).

Tabla 1. Recuento de unidades formadoras de colonia en muestras de aguas y sustratos.

Muestra	Unidades	Hongos totales	Bacterias totales	Actinos	Solubilizadores P	Fijadores N
Compost 1	UFC.g ⁻¹	4,97 x 10 ⁸	-	-	-	-
Compost 2	UFC.g ⁻¹	2,40 x 10 ⁶	-	-	-	-
Compost 3	UFC.g ⁻¹	3,15 x 10 ⁴	1,24 x 10 ⁸			
Compost 4	UFC.100ml ⁻¹	3,67 x 10 ³	8,06 x 10 ⁶	<100	1,4 x 10 ⁶	> 10000
Perlita	UFC.g ⁻¹	<1000	6,33 x 10 ⁵	-	-	-
Coco	UFC.g ⁻¹	1,47 x 10 ⁵	9,57 x 10 ⁷	0	5,1 x 10 ⁵	1,23 x 10 ⁷
Turba	UFC.g ⁻¹	7,63 x 10 ⁴	5,57 x 10 ⁷	6,67 x 10 ³	4,1 x 10 ⁴	9,33 x 10 ⁵
Mezcla suelo inoculado	UFC.g ⁻¹	8,88 x 10 ⁴	6,7 x 10 ⁷	0	3,00 x 10 ⁵	3,93 x 10 ⁶
Suelo Bloque producción	UFC.g ⁻¹	7,38 x 10 ⁴	1,9 x 10 ⁷	3,67 x 10 ³	6,00 x 10 ⁵	1,49 x 10 ⁷
Agua confinamiento	UFC.100ml ⁻¹	<10	3,57 x 10 ³	-	-	-
Agua cruda	UFC.100ml ⁻¹	<10	1,10 x 10 ⁴	-	-	-

UFC.g⁻¹: Unidades formadoras de colonia por gramo de sustrato; UFC.100ml⁻¹: Unidades formadoras de colonia por 100 ml de suspensión. Los datos corresponden a la media de tres repeticiones en tres ensayos repetidos en el tiempo.

En la muestra de Compost 1 se encontraron 7 biotipos de hongos filamentosos diferentes, los cuales por caracterización molecular correspondieron a los géneros *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Plectosphaerella* sp., *Rasamsonia* sp., *Geomyces* sp., entre otros. Estos son géneros de hongos ubicuos, habitantes comunes de suelos. Solo los aislamientos de *Cladosporium* sp. podrían representar una amenaza potencial en caso tal que fueran considerados patógenos en la especie *Cannabis sativa* (Punja *et al.*, 2019, Punja *et al.*, 2018)

En ninguno de los sustratos, compost o suelos evaluados se aislaron biotipos de los géneros *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Cercospora* sp., *Sclerotinia* sp., los cuales se han reportado frecuentemente como patógenos en plantas de *Cannabis sativa* (Punja *et al.*, 2019) y los cuales además eran considerados las principales limitantes del cultivo en evaluación. Considerando que el compost que se utiliza en sistema productivo se obtiene a partir del procesamiento del material de cosecha (hojas, tallos) de plantas enfermas y/o sanas, este resultado indica que el proceso de compostaje se está haciendo correctamente y que se está cumpliendo con

las fases que garantizan la calidad microbiológica del compost (De Corato, 2020). De igual forma en la muestra Compost 3, cinco de los 6 biotipos aislados de bacterias fueron bacilos Gram + esporulados lo cual es otro indicador del correcto proceso de compostaje efectuado en la finca (Tabla 3), Durante la etapa termofílica de compostaje poblaciones de bacterias patógenas (En su mayoría Gram-) se reducen y solo aquellas capaces de generar estructuras de resistencia como endosporas (Gram+) sobreviven (Chandna *et al.*, 2013). La presencia de bacilos aerobios Gram + esporulados (BAFES) en las muestras de Compost también podrían estar relacionados con la aplicación de algún inoculante a base de *Bacillus* spp. que era de común uso en el sistema productivo evaluado.

