UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

TITULO

Identificación molecular de bacterias con potencial fijador de nitrógeno, asociadas a la rizósfera de *Prosopis pallida* "algarrobo"

Para optar el Título profesional de Ingeniero Forestal y del Medio Ambiente

Bach. Mack Frank García León
Ejecutor

Tumbes – Perú

2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

TITULO

Identificación molecular de bacterias con potencial fijador de nitrógeno, asociados a la rizósfera de *Prosopis pallida* "algarrobo"

Tesis aprobada por:

MSc. Jalmer Fidel Campaña Olaya (Presidente) _____

MSc. Eber Leopoldo Herrera Palacio (Secretario) _____

MSc. Rosa Liliana Solís Castro (Vocal) _____

Tumbes – Perú

2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

TITULO

Identificación molecular de bacterias con potencial fijador de nitrógeno, asociados a la rizósfera de *Prosopis pallida* "algarrobo".

LOS SUSCRITOS DECLARAMOS QUE LA TESIS ES ORIGINAL EN SU CONTENIDO Y FORMA.

García León Mack Frank (Autor) _____

Dr. Ramón García Seminario (Asesor) _____

MSc. César Augusto Mogollón Farias (Co-Asesor) _____

Tumbes – Perú

2020

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a Dios, a mi madre y a mi abuela, ya que ellas son las únicas personas que me tienen paciencia y comprensión. Gracias a sus consejos y orientación que han incidido en mi formación como persona de bien.

A mi padre y hermanas, que siempre están corrigiendo mis errores, que por cada discusión que tenemos siempre encontramos una buena solución.

AGRADECIMIENTO

Primeramente, a Dios ya que siempre me ha guiado y me ha llevado en el camino correcto. Me ha enseñado muchas cosas mediante la oración, una de las más importantes es en seguir siempre adelante a pesar de las adversidades de la vida.

A mis padres y a mis abuelos: Eladio García Nizama, Clara Emilia, León Bautista, Genobeba Nizama Vilchez, Victoria Bautista Delgado, Valentin León Flores y Juan García Ramírez (F); muchas gracias por su apoyo y estar a mi lado durante todo el recorrido de mi aprendizaje.

A mis Maestros, mis tutores, mi apoyo incondicional al Dr. Ramón García Seminario por su tiempo y dedicación, su gran paciencia a lo largo del desarrollo de la investigación. Así mismo, a los demás docentes de la Escuela Académica de Ingeniería Forestal y del Medio Ambiente por sus conocimientos impartidos en aula, los cuales fueron de vital importancia en mi desarrollo profesional.

A mi Co-Asesor César Augusto Mogollón Farías por su ayuda y nuevas enseñanzas en el transcurso de la investigación.

A la empresa Inca´Biotec por todas las facilidades que me brindó y a cada uno de los miembros de Plant Biotec del área verde.

A Raisa Keterine Orejuela Farromeque y Dayana Muñoz Aguilar por su ayuda infinita y su tiempo brindado en el desarrollo de esta tesis.

A Ponce Garcia Nizama y Alex Daniel Garcia Celi por su apoyo y consejos durante el desarrollo de la tesis.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA FORESTAL Y MEDIO AMBIENTE

CAMPUS UNIVERSITARIO S/N "LA CRUZ"
SECRETARIA ACADÉMICA
TUMBES – PERU

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Tumbes, a los 25 día (s) del mes de NOVIEMBRE de dos mil veinte, se reunieron de manera virtual, https://untumbes.webex.com/untumbes-sp/j.php?MTID=m6d56b60c011530622d96e726c958c2bd, los integrantes del jurado designados, según Resolución Nº 125-2019/UNTUMBES-VRACAD-FCA-D (15-11-2019) y Resolución Nº 032-2020/UNTUMBES-VRACAD-FCA-D (12-06-2020) donde se aprueba el Proyecto de Tesis y ratifica el jurado; con el objeto de evaluar la sustentación de la tesis denominada: **Identificación molecular de bacterias con potencial fijador de nitrógeno, asociados a la rizosfera de *Prosopis pallida* "algarrobo"**, para optar el Título de Ingeniero Forestal y Medio Ambiente. **Cuyo Asesor de la mencionada tesis es el Dr. Ramón García Seminario**.

A las ONCE horas con QUINCE minutos y, de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento respectivo, el presidente del jurado dio por iniciado el acto.

