



Universidad Central de Venezuela.

Facultad de Ciencias.

Escuela de Biología.

Departamento de Ecología.



**Caracterización de algunos tipos microbianos promotores de crecimiento vegetal de la  
rizósfera de *Coffea arabica* L, cultivo predominante en la  
Estación Experimental “Jaime Henao Jaramillo”, El Laurel, UCV.**

Br. Norca García.

Tutora I: Dra. Marcia Toro

Tutora II: Dra. Palmira Guevara

Caracas, Diciembre 2016



Universidad Central de Venezuela.

Facultad de Ciencias.

Escuela de Biología.

Departamento de Ecología.



**Caracterización de algunos tipos microbianos promotores de crecimiento vegetal de la  
rizósfera de *Coffea arabica* L, cultivo predominante en la  
Estación Experimental “Jaime Henao Jaramillo”, El Laurel, UCV.**

**Trabajo Especial de Grado**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Br. Norca García como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutora I: Dra. Marcia Toro

Tutora II: Dra. Palmira Guevara

Caracas, Diciembre 2016

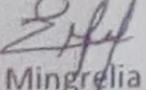


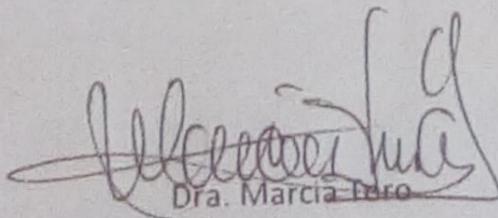
Universidad Central de Venezuela  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Biología  
Departamento de Ecología

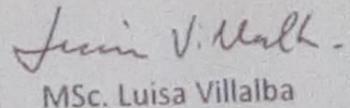
#### ACTA

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Bachiller Norca José García Romero C.I. 19.858.685, titulado "Caracterización de algunos tipos microbianos promotores de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Coffea arabica* L, cultivo predominante en la Estación Experimental "Jaime Henao Jaramillo", El Laurel, UCV", para optar por el título de Licenciada en Biología, consideramos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos y lo consideramos aprobado.

En la ciudad de Caracas, a los 7 días del mes de diciembre de 2016.

  
Dra. Mingrelia España

  
Dra. Marcia Toro

  
MSc. Luisa Villalba

*A ti,*

*que a pesar de todo creíste en mí*

*y seguiste apoyándome.*

### **Agradecimientos.**

Puede parecer extraño que en un trabajo de carácter científico se inicie agradeciendo a Dios por sobre todas las cosas, por dar fortaleza y guiar nuestros pasos en el camino correcto. Sin embargo, creer es el motivo por el cual podemos seguir luchando y precisamente creer que podía lograrlo fue lo que me llevó a concluir y no renunciar a lo largo de esta aventura y ¡vaya que fue larga!

Agradezco a mi madre, mujer luchadora e independiente por ser mi fuente de apoyo continuamente, así mismo agradezco a mis familiares más cercanos (hermanos y tíos) por estar junto a mi brindarme su apoyo. A todos gracias por ayudarme cuando más lo necesite.

A Gilkar Urbina y su familia. Por ser una amiga incondicional y ayudarme a iniciarme nuevamente en este camino, después de haberme retirado por un año. Muy agradecida por su cariño y confianza.

A Johan Cisneros y a su familia, por ser de gran importancia en la parte final de mi carrera, darme ánimos y hacerme creer que podía lograr lo que me propusiera. Gracias porque me ayudaste a creer de nuevo en mi. A Carol Ramírez por dejarme entrar en su hogar y compartir sus experiencias conmigo.

A la profesora Marcia Toro, por creer en mi y recibirme en su laboratorio sin conocerme, por sus consejos y excelente tutoría. También agradezco a la profesora Palmira Guevara por compartir sus conocimientos conmigo y ser tan amable al aceptar compartir la tutoría de este trabajo con la profesora Marcia. Estoy inmensamente

agradecida con ambas. No puedo olvidarme de Ana López, en quien pude ver a una amiga y gran consejera, gracias por tu compañía en el laboratorio y tu preocupación hacia mi. Tambien agradezco a mis Jurados, Luisa Villalba y Mingrelia España, por sus consejos y correcciones. En especial a Luisa que me acompaña en la recolección de las muestras.

Agradezco también al personal que labora en “El Laurel”, por su amabilidad y ayuda en sus instalaciones.

No puedo dejar de mencionar mi agradecimiento a las damas del CVCM, Juana Vitelli e Indira Pérez, por su colaboración en la realización de este trabajo y recibirme siempre que fue necesario.

Muchas gracias a todos, pues han sido parte importante en el desenlace final de mi formación profesional y personal.

## Índice General.

Resumen.....	12
1. Introducción.....	14
1.1 Estación Experimental “Jaime Henao Jaramillo” (El Laurel). .....	14
1.2 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal. ....	15
1.3 Mecanismos de acción de las bacterias promotoras de crecimiento. ....	17
1.4 Técnicas usadas en la caracterización de las PGPR. ....	19
1.5 Importancia de las PGPR en el ambiente.....	21
2. Antecedentes.....	23
3. Objetivos.....	30
3.1 Objetivo general.....	30
3.2 Objetivos específicos. ....	30
4. Materiales y métodos.....	30
4.1 Recolección de muestras del suelo rizosférico. ....	30
4.2 Aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento. ....	31
4.2.1 Preparación de muestras de suelo para aislamiento bacteriano.....	31
4.2.2 Aislamiento de <i>Bacillus</i> sp.....	32

4.2.3 Aislamiento de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno ( <i>Azotobacter</i> sp.).....	32
4.2.4 Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfatos. ....	33
4.3 Colección microbiana.....	34
4.4 Evaluación del efecto de los aislados bacterianos sobre semillas. ....	35
4.5 Caracterización microbiológica. ....	35
4.5.1 Tinción Gram-Hucker.....	36
4.5.2 Prueba de la oxidasa.....	36
4.5.3 Crecimiento en el medio agar Hierro de Kliger (KIA).....	37
4.5.4 Prueba SIM.....	37
4.5.5 Prueba de citrato de Simmons.....	37
4.5.6 Prueba de crecimiento en agar Bilis Esculina.....	38
4.5.7 Prueba de reducción de nitratos.....	38
4.5.8 Prueba de crecimiento en urea.....	38
4.6 Análisis in silico de las secuencias de los géneros bacterianos reportados en el suelo rizosférico.....	38
5. Resultados.....	39
5.1 Aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento. ....	39
5.2 Aislamiento de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno. ....	42

5.3	Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfatos. ....	43
5.4	Colección microbiana.....	45
5.5	Evaluación del efecto de los aislados bacterianos sobre semillas. ....	46
5.6	Caracterización microbiológica. ....	50
5.7	Ánalisis in silico de las secuencias de los géneros bacterianos reportados en el suelo rizosférico.....	52
6.	Discusión.....	58
6.1	Aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento. ....	58
6.2	Aislamiento de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno. ....	60
6.3	Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfatos. ....	61
6.4	Evaluación del efecto de los aislados bacterianos sobre semillas. ....	63
6.5	Caracterización microbiológica. ....	64
6.6	Ánalisis in silico de las secuencias del gen RNAr 16S en GenBank de los géneros bacterianos reportados. ....	65
7.	Conclusiones.....	68
8.	Bibliografía.....	69

## Índice de Tablas.

<i>Tabla 1. Algunos análisis del DNA genómico usando en estudio de diversidad bacteriana (Ibarra, 2010).....</i>	20
<i>Tabla 2. Composición del Medio TGE con valores para preparar un volumen de 1 L.....</i>	32
<i>Tabla 3. Composición del medio mineral sin nitrógeno para preparar un volumen de 1 L.</i>	33
<i>Tabla 4. . Composición del medio YED-P con valores para un volumen de 100 mL. ....</i>	34
<i>Tabla 5. Valores obtenidos con ANOVA para bacterias promotoras de crecimiento. ....</i>	41
<i>Tabla 6. Valores obtenidos con ANOVA para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.</i>	
.....	43
<i>Tabla 7. Ficha de identificación de la colección bacteriana. ....</i>	46
<i>Tabla 8. Pruebas microbiológicas aplicadas a las bacterias promotoras de crecimiento vegetal.....</i>	51
<i>Tabla 9. Datos de las secuencias genéticas, zonas de anclaje de los primers y porcentaje de identidad de anclaje.....</i>	56

## Índice de Figuras.

Figura 1. Mapa geográfico de la localización de la estación Experimental “Jaime Henao Jaramillo”.....	14
Figura 2. Grupos de género bacterianos que son clasificados como PGPR.....	16
Figura 3. Ciclo del nitrógeno.....	19
Figura 4. Imagen que ilustra la preparación de la muestra del suelo y diluciones. ....	31
Figura 5. Bacterias promotoras de crecimiento por gramos de suelo. ....	40
Figura 6. Colonias de bacterias cultivadas en TGE. ....	42
Figura 7. Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno. ....	42
Figura 8. Bacterias solubilizadoras de fosfatos en Catuai.....	44
Figura 9. Bacterias solubilizadoras de fosfatos en Caturra.....	45
Figura 10. Efecto de promoción de crecimiento de las bacterias asociadas a rizósfera de Catuai sobre semillas de lechuga.....	47
Figura 11. Efecto de promoción de crecimiento de las bacterias asociadas a rizósfera de Caturra sobre semillas de lechuga.....	48
Figura 12. Efecto promotor de germinación de las bacterias asociadas a la rizósfera de Catuai. ....	49
Figura 13. Efecto promotor de germinación de las bacterias asociadas a la rizósfera de Catuai. ....	50
Figura 14. Ficha de secuencia genética en DNAMAN. ....	53
Figura 15. Ubicación de los iniciadores del ensayo de PCR del 16S en el ARNr 16S de <i>E.coli</i> . ....	54

Figura 16. Alineamiento de secuencia del gen RNAr 16S con el oligo U2.....	54
Figura 17. Geles de digestión del gen 16S de los géneros <i>Rhizobium</i> , <i>Pseudomonas</i> y <i>Bacillus</i> .....	57
Figura 18. Bacteria Solubilizadora de Fosfato con halo alrededor.....	62

### **Resumen.**

El café es un importante rubro agrícola en Venezuela, con más de 300 mil hectáreas sembradas en el territorio nacional. Se han venido presentando cambios de uso de la tierra para la ganadería o usos agrícolas diferentes a la plantación del café, por lo que la demanda del país no es satisfecha con la producción nacional, y se hace necesario incrementar su producción. La inoculación de cafetos con microorganismos beneficiosos es una práctica cada vez más extendida. Se han desarrollado trabajos que buscan usar y elaborar biofertilizantes que ayuden a mejorar la productividad agrícola mediante el uso de bacterias o rizobacterias promotoras de crecimiento. En el Laboratorio de Agroecología, del Instituto de Zoología y Ecología Tropical, llevamos a cabo un estudio en el que se busca aislar bacterias procedentes de la rizósfera asociada a plantas de café (de las variedades Catuai y Caturra). Interesados en los efectos de promoción de crecimiento que estas bacterias puedan tener sobre las plantas, se aislaron según tres propiedades: Promoción de crecimiento, solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno. Adicionalmente, se evaluó el efecto de promoción de crecimiento de cada aislado en semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*) en una prueba de germinación en condiciones de esterilidad. Al evaluar el efecto de estos aislados durante los 7 días en el que se incubaron, se pudo apreciar una curva ascendente en todos los casos del registro de semillas germinadas, obteniendo resultados de 70% y 60% de germinación en comparación a los controles. De los 16 aislados caracterizados M5B y M1, fueron identificados como parte del género *Bacillus* capaces de promover el crecimiento; M35 se ubicó dentro del género

*Micrococcus* promotor de crecimiento; M1L pertenece al género *Pseudomonas* excelentes solubilizadores de fosfatos; mientras que M1T, M1G, M1B, M1C y M1t se agruparon dentro de los *Enterobacter* como solubilizadores. La capacidad de solubilizar fosfatos fue medida a través del Índice de Solubilización, bajo la premisa de a mayor área abarcada por el halo, mayor capacidad de solubilización posee la colonia.

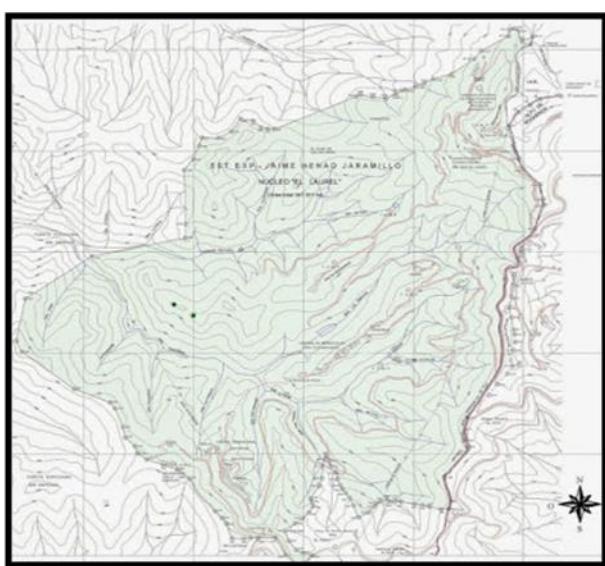
Además, se realizaron pruebas bioquímicas con la finalidad de caracterizar e identificar los aislados bacterianos obtenidos. Empleando una aplicación de secuenciación se llevó a cabo el análisis *in silico* del ARNr 16s, alineando las secuencias genómicas delimitadas por los oligos universales U1 y U2, donde se identificó los sitios de corte por la enzima de restricción HaeIII, disponible en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología Experimental. Esto hizo posible el conocimiento de patrones de bandas en geles de electroforesis que separan a los géneros reportados por Marcano (2014), en tres grupos fáciles de identificar y permitió establecer el diseño de un ensayo PCR-RFLP útil en la caracterización de los aislados bacterianos.

**Palabras claves:** Bacterias promotoras, fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosfato, café, PCR-RFLP

## 1. Introducción.

### 1.1 Estación Experimental “Jaime Henao Jaramillo” (El Laurel).

La estación Experimental Jaime Henao Jaramillo, es parte de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, localizada en el sector El Laurel, Municipio Guaicaipuro, Estado Miranda ( $10^{\circ}22'24"N$   $66^{\circ}54'04"W$ ) (Albán y col., 2013). Ubicada a 15 Km de la ciudad de Caracas, esta estación tiene 149,329 hectáreas y se especializa en el cultivo de café. Está enclavada en una selva nublada tropical a una altitud que varía entre los 1.230 y 1.460 m.s.n.m. Tiene un clima de montaña con una temperatura media anual de  $19,2^{\circ}C$ , y un promedio de precipitación de 1.282 mm/año de lluvias que condicionan una humedad relativa de 78% (Abarca, 2005). El suelo de esta Estación es una combinación de suelo acrisol y cambrisol húmico, con una textura franco arcillosa, un pH de 6,4 y un porcentaje de materia orgánica del 5,43 (Albán y col., 2013).