La riqueza de hongos encontrados en la muestra de compost 3 fue significativamente más baja que en las muestras de Compost 1 y Compost 2 (Tabla 2). En esta muestra solo se encontraron dos morfotipos pertenecientes a los géneros *Plectosphaerella* sp. y *Aspergillus* sp. (Tabla 2). La prevalencia de Bacilos Gram + esporulados en la presente muestra es un indicador más del proceso adecuado de compostaje como se ha mencionado anteriormente donde solo las bacterias mesófilas que presenten estructuras de resistencia o latencia pueden sobrevivir a las etapas termofílicas de compostaje (Chandna *et al.*, 2013).

En la fibra de coco se aislaron biotipos que por caracterización molecular pertenecen a los géneros *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Fusarium* sp. Los biotipos del género *Penicillium* evidenciaron una mayor concentración (cerca de los 6000 UFC.ml⁻¹) junto con el biotipo de *Fusarium* (cerca de los 10.000 UFC.ml⁻¹) en este sustrato con respecto a los otros biotipos aislados.

El género *Fusarium* sp. comprende una amplia variedad de especies no patogénicas

que viven de forma saprofita en muchos ambientes (Karim *et al.*, 2016). En esta misma muestra se encontraron tres biotipos de bacterias Gram -, que por caracterización molecular correspondieron a los géneros *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Cronobacter* sp. y una Gram +, *Lysinibacillus* sp. Un mismo comportamiento se encontró en la perlita, la cual, a pesar de no mostrar la presencia de hongos, evidenció la aparición de tres morfotipos característicos de bacterias (Bacilo Gram + esporulado, Bacilo Gram - y Coco Gram +). Con la caracterización molecular de estos aislamientos se encontró que correspondían a bacterias de los géneros *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. y *Lysinibacillus* sp. (Tabla 3). Lo cual indica que se trata de un sustrato que no representa una amenaza desde el punto de vista fitosanitario para el sistema productivo y por el contrario podrían tener algún papel en el control biológico de patógenos del suelo, como los descritos para el género *Bacillus* sp. (Fira *et al.*, 2018; Villareal-Delgado *et al.*, 2018).

En suelos recién inoculados con una mezcla de microorganismos benéficos (práctica común en la finca de estudio) solamente se encontraron tres biotipos de dos géneros de hongos; *Trichoderma* spp. y *Penicillium* sp. Este resultado parece indicar que la aplicación de organismos benéficos reduce de forma drástica a otros microorganismos del suelo lo cual ha sido descrito por otros autores (Umadevi *et al.*, 2018). Este es un hallazgo importante que permite esclarecer la efectividad de la aplicación de estos bioproductos en el control de otros hongos bajo el modelo evaluado. Así mismo es un indicador de la supervivencia de las poblaciones de *Trichoderma* sp. en el suelo. Es de resaltar que este género comprende una amplia variedad de especies con actividad biocontroladora, inductora de resistencia y promotora de crecimiento (Nakkeeran *et al.*, 2018).

En la misma muestra de suelo inoculada se encontraron biotipos de los géneros *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. y *Lysinibacillus* sp. los cuales no representan un problema fitosanitario (Tabla 3). Sin embargo, su presencia indica una mayor efectividad de *Trichoderma* spp. para desplazar hongos, que para desplazar bacterias.

En la muestra del suelo de producción se estableció por morfología microscópica y molecular la presencia de aislamientos de los géneros *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Acremonium* sp. (Tabla 2). Es importante indicar que especies del género *Fusarium* junto con *Gibberella* sp. y *Mortierella* sp. son hongos dominantes en suelos con aplicaciones de fertilizantes basados en NPK y que géneros como *Cyphellophora* sp., *Penicillium* sp., *Chloridium* sp., *Trichoderma* sp. y *Acremonium* sp. incrementan en suelos fertilizados (Ding *et al.*, 2017). Lo anterior se relacionó con la fertilización química que se emplea en el sistema productivo para suplementar los sustratos y suelos preparados; es importante resaltar, que a pesar de que los sistemas de *Cannabis* en general utilizan modelos de producción limpios y reducen las aplicaciones de plaguicidas, al ser cultivos con una alta rotación y ciclos muy cortos (tres a cuatro meses), es necesario suplementar los sustratos con fertilización química (Bernstein *et al.*, 2019).

En las muestras de suelo de los lotes de propagación se aislaron colonias de *Fusarium solani*, un patógeno frecuentemente reportado en *Cannabis* y causante de marchitamiento y mal de talluelo (Punja, 2018; Punja *et al.*, 2019). Sin embargo, la frecuencia y el número de unidades formadoras de colonia encontradas, no permitieron correlacionar su presencia con el desarrollo de enfermedades en el cultivo.