Luego de la exposición del trabajo, la formulación de preguntas y la deliberación del jurado lo declararon APROBADO por UNANIMIDAD con el calificativo de MUY BUENO.

Por lo tanto el Bachiller: **GARCIA LEON MACK FRANK,** queda apto para que el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Tumbes, le expida el Título Profesional de Ingeniero Forestal y Medio Ambiente de conformidad con lo estipulado en el Artículo 90 del Estatuto de la Universidad Nacional de Tumbes y a lo normado en el Reglamento de Grados y Títulos.

Siendo las DOCE horas con TREINTA minutos, el presidente del jurado dió por concluido el presente acto académico y para mayor constancia de lo actuado firman en señal de conformidad todos los integrantes de este jurado, presentes en el acto de sustentación.

Mg. JALMER FIDEL CAMPAÑA OLAYA
DNI N° 00236469
Presidente

Mg. EBER LEOPOLDO HERRERA PALACIOS
DNI N° 42450218
Secretario

Mg. ROSA LILIANA SOLIS CASTRO
DNI N° 17628592
Vocal

INDICE

DEDICATORIA v
AGRADECIMIENTO vi
INDICE vii
ÍNDICE DE TABLAS ix
ÍNDICE DE FIGURAS ix
RESUMEN xi
ABSTRACT xi
I. INTRODUCCION 12
II. Estado de Arte 14
2.1. Origen del algarrobo (*Prosopis pallida*) 14
2.2. Clasificación Taxonómica 14
2.3. Descripción botánica 15
Tallo 15
Ramas 15
Hojas 15
Folíolos 16
Inflorescencia 16
Ovario 17
Fruto 17
Raíz 18
2.4. Distribución Ecológica 18
2.5. Requisitos medioambientales (Pasiecznik et al., 2001) 19
2.5.1. Suelo 19
2.5.2. Requerimiento de agua 19
2.5.3. Temperatura 19
2.6. Técnicas de Identificación Molecular 19
2.7. Antecedentes 22
III. Materiales y Métodos 25
3.1. Ubicación del Área de estudio 25
3.2. Fase de campo 25
3.2. Fase de laboratorio 26

3.2.1. Aislamiento y purificación de cultivos bacterianos 26
3.2.2. Caracterización Morfológica 27
3.2.3. Pruebas Bioquímicas de los aislados bacterianos: 28
3.2.4. Ensayos de compatibilidad bacteriana in vitro 30
3.2.5. Caracterización molecular de las bacterias aisladas 30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 34
4.1. Aislamiento y caracterización morfológica de bacterias rizosféricas 34
4.2. Pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas 38
4.2.1. Fijación de Nitrógeno 38
4.2.2. Solubilización de fosfato 40
4.3. Ensayos de compatibilidad bacteriana in vitro 42
4.4. Caracterización molecular de las bacterias aisladas 43
V. Conclusiones 46
VI. Recomendaciones 46
VII. Bibliografía 47
VIII. ANEXOS 57
ANEXO 1. Composición química de medios de cultivos 57
1. Trypticase Soy Agar (TSA) 57
2. Luria Bertani (LB) 57
3. Medio Especifico Ashby 58
4. Medio Especifico NBRIP 58
ANEXO 2. Componentes de Extracción de ADN y PCR 59
1. Concentración por ebullición en Buffer Fosfato Alcalino (PBS) 59
2. Mix de Reacción de PCR 59
ANEXO 3. Galería de Fotos 60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros evaluados en la caracterización morfológica de las bacterias aisladas de suelo rizosférico en plantas de *P. pallida*……27

Tabla 2. Descripción de la morfología colonial y celular de los aislados bacterianos sembrados en medio de cultivo TSA……35

Tabla 3. Crecimiento de aislados bacterianos fijadores de Nitrógeno en medio ASBHI……..……38

Tabla 4. Identificación molecular de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de la rizósfera de *P. pallida*, mediante secuenciación del ARNr 16S……..43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de desarrollo de la hoja de *P. pallida* 16

Figura 2. Rama con inflorescencia de *Prosopis pallida*..... 17

Figura 3. Vaina madura de *Prosopis pallida*..... 17

Figura 4. Sistemas de raíces del *P. pallida* 18

Figura 5. Desnaturalización - Emparejamiento ó Alineamiento - Extensión 21

Figura 6. Recolección de suelo rizosférico en planta de *P. pallida*..... 26

Figura 7. Aislamiento de colonias bacterianas a partir de suelo Rizosférico de una planta de *P. pallida*..... 27

