

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA DE SUELOS DEDICADOS AL CULTIVO DE TOMATE EN AZUERO¹

**Maryuri Estrada²; Julio Rachel³; Rito Herrera⁴; Lisbeth L. Rodríguez⁵
Dalila Montañez⁶; Gesabel Navarro⁷; Álex Martínez⁸**

RESUMEN

Los hongos antagonistas representan una alternativa ecológica ante la utilización de agroquímicos para el control de microorganismos fitopatógenos que afectan los cultivos. Este trabajo se realizó entre el 2016 y 2017, con el propósito de encontrar hongos del género *Trichoderma* y conocer la diversidad de hongos presentes en suelos dedicados al cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). Se seleccionaron ocho sitios de estudio ubicados en la península de Azuero. En total, se colectaron 200 muestras de suelo (25 por sitio) y se realizaron diluciones seriadas para el aislamiento. Se aislaron un total de 590 hongos, generando 576 inclinados (morfotipos). La identificación se realizó a nivel de género y morfoespecie, para los hongos que produjeron estructura vegetativa. Los datos se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Se logró aislar 340 crecimientos fúngicos en platos Petri pequeños, agrupados en 15 géneros. El 75% de los aislamientos se identificó a nivel de género; 2% fueron levaduras; 23% micelio estéril. Los géneros más frecuentes fueron: *Aspergillus* y *Penicillium*. Además, se realizaron pruebas bioquímicas de respiración microbiana y actividad enzimática de la deshidrogenasa en los suelos de las cuatro fincas de mayor importancia agrícola, donde se determinó que el suelo que presentó mayor actividad microbiana xi (producción de CO₂) fue el de La Colorada, seguido por El Faldar y Tonosí; el que presentó menor actividad microbiana fue Tonosí Centro. Con el cálculo de las UFC se pudo determinar que la carga fúngica óptima se encuentra en la dilución 10⁻⁴.

Palabras clave: Alternativa ecológica, *Aspergillus*, hongos antagonistas, *Penicillium*, *Trichoderma*.

¹Recepción: 10 de septiembre de 2024. Aceptación: 01 de octubre de 2024. Trabajo de Graduación para optar por el título de Licenciatura en Biología con orientación en Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, Universidad de Panamá.

²Universidad de Panamá (UP). Lic. Biología. e-mail: maryuseth11@gmail.com;

ORCID iD: <https://orcid.org/0009-0007-1342-3298>

³UP. Lic. Biología. e-mail: shelli.060304@gmail.com

⁴IDIAP. Centro de Innovación Agropecuaria en Recursos Genéticos (CIARG) - Universidad de Panamá. Ph.D. Microbiología. e-mail: rito.herrera@up.ac.pa; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2509-0391>

⁵IDIAP. Laboratorio de Análisis y Biología Molecular Aplicada (LABMA). Licenciatura en Biología con orientación en Biología Ambiental. e-mail: lisbethlourdes20@gmail.com; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1750-9228>

⁶UP. Ph.D. Biología. e-mail: Dalmontz.crua@gmail.com; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-0218-5796>

⁷UP. Ph.D. Biología. e-mail: gnavarro_76@yahoo.es; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-2547-0052>

⁸UP. Ph.D. Biología. e-mail: amartinet13@gmail.com; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-5001-6217>



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MYCOBIOTA FROM SOILS DEDICATED TO TOMATO CULTIVATION IN AZUERO

ABSTRACT

Antagonist fungi represent an ecological alternative to the use of agrochemicals to control phytopathogenic microorganisms that affect crops. This work was carried out during 2016 and 2017 with the purpose of finding fungi of the genus *Trichoderma* and knowing the diversity of fungi present in soils dedicated to the cultivation of tomatoes (*Solanum lycopersicum*). Eight study sites located in the Azuero Peninsula were selected. In total, 200 soil samples were collected (25 per site) and serial dilutions were carried out for isolation. Thus, a total of 590 fungi were isolated, thus generating around 576 inclined fungi (morphotypes). The identification was carried out at the genus level, and at the morphospecies, for fungi that only produced vegetative structure. The data were statistically analyzed using Pearson's correlation coefficient. On the other hand, 340 fungal growths were isolated in small Petri dishes, grouped into 15 genera. 75% of the isolates were identified at the gender level; 2% were yeasts; 23% were sterile mycelium. The most frequent genera were: *Aspergillus* and *Penicillium*. In addition, biochemical tests of microbial respiration and enzymatic activity of dehydrogenase were carried out in the soils of the four farms of greatest agricultural importance, where it was determined that the soil that presented the highest microbial activity xi (CO₂ production) was that of La Colorada, followed by El Faldar and Tonosí; the one that presented the lowest microbial activity was Tonosí Centro. With the calculation of the CFU it was possible to determine that the optimal fungal load is found in the 10⁻⁴ dilution.

Keywords: Antagonistic fungi, *Aspergillus*, ecological alternative, *Penicillium*, *Trichoderma*.

INTRODUCCIÓN

Los hongos presentes en el suelo representan la micobiota edáfica, estos ocupan el mayor porcentaje de biomasa microbiana de dicho recurso. Además, desempeñan una serie de funciones claves para el funcionamiento de los ecosistemas, tales como la descomposición orgánica de la materia y el ciclaje de nutrientes. Estos procesos son esenciales para los suelos agrícolas, ya que si existe una diversidad de hongos benéficos que aumentan la productividad y el rendimiento de los cultivos (Landínez-Torres y Fagua, 2022).

Tradicionalmente, para el control de organismos fitopatógenos se utilizan los agroquímicos, sin embargo, el uso de hongos en la agricultura representa una alternativa



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

de biocontrol eficiente ante los patógenos presentes en los suelos agrícolas, a la vez que se disminuye el uso de compuestos sintéticos y con esto los efectos negativos que ocasionan en el ambiente (Heflish et al., 2021).

En Panamá la mayor producción del cultivo de tomate industrial (*Solanun lycopersicum*) se da en la península de Azuero, específicamente en el distrito de Los Santos, provincia de Los Santos. Datos del Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA, 2014) indican que en el Arco Seco de Panamá se cultiva el 80% de este rubro. El cultivo se da principalmente durante la estación seca, reportando una superficie total de 147 hectáreas y un rendimiento promedio de 46,9 t/ha (NESTLÉ , 2017).

Las estrategias utilizadas tradicionalmente para el control de plagas han provocado: degradación de los agroecosistemas, contaminación del medio y daños a la salud de los productores y consumidores. Esto representa una amenaza para el desarrollo sostenible de cualquier región. En ese sentido, se presenta el reto de encontrar alternativas tecnológicas más eficientes para la producción agrícola (MacLaren et al., 2020).

El uso indiscriminado de agroquímicos también disminuye la calidad de los suelos, ya que con su aplicación se eliminan la mayoría de los organismos presentes, sin distinción entre patógenos y benéficos, por lo que es necesario que se dé un adecuado manejo del recurso, esto implica el mantenimiento de su estructura y composición. Además, en caso de que se requieran se adiciona nutrientes esenciales mediante la aplicación de abonos orgánicos según las recomendaciones de fertilización dada por los análisis físicoquímicos del suelo (Medina Mendoza y Vélez Medina, 2018).