Este aspecto continúa en evaluación por el equipo de investigadores de este proyecto. Para el caso de las poblaciones bacterianas se observaron aislamientos Gram +, con morfologías microscópicas de bacilos, cocos y actinobacterias (Tabla 3). Los Bacilos Gram + esporulados aislados de la muestra pueden provenir de las aplicaciones de Bioplaguicidas a base de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis* realizadas con frecuencia en el cultivo.

En la muestra de turba, hubo crecimiento de morfotipos del género *Penicillium* sp. (Tabla 2), lo cual resulta llamativo, dado que este tipo de sustratos se venden como estériles, sin embargo es posible que las condiciones de almacenamiento o incluso preparación facilite el desarrollo de organismos de tipo ambiental como *Penicillium* sp., el no hallazgo de patógenos importantes en los cultivos como *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. o *Pythium* sp. causantes de “damping off” en las plántulas (Mcpartland, 2019) genera tranquilidad sobre el uso de este tipo de sustratos. Se debe destacar que en esta muestra fue la única en la cual fue posible aislar un biotipo de actinobacteria, estos son una fuente significativa de compuestos antibióticos que pueden estar regulando en el suelo poblaciones de bacterias patógenas Gram - (de Lima Procópio *et al.*, 2012).

En ninguna de las dos muestras de agua hubo presencia de hongos filamentosos. En la muestra de agua de la zona de producción de material vegetal, solamente se aisló, un morfotipo correspondiente a un Bacilo Gram + esporulado, los cuales no son considerados agentes fitopatógenos. Este probablemente esté asociado con empleo de Bioplaguicidas a base de especies de *Bacillus* sp. En la muestra de agua cruda se caracterizó la presencia de 4 morfotipos de Bacilos Gram +. Es común que en ambientes acuáticos inestables con una disponibilidad escasa de nutrientes

abunden bacterias Gram + aunque en menor proporción que bacterias Gram – (Cabral, 2010). En este sentido, ninguna de las muestras de agua, es una fuente de contaminación de hongos fitopatógenos y bacterias. Para el

caso del agua cruda, se realizó la caracterización molecular de los morfotipos estableciendo la presencia de los géneros *Lysinibacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Rhizobium* sp. (Tabla 3).

Tabla 2. Caracterización de biotipos de hongos aislados de sustratos*

Muestra	Caracterización molecular	Concentración (UFC.g ⁻¹)
Compost 1	<i>Cladosporium</i> sp.	2,05 x 10 ⁵
	<i>Cladosporium</i> sp.	7,25 x 10 ⁴
	<i>Geomyces</i> sp.	3,50 x 10 ⁵
	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	1,50 x 10 ⁵
	<i>Phialemonium inflatum</i>	3,35 x 10 ⁶
	<i>Geomyces</i> sp.	2,00 x 10 ⁴
	<i>Geotrichum</i> sp.	1,50 x 10 ⁵
Compost 2	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	4,00 x 10 ⁴
	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	1,30 x 10 ⁶
	<i>Penicillium citreonigrum</i>	3,50 x 10 ⁴
	<i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i>	2,50 x 10 ⁵
	<i>Geomyces pannorum</i>	4,00 x 10 ⁴
Compost 3	<i>Aspergillus niger</i>	1,00 x 10 ⁴
	<i>Penicillium spinulosum</i>	1,50 x 10 ⁴
Fibra de coco	<i>Plectosphaerella oligotrophica</i>	3,55 x 10 ⁴
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,50 x 10 ³
	<i>Penicillium spinulosum</i>	6,00 x 10 ³
	<i>Aspergillus niger</i>	4,00 x 10 ³
Turba	<i>Penicillium roseomaculatum</i>	7,00 x 10 ⁴
	<i>Penicillium roseomaculatum</i>	5,00 x 10 ³
	<i>Fusarium fujikuroi</i>	1,00 x 10 ⁴
Mezcla suelo inoculado	<i>Penicillium</i> sp.	1,00 x 10 ⁴
	<i>Penicillium spinulosum</i>	3,50 x 10 ⁴
	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	2,00 x 10 ³
Suelo Bloque de producción	<i>Trichoderma atroviride</i>	1,00 x 10 ⁴
	<i>Penicillium amphipolaria</i>	9,00 x 10 ⁴
	<i>Trichoderma harzianum</i>	5,00 x 10 ³
	<i>Fusarium oxysporum</i>	4,00 x 10 ³
Suelo Bloque de producción	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	2,00 x 10 ³
	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	1,65 x 10 ⁴
	<i>Penicillium bilaiae</i>	4,50 x 10 ³
Suelo Bloque de producción	<i>Acremonium aff. Curvulum</i>	2,50 x 10 ³
	<i>Fusarium solani</i>	2,50 x 10 ³