Figura 8. Representación de las circunferencias del radio exterior e interior 29

Figura 9. Crecimiento de los aislados bacterianos en medio general TSA 35

Figura 10. Tinción Gram en las cepas bacterianas observadas en microscopio óptico (100X) 38

Figura 11. Crecimiento de bacterias fijadoras de Nitrógeno en medio específico ASBHY 38

Figura 12. Crecimiento de bacterias solubilizadoras de fosfato en medio específico NBRIP 40
Figura 13. Área del halo de solubilización de fosfato (mm2) de las bacterias aisladas de la rizósfera del algarrobo, incubadas a 26°C por 24 hora (círculo menor) y 48 horas (círculo mayor). 41
Figura 14. Ensayo de compatibilidad in vitro de 10 cepas bacterianas con mayor potencial de fijación de nitrógeno aisladas de la rizosfera de P. pallida. 42
Figura 15. Recolección de muestra de la Rizosfera de Prosopis pallida en el distrito San Juan de la Virgen 60
Figura 16. Aislamiento de Bacteriano 60
Figura 17. Aislamiento y siembra de bacterias 61
Figura 18. Bacterias purificadas. 61
Figura 19. Bacterias purificadas cultivadas en medio de cultivo Lb agar. 62
Figura 20. Prueba de tinción Gram 62
Figura 21. Extracción de ADN de la Cepas con Potencial Fijador de Nitrógeno, aisladas de la Rizosfera del Prosopis pallida. A) Reactivos utilizados para la extracción. B) Pellet resuspendido en agua ultrapura, para adicionar ARNasa. 63
Figura 22. Amplificación mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). A) Realizando el mix de reacción de PCR. B) Termociclador BLUE-RAY TurboCicler.. 63
Figura 23. Visualización de amplicone en un transiluminador (Vilber Lourmot TFX20M). 64

RESUMEN

El algarrobo (*Prosopis pallida*) es una de las especies forestales más representativa de la costa peruana por los diversos usos que brinda a la población. Esta investigación tuvo como objetivo, aislar e identificar bacterias con potencial en la fijación de nitrógeno a partir de la rizosfera del algarrobo, mediante secuencias parciales del gen 16S ARNr. Se obtuvieron 50 aislados bacterianos en medio de cultivo TSA, caracterizados morfológicamente, de los cuales se determinaron 41 bacterias fijadoras de nitrógeno cultivadas en medio específico ASHBY. Sin embargo, solo 10 cepas bacterianas con mayor potencial de fijación de nitrógeno fueron identificadas, pertenecientes a los géneros *Lysinibacillus, Olivibater, Bacillus, Pantoea* y *Erwinia,* 5 bacterias de estos 3 últimos géneros fueron también solubilizadoras de fosfato.

Palabras clave: Phylum, Rhizobacterias, PCR, Algarrobo, secuenciación.

ABSTRACT

The algarrobo tree (*Prosopis pallida*) is one of the most representative forest species of the Peruvian coast due to the various uses it offers to the population. The objective of this research was to isolate and identify bacteria with potential for nitrogen fixation from the rhizosphere of the algarrobo tree, through partial sequences of the 16S rRNA gene. 50 bacterial isolates were obtained in TSA culture medium, morphologically characterized, of which 41 nitrogen-fixing bacteria cultured in specific ASHBY medium were determined. However, only 10 bacterial strains with greater nitrogen fixation potential were identified, belonging to the *Lysinibacillus*, *Olivibater*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Erwinia* genera, 5 bacteria from these last 3 genera were also phosphate solubilizers.

Keywords: Phylum, Rhizobacterias, PCR, Algarrobo, sequencing.

I. INTRODUCCION

El Perú figura entre los seis países más ricos en biodiversidad del mundo, con alrededor de 84 de las 117 zonas de vida del planeta y 28 de los 32 climas del mundo, además de contar con unas 25 000 especies de flora, lo que representa el 10 por ciento de la diversidad existente en el mundo (Muñoz, 2013). El 30% de estas especies son endémicas; además el Perú es el primero en número de especies de plantas utilizadas por la población (4 400 especies) y primero en especies domesticadas nativas (128), plantas comestibles y sus parientes silvestres (787 especies) (MINAGRI, 2015).