**Figura 1.** Mapa geográfico de la localización de la estación Experimental “Jaime Henao Jaramillo”.

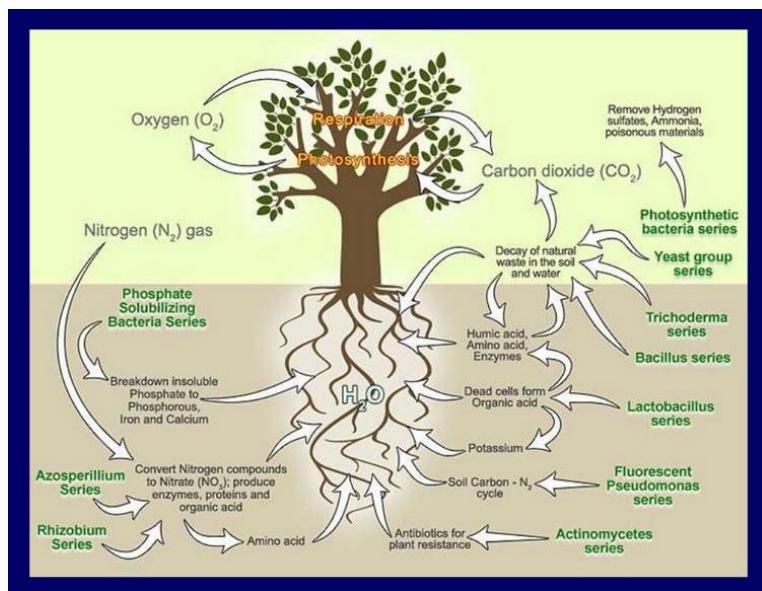
Se producen semillas de las siguientes variedades de café: Catimor, Bourbon, Híbrido Timor, San Ramón, Mundo Nuevo, Caturra Amarillo, Caturra Rojo, Catuai y Canefora. Constituye un patrimonio de inmenso valor para la universidad y la sociedad, no solo por el gran capital económico que conforma, sino por el potencial productivo que representa como alternativa para la generación segura y autónoma de recursos, para la producción de conocimientos y para la realización de actividades de extensión y docencia (Abarca, 2005). Esto último, hace a El Laurel, un objeto de estudio e interés para el análisis microbiológico del suelo que permitan generar información que maximice el valor productivo de sus suelos, haciendo que la misma recobre su funcionalidad total como empresa.

### **1.2 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.**

En el suelo existe gran diversidad de microorganismos benéficos para el desarrollo y producción de las plantas, entre los que se encuentran las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas, PGPR por su acrónimo en inglés “Plant Growth Promoting Rhizobacteria” (Kloepper y Schroth, 1978), algunos autores también la llaman Plant Growth Promoting (PGP) acrónimo de PGPR (Cabello-Conejo y col., 2014; Marcano, 2014) por su capacidad para inducir mejoras en el crecimiento y el desarrollo de las plantas mediante diferentes modos de acción (Vessey, 2003; Spaepen y col., 2008; Hayat y col., 2010; Marcano, 2014).

El suelo rizosférico contiene tipos diversos de comunidades PGPR, las cuales exhiben efectos beneficiosos en la productividad de la cosecha. Numerosos resultados de investigaciones son conducidos a entender la diversidad, dinámica e importancia de las

comunidades PGPR del suelo y su beneficio y rol de cooperación en la productividad agrícola. Algunos ejemplos comunes de géneros de PGPR que muestran actividad promotora de crecimiento en plantas son: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Mycobacterium*, *Mesorhizobium*, *Flavobacterium*, etc (Shankar, 2013).



**Figura 2.** Grupos de género bacterianos que son clasificados como PGPR. (Tomada de <http://es.slideshare.net/alterbiosa/promotores-de-crecimiento-ing-alejandro-perticari>)

Las PGPR pueden ser definidas como una parte indispensable de la biota en la rizósfera, ya que pueden estimular el crecimiento del huésped tanto en asociación simbiótica con las plantas, como al desarrollarse libremente en la rizósfera. Las PGPR parecieran ser exitosas en llegar a establecerse en el ecosistema del suelo debido a su alta adaptabilidad en gran variedad de ambientes, rápido rango de crecimiento y su versatilidad bioquímica para metabolizar un amplio rango de compuestos naturales (Kloepper y col., 1981, Bhattacharyya y Jha. 2012). Los productos formulados a base de

bacterias promotoras del crecimiento vegetal en agricultura reciben el nombre genérico de biofertilizantes y contribuyen al desarrollo de la agricultura sostenible (González-Andrés y col., 2007; Singh, 2013).

### **1.3 Mecanismos de acción de las bacterias promotoras de crecimiento.**

Las PGPR pueden promover y desarrollar el crecimiento en plantas tanto directa como indirectamente (Castro y col., 2009, Bhattacharyya y Jha2012). El efecto directo constituye un aumento en la movilización de los nutrientes solubles, además de un mejoramiento de absorción de los mismos por la planta, la producción de antibióticos contra hongos, bacterias y virus (Hoffland y col., 1997). Efectos indirectos incluyen el aumento de fijación de N<sub>2</sub>, al mejorar el número de nódulos de la raíz y el aumento de la actividad nitrogenasa (Zhang y col., 1996), los cuales intervienen en la transformación del N<sub>2</sub> en formas asimilables para las plantas.

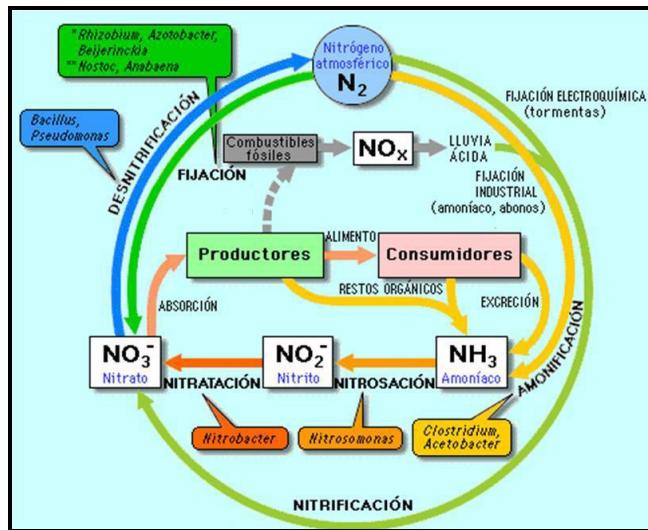
Se han señalado incrementos en la biodisponibilidad de P en el suelo cuando existen aumentos paralelos en la actividad microbiana. Los mecanismos involucrados en la solubilización-mineralización microbiana de las diferentes formas de fosfato insoluble incluyen procesos de acidificación, quelación, reacciones de intercambio, producción de ácidos y acción enzimática (Rodríguez y col., 1999; Sánchez y col., 2012; Restrepo-Franco y col., 2015) en los que se destacan las bacterias solubilizadoras de fosfatos por su eficiencia en este proceso. Las bacterias transforman los fosfatos insolubles a formas solubles por la acción de diferentes mecanismos directos o indirectos. Entre ellos se destacan: i) la acción de ácidos orgánicos producidos por microorganismos (Watanabe y col., 1965; Restrepo-Franco y col., 2015) ii) quelación de los elementos responsables de la insolubilidad de los

fosfatos presentes y iii) asimilación directa de fosfatos insolubles por microorganismos que lo acumulan en sus células y los liberan posteriormente (Puente me y col., 2009; Restrepo-Franco y col., 2015).

Las PGPR tienen la capacidad de producir o cambiar la concentración de reguladores de crecimiento como giberelinas, citoquininas y auxinas, que son hormonas vegetales que controlan un gran número de sucesos, entre ellos el crecimiento de las plantas, la senescencia, la floración, la formación del fruto y la germinación (Arun y col., 2012; Marcano, 2014).

Dado el papel esencial del nitrógeno en la nutrición de las plantas, la fijación del nitrógeno molecular ( $N_2$ ) hasta amonio, por medio de los microorganismos simbióticos y de vida libre mediante el complejo enzimático de la nitrogenasa (Ahemady y Mulugeta, 2014), es de gran relevancia para los agrosistemas, al permitir la reducción o incluso supresión de los abonos minerales nitrogenados (Durán y col., 2013). La transformación de nitrógeno atmosférico o dinitrógeno ( $N_2$ ) hasta amoniaco ( $NH_3$ ), y finalmente hasta amonio ( $NH_4^+$ ) mediante un proceso metabólico de reducción, recibe el nombre de “fijación biológica de nitrógeno”. La enzima responsable de dicho proceso de reducción es la nitrogenasa, la cual presenta dos componentes (I y II) y en presencia de ATP y un sistema transportador es capaz de reducir el dinitrógeno hasta amoniaco (González y Lluch, 1992; Arzolay, 2013), como se muestra en la siguiente fórmula:





**Figura 3.** Ciclo del nitrógeno.(Tomado de <http://contenidos.educarex.es>)

#### 1.4 Técnicas usadas en la caracterización de las PGPR.

Actualmente estos se pueden estudiar mediante dos estrategias: 1) Aislamiento y caracterización de las cepas en medios de cultivo, lo cual permite conocer la diversidad así como inferir algunas funciones de estos microorganismos (Li y col., 2007), pero solo menos de 10% de los microorganismos de suelo podrían crecer en los medios de cultivo, entonces este método no puede evaluar la diversidad de toda la comunidad microbiana en suelo. 2) Métodos moleculares independientes de cultivo, que incluyen aislamiento de DNA metagenómico del suelo y clonación de algunos genes previamente amplificados por PCR (Zani y col., 2000), permitiendo conocer a los microorganismos cultivables y no cultivables presentes en el suelo (Izquierdo y Nusslein, 2006), pero no se puede evaluar las características fenotípicas de los microorganismos.

En estudios de diversidad y taxonomía de los aislados microbianos, los métodos usados más comunes incluyen análisis de DNA, rRNA, proteínas (enzimas), composición celular (ácidos grasos, polisacáridos extracelulares...), y caracterización fenotípica

(actividad de las enzimas, variedad de fuente de carbono y de nitrógeno, producción de algunos compuestos específicos, resistencia a antibióticos y agentes químicos, entre otros) (Ibarra, 2010).

**Tabla 1.** Algunos análisis del DNA genómico usando en estudio de diversidad bacteriana (Ibarra, 2010).

Método	Aplicación	Ventajas	Desventajas
<b>PFGE (Electroforesis de campo pulsado)</b>	Estimar el tamaño de cromosoma y diferenciar las especies y cepas	Se puede identificar las cepas clínicas en nivel de biovariabilidad	Necesita tiempo largo
<b>RAPD (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados aleatoriamente)</b>	Diversidad dentro especies e identificar las cepas	Simple, rápido y fácil a realizarse	Sensible a las condiciones, bandas falsas, y no es muy reproducible
<b>TP-RAPD (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados aleatoriamente por dos primers)</b>	Dividir especies	Rápido, exacto, confiable	-
<b>rep-PCR (PCR de secuencias de repetición)</b>	Identificar las especies y cepas	Simple, no necesita muy DNA con alta calidad	Sensible a las condiciones, y no es muy reproducible
<b>AFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados)</b>	Diferenciar las especies e identificar las cepas	Sensible, y reproducible	Mucho trabajo, difícil de manejar
<b>Patrones de LMW RNA (RNA de bajo peso molecular)</b>	Diferenciar las especies e identificar las cepas	Estable y reproducible	Difícil de manejar
<b>Hibridación DNA-DNA</b>	Definir las especies	Se analiza todo cromosoma, reproducible	Mucho trabajo, difícil de manejar
<b>Secuenciación del gen 16S rRNA</b>	Diferenciar los géneros y especies	Fácil, confiable, y se puede comparar datos de diferentes trabajos	No se puede diferenciar las especies muy relacionadas
<b>Secuenciación de los genes esenciales</b>	Diferenciar los géneros y especies	Fácil, confiable, y se puede comparar datos de diferentes trabajos	-
<b>RFLP de 16S-23S ITS</b>	Diferenciar las especies	Fácil, confiable.	-

### **1.5 Importancia de las PGPR en el ambiente.**

La fertilidad de suelo consiste en la capacidad de poder suministrar las condiciones necesarias para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Sánchez, 2007). La fertilidad de los suelos comprende cinco factores: composición química, estructura física, condiciones climáticas, prácticas de cultivo y microorganismos. Sin estos últimos se ha comprobado que el cultivo de las plantas se verifica con dificultad; siendo los suelos más fértiles aquellos que poseen floras microbiológicas elevadas (González y Lluch, 1992; Arzolay, 2013).

Resulta de gran importancia y ventajoso aislar estos microorganismos, caracterizar y evaluar el efecto que estos podrían tener sobre el crecimiento en plantas de café como potenciales optimizadores del cultivo, de manera que se puedan emplear como biofertilizantes y como bioestimulantes. Los biofertilizantes son compuestos preparados a partir de microorganismos vivos los cuales, cuando se aplican a las semillas o a las superficies del suelo adyacentes a las plantas y que pueden colonizar la rizósfera o el interior las partes interiores de las plantas y promoviendo el crecimiento de las raíces (Bhattacharyya y col. 2012). Las PGPR son herramientas potenciales para una agricultura sustentable, de aquí que investigar y definir cuáles bacterias, para qué plantas y en cuáles condiciones ambientales funcionan de manera óptima, puede ser útil para la optimización de la obtención de mejores cultivos agrícolas. En este caso, trabajar con muestras de suelo extraídas de la rizósfera de cultivos de café permitirá generar un producto biológico para la potencial elaboración de un biofertilizante de uso local y/o regional.

El uso de biofertilizantes en la agricultura local, regional o nacional representaría una forma importante de contribuir a un desarrollo, sustentable y ecológico, de la economía nacional, reduciendo el uso de insumos nocivos para el medio ambiente, manufacturados, costosos o escasos y aumentar el uso de insumos naturales y locales, a la vez que se refuerzan las interacciones biológicas para promover procesos y servicios ecológicos y promoviendo la actividad biológica del suelo, mantener y mejorar la fertilidad del mismo (Altieri, 1997¿2002?). La agricultura nacional, con la siembra y retiro constante de los cultivos, trae como consecuencia la erosión y agotamiento nutricional del suelo. Ello, junto con el uso de fertilizantes, biocidas y la compactación del suelo por la maquinaria, afecta negativamente la producción agrícola (Kuyper y col., 2004, Toro, 2008).

Los sistemas agrícolas sustentables operan con procesos biológicos para alcanzar niveles aceptables de producción y calidad de alimentos, con un mínimo de efectos adversos al ambiente (Altieri, 2002; Toro y col., 2008). El manejo tradicional de la agricultura emplea tratamientos intensivos con fertilizantes químicos y pesticidas, además del uso de maquinarias para la compactación y arado del suelo; estos constituyen factores negativos que a su vez producen efectos poco beneficiosos y representan un manejo inadecuado de los recursos, lo que hace necesario establecer estrategias a través de diferentes alternativas de manejo en los suelos a fin de frenar el deterioro acelerado del ambiente, enmendar las áreas afectadas y evitar el deterioro de zonas no afectadas para así lograr a mediano plazo la formación de un perfil cultural donde sea posible hacer agricultura y ganadería sostenible (Toro y col., 2008).

Los sistemas sustentables buscan conservar y recuperar los nutrientes presentes en el suelo garantizando que al ser empleados luego para el crecimiento de los cultivos, se obtenga un producto de buena calidad. Existen muchas formas de manejo sustentable que benefician al ambiente, de aquí que el emplear bacterias promotoras de crecimiento como una fuente biofertilizante represente un recurso atractivo para conservación ambiental y de interés agrícola debido a que ayudan no solo como promotoras de crecimiento sino que en algunos casos, estas bacterias, pueden funcionar tanto como fertilizantes como control biológico (Bhattacharyya y Jha. 2012).

## **2. Antecedentes.**

Actualmente se han desarrollado trabajos que buscan usar y elaborar biofertilizantes que ayuden a mejorar la productividad agrícola mediante el uso de bacterias o rizobacterias promotoras de crecimiento. Estos microorganismos en su mayor parte asociados con la rizósfera, fueron descritos por primera vez en los trabajos de Kloepper y Schroth en 1978. Las bacterias promotoras de crecimiento son un grupo de diferentes especies de bacterias que pueden incrementar el crecimiento y productividad vegetal. Estas se pueden clasificar en dos grupos: i) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas, donde la bacteria afecta a las plantas suprimiendo otros microorganismos (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas, fijando nitrógeno, incrementando la toma de agua y minerales). ii) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas con capacidad de control biológico, las cuales promueven el crecimiento de la planta al suprimir los fitopatógenos (de-Bashan y col, 2007).