*Caracterización basada en secuencias parciales lts. Suplemento 1. UFC.g⁻¹: Unidades formadoras de colonia por gramo de sustrato; UFC.100ml⁻¹: Unidades formadoras de colonia por 100 ml de suspensión

Tabla 3. Caracterización de biotipos de bacterias aisladas de aguas y sustratos.

Muestra	Caracterización molecular	Concentración (UFC.g ⁻¹)
Fibra de coco	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,00 x 10 ⁶
	<i>Enterobacter cloacae</i>	5,33 x 10 ⁶
	<i>Cronobacter sakazakii</i>	5,33 x 10 ⁶
	<i>Lysinibacillus</i> sp.	5,33 x 10 ⁶
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	3,33 x 10 ⁷
Mezcla suelo inoculado	<i>Pseudomonas</i> sp.	4,00 x 10 ⁶
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,80 x 10 ⁷
	<i>Pseudomonas</i> sp.	1,33 x 10 ⁶
	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	2,00 x 10 ⁶
Suelo Bloque de producción	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	1,33 x 10 ⁶
	<i>Bacillus megaterium</i>	5,00 x 10 ⁶
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	1,00 x 10 ⁶
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	1,57 x 10 ⁶
Turba	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	9,00 x 10 ⁶
	<i>Lysinibacillus</i> sp.	1,13 x 10 ⁷
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2,37 x 10 ⁷
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	5,90 x 10 ⁶
	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	5,00 x 10 ⁵
Compost 3	<i>Bacillus aerius</i>	8,00 x 10 ⁶
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	4,33 x 10 ⁶
	<i>Bacillus cereus</i>	3,33 x 10 ⁵
	<i>Bacillus subtilis</i>	3,67 x 10 ⁶
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	9,67 x 10 ⁶
	<i>Bacillus pumilus</i>	1,00 x 10 ⁷
Perlita	<i>Bacillus pumilus</i>	6,2 x 10 ⁵
	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	4,00 x 10 ⁴
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2,30 x 10 ⁵
Agua confinamiento	<i>Lysinibacillus</i> sp.	3,67 x 10 ³
Agua cruda	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	< 1000
	<i>Pseudomonas costantinii</i>	< 1000
	<i>Lysinibacillus</i> sp.	2,50 x 10 ³
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	3,00 x 10 ³
	<i>Rhizobium pusense</i>	1,50 x 10 ³

* Caracterización basada en secuencias parciales lts. Suplemento 1. UFC.g⁻¹: Unidades formadoras de colonia por gramo de sustrato; UFC.100ml⁻¹: Unidades formadoras de colonia por 100 ml de suspensión.

Los microorganismos presentes, en las muestras de suelo, tanto bacterias como hongos, se encuentran en concentraciones significativamente altas y presentan una amplia diversidad en la rizosfera. Esto demuestra que esta zona está influenciada por una intensa asociación de la actividad microbiana con las raíces de las plantas (Fincheira y Quiroz, 2018).

Los exudados de la planta determinan o modifican la comunidad microbiana a lo largo del sistema de raíces y estos a su vez secretan diversos metabolitos no volátiles con efectos beneficiosos que incluyen promoción del crecimiento de las plantas produciendo fitohormonas, o mejorando la biofertilización y promoviendo la reducción del estrés abiótico y bióticos induciendo resistencia a las plantas o por antibiosis. Por su parte, existen suelos supresivos donde no ocurre la enfermedad, aunque esté presente el patógeno. Algunos autores reportan que bacterias de la familia Pseudomonadaceae, son más abundantes en suelos supresores. Así mismo se han identificado estreptomicetos capaces de producir sustancias volátiles químicamente diversas (COV) con actividad antifúngica y con propiedades promotoras del crecimiento vegetal (Braga *et al.*, 2016).