El bosque seco del norte contiene una superficie de 3 402 212 hectáreas, siendo el algarrobo el árbol representativo del lugar (Kometter, 2020). El algarrobo (*Prosopis pallida*) es un árbol de tronco grueso, que crece de manera silvestre hasta los 1 500 m s.n.m, proporciona múltiples beneficios como alimento, forraje, abono, madera, medicina y materia prima para el desarrollo de diversas actividades económico-productivas. Además, es importante en el control de las dunas, captación de nitrógeno y su fijación en el suelo, incorporación de materia orgánica a partir de la descomposición (hojas y ramas), producción de oxígeno y estabilidad del clima (SERNANP, 2019). Sin embargo, en los últimos años, el algarrobo ha sufrido una reducción drástica, debido a diversos factores, como, el cambio en su fenología, perdida de la biodiversidad de esta especie, deficientes programas de conservación, aumento de especies invasoras (GIZ, 2020) y presencia de microorganismos patógenos que causan mortandad, disminuyendo la tasa de población (Nasto, 2014). Por ello, es necesario la implementación de estrategias que conduzcan a una repoblación y preservación de esta especie forestal que está catalogada como vulnerable.

Numerosos microorganismos han sido descritos como promotores del crecimiento vegetal, asociados con especies importantes para la agricultura, en particular aquellos que proveen de nutrientes (fijadores de nitrógeno atmosférico, solubilizadores de fosfatos y de potasio), resistencia a patógenos y factores abióticos y producción de sideróforos (Nasto *et al*., 2014).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) son organismos procarióticos de vida libre o asociados simbióticamente que capturan el nitrógeno de la atmósfera (N_2) y lo convierten en amonio (NH4) incorporándolo a la biosfera. Esta fijación biológica es importante, porque es una fuente de nitrógeno que se incorpora al suelo y está disponible para la planta (Silva *et al*., 2017). Además, se ha descrito a estas bacterias como sintetizadoras de sustancias reguladoras del crecimiento de plantas (auxinas, citocininas, ácido abscísico, giberelinas, etileno y ácido indolacético) (Armenta *et al*., 2010).

Se han identificado algunas BFN, a través de métodos tradicionales de microbiología (aislamiento en medios selectivos, entre las cuales encontramos: *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Enterobacter*, *Serratia, Erwinia, Azospirillum, Pseudomas, Rhizobium, Flavobacterium, Klebsiella, Olivacter* (Tan *et al*., 2015, Hirsch y Kaplan, 2019, Navarro *et al*., 2013, García *et al*., 2011). La literatura no reporta estudios realizados con estos microorganismos en plantas de algarrobo (*Prosopis pallida*) a nivel molecular; por lo que esta investigación tuvo como objetivo, identificar bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a la rizósfera del algarrobo, mediante el uso del gen universal 16S del ARN ribosomal.

II. Estado del Arte

2.1. Origen del algarrobo (*Prosopis pallida*)

Cairati (2013), señala que desde tiempos prehistóricos el *P. pallida* ha estado presente en la expansión del Bosque Seco del Perú (Costa Norte), refiriéndose a las evidencias halladas en el Santuario Histórico Bosque de Pómac. Hallazgo que demuestra, huellas talladas de deidades pre incas en la madera de *P. pallida*. El *P. pallida* a nivel simbólico era venerado y respetado por las culturas pre hispánicas; hallazgo que hizo el investigador Antonio Raimondi (Perú-Ecológico, 2009).

P. pallida es originaria de Perú, Colombia y Ecuador, se desarrolla desde el nivel del mar hasta los 1500 metros; con precipitación de 150 a 1600 mm. Es la especie dominante de la costa peruana fue documentada en 13 departamentos, principalmente en las zonas costeras (0 – 1500 m s.n.m.) (Dostert *et al*., 2012).

2.2. Clasificación Taxonómica

Cárdenas (2017), establece las siguientes categorías taxonómicas para el *P.pallida*:

Reino	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Fabales
Familia:	Mimosaceae
Género:	Prosopis
Especie:	*Prosopis pallida*

Autor epíteto especifico	(Humboldt & Bompland ex Willadenow) H.B. K

2.3. Descripción botánica

FAO (2014), estipula las siguientes características morfológicas para el *P. pallida*:

Tallo: *Prosopis pallida*, puede medir hasta 20 m de altura, contiene un tronco torcido de 40 a 150 cm de diámetro, que a edad avanzada puede tener arbustos de 2 a 5 m. Su corteza es marrón oscuro rugosa.

Ramas: ramas más gruesas se bifurcan desde los 15 cm sobre el suelo hasta 150 cm, algunas de estas contienen ramas con espinas, mientras que las ramas terminales tienen forma de zigzag.