Shankar (2013) en su trabajo acerca de las bacterias promotoras de crecimiento como potenciales organismos para una agricultura sostenible, indica que se han alcanzado progresos considerables en el área tecnológica en la que se emplean rizobacterias promotoras de crecimiento como biofertilizantes. Asegura además, que son un excelente sistema con el cual los biotecnólogos pueden desarrollar diversas herramientas aplicadas al mejoramiento la agricultura y ambiente sustentable. Por lo tanto, el estudio y la investigación dirigida a desarrollar el potencial de estos microorganismos, es importante para facilitar la creación de componentes en los sistemas de agricultura sustentable.

Se han llevado a cabo experimentos sobre el efecto de las bacterias promotoras de crecimiento sobre diferentes especies de plantas. Por ejemplo, Rivas y col. (2007), en una reseña bibliográfica relacionada con las bacterias promotoras de crecimiento vegetal en el cultivo de arroz, señala la tendencia de usar estas bacterias como potenciales biofertilizantes para la obtención de productos de mayor calidad, haciendo mayor énfasis en el arroz como cultivo de gran consumo e importancia económica en Cuba; recalando la interacción planta-microorganismo como base importante a considerar en la industria agrícola. Concluye diciendo que las bacterias promotoras de crecimiento pueden ser empleadas como biofertilizantes para diferentes tipos de cultivos y es importante conocer las metodologías existentes para su aislamiento e identificación, como también comprender los mecanismos de acción que puedan desarrollar y resulten beneficiosos para las plantas.

Díaz y col. (2001) inocularon 30 cepas de bacterias promotoras de crecimiento en lechugas, evaluando su efecto en la germinación y crecimiento de este rubro. Ellos

observaron, que la mayoría de las bacterias estudiadas mostraron beneficios en el cultivo de la lechuga, al promover el crecimiento, tanto en la germinación, como en el desarrollo vegetativo del cultivo de lechuga. La mayor estimulación del crecimiento lo obtuvieron con la cepa R1B (no identificada) la cual incrementó el peso fresco en 277%, el peso seco en 371%, el área foliar en 240% y el volumen radical en 300%. Este resultado sugiere que en efecto, las bacterias promotoras de crecimiento tienen potencial para emplearse en la producción de plántulas de interés agrícola. También se han extraídos estos microorganismos de la rizósfera de plantas de guayaba y evaluado el efecto que las promotoras de crecimiento tienen sobre la planta. Gómez-Luna y col. (2012) inocularon tres cepas de *Bacillus subtilis* en macetas con plantas de guayaba y obtuvieron que todas las plantas inoculadas con las bacterias presentaron un mayor crecimiento con respecto al control del experimento. Además reportaron haber aislado 30 cepas con capacidades promotoras de crecimiento. La identificación de las bacterias se realizó con perfiles metabólicos BIOLOG, en los que obtuvieron porcentajes de similitud con los géneros *Xanthomonas*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. Adicionalmente, encontraron con satisfacción que unas de sus cepas, la que llamaron A2c, arrojó como resultado un 100% de germinación en la prueba de germinación y promoción de crecimiento en plantas, en comparación con el control en la que germinaron el 46% de las semillas inoculadas. Estos resultados indican que los aislados presentan una excelente opción para formular un biofertilizante específico para la producción de guayaba, pero lo más importante es que no solo se evaluó el efecto de las cepas bacterianas aisladas en

plantas de guayaba, sino que también verificaron sus efectos en semillas de otros cultivos de interés agrícola.

Marcano (2014), aisló y caracterizó bacterias de la rizósfera de banano. En este trabajo se aislaron un total de 262 cepas bacterias (en dos etapas, en la primera etapa se aislaron 114 y en la segunda etapa 148) con capacidades fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosforo, y bacterias con actividad ACC desaminasa. La identificación filogenética de estas cepas se realizó mediante la amplificación y posterior secuenciación del gen RNAr 16S. Los resultados se compararon con cepas tipo almacenadas en la base de datos EZ-BioCloud. Con este método lograron identificar las 114 cepas aisladas en la primera etapa, de las cuales se pudo identificar 66 cepas hasta el nivel de especies, mientras que el resto se identificaron hasta el nivel de género, aunque de éstas, 48 cepas presentaron una similitud menor al 99,5% por lo que no se pudo asegurar su identidad y se requirió realizar otras técnicas para identificarlas correctamente. Éste análisis evaluó procedimientos alternativos a la secuenciación del RNAr 16S para la caracterización molecular que incluyeron el análisis de los perfiles RADP por su acrónimo en inglés “Random Amplification of DNA Polymorphism” y la técnica PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) del RNAr 16S. De las técnicas expuestas, señalan la preferencia de emplear la técnica PCR-RFLP rRNA, debido a que ésta discrimina entre grupos de especie, sin embargo, dependiendo del nivel de discriminación recomiendan analizar ambas opciones, previo a la secuenciación.

A nivel nacional, se han desarrollado diversos trabajos en relación a las PGPR. Por ejemplo, Mora y Toro (2007), estudiaron el estímulo de crecimiento vegetal promovido

por *Burkholderia cepacia*. En la investigación, Mora, aisló bacterias de la rizósfera de plantas nativas de la sabana venezolana con el fin de identificar y caracterizar bacterias con capacidad solubilizadora de fosfato, posteriormente evaluó el efecto de los aislados que obtuvo en plantas de *Zea mayz*. *Burkholderia cepacia*, resultó ser la cepa con mayor predominancia en las muestras de suelo rizosférico analizada; mientras que el efecto que dicha cepa ejercía sobre la emergencia radicular de la planta resultó ser de un 29% superior con respecto al control, también demostró capacidad para solubilizar fosfatos, hierro y aluminio, sustancias predominantes en el suelo de sabana. Por lo cual, *B. cepacia* es señalada como una bacteria con potencial de aplicación como biofertilizante en cultivos en el suelo de las sabanas venezolanas.

López y col. (2010), analizaron la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico en cepas nativas de agroecosistemas venezolanos. La capacidad de fijación de nitrógeno (CFN) de estos microorganismos, fue estimada a través de pruebas de agitación-fermentación de los bioproductos durante 72 h. Evaluaron 9 cepas, dividiéndolas en dos grupos. El grupo uno compuesto por cepas aisladas de muestras de campo y el grupo dos con cepas pertenecientes al cepario Nacional INIA-CENIAP. El primer grupo presentó potencial para fijar el nitrógeno atmosférico, aportando 39 a 50 kg de N Ha<sup>-1</sup> a cultivos de interés agrícola, lo cual conllevaría a reducir la aplicación de fertilizantes nitrogenados de origen industrial y de este modo, ayudando a reducir el efecto negativo sobre el ambiente.

Arzolay (2012), logró aislar y caracterizar bacterias endosimbióticas provenientes de nódulos de leguminosas nativas en el Estado Guárico (Venezuela), empleando técnicas bioquímicas y moleculares. Estas bacterias forman estructuras radicales conocidas como

nódulos, y poseen la capacidad de fijar el N directamente de la atmósfera, el cual es posteriormente transformado en formas asimilables por la planta. En el proyecto, obtuvo 15 aislados bacterianos provenientes de los nódulos de la leguminosa *Calopogonium* sp. Arzolay, logró la caracterización molecular de 14 de los 15 aislados empleando la técnica genotípica TP-RAPD, obteniendo 10 perfiles de bandas distintos, donde 3 grupos de aislados presentaron perfiles comunes. Aunque, solo dos de los 15 aislados resultaron ser pertenecientes al género *Rhizobium*, con una eficiencia fijadora de nitrógeno muy baja, y catalogados por lo tanto, como inefectivas; indica que el resto de los aislados analizados presentaron propiedades promotoras de crecimiento vegetal. En el 2013, Toro y colaboradores aislaron bacterias con capacidad solubilizadora de fosfatos procedentes del suelo rizosférico de *Vigna unguiculata* L. (frijol) y adicional a esto realizaron la identificación de las cepas mediante la secuenciación del gen 16S del ARNr. Empleando la técnica de secuenciación hallaron un porcentaje de similitud del 99,2% con respecto a la especie *Pseudomonas taiwanensis*, mientras que obtuvieron 99,1% de similitud con respecto a las especies *Pseudomonas sentomophila*, *Pseudomonas splecoglossicida* y *Pseudomonas smonteilii*.

Los trabajos realizados en relación al aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento, parecieran indicar que en general, estas bacterias son potenciales biofertilizantes para la producción agrícola de diferentes rubros. Por lo cual, es de esperar que este efecto positivo se extienda también a plantas de café. Así lo indica Noriega (2014). En esta investigación, Noriega asegura que es recomendable la inoculación de cafetos con bacterias promotoras de crecimiento como *Azotobacter*,

puesto que esta estrategia abastece al cafeto de 20 a 30 Kg/ha/año de nitrógeno, además que aporta sustancias promotoras de crecimientos a las plantas.

Varios autores han obtenido resultados favorables con la aplicación individual o con la combinación de microorganismos benéficos. La aplicación de *Azotobacter chroococcum* y bacterias solubilizadoras de fósforo, tuvo un efecto favorable sobre el crecimiento y desarrollo de posturas de cafeto hasta 33%, en un suelo ferralítico rojo lixiviado típico de montaña (Díaz-Medina y col., 2004). De igual forma Adriano y col. (2011), en su trabajo sobre la biofertilización de café orgánico en etapa de vivero indicaron que en el desarrollo de sus experimentos, inocular con tres microorganismos (uno de ellos *Azotobacter*), resultó ser el de los mejores resultados, obteniendo plantas mucho más altas (32,8%) que las plantas control, resaltan además que estas asociaciones ocurren en condiciones determinadas y que es necesario aislar los organismos y caracterizarlos para cada plantación.

Por su parte, Ramírez-Bahena y colaboradores (2016), analizaron el gen 16S del ARNr, en varios aislados de *Bradyrhizobium* provenientes de Venezuela aisladas de nódulos radiculares de plantas del género Centrocema. Lograron determinar tres especies dentro del género bacteriano *Bradyrhizobium* que tienen una similitud del 100% con *Bradyrhizobium daqingense*, *Bradyrhizobium guangxiense* y *Bradyrhizobium viridifuturi* y dos especies nuevas pertenecientes a este mismo género.

### **3. Objetivos.**

#### **3.1 Objetivo general.**

- Caracterizar algunos tipos de microorganismos promotores de crecimiento presentes en la rizósfera de *Coffea arabica* L. y evaluar su efecto sobre el crecimiento vegetal.

#### **3.2 Objetivos específicos.**

1. Aislar y cuantificar microorganismos promotores de crecimiento en el suelo rizosférico.
2. Aislar y cuantificar bacterias con capacidad de fijar Nitrógeno (N<sub>2</sub>).
3. Aislar y cuantificar bacterias con capacidad de solubilizar fosforo.
4. Crear una colección de bacterias aisladas de suelo rizosférico (café).
5. Caracterizar los aislados obtenidos a través de pruebas bioquímicas empleadas en microbiología.
6. Inocular semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) para evaluar el efecto promotor de los aislados seleccionados.
7. Realizar un análisis *in silico* de las secuencias del gen RNAr 16S en GenBank de los géneros bacterianos reportados presentes en muestras de suelo rizosférico como orientador en la escogencia de la enzima para el análisis de PCR- RFLP.

### **4. Materiales y métodos.**

#### **4.1 Recolección de muestras del suelo rizosférico.**

Con el fin de aislar algunos microorganismos promotores de crecimiento presentes en la rizósfera de los cafetos, se colectaron muestras en la Estación Experimental “Jaime

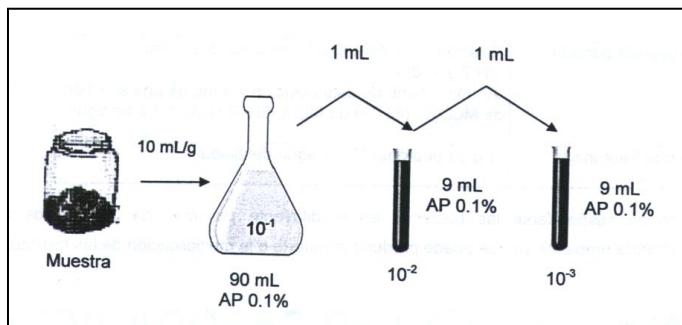
Henao Jaramillo”, El Laurel, UCV de zonas con dos cultivos de café: Caturra y Catuai; seleccionándose seis sitios de muestreo por cada tipo de cultivo.

Se extrajeron las muestras a una profundidad de 0-20 cm, haciendo un recorrido del área de estudio en forma de zigzag, donde se encuentran el 52,3% de las raíces absorbentes (finas) del café. Posteriormente se trasladaron al Laboratorio de Agroecología del IZET, donde se realizó el aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento, fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos.

#### **4.2 Aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento.**

##### **4.2.1 Preparación de muestras de suelo para aislamiento bacteriano.**

Con la finalidad de aislar bacterias del suelo, se diluyeron 10 gramos de la muestra de suelo rizosférico en 90 mL de agua peptonada estéril, esta solución fue dejada en agitación constante por 20 min. Finalizado el tiempo de agitación se realizaron diluciones seriadas, considerándose como primera dilución, la dilución  $10^{-1}$ .



**Figura 4.** Imagen que ilustra la preparación de la muestra del suelo y diluciones. (Tomado de Manual de Microbiología Agrícola, 2008).

#### **4.2.2 Aislamiento de *Bacillus* sp.**

Se calentó entre 20 y 30 minutos a 80 °C en baño de maría, la dilución  $10^{-1}$  de la muestra de suelo con la finalidad de eliminar la microflora no deseada, dejando en la dilución las esporas bacterianas. A partir de dicha dilución, se realizaron diluciones de manera rutinaria de  $10^{-2}$  hasta  $10^{-4}$ . Se sembraron, por rastrilleo y por triplicado, 0,1 mL de cada dilución en placas Petri con agar, Glucosa, Triptona y Extracto de Carne (TGE). Estas placas se colocaron en incubación por un lapso de 48 horas a 28 °C. Se observaron y contaron las colonias con características de *Bacillus* sp. Las colonias del género *Bacillus* sp., se caracterizan por ser blanquecinas, mucosas o secas con bordes irregulares (Zuñida, 2008).

Para preparar el medio TGE, se pesan los componentes del medio en las cantidades requeridas, se calientan en la plancha con agitación constante hasta diluir completamente los componentes y se ajusta a pH 7.

**Tabla 2.** Composición del Medio TGE con valores para preparar un volumen de 1 L.

<b>Medio TGE</b>	
Triptona	5.0 g
Extracto de Carne	3.0 g
Agar	15 g

#### **4.2.3 Aislamiento de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno (*Azotobacter* sp.).**

A partir de la dilución de la muestra  $10^{-1}$ , se realizaron diluciones de  $10^{-2}$  hasta  $10^{-5}$ . De cada una de las diluciones se extrae 1 mL de solución, que fueron colocados en tubos que contenían 10 mL de medio mineral sin nitrógeno (previamente esterilizado) con el

indicador azul de bromotimol (ABT) al 0,5 % en etanol y por triplicado. Los tubos se dejaron en incubación por 7 u 8 días a 28 °C. Se reportaron como resultados positivos aquellos tubos en los que se observó un viraje en el color, cambiando de color verde a amarillo. Este cambio de color hace referencia a una variación del pH del medio (de pH neutro a pH ácido), debido a la transformación de nitrógeno atmosférico o dinitrógeno ( $N_2$ ) hasta amoniaco ( $NH_3$ ), y finalmente hasta amonio ( $NH_4^+$ ), mediante un proceso metabólico de reducción (González y Lluch, 1992; Arzolay, 2013).