La presencia de bacterias promotoras de crecimiento de las plantas (PGPR) de los géneros *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Lysinibacillus* sp. y *Rhizobium* sp. en diferentes tipos de muestras del cultivo evaluado sugiere una alternativa prometedor a los fertilizantes químicos en este sistema productivo. Estas bacterias pueden promover el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de varios mecanismos, tales como: fijación de nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos (los sideróforos quelatan el hierro para estar disponible para la raíz de la planta), solubilización de minerales (particularmente fósforo), producción de sustancias

promotoras del crecimiento de las plantas (como auxinas, citoquininas, giberelinas) y la síntesis de varios otros compuestos promotores del crecimiento (por ejemplo, enzimas), así mismo estimulan el alargamiento de los sistemas radiculares, formación de raíces laterales y adventicias, pelos radiculares y pelos radiculares ramificados, juega un papel importante en la mejora de crecimiento y rendimiento de cultivos en diversas condiciones ambientales y del suelo (Pagnani *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

La alta diversidad de microorganismos benéficos observados en el sistema de *Cannabis* indica la bondad del modelo de producción orgánico típico en estos cultivos y permite inferir que las interacciones benéficas tienen un gran potencial para la prevención y manejo de plagas en este tipo de sistemas productivos.

No se encontró en ninguna de las muestras analizadas: suelos, sustratos, compost o aguas, provenientes de diferentes fases de producción del cultivo de Cannabis la presencia de microorganismos patógenos, que pudieran explicar la incidencia de enfermedades dentro del cultivo; lo que indica, que el compost proveniente de residuos de la misma plantación y que los sustratos que se adicionan al suelo (perlita y fibra de coco), no representa riesgos sanitarios para la producción.

Se encontraron altas poblaciones de solubilizadores de fósforo y fijadores de nitrógeno en las muestras de perlita y fibra de coco, lo que permite indicar que estos sustratos favorecen poblaciones benéficas en sustratos y suelos.

Se observó que en suelos tratados con *Trichoderma* spp. se presenta una menor cantidad de biotipos de hongos, lo cual confirma su papel como regular de las poblaciones de patógenos del suelo.

AGRADECIMIENTOS

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-AGROSAVIA por los recursos asociados al proyecto ID 1001057: Caracterización materiales *Cannabis*.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que es un trabajo original y no existió conflicto de intereses de ningún tipo en la elaboración y publicación del manuscrito.

REFERENCIAS

- André, C. M., Hausman, J. F. and Guerriero, G. 2016.** Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science Feb 4;7:19*. doi: [10.3389/fpls.2016.00019](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019)
- Adesina, I., Bhowmik, A., Sharma, H. and Shahbazi, A. 2020.** A Review on the Current State of Knowledge of Growing Conditions, Agronomic Soil Health Practices and Utilities of Hemp in the United States. *Agriculture*. 2020; 10(4):129. <https://doi.org/10.3390/agriculture10040129>.
- Amendola, G., Bocca, B., Picardo, V., Pelosi, P., Battistini, B., Ruggieri, F., Attard Barbini, D., De Vita, D., Madia, V.N., Messori, A., Di Santo, R. and Costi, R. 2021.** Toxicological aspects of cannabinoid, pesticide and metal levels detected in light Cannabis inflorescences grown in Italy. *Food Chem Toxicol*. doi: [10.1016/j.fct.2021.112447](https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112447)
- Becerra, J. M., Quintero, D., Martínez, M. y Matiz, A. 2011.** Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 5(2): 195-208.
- Betancur, L. 2018.** Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos. Tesis Doctorado en Ciencias – Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Bernstein, N., Gorelick, J. Z. R. and Koch, S. 2019.** Impact of N, P, K, and Humic Acid Supplementation on the Chemical Profile of Medical Cannabis (*Cannabis sativa* L). *Frontiers in Plant Science* 10: 1-13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00736>
- Braga, R. M., Dourado, M. N. and Araújo, W. L. 2016.** Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology* 47: 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.005>
- Cabral, J. P. S. 2010.** Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7(10): 3657–3703. <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>
- Cao, G., Song, T., Shen, Y., Jin, Q., Feng, W., Fan, L. and Cai, W. 2019.** Diversity of bacterial and fungal communities in wheat straw compost for agaricus bisporus cultivation. *HortScience* 54(1): 100–109. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13598-18>
- Chandra, S., Lata, H. and ElSohly, M. A. 2020.** Propagation of Cannabis for clinical research: an approach towards a modern herbal medicinal products development. *Frontiers in plant science*, 11, 958. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00958>.
- Chandra, S., Lata, H., Khan, I. A. and El-Sohly, M. A. 2011.** Temperature response of photosynthesis in different drug and fiber varieties of Cannabis sativa L. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 17 (3), 297–303. DOI: [10.1007/s12298-011-0068-4](https://doi.org/10.1007/s12298-011-0068-4)