En la actualidad, con el desarrollo tecnológico se han generado avances en la agroindustria y biotecnología, esto ha permitido conocer los beneficios que aportan los microorganismos para el desarrollo de la vida y calidad de los suelos. De manera que estos puedan aplicarse de manera eficiente. Esto es de gran importancia para el futuro alimenticio de la población en crecimiento que cada día demanda una mayor cantidad y calidad de alimentos (Rea-Sánchez et al., 2015).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

El objetivo principal de esta investigación fueron aislar e identificar hongos del género *Trichoderma* sp., el cual se ha reportado como un agente de biocontrol eficaz y conocer la diversidad fúngica presente en suelos dedicados al cultivo del tomate (*S. lycopersicum*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

Para este trabajo se seleccionaron ocho sitios (Cuadro 1) ubicados en la provincia de Los Santos, distritos de Los Santos (cinco fincas) y Tonosí (tres fincas) (Figura 1). La principal característica para la selección de las fincas era que se hubiera sembrado tomate al menos un año antes o que se estuviera cultivando durante el transcurso de la investigación. Las muestras fueron tomadas a inicios de la estación lluviosa (mayo).

Cuadro 1. Coordenadas de los sitios de muestreo.

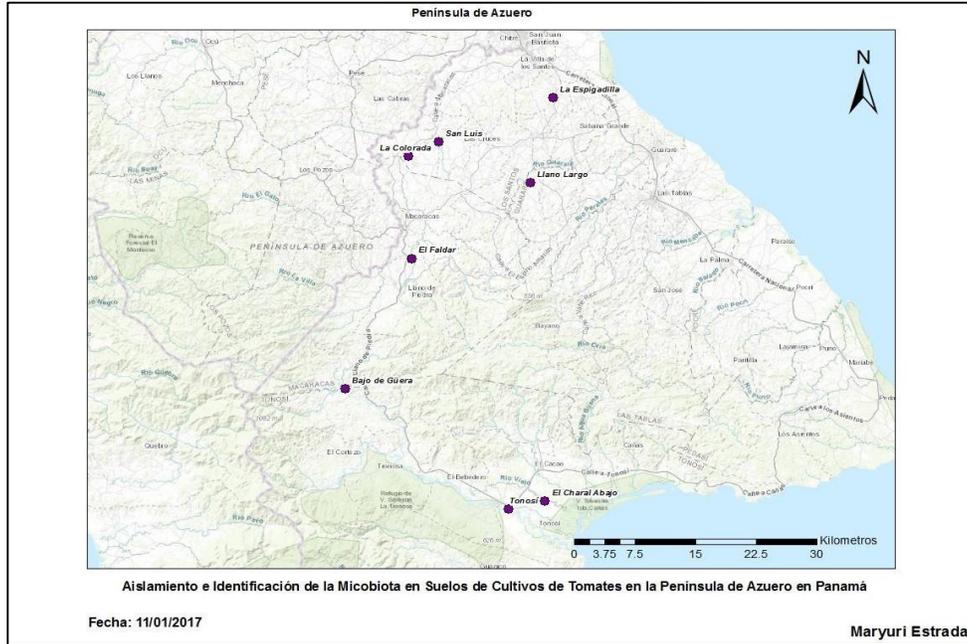
Sitios de muestreo	Latitud	Longitud
La Espigadilla	7,884642	-80,38874
Llano Largo	7,785507	-80,414192
El Faldar	7,69697574	-80,546342 106 msnm
Bajo de Güera	7,545002	-80,620354 115 msnm
El Charal Abajo	7,413587	-80,397996 8 msnm
Tonosí	7,404149	-80,438767 7 msnm
San Luis	7,83333	-80,5167
La Colorada	7,81667	-80,55

Colecta de muestra

En cada finca se trazó una parcela, en donde se seleccionaron cinco puntos para la colecta de muestra (Figura 2). Luego se tomaron aproximadamente 500 g de suelo a una profundidad de 20 cm, ya que esta es la profundidad que más o menos alcanzan las raíces. Las muestras se almacenaron en frío para su posterior análisis en Laboratorio.

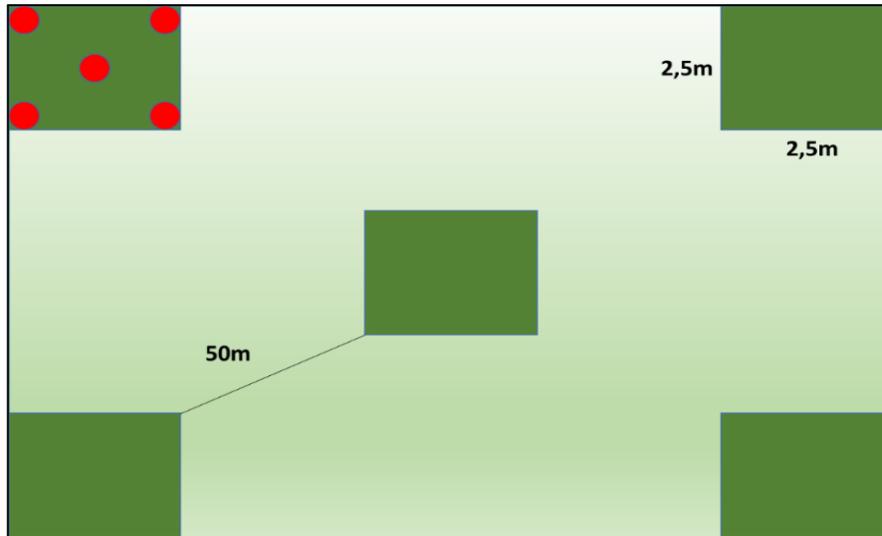


Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)



Fuente: Google Earth, 2024.

Figura 1. Ubicación de las fincas de estudio.



Fuente: Hernández et al., 2016.

Figura 2. Esquema utilizado para la colecta de muestra.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Análisis estadístico

Se analizó el coeficiente de correlación de Pearson para variables cuantitativas (géneros de hongos filamentosos aislados y las Unidades Formadoras de Colonias) y el índice de Simpson para determinar la abundancia de géneros aislados.

Análisis de suelo

El análisis fisicoquímico del suelo se realizó únicamente en cuatro sitios (El Faldar, Tonosí, Tonosí Centro y La Colorada) por ser consideradas las fincas de mayor producción de tomate. El análisis fue realizado por el Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). También, se realizaron pruebas bioquímicas en Laboratorio para determinar la actividad biológica del suelo, las cuales se describen a continuación:

Actividad de la Enzima Deshidrogenasa

La determinación de la actividad de la enzima deshidrogenasa (ADH) en los suelos está relacionada con el contenido de Materia Orgánica (MO) y puede utilizarse como indicador biológico, e índice de Actividad Microbiológica (IAM). Para determinar dicha actividad se realizó el Método de Casida et al. (1967), descrito a continuación:

Se colocaron 6 g de suelo húmedo en tubos de ensayo suplementado con 50 mg de glucosa para acelerar el proceso de activación de los microorganismos. Luego se añadieron 2 mL de agua destilada y 1 mL de Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium (TTC) al 3%. Se homogeneizó la mezcla hasta obtener una consistencia lodosa. Cada tubo fue cubierto con papel aluminio e incubado en oscuridad, a una temperatura de $26^{\circ}\text{C}\pm 2$ por 8 días. Transcurrido este tiempo se añadió 25 mL de metanol a cada tubo. Se homogeneizó nuevamente y se dejó reposar hasta la precipitación de las partículas de suelo. Se filtró el sobrenadante con la ayuda de un sistema de filtrado al vacío y se colocó en un tubo hasta obtener un volumen de 25 mL. Finalmente, se tomó lectura por espectrofotometría a una absorbancia de 485 nm. Como blanco se utilizó una mezcla que contenía: 2 mL de agua, 1 mL de TTC y 25 mL de metanol.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Contenido de humedad en suelos

En análisis microbianos, para determinar el contenido de humedad es usualmente reportado como el porcentaje de humedad relativa. Este se define como:

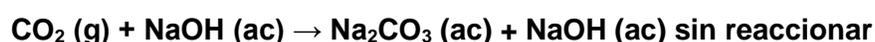
$$\% = \frac{m - d}{m} (100)$$

(m) es la masa de suelo húmedo antes del secado y (d) es la masa de suelo luego de secado al horno.