El medio mineral sin nitrógeno se preparó pesando los componentes necesarios para la elaboración del medio en una balanza y se añadieron las soluciones en las cantidades requeridas, completando el volumen con agua destilada, diluyendo en calor y con agitación constante. El pH se debe ajustar a 7.

**Tabla 3.** Composición del medio mineral sin nitrógeno para preparar un volumen de 1 L.

Medio Mineral Sin Nitrógeno	
$K_2HPO_4$	0,655 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
NaCl	0,02 g
CaCl <sub>2</sub>	0,01 g
Cl <sub>3</sub> Fe (1% en solución)	3,4 g
NaMo <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)	0,0108 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15 g
Manitol	10 g
Sacarosa	10 g
Azul de bromotimol (Sol 0,5 % en etanol 70%)	15 mL

#### 4.2.4 Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfatos.

Partiendo de la primera dilución, se realizaron diluciones seriadas desde  $10^{-2}$  hasta  $10^{-5}$ . De cada dilución se sembró, por rastrilleo y por triplicado, 0,1 mL en placas Petri con

que contenían el medio YED-P (yeastextract-dextrosephosphate). Las placas sembradas se dejaron en incubación por 48 horas o hasta que se observó la formación de un halo transparente alrededor de la colonia, a una temperatura de 28 °C.

La formación del halo alrededor de la colonia se tomó como indicador de que la misma tiene la capacidad de solubilizar fosfatos. El medio se ajustó a pH 6,8. Esta variable hace referencia a la capacidad relativa del microorganismo de utilizar como sustrato la fuente insoluble de este nutriente (Khan y col., 2010). Se midió el índice de eficiencia solubilizadora de fosfatos (IES). Este índice se calcula por relación:

$$IES = \frac{\text{Area del halo de solubilización}}{\text{Area de crecimiento de la colonia}}$$

**Tabla 4.** . Composición del medio YED-P con valores para un volumen de 100 mL.

Medio YED	
Glucosa	1 g
Extracto de levadura	0,5 g
Fosfato cálcico	0,2 g
Agar	2 g

Todos los aislados bacterianos se conservaron en punciones de agar del medio en que fueron cultivadas contenidas en tubos eppendorf.

#### **4.3 Colección microbiana.**

Con la finalidad de crear un cepario que contenga los aislados bacterianos obtenidos durante la ejecución de este trabajo investigativo, se elaboraron punciones en los medios de cultivos en los cuales habían estado creciendo los microorganismos. Así, las punciones de las bacterias con capacidad promotora de crecimiento se realizaron en medio TGE, las bacterias que eran consideradas fijadoras de nitrógeno de vida libre se

realizaron en medio mineral sin nitrógeno y finalmente, las bacterias con capacidad de solubilizar fosforo, se realizaron en medio YED-P. Las punciones fueron identificadas con el medio de crecimiento, zona de recolección, cultivo asociado y fecha de inoculación.

#### **4.4 Evaluación del efecto de los aislados bacterianos sobre semillas.**

Para la evaluación del efecto en la germinación, los aislados seleccionados se inocularon en el medio de crecimiento de la bacteria. Se aplicó 1 mL del inóculo preparado con la cepa a evaluar con una densidad de  $10^8$  células/mL, en capsulas Petri que contengan semillas de lechuga; como control un grupo de semillas se incubaran con el medio de crecimiento correspondiente a cada aislado sin inocular.

Las semillas se colocaron en placas Petri con papel húmedo estéril, dejándoles en incubación a 28°C por 48 horas. Se realizó el conteo de las semillas con emergencia radicular, calculando así el % de germinación de cada placa preparada (este procedimiento se llevó a cabo durante una semana). La emergencia de radícula es el criterio que se utilizará para determinar la germinación de la semilla (Mora y col., 2007).

La prueba de emergencia de radícula, se realizó en semillas de lechuga que tienen un tiempo de germinación aproximado de 3-4 días, corto tiempo de germinación en comparación a las semillas de café que tardan hasta más de 30-40 días en germinar, aunque estas semillas serían ideales para corroborar el efecto promotor de las bacterias ya que los aislados provienen de la rizósfera de cafetos.

#### **4.5 Caracterización microbiológica.**

Mediante pruebas con fundamento bioquímico se intentó identificar los aislados bacterianos obtenidos al menos hasta nivel de género. Las pruebas que se aplicaron son

comunes en la identificación de enterobacterias de origen clínico, que se almacenan en el Centro Venezolano de Colección de Microorganismos (CVCM), ubicado en el Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Universidad Central de Venezuela.

#### **4.5.1 Tinción Gram-Hucker.**

Se realizó la tinción Gram para identificar bacterias tipo gram positivas y gram negativas, según procedimiento descrito en la Guía de Microbiología General de la Facultad de Ciencias, UCV (2012). Esta determinación también permitió visualizar la morfología de los aislados bacterianos y separarlos en grupos.

#### **4.5.2 Prueba de la oxidasa.**

Los citocromos son enzimas que forman parte de la cadena de transporte de electrones en la respiración aeróbica, transfiriendo electrones al oxígeno, con la formación final de agua. La siguiente prueba permitió la detección de la citocromo c oxidasa. Se tomó un cultivo de 48 horas de cada uno de los aislados, con un palillo de madera estéril se tomó una colonia bacteriana y se trazó una línea sobre una tira de papel de filtro impregnada en solución acuosa al 1% de clorhidrato de tetrametil-para-fenilen-diamina (producto de color azul), colocada sobre una placa Petri limpia.

Se consideró el ensayo como “positivo” al aparecer un color azul profundo en un tiempo menor a 10 segundos. Se consideró “positivo lento a confirmar” cuando el color apareció entre 10 y 60 segundos. Y se considera “negativo” cuando no hay desarrollo de color o cuando se produce en un tiempo mayor a 60 segundos.

#### **4.5.3 Crecimiento en el medio agar Hierro de Kliger (KIA).**

Esta prueba se suele usar en la identificación inicial de bacilos Gram negativos. El ensayo consiste en inocular tubos de ensayo grandes con agar hierro Kliger inclinado usando un asa de siembra, tomando microorganismos de cada cultivo analizado y haciendo una picadura hasta el fondo del tubo, continuando la siembra por estría en la superficie. Se incubaron los tubos a 28°C durante 24 horas y se observaron los resultados.

#### **4.5.4 Prueba SIM.**

Este es un medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno por los microorganismos. Es útil para diferenciar miembros de la familia Enterobacteriaceae.

Por punción profunda utilizando aguja de inoculación recta, se inoculó el centro del tubo que contenía el medio (la punción debe abarcar 2 tercios de profundidad del medio de cultivo desde la superficie). Los tubos se dejan en incubación en condiciones de aerobiosis a 35-37 °C, durante 18-24 horas. Al cabo del tiempo estipulado se observó el crecimiento bacteriano y el color del medio, posteriormente se debe aplicar la prueba del indol. Para esta prueba se añaden al tubo de 3 a 5 gotas de Indol.

#### **4.5.5 Prueba de citrato de Simmons.**

El medio se inoculó (con un inóculo ligero) haciendo una estría en el bisel, con un filamento cargado con poca cantidad de inóculo, obtenido de un cultivo en medio sólido. Se incubó a 35°C por 24-48 horas. El desarrollo de crecimiento en este medio y el viraje del indicador de verde a azul, indican que el microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono.

#### **4.5.6 Prueba de crecimiento en agar Bilis Esculina.**

El medio agar Bilis Esculina es utilizado para el aislamiento e identificación presuntiva de estreptococos del grupo D. Se inocularon los tubos con una aguja de inoculación, haciendo una punción en el medio del tubo y una estría en el bisel del tubo. Se incubaron en aerobiosis a 37 °C por 24 horas.

#### **4.5.7 Prueba de reducción de nitratos.**

En esta prueba se detecta la capacidad de la bacteria para crecer en condiciones de anaerobiosis. Los nitratos se reducen a nitritos y algunas bacterias reducen los nitritos a productos gaseosos (N<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O). Las enzimas responsables de ambas reducciones se denominan nitrato y nitrito reductasa, respectivamente.

Se inocularon los tubos y se incubaron a 37 °C por un periodo de 24-48 horas.

#### **4.5.8 Prueba de crecimiento en urea.**

Para la ejecución de esta prueba se sembró un inoculo con el asa de platino en el tubo que contenía el caldo de urea. Se dejó en incubación a 37 °C por 24-48 horas. Una reacción positiva a la ureasa se pondrá de manifiesto por el cambio de color del medio (de amarillo a rojo/rosado), mientras que en la reacción negativa no se produce cambio de coloración.

### **4.6 Análisis *in silico* de las secuencias de los géneros bacterianos reportados en el suelo rizosférico.**

Con el fin de establecer las enzimas de restricción para un ensayo PCR-RFLP, se realizó un análisis de las secuencias del gen RNAr 16S depositadas en GenBank de los géneros bacterianos reportados presentes en muestras de suelo rizosférico. Para este

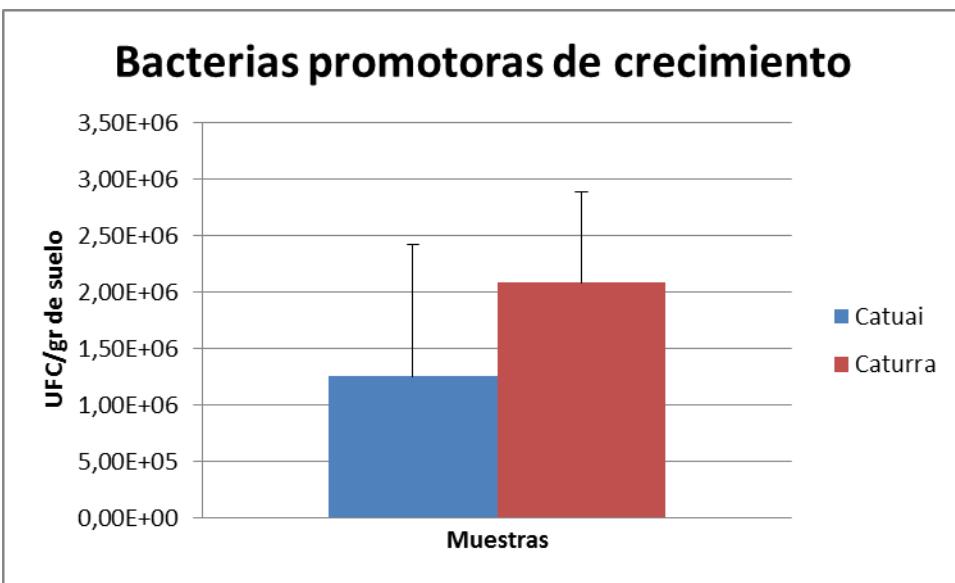
análisis se emplearon los programas de alineación y búsqueda de sitios de corte con enzimas de restricción en la aplicación DNAMan. Los géneros que se consideraron son algunos de los descritos en el trabajo de Marcano (2014), que adicionalmente se han considerado por otros autores como organismos promotores de crecimiento vegetal (*Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter* y *Rhizobium*, entre otros).

## **5. Resultados.**

Se analizaron muestras de suelo de la rizósfera de las variedades de café Caturra y Catuai de la Estación Experimental “Jaime Henao Jaramillo”. Se tomaron seis muestras de suelo (1-2 Kg de suelo) por cada variedad de cafeto, en total se recolectaron 13 muestras de suelo. Las cuales se extrajeron a una profundidad de 0-20 cm de la rizósfera, haciendo un recorrido del área de estudio en forma de zigzag.

### **5.1 Aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento.**

En el análisis de las muestras para el aislamiento de bacterias con capacidad promotora de crecimiento, se obtuvieron resultados en cuanto a cantidad de unidades formadoras de colonias por gramos de suelo que se cuantificaron en las placas Petri, obteniendo mayores valores para Caturra.



**Figura 5.** Bacterias promotoras de crecimiento por gramos de suelo.

En la Figura 5, se observa la representación gráfica de las UFC/gr de suelo, calculadas para cada variedad de cafeto analizado. Al momento de procesar la información se observaron valores muy diferentes, indicando una diferencia en la composición bacteriana del suelo. Las muestras colectadas de la rizósfera asociada a los cafetos de la variedad Caturra parecieran tener mayor presencia (en cuanto cantidad refiere) de bacterias con la capacidad de promover el crecimiento de las plantas, mientras que en las muestras tomadas de la rizósfera de Catuai los valores no son tan relevantes.

Sin embargo, al aplicar un análisis estadístico que permitiera comparar si había diferencias significativas entre las rizósfera asociados a las variedades de café, se pudo comprobar que la población bacteriana asociada a estas rizósfera no era diferente entre sí. Se empleó un ANOVA (análisis de varianzas de un factor) y se estableció como hipótesis nula ( $H_0$ ) que no hay diferencia significativa entre las muestras y como hipótesis

alternativa ( $H_1$ ) que, en efecto, hay una diferencia significativa entre las muestras analizadas.

**Tabla 5.** Valores obtenidos con ANOVA para bacterias promotoras de crecimiento.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS (SC)	GRADOS DE LIBERTAD (gl)	MEDIA DE CUADRADOS (MC)	F calculado
FACTOR	1,04167E+12	1	1,04167E+12	2,43E-01
RESIDUAL	4,28E+13	10	4,28E+12	-
TOTAL	4,28E+13	12	-	-

En la Tabla 5, se observan los valores arrojados por el estadístico, donde  $F_{calculado}$  es la diferencia entre las media de cuadrados (factor y residual). Este valor se compara con un valor estadístico ( $F_\alpha$ ) que se ubica en las tablas de distribución de Fisher con una confiabilidad de 95%, empleando los grados de libertad. Si,  $F_{calculado}$  resulta mayor que  $F_\alpha$ , entonces se rechaza  $H_0$ , de lo contrario se acepta la hipótesis nula. En este caso, se acepta la hipótesis nula, en vista de que  $F_{calculado} < F_\alpha$ , es decir  $2,43E-01 < 4,96$  y se acepta la hipótesis nula. El estadístico ANOVA indica que no hay diferencia significativa entre las rizósfera asociadas a los cafetos de Catuai y Caturra.

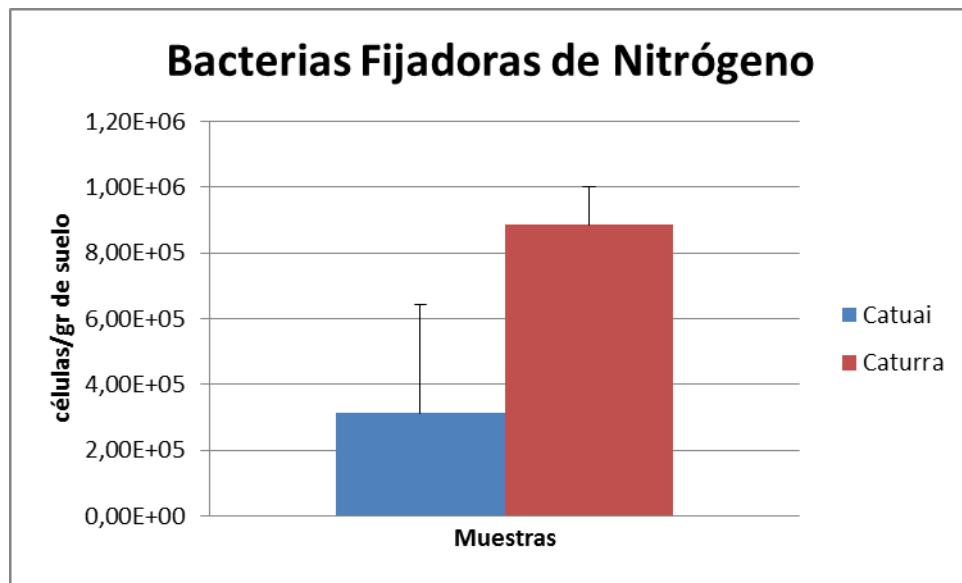
Las colonias obtenidas en esta etapa del aislamiento eran de color blanco, de aspecto cremoso y bordes irregulares. Siendo esta una de las características principales a considerar al momento de la selección para el aislamiento y purificación de las cepas que se analizaron.