- Chandra, S., Lata, H., Mehmedic, Z., Khan, I. A. and ElSohly, M. A. 2010.** Assessment of cannabinoids content in micro-propagated plants of *Cannabis sativa* L., and their comparison with conventionally propagated plants and mother plant during developmental stages of growth. *Planta Med.* 76, 743–750.
Doi: [10.1055/s-0029-1240628](https://doi.org/10.1055/s-0029-1240628)
- Christian, K.A., Brice, V.M., Nicaise, M.S., Doria, K.M. and Etienne, N. 2019.** The Genus *Lysinibacillus* : Versatile Phenotype and Promising Future. *International Journal of Science and Research (IJSR)* 8(1): 1238–1242.
<https://doi.org/10.21275/ART20194281>.
- Chandna, P., Nain, L., Singh, S. and Kuhad, R. C. 2013.** Assessment of bacterial diversity during composting of agricultural byproducts. *BMC Microbiology* 13(1).
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-99>
- De Corato, U. 2020.** Disease-suppressive compost enhances natural soil suppressiveness against soil-borne plant pathogens: A critical review. *Rhizosphere* 13(November 2019): 100192.
<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100192>
- De Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L. and de Araújo, J. M. 2012.** Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 16(5): 466–471.
<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- Ding, J., Jiang, X., Guan, D., Zhao, B., Ma, M., Zhou, B. and Li, J. 2017.** Influence of inorganic fertilizer and organic manure application on fungal communities in a long-term field experiment of Chinese Mollisols. *Applied Soil Ecology* 111: 114–122.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.12.003>
- Filippidou, S., Wunderlin, T., Junier, T., Jeanneret, N., Dorador, C., Molina, V., Johnson, D.R. and Junier, P.A. 2016.** Combination of extreme environmental conditions favor the prevalence of endospore-forming firmicutes. *Front Microbiol.* 2016 Nov 3;7:1707.
Doi: [10.3389/fmicb.2016.01707](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01707)
- Fincheira, P. and Quiroz, A. 2018.** Microbial volatiles as plant growth inducers. *Microbiological Research*, 208(January): 63–75.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.002>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J. and Stanković, S. 2018.** Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of biotechnology* 285: 44–55.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Griffith, G. W. and Shaw, D. S. 1998.** Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Applied and Environmental Microbiology* 64(10): 4007–4014.
<https://doi.org/10.1128/aem.64.10.4007-4014.1998>
- Gupta, A. and Gopal, M. 2016.** Beneficial microorganisms in coconut based cropping / farming systems. Conference: National Seminar on ‘Plantation based cropping system for improving livelihood security’ At: ICAR-Central Plantation Crops Research Institute Kasaragod – 671124, Kerala, India.
<https://journal.coconutcommunity.org/index.php/journalicc/article/view/274>
- Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A. and Kopriva, S. 2017.** The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition-current knowledge and future directions. *Frontiers in plant science*, 8, 1617.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01617>
- Karim, N. F. A., Mohd, M., Nor, N. M. I. M. and Zakaria, L. 2016.** Saprophytic and potentially pathogenic fusarium species from peat soil in perak and pahang. *Tropical Life Sciences Research* 27(1): 1–20.
- Langvad, F. 1980.** A simple and rapid method for qualitative and quantitative study of the fungal flora of leaves. *Canadian Journal of Microbiology* 26(6): 666-670.
<https://doi.org/10.1139/m80-116>