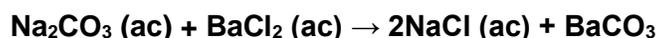
Respiración microbiana

Inicialmente se realizó la incubación de las muestras, para esto se seleccionó un frasco de vidrio de boca ancha con cierre hermético, en donde se añadieron 25 g de suelo húmedo. El cual se mantuvo en oscuridad a 26° C durante 10 días. Adicional, se utilizaron envases pequeños de plástico, los cuales contenían: 10 mL de NaOH 0,1M y 10 mL de agua destilada. Para el blanco o control se realizó el montaje con NaOH sin suelo. La solución de NaOH se cambió periódicamente, los días 1°, 2°, 4°, 7° y 10° de la incubación.

Se determinó la concentración de CO₂ capturado. Para ello, se procedió a tomar una alícuota de 2 mL de cada tratamiento y se le añadió agua destilada (1-2 mL aprox.). Siguiendo la siguiente reacción:



Previamente, a la titulación se adicionó 1 mL de BaCl₂ al 20%, para que los carbonatos que se formaron se precipitaran en forma de BaCO₃ de acuerdo con la siguiente reacción:



La técnica implicó calcular la cantidad de NaOH que queda sin reaccionar en el proceso de respiración (exceso), valorándolo con HCl 0,1 M en una bureta, utilizando azul de timol 1% como indicador. El CO₂ emitido por el suelo se calculó como la diferencia entre



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

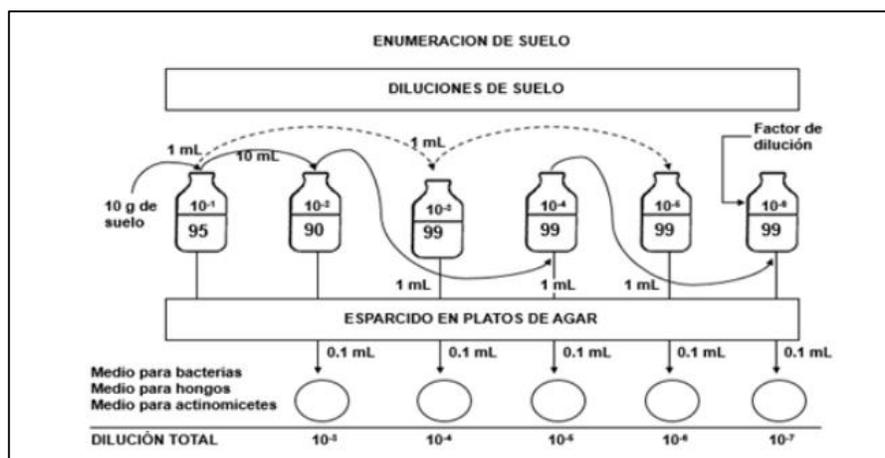
el valor de titulación de un blanco sin suelo (NaOH) y el de cada muestra expuesta a la actividad microbiana (NaOH + CO₂ [suelo]). La cantidad de CO₂ desprendido de la mineralización se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{CO}_2 = (\text{B}-\text{M}) \times \text{NHCl} \times \text{Peq} \times \text{A} \times 100 / [25(\text{ss}/\text{sh})]$$

Dónde: CO₂ = mg CO₂ • 100 g⁻¹ de suelo seco a 105° C; B = volumen de HCl consumido por el blanco; M= volumen de HCl consumido por la muestra; NHCl= concentración o normalidad exacta del ácido clorhídrico; Peq = peso equivalente del CO₂ emitido (44/2); A = alícuota de la muestra expuesta al suelo (10/2); Ss/sh = relación de suelo seco a 105° C Y suelo húmedo (en gramos).

Aislamiento microbiano

El análisis de las muestras de suelo se realizó en los Laboratorios de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Panamá, durante los años 2016 y 2017. Siguiendo la metodología de Hernández et al. (2016) se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶. Posteriormente, se extendieron 100 µl de cada dilución en platos Petri de 20 mL con medio agar papa dextrosa (PDA) + ácido tartárico (1,4%) previamente preparado (Figura 3). Este procedimiento se realizó con sus correspondientes réplicas.



Fuente: Hernández et al., 2016.

Figura 3. Esquema utilizado para la dilución seriada de las muestras de suelo.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Identificación

Los aislamientos se transfirieron a viales de 10 mL, conteniendo 5 mL de agar (PDA) inclinado y se incubaron a 25-28° C. El criterio empleado para la identificación fue la categoría morfotipo para estructura vegetativa, mientras que aquellos aislamientos que desarrollaron estructuras reproductivas se identificaron mediante las claves de (Watanabe, 2010).

Las características empleadas para la agrupación morfológica fueron las siguientes: tasa de crecimiento (lento, moderado o rápido), presencia o ausencia de micelio aéreo, textura del micelio (18 categorías), forma del margen (liso, irregular, flecos entre otros), elevación o profundidad de la colonia (convexo, plano, tubo cubierto de micelio entre otros) presencia de cuerpos fructífero, color del agar y del micelio aéreo (Moller et al., 1995). La caracterización taxonómica se realizó con la comparación y agrupamiento de los aislamientos por cada muestra de suelo.

Caracterización de morfotipos mediante el método de microcultivo

Este método de microcultivo es el más preciso, ya que permite observar las estructuras fúngicas *in situ*. Para su realización se utilizó un plato Petri con un caballete de vidrio en forma de U. Inicialmente se depositaron 5 mL de agua estéril en el plato y se colocó un portaobjeto sobre el caballete, luego con una pipeta estéril se vertió una capa de agar en la superficie de la lámina (Arenas, 1983).

Se inoculó el centro con un fragmento del cultivo y se fijó con un cubreobjeto estéril. Se incubo a la temperatura seleccionada para cada aislamiento. Pasado el tiempo se retiró el cubreobjeto y se añadió una gota de azul de lactofenol para su observación al microscopio (40X y 100X) (Arenas, 2003; Casas, 1989).

Técnica de cinta adhesiva

Esta técnica es una de las más utilizadas debido a que se conserva la yuxtaposición original de las esporas y el segmento de hifas (Koneman y Roberts, 1987). Además de permitir observar las estructuras fúngicas casi sin alteración (Arenas, 1993).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Para esta prueba se tomó cinta adhesiva de 4 cm con pinzas estériles y con el lado adhesivo hacia fuera, se presionó firmemente contra la superficie de las colonias de estudio. Posteriormente, la cinta se colocó en un portaobjeto con una gota de azul de lactofenol.

Preservación en glicerol y agua estéril

Los hongos se almacenaron en glicerol al 30%. Se realizó una suspensión para cada hongo, con el objetivo de obtener la mayor cantidad de esporas.