Hojas: alternas y bipinnadas cuando son jóvenes. Presenta espinas divaricadas, una sola en cada nudo de 1 a 4 cm de longitud. Es común ver en los nudos de plantas adultas 2 a 10 hojas que nacen en ramitas juntas y muy cortas (semejantes a braquiblastos) de 2 a 8 cm de longitud, falcadas dorsalmente. Lo más frecuente es encontrar con 2 a 3 pares de pinnas, los folíolos opuestos a lo largo de un raquis (en número de 11 a 14 pares, distanciados 2 a 3 mm, entre cada par) y un número de foliolos de 15 en el cuarto estadío (Fig. 1).

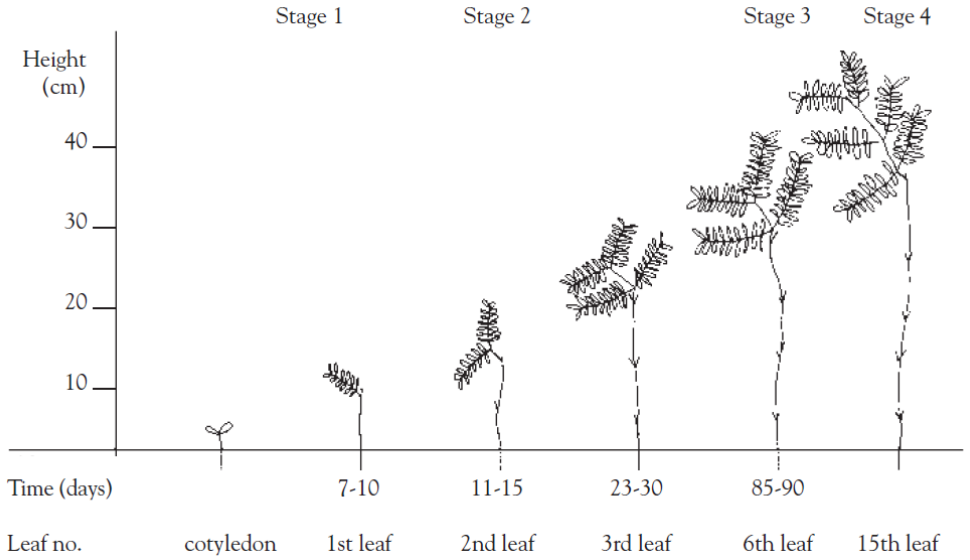

Figura 1. Etapas de desarrollo de la hoja de *P. pallida*

Fuente: Pasiecznik et al. (2001)

Folíolos: obtusos, lineales, mucronados, regularmente pubescentes, de 1 a 3 mm de ancho por 8 mm de longitud, con presencia de glándulas cupuliformes, en la unión de cada par de pinnas.

Inflorescencia: tipo racimosa de 23 mm de ancho, 8–15 cm de largo y un espesor de 10–13 mm, de cáliz sublobado, agudo, con flores subsésiles amarillo-verdosas; y con pétalos libres lineales lanceolados, de 2 a 3 cm de largo. Contiene 10 estambres libres, fuera de la corola, el polen es tricolporado (Fig. 2).

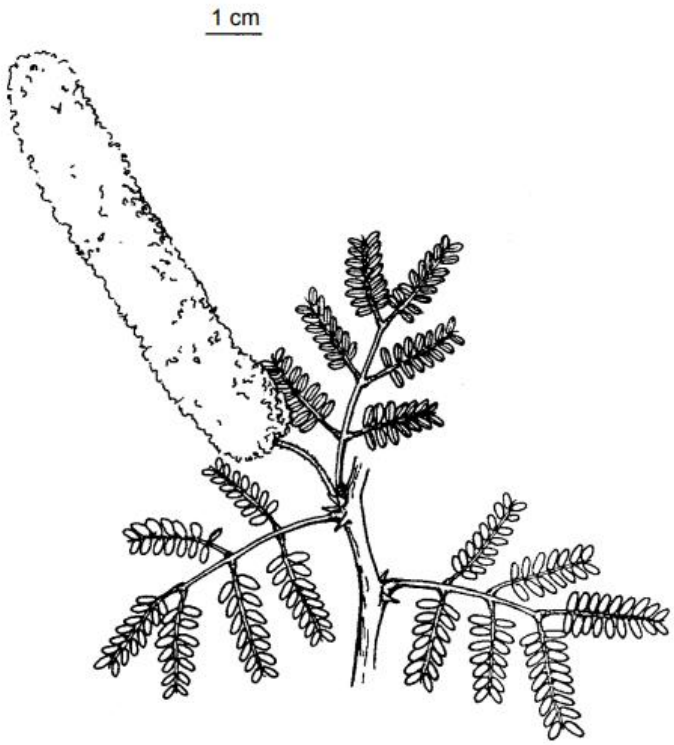

Figura 2. Rama con inflorescencia de *Prosopis pallida*

Fuente: Van y Campbell (2001)