**Figura 6.** Colonias de bacterias cultivadas en TGE.

### 5.2 Aislamiento de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno.

Para el análisis de los resultados obtenidos en el aislamiento de las bacterias con capacidad fijadora de nitrógeno la contabilización de estas bacterias fue llevada a cabo a través del método del Número Más Probable (NMP). Se contaron, por dilución y triplicado, la cantidad de tubos con resultados positivos (color amarillo) y se descartaron los tubos negativos (color verde). Estos valores fueron ubicados en una tabla de valores reportadas por Woomer, 1994.



**Figura 7.** Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno.

En la Figura 7, se observa gráficamente una representación de las diferencias obtenidas en el análisis de las muestras, donde aparentemente hay mayor proporción, en cuanto cantidad se refiere, de bacterias de vida libre con capacidad fijadora de nitrógeno, en la rizósfera de Caturra que en la de Catuai. Las colonias observadas en estos aislados tenían aspecto acuoso, de color transparente y de forma irregular (parecida a una gota de

agua). Para corroborar la información observada a simple vista en los datos obtenidos, se decidió analizar los datos con una ANOVA, de manera que pudiéramos establecer estadísticamente una diferencia entre ambas rizósferas.

**Tabla 6.** Valores obtenidos con ANOVA para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS (SC)	GRADOS DE LIBERTAD (gl)	MEDIA DE CUADRADOS (MC)	F calculado
<b>FACTOR</b>	4,9307E+11	1	4,9307E+11	1,18E+00
<b>RESIDUAL</b>	4,16E+12	10	4,16E+11	-
<b>TOTAL</b>	1,60E+12	12	-	-

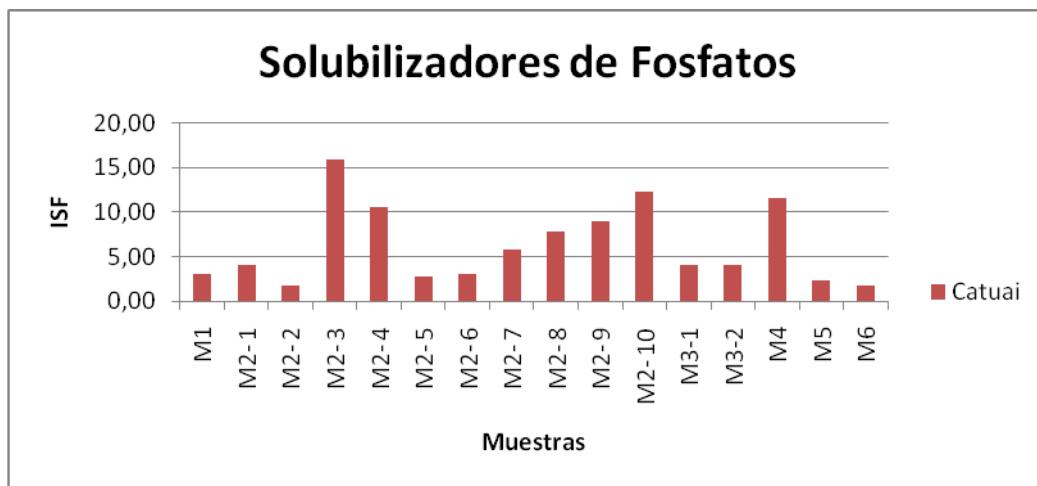
En la tabla anterior se pueden observar los resultados obtenidos en el análisis de varianzas. El  $F_\alpha$  se determinó en una tabla que seguía una Distribución de Fisher con una confiabilidad del 95%. De esta manera se obtuvo el valor  $F_\alpha$  igual a 4,96. Este valor se comparó con el  $F_{\text{calculado}}$  del ANOVA y se llegó a la conclusión de que al ser  $F_{\text{calculado}} < F_\alpha$ , es decir,  $1,18 < 4,96$  entonces se debe aceptar la hipótesis nula establecida en la aplicación del estadístico de análisis de varianzas y no hay diferencia significativa entre la cantidad de bacterias asociadas a las rizósfera de cada cafeto.

### 5.3 Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfatos.

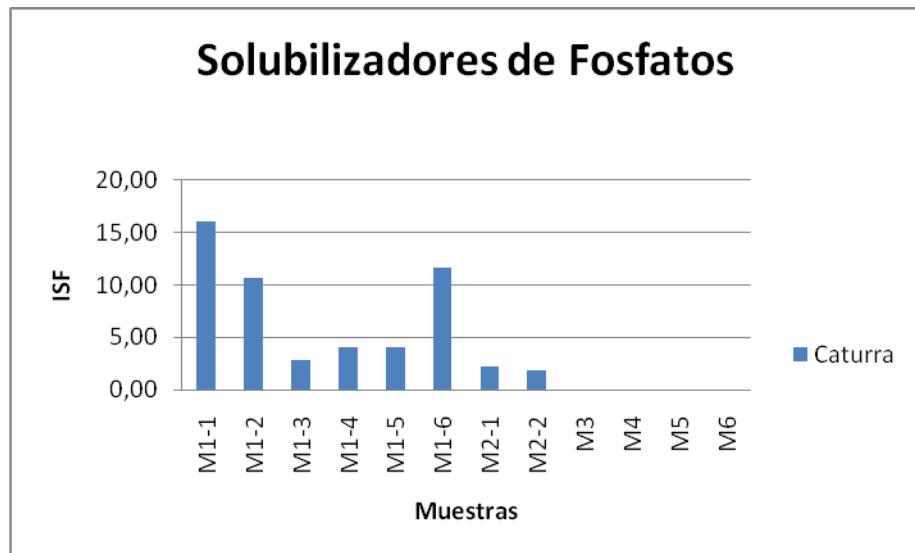
La selección de las bacterias solubilizadoras de fosfatos se llevó a cabo mediante la selección de aquellas que su alrededor tuviesen formado un halo transparente confirmando la solubilización del fosfato contenido en el medio. Se calculó, para cada colonia seleccionada, el índice de solubilización siguiendo la siguiente fórmula:

$$ISF = \frac{\text{Área del halo de solubilización}}{\text{Área de crecimiento de la colonia}}$$

La fórmula anterior, fue usada por Khan y col. (2010) para establecer una diferencia entre las bacterias que habían aislado y la capacidad que estas tenían para solubilizar. En la siguiente figura se observa una representación gráfica de los valores obtenidos para cada aislado bacteriano en cada muestra recolectada para la variedad de café Catuai, es apreciable como en la muestra “M2” se obtuvieron mayor cantidad de bacterias aisladas, una de las cuales presentó uno de los mayores índices de solubilización de fosfatos presentes en el medio de crecimiento.



**Figura 8.** Bacterias solubilizadoras de fosfatos en Catuai. Gráfico que muestra los índices obtenidos para las cepas bacterianas aisladas en las muestras colectadas de la rizósfera asociada a Catuai.



**Figura 9.** Bacterias solubilizadoras de fosfatos en Caturra. Gráfico que muestra la representación de los valores de los índices de solubilidad calculados para las muestras de suelo de la variedad Caturra.

El mismo procedimiento fue seguido para el análisis de las muestras tomadas en la rizósfera asociada a la variedad de café Caturra, en la Figura 6 se observa de forma gráfica los valores obtenidos en la aplicación del índice de solubilidad sobre cada aislado bacteriano. En la misma, se visualiza como en comparación a las muestras obtenidas de la rizósfera asociada a la variedad de café Catuai, la cantidad de aislados con capacidad solubilizadora de fosfatos es menor aunque el índice calculado para estos aislados indica un buen desempeño de solubilización.

#### 5.4 Colección microbiana.

Se obtuvo un total de 25 punciones cada una correspondiente a las cepas bacterianas aisladas. No se observó rastro de contaminación, además se pudo apreciar que el crecimiento de algunas de estas bacterias fue en la parte superior del medio. A partir de estas punciones se realizó el ensayo de germinación de radícula con el que se

buscaba estudiar el efecto de estos aislados sobre las semillas de lechuga. En la tabla 7, se muestra un ejemplo de la composición de las fichas elaboradas para facilitar la búsqueda en el cepario de las cepas almacenadas durante el proyecto.

**Tabla 7.** Ficha de identificación de la colección bacteriana.

<b>Nomenclatura</b>	M5B
<b>Género</b>	<i>Bacillus</i> sp.
<b>Medio de crecimiento</b>	Triptona-Glucosa-Extracto de carne
<b>Capacidad</b>	Promoción de crecimiento
<b>Zona de recolección</b>	E. E. Jaime Henao Jaramillo (10°22'24"N 66°54'04"W). rizósfera de <i>Coffea arabica</i> L. variedad Caturra.
<b>Tipo de suelo</b>	Ultisol, pH (6,1), materia orgánica (5,4 %)
<b>Características climáticas</b>	Altitud 1.230 y 1.460 m.s.n.m. Temperatura media anual 19°C. Precipitación promedio 1.282 mm/año. Humedad Relativa 78%

### **5.5 Evaluación del efecto de los aislados bacterianos sobre semillas.**

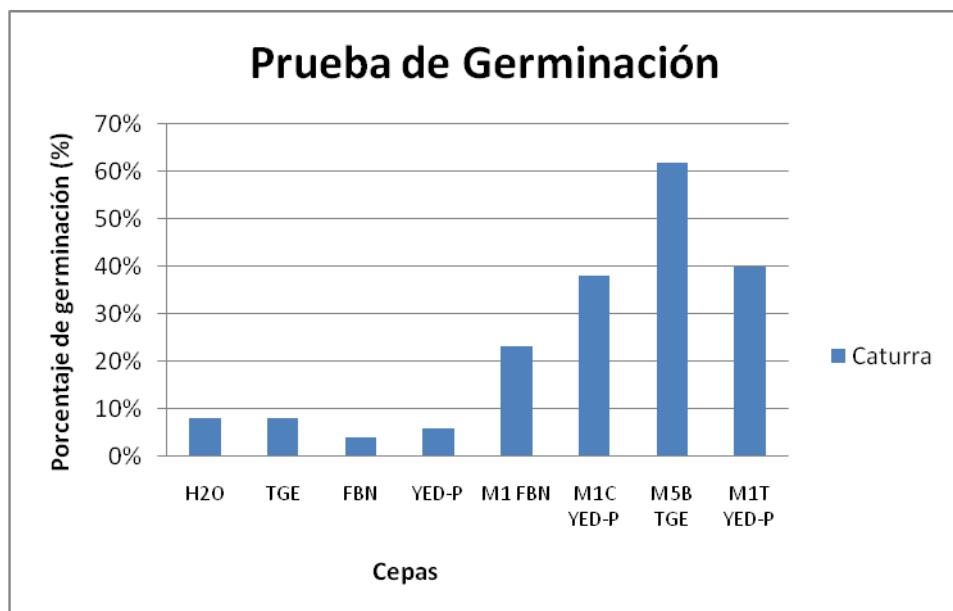
Para realizar la evaluación del efecto de promoción que tienen las bacterias aisladas sobre semillas de lechuga, se empleó el método de cámara húmeda. Este método consiste en una placa de Petri que en su interior contiene un papel de filtro sobre el que se colocan las semillas de lechuga. Una vez armada las cámaras de germinación, se procede a inocular con las bacterias cada una de las mismas, todo esto se desarrolló en condiciones de esterilidad. Se analizó el comportamiento de los 25 aislados,

posteriormente se consideraron para una caracterización bioquímica que permitiera identificar la especie bacteriana, aquellos cuyos resultados superaban en un 20% a los resultados de los controles. Las placas se dejaron en incubación por un período de 7 días, durante el cual se evaluó el tiempo que tardó cada semilla en germinar. La figura que sigue es una representación gráfica de los resultados obtenidos al finalizar los tiempo de incubación, en esta imagen se aprecia como en efecto las cámaras que fueron inoculadas con las bacterias que se habían aislado de las muestras de suelo rizosférico, poseían una clara capacidad de promover la germinación de la radícula con mayor efectividad y velocidad que sin haber sido inoculadas.



**Figura 10.** Efecto de promoción de crecimiento de las bacterias asociadas a rizósfera de Catuai sobre semillas de lechuga. Imagen gráfica de valores expresados en porcentaje del efecto de promoción de germinación radicular para cada uno de los aislados. Las semillas inoculadas poseen un porcentaje de germinación superior al de los controles. Los valores más bajos de germinación corresponden a las bacterias que fueron

aisladas como fijadoras biológicas de nitrógeno, mientras los valores más altos pertenece a las bacterias que se aislaron en los medio TGE y YED-P (promotoras de crecimiento y solubilizadoras de fosfatos, respectivamente).

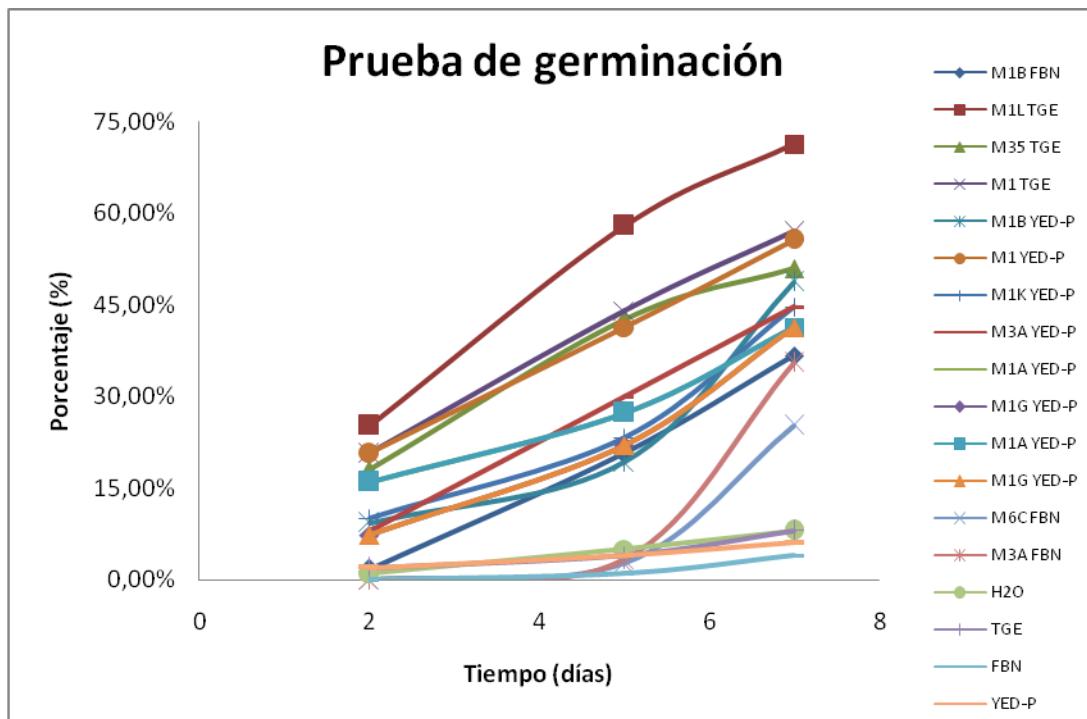


**Figura 11.** Efecto de promoción de crecimiento de las bacterias asociadas a rizósfera de Caturra sobre semillas de lechuga.