En los platos Petri se colocaron los aislamientos hasta que se cubriera en su totalidad el plato, luego se le añadió 2 mL de agua estéril y se procedió a frotar la superficie del plato para levantar la mayor cantidad de esporas.

Para cada aislamiento se tomaron dos crioviales, en uno se añadió 10 µL de la suspensión de esporas + 990 µL de agua estéril para efectuar una dilución 1/100 y efectuar el conteo de esporas. En el otro criovial se agregó 700 µL de la suspensión de esporas + 300 µL de glicerol, y se agitó por 1 min, para luego almacenarse a -80° C.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Propiedades fisicoquímicas de los sitios de muestreo

El suelo de las cuatro fincas seleccionadas presentó un color amarillento, con una textura franco-arenosa. En la zona del “Arco Seco” de Azuero, la evaporación supera la precipitación anual, lo que contribuyó a que los suelos de estudio presentaran (0,10 cmol/kg) (Villarreal-Núñez et al.,2012) y consecuentemente presentaran un bajo nivel de saturación de aluminio.

Los análisis hechos por el IDIAP determinaron que los niveles de materia orgánica fueron bajos, manteniéndose en un rango entre 0,48%- 1,75%; estos suelos también presentaron niveles de pH poco ácidos (6,10 – 6,90), con la excepción de la Colorada que presento un pH de 5,60 (ácido); además se comparó la Capacidad de Intercambio Catiónico (CICE) (Cmol/kg) de las muestras. Estas se mantuvieron en niveles medio a excepción de la Colorada con 41,35 (Alto). Estos datos coinciden con lo planteado por



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

(Villarreal-Núñez et al., 2012), en donde indican que en los últimos años ha habido una reducción en el contenido de MO en la península de Azuero.

En general, los suelos de Panamá están lavados o lixiviados, son de textura franco-arcillosa o de arcilla liviana, con pH ligeramente ácido, presentan bajos contenidos de fósforo y medianos o bajos contenidos de materia orgánica. El nivel deseable de MO en los suelos arcillosos medios es del 2%, pudiendo descender a 1,65% en suelos pesados y llegar a un 2,5% en los arenosos, el cuál encaja con las muestras de nuestro estudio, sin embargo, los valores obtenidos fueron muy bajos (Gros y Domínguez, 1992)

Respiración microbiana

El suelo que presentó mayor tasa de respiración microbiana fue el de La Colorada, con $54,15 \text{ mg CO}_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Cabe señalar que este suelo también presentó el mayor porcentaje de humedad, con un 9,2%. En segundo lugar, El Faldar con $47,61 \text{ mg CO}_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ y un porcentaje de humedad de 5,2%. En Tonosí se presentó un $45,05 \text{ mg CO}_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ con un porcentaje de humedad de 4,8. El menor porcentaje de respiración fue Tonosí Centro con un $37,03 \text{ mg CO}_2 \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ con un porcentaje de humedad de 5,4% (Figura 4).

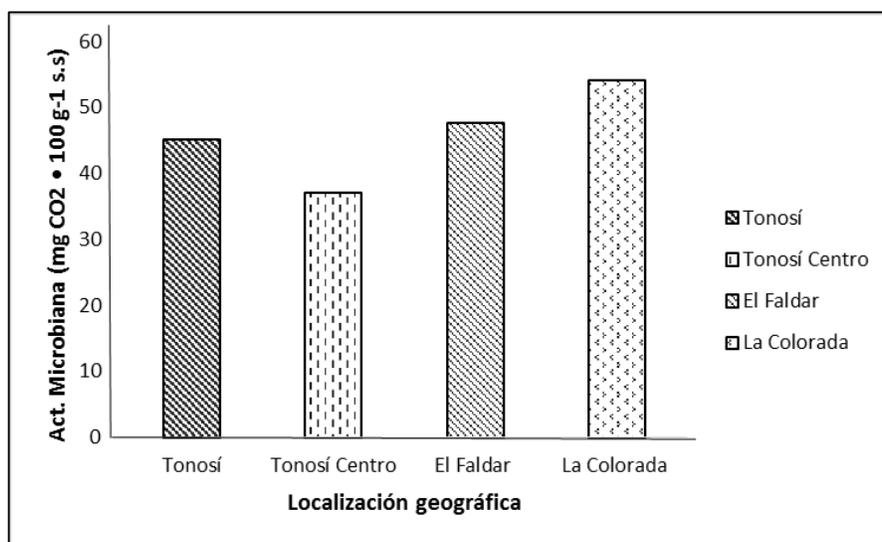


Figura 4. Valores de respiración microbiana en suelo.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Cuando existen condiciones aeróbicas en el suelo, gran parte del carbono que ingresa al mismo es lábil y solo una pequeña fracción se acumula en la fracción húmica estable. Según Sánchez-González et al. (2006) aunque el carbono del suelo es susceptible de perderse por deforestación o alteraciones, el suelo puede ser un almacén de carbono o bien convertirse en una fuente de emisiones de CO₂. Lo segundo puede estar ligado al cambio en el uso de la tierra y factores ambientales. En nuestro caso esto se presenta debido a la acción antropogénica realizada con el objetivo de producir cultivares de tomates para la venta.

Actividad deshidrogenasa en suelos

La finca de Tonosí Centro presentó una mayor absorbancia, mientras que La Colorada mostró menor valor. La actividad de la enzima deshidrogenasa (ADH) está relacionada con la tasa de MO y puede utilizarse como indicador biológico tal como señala la Norma de suelos de Panamá en el Decreto Ejecutivo # 2 de 14 de enero de 2009 (gaceta oficial 26201).

Los porcentajes de humedad del 18%, obtenidos en este trabajo, registraron una mayor actividad deshidrogenasa (Figura 5). Mientras que Brzezińska et al. (1998) reportan que con un incremento de agua en el suelo hay una mayor ADH, ya que se reduce el estado de aireación por la disminución del espacio de los poros para la difusión de gases. En nuestro caso, las condiciones de estudio no alcanzan ni la mitad de los valores de porcentajes de humedad que se establecieron en los trabajos anteriormente mencionados. Por lo cual, no pueden compararse. En ese sentido, se requiere de más estudios en suelos agrícolas con menores porcentajes de humedad.

Valoración de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Se encontró que las diluciones de 10⁻³ a 10⁻⁴, se mantuvieron constantes en la presencia de colonias en casi todos los sitios de muestreo, con excepción de la muestra de Llano Largo, donde la dilución más efectiva fue 10⁻⁶ (Figura 6).



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

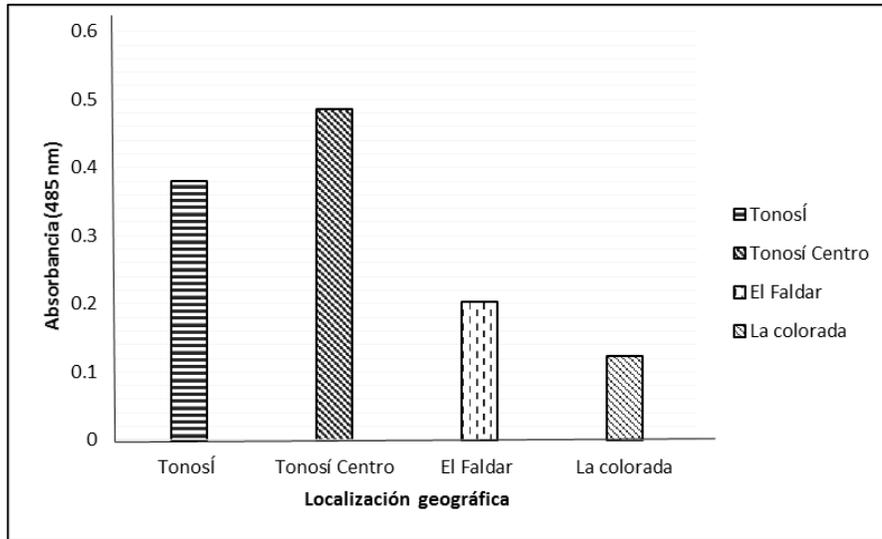


Figura 5. Valores de la actividad deshidrogenasa en suelo.