- López, M., Martínez Viera, R., Brossard Fabré, M. and Toro, M. 2010.** Capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico de cepas nativas de agroecosistemas venezolanos. *Agronomía Tropical* 60(4): 355-362.
- Mcpartland, J. M. 2019.** A review of Cannabis diseases. *Journal of the International Hemp Association* 3(1): 19–23.
- Montoya, Z., Conroy, M., Vanden Heuvel, B.D., Pauli, C.S. and Park SH. 2020.** Cannabis contaminants limit pharmacological use of cannabidiol. *Front Pharmacol.* 2020 Sep 11;11:571832. Doi: [10.3389/fphar.2020.571832](https://doi.org/10.3389/fphar.2020.571832)
- Nakkeeran, S., Vinodkumar, S., Priyanka, R. and Renukadevi, P. 2018.** Mode of Action of Trichoderma Spp. in Biological Control of Plant Diseases. *Biocontrol of Soil Borne Pathogens and Nematodes* 81–95.
- O’Toole G. A. 2016.** Classic Spotlight: How the Gram Stain Works. *Journal of bacteriology*, 198(23): 3128. <https://doi.org/10.1128/JB.00726-16>
- Pagnani, G., Pellegrini, M., Galieni, A., D’Egidio, S., Matteucci, F., Ricci, A. and Del Gallo, M. 2018.** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in Cannabis sativa ‘Finola’ cultivation: An alternative fertilization strategy to improve plant growth and quality characteristics. *Industrial Crops and Products* 123(June): 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.033>
- Punja Z. K. 2021.** Emerging diseases of Cannabis sativa and sustainable management. *Pest management science*, 77(9), 3857–3870. <https://doi.org/10.1002/ps.6307>
- Punja, Z. K., Collyer, D., Scott, C., Lung, S., Holmes, J. and Sutton, D. 2019.** Pathogens and Molds Affecting Production and Quality of Cannabis sativa L. *Frontiers in Plant Science* 10(October): 1–23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01120>
- Punja, Z. K. 2018.** Flower and foliage-infecting pathogens of marijuana (Cannabis sativa L.) plants. *Canadian Journal of Plant Pathology* 40(4): 514–527. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1535467>
- Ramírez, J. 2019.** La Industria del Cannabis Medicinal en Colombia. Fedesarrollo. p61. consultado: https://www.repository.fedesarrollo.org.co/bitstream/handle/11445/3823/Reporto_Diciembre_2019_Ram%c3%adrez.pdf?sequence=4&isAllowed=y
- Sharafi, G., He, H. and Nikfarjam, M. 2019.** Potential use of cannabinoids for the treatment of pancreatic cancer. *J. Pancreat. Cancer* 5, 1–7. doi: [10.1089/pancan.2018.0019](https://doi.org/10.1089/pancan.2018.0019)
- Sutton, J., Sopher, C., Going, N., Liu, W., Grodzinski, B., Hall, J. and Benchimol, R. 2006.** Etiology and epidemiology of Pythium root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. *Summa Phytopathologica.* 32. [10.1590/S0100-54052006000400001](https://doi.org/10.1590/S0100-54052006000400001)
- Taghinasab, M. and Suha, J. 2020.** Cannabis microbiome and the role of endophytes in modulating the production of secondary metabolites: an overview” *Microorganisms* 8, no. 3: 355. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030355>.
- Umadevi, P., Anandaraj, M., Srivastav, V. and Benjamin, S. 2018.** *Trichoderma harzianum* MTCC 5179 impacts the population and functional dynamics of microbial community in the rhizosphere of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Brazilian Journal of Microbiology* 49(3): 463–470. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.011>

- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I. y Santos-Villalobos, S. 2018.** El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología* 36(1): 95-130.
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Yadav, A. N., Verma, P., Kumar, V., Sangwan, P., Mishra, S., Panjiar, N., Gupta, V. K. and Saxena, A. K. 2017.** Biodiversity of the genus *penicillium* in different habitats. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Penicillium System Properties and Applications* (pp. 3-18). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63501-3.00001-6>
- Zuardi, A. 2006.** History of cannabis as a medicine: a review. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 28(2) pp 153-157.
<https://doi.org/10.1590/S1516-44462006000200015>.
- Zheng, X., Wang, Z. and Zhu, Y. 2020.** Effects of a microbial restoration substrate on plant growth and rhizosphere bacterial community in a continuous tomato cropping greenhouse. *Sci Rep* 10, 13729.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-70737-0>.