En la Figura 11 se pueden apreciar los resultados obtenidos en la inoculación de las bacterias asociadas a la variedad de café Caturra. Debe destacarse que, al igual que en el caso de la inoculación de las bacterias asociadas a Catuai, estas cepas resultaron ser buenas promotoras de germinación mostrando mayores resultados a los obtenidos en los controles y superando sus valores en más del 10%. Al evaluar el efecto de estos aislados durante los 7 días que duró el experimento, se pudo apreciar una curva ascendente en todos los casos del registro de semillas germinadas.

A continuación se muestra un gráfico donde se puede ver el efecto que ejercieron las bacterias sobre las semillas a lo largo del tiempo de duración de incubación. Se puede

observar como las curvas pertenecientes a los valores de los controles se encuentran por debajo de las curvas que reflejan los valores de las cámaras inoculadas.

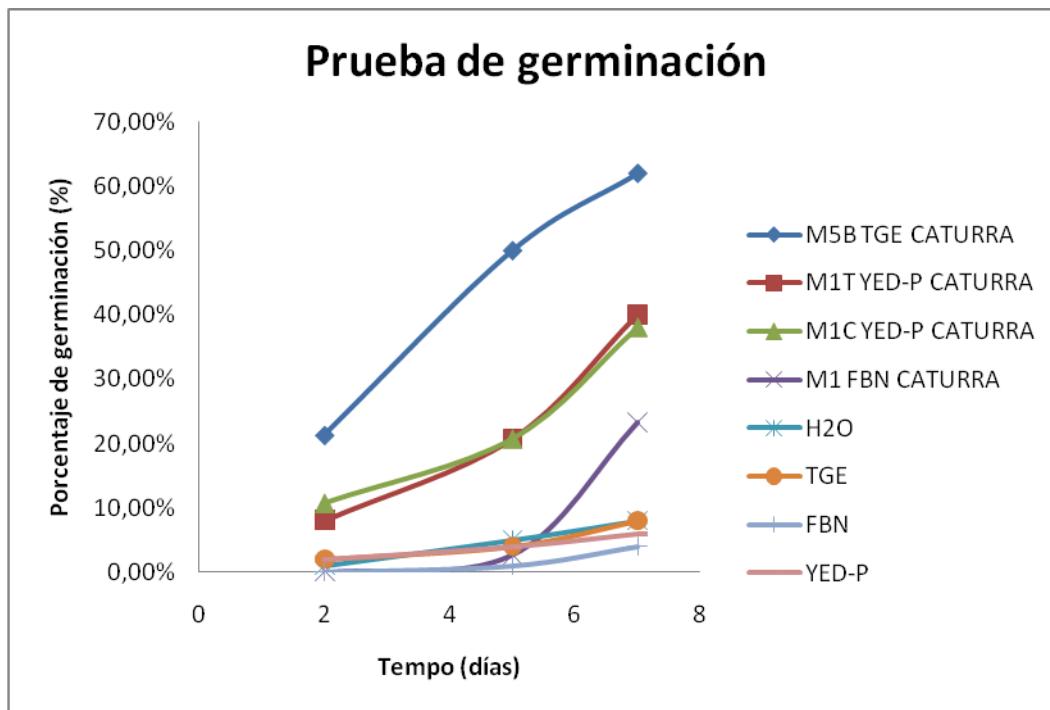


**Figura 12.** Efecto promotor de germinación de las bacterias asociadas a la rizósfera de Catuai. Gráfico de porcentaje de germinación en función del tiempo, cada una de las líneas representa una cepa bacteriana seleccionada para realizar la prueba.

En todo caso se evidencia que el efecto de las bacterias durante el tiempo de incubación resultó siempre superior al de los controles. Tanto para la variedad Catuai como para la variedad de café Caturra, los resultados reflejados indican que las bacterias aisladas de la rizósfera muestran un efecto de promoción de germinación indicando que todas las bacterias en mayor o gran medida ejercen un efecto promotor de crecimiento vegetal beneficioso.

Esto se puede apreciar con mayor claridad en la Figura 13, que muestra el efecto de los aislados obtenidos de la rizósfera asociada a las plantaciones de café Caturra que al

igual que en el caso de las asociadas a la variedad Catuai demostraron un efecto promotor a lo largo del tiempo siempre superior los controles establecidos.



**Figura 13.** Efecto promotor de germinación de las bacterias asociadas a la rizósfera de Catuai. Representación gráfica del porcentaje de germinación en función del tiempo expresado en días en el que cada línea representa un aislado bacteriano obtenido de la rizósfera de Caturra.

### 5.6 Caracterización microbiológica.

Con el fin de caracterizar e identificar microbiológicamente se aplicaron pruebas con fundamentos bioquímicos a 16 aislados bacterianos (12 cepas aisladas de rizósfera de Catuai y 4 cepas de Caturra), que fueron escogidos según su efecto de germinación sobre semillas de lechuga.

A estas bacterias se les realizó inicialmente una Tinción Gram, una vez revelado los resultados se establecieron una serie de pruebas que permitieran identificar las cepas

seleccionadas. En la Tabla 1, se aprecian los resultados de la Tinción Gram y de las pruebas que se aplicaron posteriormente. Estas pruebas permitieron separar las cepas por grupos y establecer un aproximado del género al cual pertenece cada una de ellas.

**Tabla 8.** Pruebas microbiológicas aplicadas a las bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Suelo	Cepa	Tinción Gram	Morfología	Kliger	Cítrato	Esculina	SIM	Nitrato	Urea	Oxidasa
CATUAL	M1G	-	Cocobacilos	R/A <sup>a</sup>	+	-	C/S	S/C	S/C	-
	M1T	-	Bacilos muy cortos	R/A	+ <sup>b</sup>	-	C/S	S/C	S/C	-
	M1B	-	Cocobacilos	R/A	+	- <sup>c</sup>	C/S	S/C	S/C	-
	M35	-	Bacilos cortos	R/A	+	-	C/S <sup>d</sup>	S/C	S/C	-
	M3A	+	Cocos entetradas y racimos				N/A <sup>e</sup>			-
	M1L	-	Bacilos cortos	R/A	+	-	C/S	S/C <sup>f</sup>	S/C	+
	M1	-	Bacilos gordos y gruesos	Inerte	-	-	S/C	S/C	S/C	-
CATURRA	M1C	-	Cocobacilos	R/A	+	-	C/S	S/C	S/C	-
	M5B	-	Bacilos gordos y gruesos	Inerte	-	-	S/C	S/C	S/C	-
	M1T	-	Cocobacilos	R/A	+	-	C/S	S/C	S/C	-

<sup>a</sup>R/A: Rojo-Amarillo. <sup>b</sup>+: Positivo. <sup>c</sup>-: Negativo. <sup>d</sup>C/S: Crecimiento superficial. <sup>e</sup>N/A: No

aplica<sup>f</sup>S/C: Sin crecimiento.

En el caso de las cepas M5B y M1, las pruebas aplicadas no fueron esclarecedoras desde la Tinción Gram. Las imágenes observadas en el microscopio hacían referencia una morfología similar a la del género *Bacillus*, con esporas y estresadas por el medio de crecimiento. A estas cepas se les realizó un choque térmico para verificar su resistencia

térmica, siendo una de las características de este género. Ambas bacterias crecieron después del tratamiento con calor, orientando los resultados hacia el género *Bacillus*.

De las demás cepas se esbozó un posible género estableciéndose entonces que los resultados de la bacteria M1L se orientan hacia el género *Pseudomonas*, M3A arrojó resultados que se inclinan hacia el género *Micrococcus*. Los resultados obtenidos para las bacterias restantes sugieren que las mismas pertenecen al género *Enterobacter*.

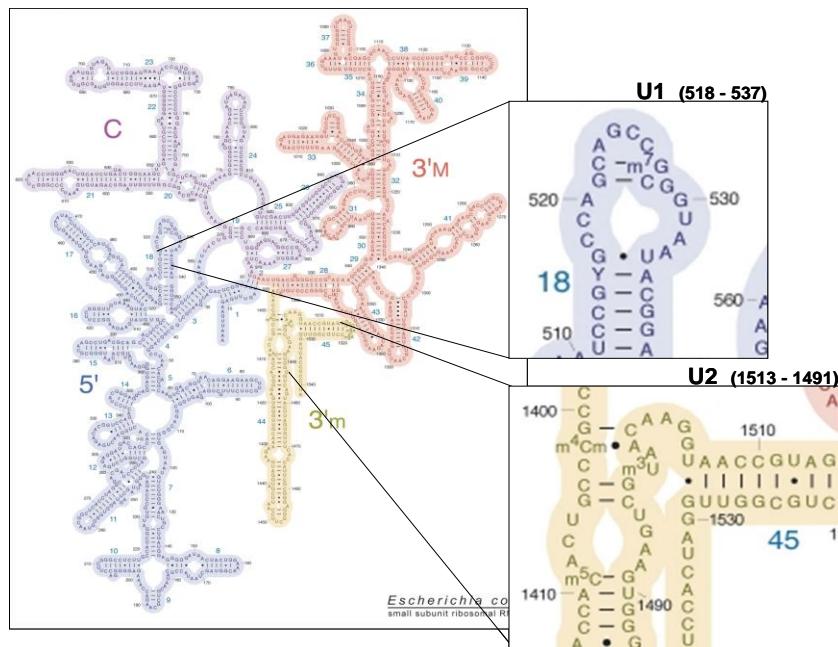
#### **5.7 Análisis *in silico* de las secuencias de los géneros bacterianos reportados en el suelo rizosférico.**

Con el fin de establecer las enzimas de restricción para un ensayo PCR-RFLP, se realizó un análisis de las secuencias del gen RNAr 16S depositadas en GeneBank de los géneros bacterianos reportados por Marcano (2014) en su trabajo de caracterización de bacterias promotoras de crecimiento asociadas al banano.

Para este análisis se emplearon los programas de alineación y búsqueda de sitios de corte con enzimas de restricción en la aplicación DNAMan. Primeramente fue necesario seleccionar las secuencias del gen RNAr 16S, las cuales fueron localizadas con el número de acceso, asociado a cada cepa bacteriana, en la página web de base de datos de secuencias genéticas: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

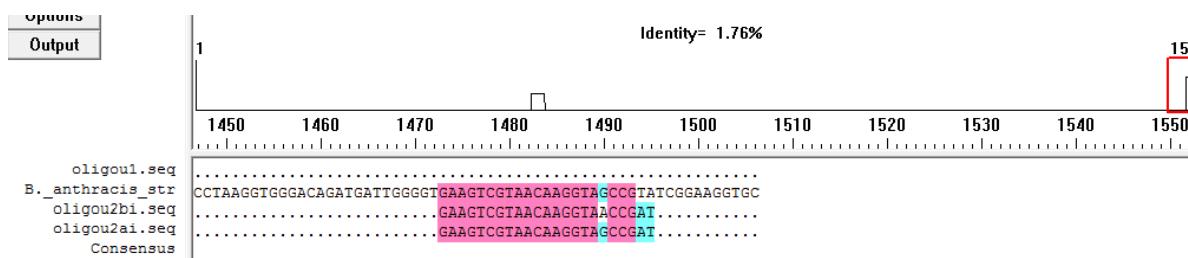
**Figura 14.** Ficha de secuencia genética en DNAMAN.

Una vez localizadas las secuencias genéticas se preparó una ficha de la secuencia de la bacteria con el número de acceso, nombre del gen, la fuente y seguido de la palabra “ORIGIN” se insertó la secuencia del gen RNAr 16S. Esto se realizó con 27 especies bacterianas que fueron reportadas en el trabajo de Marcano (2014). Seguido a esto se ejecutó la alineación de las secuencias con los primers universales escogidos: U1 (forward 5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3'), ubicado en las posiciones 518-537 del ADNr 16S de *E.coli* y U2 (reverse 5'-ATCGG(C/T)TACCTTGTACGACTTC-3) ubicado en las posiciones 1513-1491 del ADNr 16S de *E.coli*, usados por Lu y sus colaboradores (2000) en su trabajo de identificación de bacterias patógenas con oligonucleótidos universales.



**Figura 15.** Ubicación de los iniciadores del ensayo de PCR del 16S en el ARNr 16S de E.coli.

El alineamiento de las secuencias con los primers universales permitió reconocer el porcentaje de identidad en la zona de anclaje del oligo, de esta manera se aseguraba que se lleva a cabo la reacción de PCR. En la Tabla 9, se observan los datos de las cepas bacterianas y el resultado de los alineamientos. En base a esta tabla se descartaron algunas especies debido a que su porcentaje de identidad con el oligo U2 era inferior al 50% o la zona de anclaje no existía. De esta manera de 27 especies únicamente se realizó el análisis de restricción a 19 cepas bacterianas.

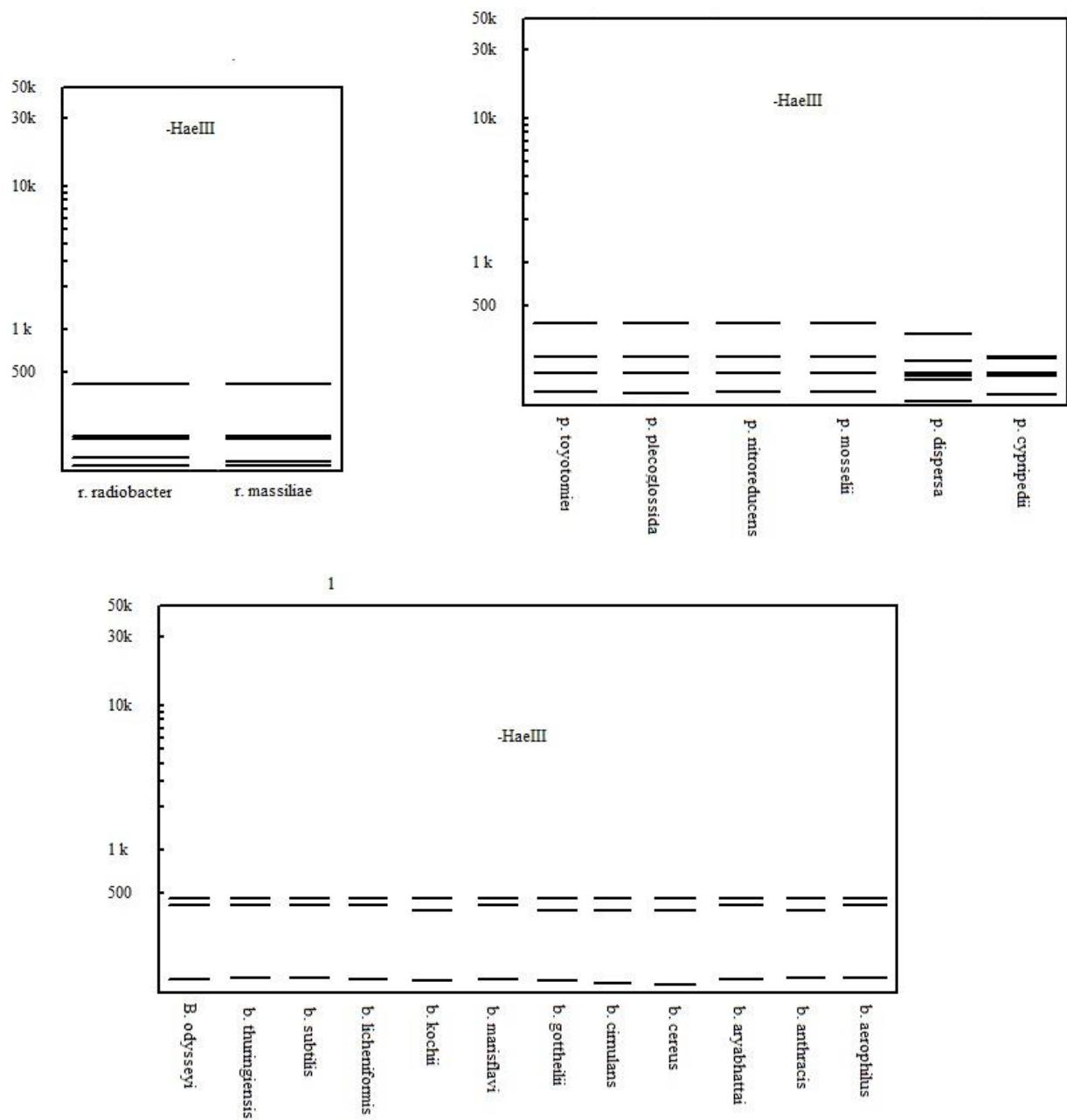


**Figura 16.** Alineamiento de secuencia del gen RNAr 16S con el oligo U2.

Para el análisis de restricción, se escogieron varias enzimas que se sabían estaban disponibles en el Laboratorio de Genética Molecular. Al realizar el análisis con la enzima de restricción HaeIII se lograron diferenciar tres patrones de bandas. Con ayuda del programa DNAMan se pudieron obtener las imágenes de como se deberían observar los patrones de restricción al realizar la digestión con la enzima y su posterior revelado mediante electroforesis.