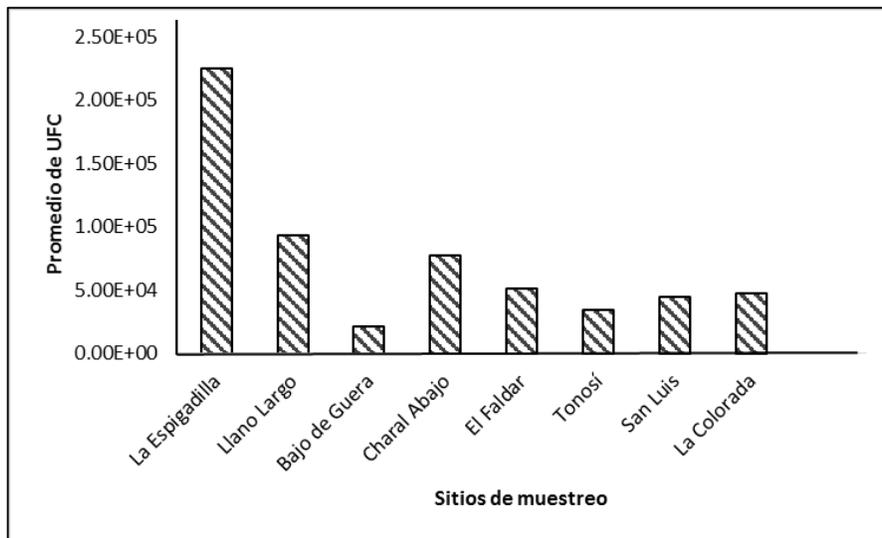


Figura 6. Promedio de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) con relación a su carga fúngica por sitio de muestreo.

La interacción de las variables de los géneros de hongos filamentosos aislados y las UFC tuvo un coeficiente de correlación de Pearson de -0,7, lo que indica que ambas variables tienen una relación lineal negativa ($-1 < r < 0$) inversa, a medida que aumentan los valores de x disminuyen los de y donde se obtuvo $r = 0,72748$; y el $r^2 = 0,5292$. Esto no es



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

significativo, ya que el coeficiente de determinación es $r^2 = 53\%$, $p > 0,05$. El r^2 significa que las unidades formadoras de colonias son responsables del 53% de la variabilidad en el número de géneros de hongos filamentosos (Figura 7).

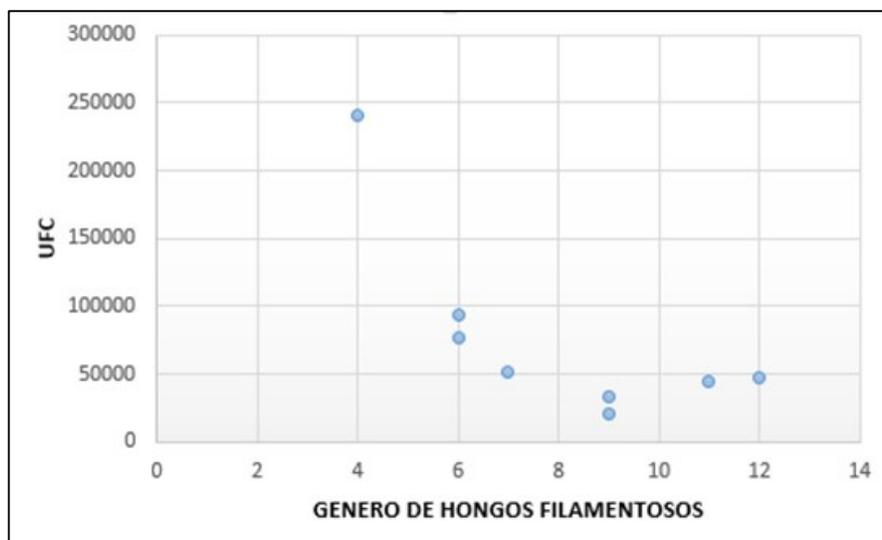


Figura 7. Grado de relación que existe entre el número de géneros de hongos filamentosos aislados y las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Para medir la abundancia de géneros de hongos filamentosos, se calculó el índice de Simpson, el cual permite medir la dominancia y diversidad. De acuerdo con nuestro grupo de datos, el índice de dominancia de Simpson fue un valor de 0,13769531, lo que indica que la dominancia es baja, mientras que el índice de diversidad de Simpson dio un valor de 0,86230469 indicando una alta diversidad (Cuadro 2).

De la interacción entre las variables de géneros de hongos filamentosos aislados y las UFC, se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de -0,7, lo cual indica que tienen una relación lineal negativa, coincidiendo este resultado con el estudio realizado por Pacasa-Quisbert et al. (2017) utilizando este estadístico, donde se buscaba la relación entre las UFC y factores físicos (% de MO) que influyen en el número de géneros de hongos filamentosos aislados.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Cuadro 2. Relación entre el área de muestreo y la abundancia de géneros

Área de muestreo	Géneros de hongos filamentosos	Abundancia relativa	P ²
La Espigadilla	4	0,0625	0,00390625
Llano Largo	6	0,09375	0,00878906
Charal Abajo	6	0,09375	0,00878906
El Faldar	7	0,109375	0,01196289
Bajo de Güera	9	0,140625	0,01977539
Tonosí	9	0,140625	0,01977539
San Luis	11	0,171875	0,02954102
La Colorada	12	0,1875	0,03515625

Los géneros de mayor incidencia fueron: *Aspergillus* sp. con 34%, *Penicillium* sp. con 20% y un 23% de micelio estéril. Mientras que los de menor incidencia fueron: *Paecilomyces* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Ramichloridium* sp., *Rhizopus* sp., *Scopulariopsis* sp., *Geotrichum* sp., *Cladosporium* sp., *Pythium* sp., *Mucor* sp., *Trichoderma* sp., *Cunninghamella* sp., *Curvularia* sp., levaduras y micelio estéril, con porcentajes menores al 4%.

A pesar de que muchos de los géneros aislados actúan como saprófitos, algunas especies son fitopatógenas bajo ciertas condiciones, pero en zonas de sabana tropical como las estudiadas en este trabajo, las cuales son similares a las zonas semi áridas o áridas, existen hongos característicos, como *Aspergillus* y *Penicillium* (Silverio et al., 1991). Hay que acotar que las especies presentes pueden variar según la acidez o basicidad que se presente el suelo.

Características macroscópicas de los aislamientos

Las colonias de los géneros aislados en este estudio se presentan en la Figuras 8 y las características macroscópicas de cada uno se describen en el Cuadro 3.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)



Figura 8. Desarrollo macroscópico de las colonias en el anverso del plato Petri.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Cuadro 3. Descripción macroscópica de hongos filamentosos sembrados en agar PDA.