Ovario: estipitado, con estigma pequeño y estilo filiforme. Un mínimo de 238 flores y como máximo de 366 flores en cada inflorescencia.

Fruto: carnoso dulce, comprimido, curvado y apiculado, con márgenes paralelos en sus bordes, de 10 a 30 cm de longitud; con 11 a 13 mm de ancho y 5 a 8 mm de espesor. La vaina es de color amarillo brilloso; las semillas están cubiertas por el endocarpo duro y sub-alado, su color es pardo, forma ovoide con un tamaño de 6 a 7 mm longitud, 3 a 4 mm de ancho (Fig 3).

Figura 3. Vaina madura de *Prosopis pallida*

Fuente: Van y Campbell 2001

Raíz: sistema radicular característico, con una raíz pivotante, llegando a medir hasta 50 m, lo que les permite absorber agua de diferentes profundidades; y las raíces laterales crecen paralelas al mismo, a una profundidad que oscila entre 15 y 25 cm, les sirven para fijarse en la parte superior del suelo y absorber agua de lluvia rápidamente. Éstas son las encargadas de nutrir al árbol, ya que poseen los pelos absorbentes (Fig 4).

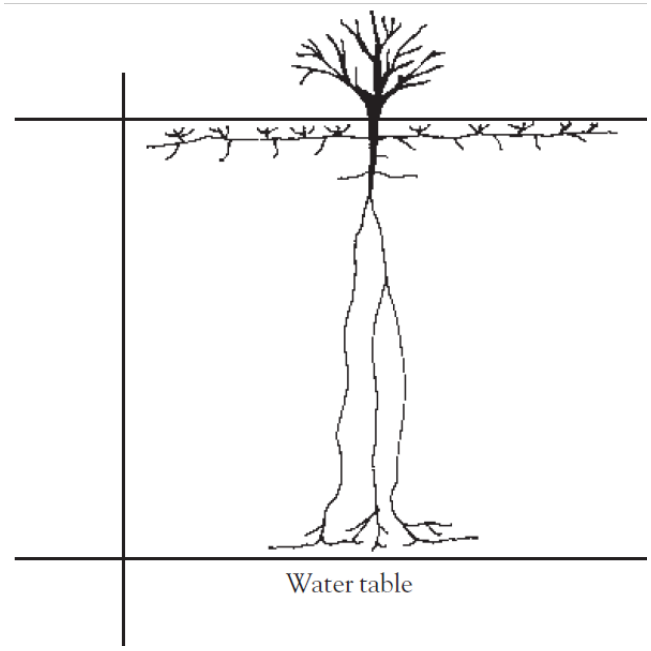

Figura 4. Sistemas de raíces del *P. pallida*

Fuente: Pasiecznik (2001)

2.4. Distribución Ecológica

Geográficamente esta especie es originaria de la zona árida costera, de los países Colombia, Ecuador y Perú. En este último país, alberga la mayor diversidad de *P.pallida*, distribuyéndose en las regiones de Tumbes, Piura y Chiclayo (Calle y Palacios, 2018).

2.5. **Requisitos medioambientales** (Pasiecznik et al., 2001)

2.5.1. Suelo

Tiene una adaptación muy amplia, encontrándose en distintos tipos de suelo, desde dunas de arena hasta arcillas agrietadas. En el Perú, según Minagri 2015, se localiza en la zona costera, su suelo llano contiene una textura Alcalino – arcilloso (vertisoles). Puede prosperar en terrenos pobres, no aptos para ninguna otra especie arbórea.

2.5.2. Requerimiento de agua

Esta especie pueden soportar precipitaciones desde 50 mm a 350 mm de agua al año. Su capacidad para tolerar lluvias anuales muy bajas es bien conocida.