**Tabla 9.** Datos de las secuencias genéticas, zonas de anclaje de los primers y porcentaje de identidad de anclaje.

Cepa Bacteriana	Nº Acceso	Longitud	Ubicación U1	Porcentaje de Identidad	Ubicación U2 (A/B)	Porcentaje de Identidad
<i>R. radiobacter</i>	AJ389904.1	1437	430-450	100	1405-1428	95,65
<i>R. massiliae</i>	AF531767.1	1434	444-464	100	1419-1443	84,06
<i>P. taiwanensis</i>	EU103629.2	1441	501-521	100	1018-1041	81,16
<i>P. toyotomiensis</i>	AB453701.1	1490	483-503	100	1458-1481	95,65
<i>P. plecoglossicida</i>	AB009457.1	1498	503-523	95	1477-1497	94,24
<i>P. nitroreducens</i>	AM088474	1521	497-517	100	1471-1494	95,65
<i>P. mosselii</i>	AF072688.2	1513	491-513	95	1468-1490	95,65
<i>P. cypripedii</i>	U80201.1	1457	467-487	100	1440-1456	86,96
<i>P. dispersa</i>	DQ504305.1	1347	410-430	100	No	0
<i>L. xylanilyticus</i>	FJ477040.1	1349	413-433	100	No	0
<i>L. odysseyi</i>	AF526913.3	1516	518-538	100	1493-1514	78,57
<i>B. thuringiensis</i>	ACNF01000156.1	1662	581-601	100	1555-1576	95,65
<i>B. sonorensis</i>	AF302118.1	1410	495-515	100	no	0
<i>B. subtilis</i>	AMXN01000021.1	1543	516-536	100	1490-1510	95,65
<i>B. olei</i>	GQ250440.2	1401	440-460	100	no	0
<i>B. safensis</i>	AF234854.2	1434	466-486	100	no	0
<i>B. siamensis</i>	NZ_AJVF01000043.1	1.4692	no	0	no	0
<i>B. licheniformis</i>	AE017333.1	1538	517-5-37	100	1490-1511	95,65
<i>B. marisflavi</i>	AF483624.1	1506	496-516	100	1471-1492	95,65
<i>B. kochii</i>	FN995265	1511	649-669	100	1624-1645	95,65
<i>B. gottheilii</i>	FN995266.1	1512	515-535	100	1490-1510	95,65
<i>B. cereus</i>	AE016877.1	1512	525-545	100	1499-1511	81,16
<i>B. anthracis</i>	AE016879	1507	525-545	100	1499-1511	95,65
<i>B. circulans</i>	AY724690.1	1487	497-517	100	1472-1486	84,06
<i>B. aryabhattai</i>	EF114313.2	1533	520-540	100	1495-1516	95,65
<i>B. aerophilus</i>	AJ831844.2	1531	514-534	100	1489-1510	95,65
<i>B. altitudinis</i>	AJ831842.1	1506	521-541	100	no	0



**Figura 17.** Geles de digestión del gen 16S de los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Bacillus*.

## **6. Discusión.**

Durante el tiempo en el que se han estudiado, las bacterias de promoción de crecimiento vegetal, se han demostrado los grandes beneficios que su aplicación conlleva. Existen múltiples técnicas de aislamiento y dependiendo del objetivo de la investigación, se seleccionaran los métodos más adecuados para obtener las cepas del suelo.

Todas las plantas presentan un sistema microbiano asociado a sus raíces y éste es responsable del establecimiento, supervivencia y productividad de la planta (Minamisawa y col., 2004). Se entiende como rizosfera a la porción de suelo que se encuentra en contacto directo con la raíz de la planta; la cual permite la interacción estrecha entre los microorganismos y la planta (Tsavkelova y col. 2006). Las bacterias rizosféricas son esencialmente atraídas por los exudados radicales que contienen una amplia variedad de moléculas orgánicas específicas de cada planta, éstas son usadas como nutrientes por los microorganismos y en retribución, los microorganismos pueden estimular el crecimiento de la planta o dar protección contra agentes patógenos (Khan, 2005).

Se aislaron bacterias promotoras de crecimiento provenientes del suelo rizosférico asociado a dos variedades de cafetos: Catuai y Caturra. Según tres características de interés, se ejecutaron tres fases de aislamiento para obtener así bacterias con capacidad de: Promoción de crecimiento, Fijación de Nitrógeno y Solubilización de Fosfatos.

### **6.1 Aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento.**

El aislamiento de estas bacterias se realizó según lo establecido en el Manual de Microbiología Agrícola (2008). Se empleó un medio de crecimiento muy rico en nutrientes con triptona y extracto de carne que además contenía glucosa como fuente de carbono y

de energía para las bacterias (Medio TGE), un pre-tratamiento térmico fue necesario para descartar la flora microbiana no deseada, orientando el aislamiento hacia las bacterias del género *Bacillus*. Los microorganismos del género *Bacillus* se caracterizan por formar esporas, ser termoresistente y formar colonias blanquecinas mucosas o secas con bordes irregulares. Algunas colonias pueden presentarse más compactas y otras más dispersas puesto que el microorganismo es motil (Manual de Microbiología Agrícola, 2008).

Una vez aislados los microorganismos en el medio TGE, se seleccionaron y sembraron hasta obtener las cepas purificadas. Estas cepas fueron contabilizadas de manera que se pudiese establecer una relación de la cantidad de microorganismos por gramo de suelo, en este caso unidad formadora de colonias por gramos de suelo analizado (UFC/gr). Los resultados obtenidos indican una gran cantidad de bacterias con esta capacidad promotora de crecimiento en el suelo, aunque la proporción de bacterias varía según la rizósfera a la que se encuentra asociada. En la Figura 5, puede observarse una clara tendencia de predominancia de las bacterias en los suelos asociados a la rizósfera de Caturra, siendo así, la cantidad de bacteria en Catuai, por lo general, es menor. La Estación Experimental “Jaime Henao Jaramillo” se encuentra en una zona de relieve montañoso de topografía accidentada donde las formas de terreno se repiten en un patrón más o menos secuencial (Rosales, 1969). La zona donde se encuentran las plantaciones de café ha sido descrita por Sedek (2016) como un suelo de pendientes suaves y relativa disponibilidad de nutrientes para las plantas. Es un suelo clasificado como humichapludults, francosa fina, mixta, isohipertémica. Suelos de color pardo oscuro en la superficie, de reacción ligeramente ácida pH (6,1), el contenido de materia orgánica es alto (5,4 %) en la

superficie. La temperatura del suelo corresponde al régimen isotérmico, es decir, que su temperatura media anual entre 13 a 22 °C entre los 50 y 100 cm de profundidad (Paltas y col., 2013).

Lo anteriormente expuesto sugiere que, el terreno en el que se encuentran las plantaciones de café no es regular, al contrario está lleno de pendientes y bordes que interfieren en la distribución de los nutrientes del suelo y en este caso, en la homogeneidad de la distribución de las bacterias. Al momento de realizar el muestreo, fue difícil establecer una zona firme en la parte donde se encontraban los cafetos de la variedad Catuai, la gran mayoría de ellos se encontraba en una pendiente bastante inclinada mientras que las plantas de la variedad de café Caturra, se encontraban en una zona de mayor firmeza y menor pendiente. Los suelos inclinados de El Laurel, se ven afectados por el lavado de sus nutrientes por el efecto del agua de las lluvias que cae y lava el terreno.

Sin embargo, se aplicó una prueba de carácter estadístico a los datos, de manera que se pudiera establecer si había diferencia significativa entre las variedades de suelo rizosférico considerando las características físicas del mismo. El estadístico ANOVA arrojó como resultado que los suelos no presentaban diferencias entre sí que por ende, no existe una diferencia entre la homogeneidad de las bacterias asociadas a las rizósfera analizadas.

## **6.2 Aislamiento de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno.**

En el aislamiento de las bacterias con capacidad de fijar el nitrógeno, se usó un medio selectivo mineral sin nitrógeno, que contiene azul de bromotimol en su composición. El azul de bromotimol ( $C_{27}H_{28}Br_2O_5S$ ) es un indicador muy utilizado para

determinar el pH en zonas próximas a la neutra, pH=7, porque tiene un intervalo de viraje del amarillo al azul entre valores 6.0 y 7.6 (aproximadamente). La función del azul de bromotimol en el medio es indicar la presencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno. Estas bacterias usan el nitrógeno presente en el medio transformándolo en amoníaco, por procesos naturales propios de la bacteria que producen la acidificación del medio y por tanto la aparición del color amarillo en solución.

Según los resultados obtenidos la cantidad de bacterias fijadoras de nitrógeno asociada a la rizósfera de Caturra es mayor que la que se cuantificó, mediante el NMP, en las muestras de suelo rizosférico de Catuai. Las diferencias establecidas entre ambas muestras bien podrían estar vinculadas con el accidentado terreno en el que se encuentra la plantación de cafetos, tal como se observó en el aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento en medio TGE. Para determinar si existe una diferencia real entre las muestras, se realizó un análisis de varianzas (ANOVA).

Los valores obtenidos están en el orden del  $10^6$  células por gramo de suelo. Berkum (1980) reporta valores de  $8.3 \times 10^5$  y  $1.6 \times 10^4$  por gramo de suelo en la rizosfera de *Sorghum vulgare* y *Branchia mutica*, lo que indica que las cantidades obtenidas en el aislamiento de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno se encuentra dentro de los valores reportados, por lo que la cantidad de estos microorganismos presentes en el suelo, en comparación con otros suelos, no se encuentra alterada.

### **6.3 Aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfatos.**

El Fósforo es uno de los elementos esenciales más importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas en todas sus etapas fisiológicas pero también puede no estar

disponible ya que es rápidamente inmovilizado al interaccionar con el resto de los componentes del suelo (Díaz y col., 2007). Para seleccionar los microorganismos presentes en el suelo de muestra con capacidad solubilizadora de fosfatos, se empleó un medio rico compuesto por extracto de levadura, peptona, D-glucosa y fosfato cálcico (“YED-P” por sus siglas en inglés). Al ser un medio muy rico, la variedad de bacterias que crecen en él es grande, la presencia del fosfato cálcico es el factor clave para la selección. Se escogieron aquellas bacterias que fueron capaces de solubilizar el fosfato contenido en el medio y que formaron su alrededor un halo transparente en contraste con el resto del medio.



**Figura 18.** Bacteria Solubilizadora de Fosfato con halo alrededor.

Luego de escoger las bacterias, se midió el diámetro de los halos y se calculó el índice de solubilización. Se escogió como solubilizadoras importantes a aquellos aislados con índice mayor a 4.

Según lo anterior, las bacterias aisladas representan solubilizadoras potenciales por lo que pueden considerarse movilizadores de fosforo de interés. Hay varios mecanismos por los cuales las bacterias solubilizan fosfatos. Tanto las plantas como los microorganismos pueden incrementar la solubilidad del P inorgánico (Pi) pobremente soluble a través de la liberación de protones, iones OH<sup>-</sup> o CO<sub>2</sub> y aniones

de ácidos orgánicos como citrato, malato y oxalato y pueden mineralizar el P orgánico (Po) por la liberación de varias enzimas fosfatases. La diferencia observada entre estos aislados probablemente pueda deberse a diferencia entre géneros, sin embargo, para aclarar estas disyuntivas es necesario hacer estudios más especializados.

#### **6.4 Evaluación del efecto de los aislados bacterianos sobre semillas.**

Evaluando el efecto que los aislados obtenidos tuvieron sobre las semillas de lechuga, se seleccionaron 16 cepas bacterianas. Estas cepas arrojaron resultados mayores al 20% de promoción de germinación de la radícula en las semillas, superando en todos los casos a los valores de los controles.

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal ejercen efectos benéficos en las plantas a través mecanismos directos e indirectos para la promoción del crecimiento vegetal. La promoción directa ocurre cuando las bacterias sintetizan metabolitos que facilita a las plantas, la toma de ciertos nutrientes a partir del ambiente (Glick, 1995; Glick, 1999; Jiménez-Delgadillo, 2004); mientras que el mecanismo indirecto se lleva a cabo cuando las PGPR disminuyen o previenen el efecto deletéreo de fitopatógenos mediante control biológico (Glick, 1995; Glick, 1999). En muchos casos, las bacterias tienen la capacidad a producir la AIA, un tipo de auxinas las cuales son responsables del crecimiento de la planta por división y alargamiento de sus células en todos los niveles este grupo estimula la germinación, incrementa el xilema y la formación de raíces (Ibarra, 2010).

Los resultados obtenidos indican que estos aislados bacterianos, son excelentes opciones a evaluar en la elaboración de un biofertilizante, la capacidad de promover la

germinación a mayor velocidad, la fijación del nitrógeno ambiental y solubilización de fósforo inaccesible a las plantas son características atractivas en la producción de rubros de interés agrícola a través de métodos sostenibles y amigables con el ecosistema. Los mecanismos por los que estas bacterias son capaces de estimular la germinación radicular, deben ser estudiados aplicando más pruebas que determinen la producción de hormonas por parte de los microorganismos, por ejemplo.

### **6.5 Caracterización microbiológica.**

Mientras que desde el punto de vista morfológico las bacterias presentan pocas diferencias, si muestran una gran variedad en cuanto a sus propiedades fisiológicas. Empelando pruebas sencillas con fundamentos bioquímicos es posible diferenciarlas, separándolas en grupos o géneros.

La Tinción Gram permitió separar a los microorganismos por dos características: 1) Gram positiva y Gram negativas y 2) Morfología vista al microscopio. Así, se pudo apreciar la forma de estas bacterias y se diferenció un único miembro del género *Micrococcus* (M3A), por la forma de racimos de uvas en grupo de cuatro que se observaba en el microscopio. Se identificaron así varias bacterias con forma de bastones o bacilos y dos cepas que por su extraña coloración no podían asegurar si era Gram negativas o positivas, además al observarlas en la luz del microscopio se podía apreciar una forma de encapsulamiento que parecía indicar la formación de esporas. A estas bacterias se les aplicó un tratamiento térmico, luego del cual crecieron.