N° de plato	GÉNERO	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS
1	<i>Aspergillus</i>	Anverso: Colonias de margen irregular, color verde caña, de rápido crecimiento y textura granulosa densa. Reverso: color verde claro.
2	<i>Aspergillus</i>	Anverso: Colonias de margen irregular, bordes externos blancos, seguido de un color marrón y en el interior, de color verde oscuro. Las esporas son de rápido crecimiento y textura granulosa densa. Reverso: de textura rugosa en forma de raíz, de color blanco con líneas amarillas.
3	<i>Penicillium</i>	Anverso: Colonia de margen redondeado suave, borde blanco 5mm, de color verde claro presenta un degradado hacia el centro blanco a rosado con un aro amarillo claro y un punto de exudado color naranja en el centro, moderado crecimiento y textura aterciopelada. Reverso: con textura liza y de color claro.
4	<i>Penicillium</i>	Anverso: Colonia de margen redondeado suave, de color rojo claro con aros internos de color rojo vino, textura aterciopelada, crecimiento moderado. Reverso: de color rojo, medio de cultivo cambia a rojo oscuro al pasar las semanas.
5	<i>Ramichloridium</i>	Anverso: Colonia presenta un margen irregular, de color chocolate oscuro hacia el centro, pequeños parches y bordes chocolate con tonalidad más clara, textura aterciopelada, crecimiento moderado. Reverso: de color chocolate oscuro, textura lisa.
6	<i>Colletotrichum</i>	Anverso: Colonia de margen redondeado, de borde como raíz, color blanco, textura lanosa, micelio aéreo de crecimiento rápido. Reverso: de color amarillo claro con textura lisa.
7	<i>Trichoderma</i>	Anverso: Colonia de margen redondeado con textura aterciopelada, de color blanco aros internos, de color verdoso aros externos que se tornan verde oliva con el tiempo formándose anillos concéntricos de color amarillo, de crecimiento rápido. Reverso: color blanco de textura lisa.
8	<i>Aspergillus</i>	Anverso: Colonia de margen irregular suave, superficie densamente aterciopelada, presenta centro de color verde caña, sin exudados. Micelio joven de color blanco textura algodonosa hacia los bordes, con crecimiento rápido. Reverso: de color que va en una tonalidad de blanco-crema.
9	<i>Aspergillus</i>	Anverso: Colonia de margen irregular suave, de color blanco y centro de color amarillo claro, de textura aterciopelada, crecimiento moderado. Reverso: de textura poco rugosa de color amarillo.
10	<i>Rhizopus</i>	Anverso: Colonia de margen irregular liso, de color blanco tornándose a café con el tiempo, micelio aéreo alcanzando altura de 1cm en el agar de crecimiento rápido, de textura algodonosa. Reverso: de color blanco de textura lisa.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Continuación

Cuadro 3. Descripción macroscópica de hongos filamentosos sembrados en agar PDA.

11	<i>Penicillium</i>	<p>Anverso: Colonia de margen redondeado suave, de color blanco y centro naranja con textura aterciopelada y decrecimiento moderado.</p> <p>Reverso: de color naranja claro y textura lisa.</p>
12	<i>Fusarium</i>	<p>Anverso: Colonia con margen redondeado suave, con borde aterciopelado, de color chocolate y un centro con textura serosa de color salmón, crecimiento rápido.</p> <p>Reverso: de color salmón, textura lisa.</p>
13	<i>Penicillium</i>	<p>Anverso: Colonia con margen redondeado de borde regular, superficie de la colonia con textura algodonosa, presenta un aro externo de tonalidad blanca, centro con aro de color rosado, crecimiento moderado.</p> <p>Reverso: es de color blanco hacia el borde, centro color crema, de textura lisa.</p>
14	<i>Aspergillus</i>	<p>Anverso: Colonias de margen irregulares suaves, de color chocolate oscuro y borde de 0.2 cm de color amarillo, textura granular densa.</p> <p>Reverso: de color amarillo con textura corrugado en forma de raíz.</p>
15	<i>Penicillium</i>	<p>Anverso: Colonias con márgenes redondeados suave, superficie corrugada, de textura aterciopeladas, de color verde olivo y bordes de 0.2cm en color blanco, presenta exudados incoloros.</p> <p>Reverso: de color blanco con textura arrugada en forma de raíz.</p>
16	<i>Penicillium</i>	<p>Anverso: Colonias con márgenes irregulares suave, presenta una superficie aterciopelada, de borde de color blanco y aros amarillo, centro de color verde oscuro, crecimiento rápido, Presenta exudados incoloros.</p> <p>Reverso: de color blanco, libera un pigmento de color rojo que cambia el medio de cultivo al pasar el tiempo.</p>
17	<i>Penicillium</i>	<p>Anverso: Colonias con márgenes redondeados, superficie irregular, textura aterciopelada compacta, de color blanco inicialmente se torna a rosado y rojo vino, presenta exudados de color rojo oscuro dispersos en todo el centro, con un crecimiento rápido.</p> <p>Reverso: de color rojo cambia el medio de cultivo a rojo oscuro.</p>
18	<i>Fusarium</i>	<p>Anverso: Colonia de margen redondeado, superficie con textura aterciopelada, micelio en las paredes, de color blanco y con un aro de color lila, crecimiento rápido.</p> <p>Reverso: de color crema claro y de textura lisa.</p>
19	<i>Rhizopus</i>	<p>Anverso: Colonia de margen redondeado liso, de color blanco tornándose a grisáceo con el tiempo, micelio aéreo alcanzando altura de 1cm en el agar, de crecimiento rápido, de textura algodonosa.</p> <p>Reverso: de color blanco, textura lisa.</p>



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Continuación

Cuadro 3. Descripción macroscópica de hongos filamentosos sembrados en agar PDA.

20	<i>Curvularia</i>	<p>Anverso: Colonia de margen redondeado, con superficie presenta textura felpa densa, de color café oliva que al pasar el tiempo se torna de un color negro grisáceo, de crecimiento rápido y no presenta exudados.</p> <p>Reverso: torna de color azul oscuro a negro el medio de cultivo.</p>
21	<i>Aspergillus</i>	<p>Anverso: Colonias de márgenes irregulares, de color chocolate oscuro, textura granular densa similar a tierra.</p> <p>Reverso: de color amarillo claro, con textura corrugado en forma de raíz.</p>
22	Micelio estéril	<p>Anverso: Colonias de márgenes redondeados suave, inicialmente de color blanco cambiándose rápidamente a un tono anaranjado vibrante, textura aterciopelada, de crecimiento moderadamente rápido.</p> <p>Reverso: de color amarillo claro, de textura lisa.</p>
23	<i>Aspergillus</i>	<p>Anverso: Colonias de márgenes redondeados, presenta una textura similar sémola, color chocolate claro, de rápido crecimiento.</p> <p>Reverso: de color amarillo claro y libera un pigmento amarillo, cambia el medio de cultivo a una tonalidad amarillenta.</p>
24	<i>Aspergillus</i>	<p>Anverso: Colonias sin márgenes visibles, superficie plana, presenta una cubierta pulverulenta, de color verde olivo, de crecimiento rápido.</p> <p>Reverso: de color verde claro, sin presentar textura.</p>
25	<i>Aspergillus</i>	<p>Anverso: Colonias de márgenes irregulares, presentan una superficie con textura granulosa, de color chocolate, bordede color blanco y centro de color verde olivo, textura pulverulenta, de crecimiento rápido. Puede presentar exudados.</p> <p>Reverso: de color amarillo claro y textura lisa.</p>
26	<i>Penicillium</i>	<p>Anverso: Colonias con margen irregular, de textura pulverulenta compacta, de color verde olivo y en el centro presenta exudados incoloros y crecimiento rápido.</p> <p>Reverso: de color amarillo claro y textura corrugada.</p>
27	<i>Penicillium</i>	<p>Anverso: Colonia con margen de forma irregular, de textura aterciopelada, de color blanco, presenta muchos exudados en el centro de color amarillo y naranja, de lento crecimiento.</p> <p>Reverso: con textura lisa, de color chocolate oscuro, libera pigmento que cambia el medio cultivo a un tono amarillento.</p>
28	<i>Trichoderma</i>	<p>Anverso: Colonia de margen no visible con textura serosa en los bordes en el centro aterciopelada, de color blanco verdoso que se tornan verde oliva con el tiempo formándose anillos, de crecimiento rápido.</p> <p>Reverso: color blanco de textura lisa.</p>