2.5.3. Temperatura

Esta especie tolera temperaturas mayores de 45°C, requiriendo un clima templado con preferencia a cálido. Las heladas ligeras causan la muerte regresiva de las ramas (menores a 10 °C), con una mortalidad completa del tallo con heladas más duras (menores a 5°C).

2.6. **Técnicas de Identificación Molecular** (Rodicio y Mendoza, 2004; Argudo et al., 2020)

La identificación de microorganismos se ha venido desarrollando mediante técnicas microbiológicas tradicionales; sin embargo, en la actualidad, existen diferentes tecnologías que permiten una caracterización mucho más precisa,

rápida y a menor costo. La Biología molecular proporciona herramientas importantes utilizando secuencias parciales de fragmentos del gen 16 S ADN o ARN, su amplificación por PCR, secuenciación de nucleótidos del amplicón, análisis de la secuencia (Programa BLAST) y el uso de base de datos para identificar organismos.

Amplificación: Consiste en amplificar el fragmento del gen ADN 16S mediante la PCR, se realiza en un termociclador, gracias a la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y consta de tres etapas: La primera desnaturalización, es la separación de las dos cadenas complementarias de ADN, se realiza a una temperatura de 92 – 98 °C en un tiempo prolongado de 30 a 90 segundos. La segunda etapa es alineación o emparejamiento, consiste en el apareamiento entre los oligonucleótidos y la cadena del ADN desnaturalizado, se desarrolla en un tiempo de 30 ó 60 segundos a una temperatura de 50 ó 60 °C. Y por último la etapa de extensión, donde el ADN polimerasa sintetiza la nueva cadena de ADN (A partir del extremo 3´). Esta etapa reacciona a una temperatura de 70 o 74 °C con un tiempo de 30 a 90 segundos. Las tres etapas se visualizan en la figura 5.

Secuenciación de Nucleótido: Son llevados a cabo por la electroforesis, estos se visualizan en geles de agarosa, la cual están representados por bandas de un tamaño especifico y es comparado con un marcador de peso molecular conocido para determinar la especificidad de la reacción.

Análisis de la Secuencia: Es la comparación de la secuencia del ARNr 16S; analizando en las bases de datos, que estas encuentran regiones de similitud entre secuencias biológicas (Los programas sólo comparan secuencias de proteínas o nucleótidos con base de datos ya reportadas y calculando la significancia estadística). Existen diversas bases de datos, algunas privadas, como SmartGene IDNS (Integrated Database Network System) y MicroSeq (Applied Biosystems), y otras públicas, pudiendo acceder a través de internet,

como: GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms) y RDP (Ribosomal Database Project). (Tamay de Dios; *et al* 2013).