Los microorganismos M1 y M5B son termoresistentes y esporulados, procedían del medio TGE que se empleó en el aislamiento orientado a *Bacillus*. Los resultados de las pruebas que le fueron aplicadas a estas bacterias no fueron significativos.

El resto de las bacterias se distinguieron por la prueba de la oxidasa, la bacteria M1L dio oxidasa positiva, diferenciándose y ubicándose en el grupo de las *Pseudomonas* que se caracterizan por ser un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasa positiva, aeróbicos estrictos aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones.

Las bacterias MIG, M1T, M1B, M1C y M1T se agruparon dentro del género *Enterobacter*. Los microorganismos de este género son entéricos Gram negativos, oxidasa negativa, no esporulados. Se recomienda complementar la caracterización bioquímica con las galerías API, pruebas de patogenicidad, reacción de la catalasa y motilidad para verificar y asegurar el género al que pertenece cada aislado.

#### **6.6 Análisis *in silico* de las secuencias del gen RNAr 16S en GenBank de los géneros bacterianos reportados.**

DNAMAN es un paquete de software único para aplicaciones de biología molecular. Este paquete proporciona un sistema integrado con funciones versátiles para el análisis de secuencias de alta eficiencia, de ahí que se halla empleado para realizar el análisis *in silico* de las secuencias del genRNAr16S. Además el uso de esta herramienta proporciona un conocimiento previo a cualquier ensayo molecular que se desee llevar a cabo, en este caso un ensayo de digestión con enzimas de restricción, lo que permite

visualizar si las secuencias genéticas poseen áreas de reconocimiento para las enzimas de restricción escogidas para el ensayo.

Las secuencias genéticas analizadas en esta etapa del proyecto corresponden al ARN ribosomal 16S que es un componente de la subunidad 30S de los ribosomas procariotas. Actualmente, en los estudios moleculares de secuenciación e identificación de género y especie microbiana se utiliza el rRNA 16S o 18S, porque son secuencias que se han mantenido bastante uniformes a lo largo de la evolución, y por eso se ven claramente las diferencias entre los distintos microorganismos y se pueden realizar árboles filogenéticos y esquemas evolutivos.

Mediante el análisis de las secuencias parciales del rRNA 16S es posible encontrar patrones de secuencias específicos para grupos, especies o incluso serotipos bacterianos. Para la identificación de los microorganismos a ese nivel, se han desarrollado pequeñas sondas específicas de la región variable del rRNA 16S. Las diferencias en las regiones conservativas proporcionan así mismo secuencias para el diagnóstico de grupos de organismos relacionados y pueden ser usadas como dianas para sondas específicas de oligonucleótidos. Sondas específicas de rRNA 16S y 23S han sido aplicadas para establecer diferentes grupos y especies, así como en la identificación de bacterias. La sensibilidad de las pruebas puede ser aumentada *in vitro* aplicando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A partir de un pequeño fragmento de DNA, es posible amplificar una secuencia diana hasta unos cuantos microgramos, los cuales pueden ser secuenciados directamente o pueden ser utilizados como diana de una sonda específica. El uso

combinado de sondas universales y específicas permite también estimar la fracción de determinados microorganismos dentro de un conjunto. (Stahl y col., 1988).

El objetivo de realizar el análisis *in silico* de las secuencias del gen RNAr 16S, es determinar cuáles enzimas de restricción usar que permitan el planteamiento de un ensayo PCR-RFLP. Con tal fin, se seleccionaron los primers universales U1 y U2 empleados por Lu y colaboradores en el 2000 para identificar bacterias patógenas en el líquido cerebro-espinal.

En su trabajo Lu y col., (2000), realizó un ensayo PCR con los primers U1 y U2 para ampliar la zona conservada (correspondiente al gen RNAr 16S) de las muestras genómicas que habían extraído del fluido cerebro-espinal y seguidamente realizó la digestión con enzimas de restricción. De esta manera, obtuvo como resultado diferentes patrones, lo que le permitió crear grupos de patrones de bandas que correspondían a diferentes especies. Bajo esta premisa, se analizaron las secuencias genómicas que fueron reportadas por Marcano en el 2014.

Estas secuencias fueron alineadas con los primers universales, de manera que se pudo determinar la zona de anclaje y si un posible ensayo PCR-RFLP sería factible. Al momento de hacer el análisis de restricción con las secuencias genómicas, se seleccionaron las enzimas de la bases de datos de la aplicación molecular que se encontrasen disponibles en el laboratorio. El análisis de restricción dio como resultado tres patrones que agrupan a tres géneros bacterianos diferentes, comprobando así que la región de las secuencias del gen RNAr 16S, en efecto están conservadas en el código genético.

Así al obtener estos patrones se tiene una idea clara de cómo serían los resultados de un ensayo de amplificación, si las enzimas disponibles sirven para realizar la digestión y una idea general de cómo se podrían agrupar los patrones y relacionarlos con un género bacteriano en específico.

## **7. Conclusiones.**

- Se obtuvieron un total de 25 aislados bacterianos con capacidades beneficiosas para las plantas. Distribuidos de la siguiente manera: 7 cepas Fijadoras de Nitrógeno de vida libre, 11 cepas solubilizadoras de fosfatos y 7 cepas promotoras de crecimiento vegetal.
- Los estadísticos indicaron que no hay diferencias entre las proporciones bacterianas asociadas a las rizósfera de las variedades de café Caturra y Catuai.
- Al evaluar el efecto que los aislados tienen sobre las semillas de lechuga se determinó que 18 de los 25 aislados obtenidos son potenciales PGPR con resultados superiores al 20% de germinación respecto a los controles experimentales.
- Los aislados obtenidos con el método de aislamiento de *Bacillus* demostraron ser excelentes promotores de crecimiento en la germinación radicular de *Lactuca sativa* L, superando un 60% la capacidad de germinación de los controles.
- Se obtuvieron resultados aproximados en relación a la caracterización bioquímica únicamente de los aislados con capacidades promotoras de crecimiento y solubilizadoras de fosfatos. Orientándose hacia los géneros *Bacillus*, *Microccoccus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*.

- El programa DNAMAN es una herramienta versátil y ampliamente recomendada para la realización de análisis *in silico* como medio de preparación de un ensayo PCR-RFLP. Incluso debido a su gran variedad de herramientas puede emplearse como aplicación de apoyo para diversos ensayos.
- Los oligos universales U1 y U2, mostraron un patrón de identidad superior al 70% en 20 de las 27 secuencias genéticas seleccionadas para este ensayo. Lo que sugiere que la zona analizada del gen 16S del ARNr es una región bastante conservada en estas cepas.
- Se hallaron patrones de bandas diferenciales a nivel de géneros para las secuencias escogidas, usando la enzima de restricción HaeIII en la digestión del material genético.
- Es posible y factible realizar un ensayo PCR-RFLP considerando la información obtenida con la aplicación molecular DNAMAN, para identificar los aislados obtenidos en este proyecto durante sus diferentes etapas de desarrollo y complementar con la información de la caracterización microbiológica.

## **8. Bibliografía.**

- ABARCA, O. 2005. Conflictos de intensidad de uso de la tierra en las estaciones experimentales de la Universidad Central de Venezuela. Análisis espacial con sistemas de información geográfica. *Agronomía Tropical* v. 55 n. 2
- ADRIANO A., M. L., JARQUIN G., R., HERNANDEZ R., C., SALVADOR F., M., MONREAL V., C. T. 2011. Biofertilización de café orgánico en etapa de vivero en Chiapas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(3): 417-431.

- AHEMAD, M., MULUGETA, K. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promotingrhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*. 26: 1-20.
- ALBAN, R., GUERRERO, R., TORO, M. 2013. Interactions between a Root Knot Nematode (*Meloidogyneexigua*) and ArbuscularMycorrhizae in Coffee Plant Development (*Coffeaarabica*). *American Journal of Plant Sciences*. 4:19-23.
- ALTIERI, M. A. 2002. Agroecology: the sciencie of natural resource management for farmers in marginal enviroments. *Agric. Ecosyst. Environ.* 93:124.
- ARUN, B., GOPINATH, B., SHARMA, S. 2012. Plant growth promoting potential of bacteria isolated on n free media from rhizosphere of *Cassia occidentalis*. *World Journal ofMicrobiology and Biotechnology*. 28: 2849-2857.
- ARZOLAY, Y. 2013. Caracterización de bacterias endosimbióticas de nódulos de leguminosas nativas del estado Guárico, mediante técnicas bioquímicas y moleculares. *Tesis de Pre-Grado*. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- BHATTACHARYYA, P. N., JHA D. K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J MicrobiolBiotechnol* 28:1327–1350.
- CABELLO-CONEJO, M.I., BECERRA-CASTRO, C., PRIETO-FERNÁNDEZ, A., MONTERROSO, C., SAAVEDRA-FERRO, A., MENCH, M., KIDD, P.S. 2014. Rhizobacterial inoculants can improve nickel phytoextraction by the hyperaccumulatorAlyssum pintodasilvae. *PlantSoil*. 379: 35-50.

- CASTRO, R. O., CORNEJO, H. A. C.; RODRÍGUEZ, L. M., BUCIO, J. L. (2009) The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav* 4(8):701–712.
- CHANWAY, C. P. 1997. Inoculation of tree roots with plant growthpromoting soil bacteria: An emerging technology for reforestation. *For. Sci.* 43: 99-112.
- DE-BASHAN, L.E., HOLGUIN, G., GLICK, B.R., BASHAN, Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In: *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo*. Editorial Trillas, Mexico City, Mexico. pp. 170-224.
- DÍAZ V., P., FERRERA-CERRATO, R., ALMAREZ-SUAREZ, J.J., ALCÁNTAR G., G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra* 19: 327-335.
- DÍAZ-MEDINA, A., ALMAGUER-LÓPEZ, J., SUÁREZ-PÉREZ, C., ALBELO, N., GONZÁLEZ-REBOSO, A., LÓPEZ, Y. 2004. Efecto de la aplicación de *Azotobacterchroococcum* y bacterias solubilizadoras de fósforo sobre el desarrollo de posturas de cafeto (*Coffeaarabica L.*). *Centro Agrícola*. 31(1):1-3.
- DURÁN, D., REY, L., SÁNCHEZ-CAÑIZARES, C., JORRÍN, B., IMPERIAL, J., RUIZ-ARGÜESO, T. (2013). Biodiversity of slow-growing rhizobia: the genus *Bradyrhizobium*. In: *Beneficalplantmicrobial Interactions: Ecology and Applications*. 20-46.
- GLICK, B.R. 1995. The enhancement plant growth free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.

- GLICK, B.R., PATTEN, C.L., HOLGUIN, O., PENROSE, D.M. 1999. Biocontrol Mechanism. Chapter 7. In Biochemical and genetic mechanism used by plant growth promoting bacteria. Ontario, Canada. Imperial CollaggePress pp. 215-248.
- GOMEZ-LUNA, B., HERNANDEZ-MORALES, A., HERRERA-MENDEZ, C. H., ARROYO-FIGUEROA, G., VARGAS-RODRIGUEZ, L., OLALDE-PORTUGAL, V. 2012. Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento de la rizósfera de plantas de guayaba (*Psidiumguajava*). Ra Ximhai Vol. 8, Número 3.
- GONZÁLEZ, J., LLUNCH, C. 1992. Biología del nitrógeno. Editorial Rueda, Madrid, España. Tesis Doctoral. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela.
- GONZÁLEZ-ANDRÉS, F., MULAS, D., MORÁN, A., MENACHO, S., GARCIA, P. & VELÁZQUEZ, E. 2007. Fertilizantes alternativos adaptados a las nuevas tendencias de la agricultura. Tierras de Castilla y León. Agricultura. 139: 26-32
- Guía de trabajos prácticos. Microbiología General. 2012. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- HAYAT, R., ALI, S., AMARA, U., KHALID, R., AHMED, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. Annals of Microbiology. 60: 579-598.
- HOFFLAND, E., BAKKER, P. A. H. M., LOON, V. L. C. 1997. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance-reply. Phytopathol. 87: 2, 138.
- IZQUIERDO, J. A., NUSSLEIN, K. 2006. Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments. MicrobEcol 51:441-452.

- JIMÉNEZ-DELGADILLO, M.R. 2004. Péptidos secretados por *Bacillus subtilis* que modifican la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Doctorado en Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato. México.
- KHAN, M. S., ZAIDI, A., AHMED, M., OVES, M., WANI, P. A. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi. Current perspective. *ArchAgron Soil Scien.* 56(1): 73-98.
- KLOEPFER, J. W., SCHROTH, M. N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. En: Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria. Gilbert-Clarey, Tours, pp 879–882.
- KLOEPFER, J. W., SCHROTH, M. N. 1981. Relationship of in vitro antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology* 71:1020–1024.
- KUYPER, T. W., CARDOSO, I. M., ONGUENE N. A., MURNIATI, J., VAN NOODWIJK, M. 2004. Managing mycorrhiza in tropical multispecies agroecosystems. CABI, Wallingford. 243261 pp.
- LI, J. H., WANG, E. T., CHEN, W. F., CHEN, W. X. 2007. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biol Biochem* 40:238-246.
- LU, J., PERNG, C., LEE, S., WAN, C. 2000. Use of PCR with universal primer and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 38 (6): 2076-2080.

- MAHMOOD, K. W., YANG, N., KIDHWAR, Z., RAJPUTY, A., ARIJO, A. 2006. Study of cellulolytic soil fungi and two nova species and new medium. *J ShejiangUniSci* 7:459-466.
- MARCANO, I. E. 2014. Aislamiento y caracterización de bacterias de la rizósfera de banano (*Musa sp*) en República Dominicana y selección de cepas para el desarrollo de biofertilizante. Tesis Doctoral. Universidad de León. León, España.
- NORIEGA A., G., CÁRCAMO, R., B., GOMEZ C., M. A., SCHWENTESIUS R., R., CRUZ H., S., LEVYA B., J., GARCÍA DE LA R., E., LOPEZ R., U. I., MARTINEZ H., A. 2014. Intensificación de la producción en la agricultura orgánica: caso café. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 5: 163-169.
- RIVAS, R., VELÁZQUEZ, E., PALOMO, J., MATEOS, P., GARCÍA, P., MARTÍNEZ, E. 2002. Rapid identification of *Clavibacter michiganensis* subspecies *sepedonicus* using two primers random amplified polymorphic DNA (TP-RAPD) fingerprints. *Europa Journal of Plant Pathology.* 108: 179-184.
- RODRÍGUEZ, H., FRAGA, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances.* 17: 319-339.
- SHANKAR, J. 2013. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Potential Microbes for Sustainable Agriculture.* Resonace.
- SINGH, J. 2013. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Resonance.* 18: 275-281.
- SPAEPEN, S., DOBBELAERE, S. & CROONENBORGH, A. 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil.* 312: 15-23.

- TORO, M. 2008. Micorrizas arbusculares como biofertilizantes para el manejo de sistemas agrícolas. *Acta Biol. Venez.* 28(1): 1-14.
- VESSEY, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil.* 255: 571-586.
- ZANI, S., MELLON, M. T., COLLIER, J. L., ZHER, J. P. 2000. Expression of *nifH* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR. *ApplEnvironMicrobiol* 66:3119-3124.
- ZHANG, F., N. DASHTI, H. HYNES Y D.L. SMITH. 1996. Plant growth promoting rhizobacteria and soybean (*Glycine max* L. Merr.) nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. *Ann. Bot.* 77: 453-459.
- ZUÑIGA D., D. 2008. Manual de Microbiología Agrícola. Rhizobium, PGPR, Indicadores de Fertilidad e Inocuidad. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.