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Continuación

Cuadro 3. Descripción macroscópica de hongos filamentosos sembrados en agar PDA.

29	<i>Paecilomyces</i>	Anverso: Colonia de margen irregular suave, borde redondeado, de color verde caña y con el tiempo el centrose torna de color verde olivo, textura aterciopelada, crecimiento moderado. Reverso: de color crema con centro rojo y textura corrugada.
30	<i>Penicillium</i>	Anverso: Colonias de márgenes irregular suave, presenta una superficie con textura aterciopelada, de color verde caña y con exudados de color verde claro en el centro, de crecimiento rápido. Reverso: textura corrugada de color verde claro.
31	<i>Cladosporium</i>	Anverso: Colonia con margen redondeado suave, de color verde olivo al pasar el tiempo cambia a color café, de textura aterciopelada, presenta exudados incoloros en el centro, crecimiento moderado. Reverso: de color café a una tonalidad negra, textura lisa.
32	<i>Aspergillus</i>	Anverso: Colonias de bordes redondeados suave, superficie aterciopelada, de color blanco con el centro ligeramente de color grisáceo, De crecimiento rápido. Reverso: de color amarillo claro centro textura deprimida en el Agar.
33	<i>Geotrichum</i>	Anverso: Colonia sin margen visible, toda la superficie contextura lanosa, de color blanco y de rápido crecimiento. Reverso: de color blanco.
34	Micelio estéril	Anverso: Colonia sin margen visible, textura aterciopelada con micelio, de color blanco al pasar el tiempo se forma un aro con las puntas de los micelios de color negro y centro decolor grisáceo, de rápido crecimiento. Reverso: de color crema.
35	Micelio estéril	Anverso: Colonia con margen redondeado, bordes en forma de raíz, de textura aterciopelada, color crema presentando gránulos duros en el centro de color marrones, rápido crecimiento. Reverso: de color crema textura lisa.
36	Micelio estéril	Anverso: Colonia sin margen visible, micelio aéreo en las paredes del plato, textura lanosa, de color crema y en el centro forma un aro de color chocolate claro, rápido crecimiento. Reverso: de color blanco.

Características microscópicas

Las estructuras reproductivas de los hongos aislados se presentan en la Figuras 9 y cabe destacar que algunas cepas mostraron un escaso crecimiento y no hubo generación de dichas estructuras.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

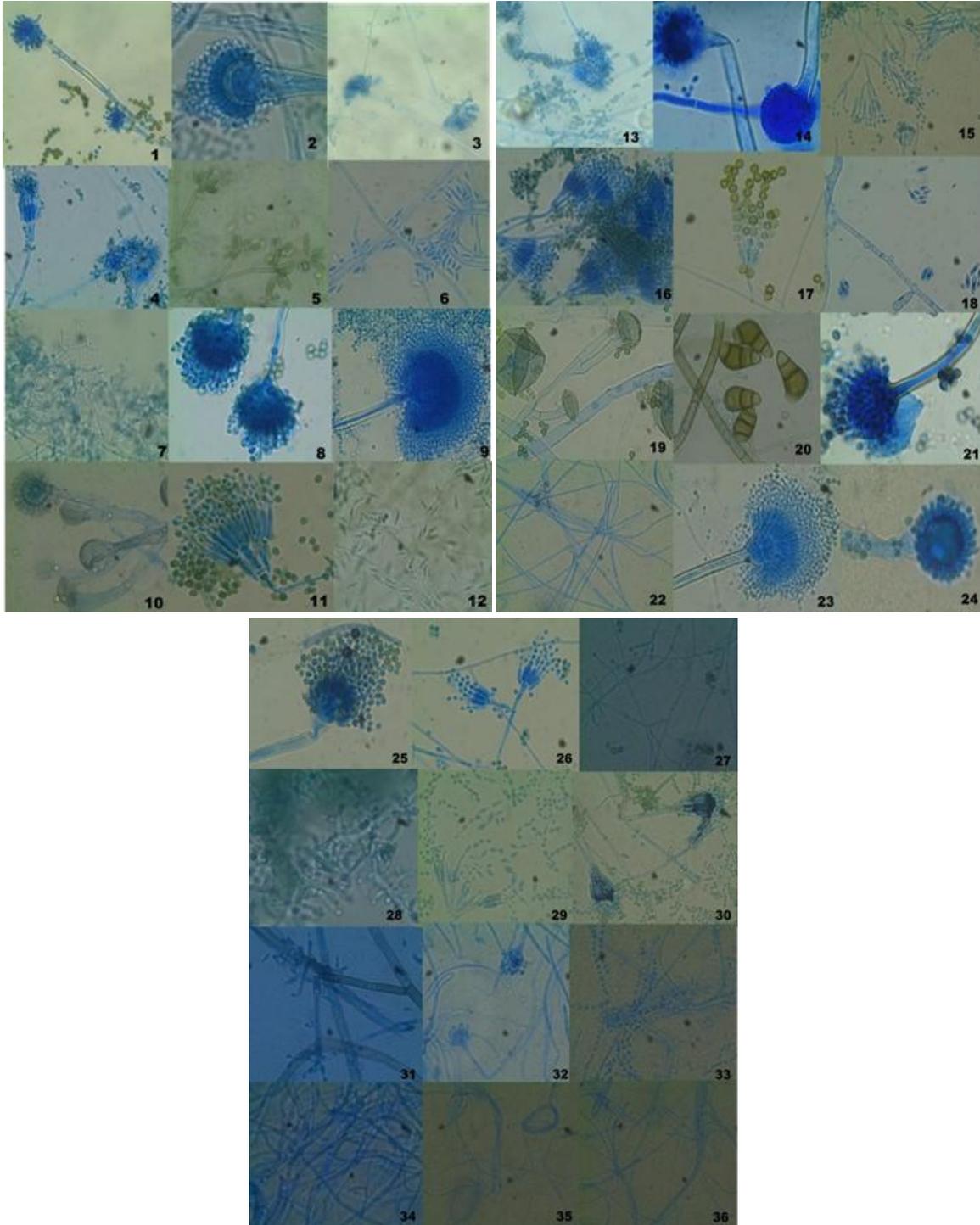


Figura 9. Colonias de hongos filamentosos.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

CONCLUSIONES

- Se determinó un total de 340 hongos aislados en platos Petri; alrededor de 576 inclinados (morfortipos).
- Con el cálculo de las UFC se pudo determinar que la carga fúngica óptima se encuentra en la dilución 10^{-4} .
- Los aislamientos de hongos se agruparon en un total de 15 géneros, basados en sus características morfológicas y microscópicas. Los cuales fueron: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Ramichloridium* sp., *Rhizopus* sp., *Scopulariopsis* sp., *Geotrichum* sp., *Cladosporium* sp., *Phytium* sp., *Mucor* sp., *Trichoderma* sp., *Cunninghamella* sp., *Curvularia* sp.

REFERENCIAS

- Arenas, R. (1993). *Micología Médica ilustrada* (Primera ed.). México D.F: McGraw Hill.
[\(PDF\) Micologia Medica Ilustrada ARENAS 5e | Helmuth Guillen - Academia.edu](#)
- Arenas, R. (2003). *Micología Médica ilustrada*. (Segunda ed.). México D.F.: McGraw Hill.
[\(PDF\) Micologia Medica Ilustrada ARENAS 5e | Helmuth Guillen - Academia.edu](#)
- Brzezińska, M., Stępniewska, Z., y Stępniewski, W. (1998). Soil oxygen status and dehydrogenase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(13), 1783-1790.
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00043-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00043-1)
- Casas, G. (1989). *Micología general*. Caracas, Venezuela. 448 pp. [TEXTO Micología general; generalidades, humana, animal, vegetal, industrial, contaminantes, procesos de laboratorio - Casas Rincón, Guillermo](#)
- Casida, L., Klein, D., y Santoro, T. (1964). Soil Dehydrogenase Activity. *Soil Science*, 98, 371-376. <https://doi.org/10.1097/00010694-196412000-00004>.



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)

Google Earth (9 de noviembre de 2024). Provincia de Los Santos, República de Panamá.

<https://earth.google.com/web/search/Los+Santos,+Panam%c3%a1/@7.61761332,-80.36428498,121.9641596a,147504.97238914d>.

Gaceta Oficial 26201, República de Panamá. Decreto Ejecutivo # 2 de 14 de enero de 2009.

https://www.gacetaoficial.gob.pa/pdfTemp/26201/GacetaNo_26201_20090114.pdf

Gros, A., y Domínguez, A. (1992). *Abonos guía práctica de la fertilización*. Madrid.:

Ediciones Mundi-Prensa. <http://catalogoweb.unab.edu.pe/cqi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=2392>

Heflish, A. A., Abdelkhalek, A., Al-Askar, A. A., y Behiry, S. I. (2021). Protective and curative

effects of *Trichoderma asperelloides* Ta41 on tomato root rot caused by *Rhizoctonia solani* Rs33. *Agronomy*, 11(6), 1162. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061162>

Hernández, B., Cornejo, H., y Mejía., F. (2016). *Manual de laboratorio del Curso de*

Microbiología Ambiental de suelos. Panamá: Universidad de Panamá.

Koneman, E., y Roberts, G. (1987). *Micología. Práctica de laboratorio*. Editorial médica

panamericana. 221 p. [Micología: práctica de laboratorio - Elmer W. Koneman, Glenn D. Roberts - Google Libros](#)

Landínez-Torres, A. Y., y Fagua, C. P. (2022). *La micobiota del suelo: estudios de caso en*

agroambientes altoandinos colombianos. 1er Congreso Colombiano de Micología,

(pág. 168). Bogotá. https://www.researchgate.net/profile/Nathali-Lopez-Cardona/publication/373329595_Reemergencia_del_hongo_Stenocarpella_sp_afectando_cultivos_de_maiz_en_el_departamento_del_Meta_Colombia/links/64e631ad0453074fbda952b1/Reemergencia-del-hongo-Stenocarpella-sp-afectando-cultivos-de-maiz-en-el-departamento-del-Meta-Colombia.pdf

[Reemergencia del hongo Stenocarpella sp afectando cultivos de maiz en el departamento del Meta Colombia/links/64e631ad0453074fbda952b1/Reemergencia-del-hongo-Stenocarpella-sp-afectando-cultivos-de-maiz-en-el-departamento-del-Meta-Colombia.pdf](#)

[ad0453074fbda952b1/Reemergencia-del-hongo-Stenocarpella-sp-afectando-cultivos-de-maiz-en-el-departamento-del-Meta-Colombia.pdf](#)

[ad0453074fbda952b1/Reemergencia-del-hongo-Stenocarpella-sp-afectando-cultivos-de-maiz-en-el-departamento-del-Meta-Colombia.pdf](#)

[ad0453074fbda952b1/Reemergencia-del-hongo-Stenocarpella-sp-afectando-cultivos-de-maiz-en-el-departamento-del-Meta-Colombia.pdf](#)



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)

MacLaren, C., Storkey, J., Menegat, A., Metcalfe, H., y Dehnen-Schmutz, K. (2020). An ecological future for weed science to sustain crop production and the environment. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 40:24, 1-29.

<https://doi.org/10.1007/s13593-020-00631-6>

Medina Mendoza, S. A., y Vélez Medina, A. D. (2018). *Evaluación de la calidad del suelo por el empleo de agroquímicos, en sistemas productivos de arroz y plátano de la trocha cuatro del municipio de Granada (Meta)*. Doctoral dissertation, Universidad Santo Tomás. <http://hdl.handle.net/11634/13684>

Ministerio de Desarrollo Agropecuario. (2014). *Informe departamento de planificación. Panamá. Dirección de Agricultura - Ministerio de Desarrollo Agropecuario.*

Moller, C., Trujillo, M., Uetz, M., Dreyfuss, M., Sanglier, M., y Leuchter, C. (1995). *Manual Bioled Project*. 124 p.

NESTLÉ. (2017). *Informe final Campaña de Tomate Industrial 2016-2017*. Panamá.

Pacasa-Quisbert, F., Loza-Murguía, M. G., Bonifacio-Flores, A., Vino-Nina, L., y Serrano-Canaviri, T. (2017). Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K iphak iphani, Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(1), 2-25.

http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2072-92942017000100002&script=sci_abstract

Rea-Sánchez, V., Maldonado-Cevallos, C., y Villao-Santos, F. (2015). Los Sistemas de Información para lograr un desarrollo competitivo en el sector agrícola. *Revista Ciencia Unemi*, 8(13), 122-129.

<https://www.redalyc.org/pdf/5826/582663827014.pdf>



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Sánchez-González, A., López-Mata, L., y Vibrans, H. (2006). Composición y patrones de distribución geográfica de la flora del bosque de oyamel del Cerro Tlaloc, México. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, (79), 67-68.

<https://www.redalyc.org/pdf/577/57707907.pdf>

Silverio, S. M., Sordo, R. N., y Alvarez, A. V. (1991). Introducción a la microbiología de suelo. Pueblo y Educación.

Villarreal-Núñez, J. E., Name-Tuñón, B., y García Espino, R. A. (2012). Monitoreo de cambios en la Fertilidad de Suelos por Medio de Análisis de Laboratorio. *Agronomía Mesoamericana*, 23(2), 301-309.

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43724664009>

Watanabe, T. (2010). *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*. Third Edition. Taylor and Francis Group, LLC.

<https://doi.org/10.1201/EBK1439804193>



Este trabajo está licenciado bajo una [licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)