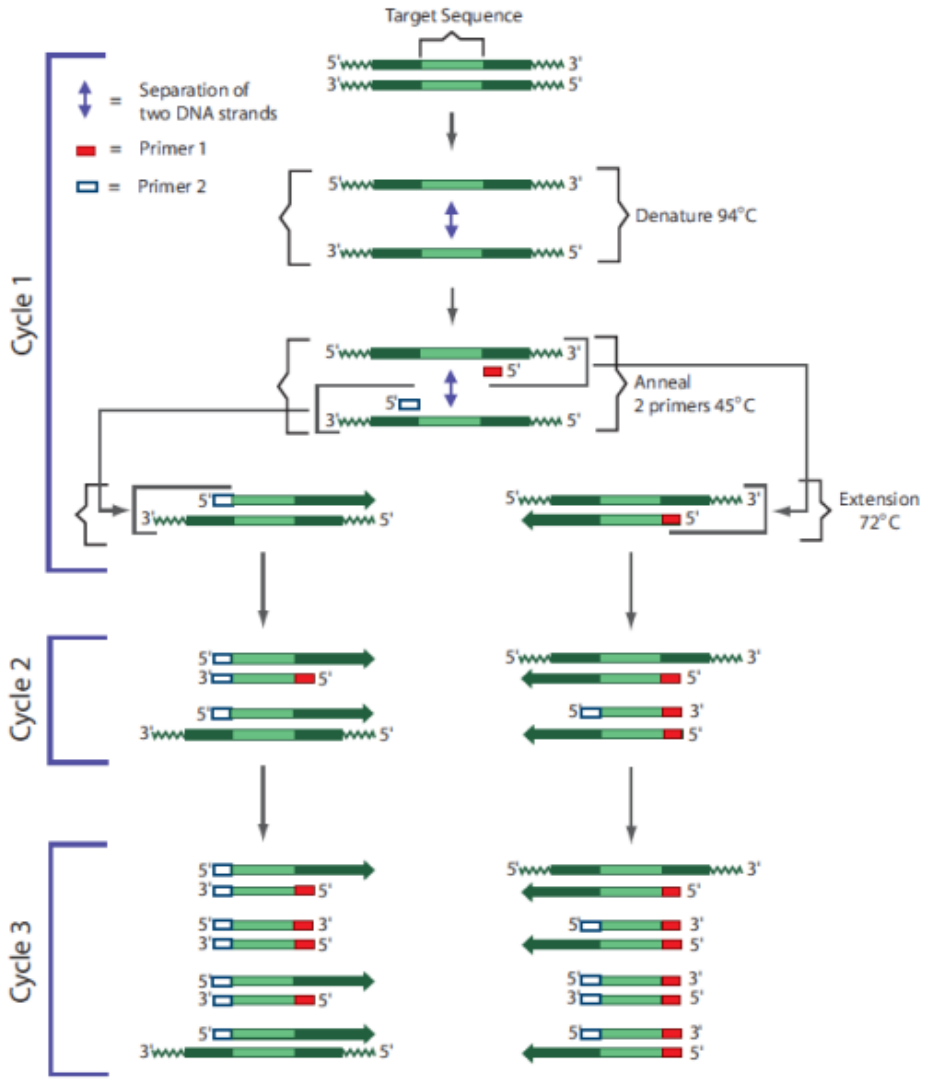

Figura 5. Desnaturalización - Emparejamiento o Alineamiento – Extensión (Ciclo de PCR)

Fuente: BIOTEC, 2015

2.7. Antecedentes

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) se observan en la rizosfera, que tienen la capacidad de llevar a cabo la fijación de nitrógeno y la producción de hormonas reguladoras del crecimiento. Estas bacterias endófitas mejoran el desarrollo, también pueden aumentar el suministro de nutrientes, lo que a su vez ayuda a construir el mecanismo de defensa de la planta (Perez, 2017).

Las plantas liberan carbohidratos, vitaminas, lípidos y aminoácido, entre otros, a través de sus raíces, estimulando la actividad y el número de microorganismos alrededor del suelo. El volumen aproximado de los exudados, que se encuentran de la superficie de la raíz con el suelo es de 2 mm (rizosfera) (Osorio, 2007).

Las PGPB participan en el ciclo biogeoquímico de nutrientes, determinando su disponibilidad para la planta e interactuando con la comunidad microbial del suelo; tienen la capacidad de colonizar el entorno del sistema radicular; distribuyéndose en tres grupos, la que se encuentra en el sistema radicular, la que forma nódulos y la que está internamente en la planta (Criollo et al., 2012).

Estudios múltiples revelan los diferentes tipos de especies bacterianas que promueven el crecimiento vegetal, dentro de las principales tenemos: *Rhizobium sp., Azospirillum sp., Bacillus sp., Olibacter sp., Lysinibacillus sp., Burkholderia sp., Enterobacter sp., Azotobacter sp., Erwinia sp., Herbaspirillum sp., Klebsiella sp., Pseudomonas sp. y Xanthomonas sp.* (Navarro *et al*., 2013).

Estas bacterias mencionadas son atraídas por diferentes tipos de sustancias, como los carbohidratos (azúcares y oligosacáridos), ácidos orgánicos,

vitaminas, nucleótidos, flavonoides, enzimas, hormonas. y compuestos volátiles; que, desde las raíces, son estimulados la actividad microbiana (Osorio, 2009).

Estudio realizado en la especie *Prosopis cineria* en Pune, India (Gupta *et al.,* 2015), se aisló e identifico bacterias endófitas de la raíz, se identificaron dos bacterias (*Bacillus Suptilis* y *Stenotrophomonas maltophilia*), estos microorganismos endófitos no mostraron ser fijadoras de nitrógeno al realizarse la prueba en medio Asbhy, mientras que en el agar Pikovskayas se detectó estos microorganismos como solubilizadores de fosfato.

Así mismo, Villegas *et al*. (2014); evaluó la especie *Prosopis grandulosa*, en la reserva de la biosfera El Pinacate (México), mostrando que la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* era la única que fijaba nitrógeno de las 19 cepas aisladas. También en los suelos áridos en Túnez se aislaron 50 bacterias endófitas de la raíz del *Prosopis farcta*, evaluando 8 cepas que pertenecían al género *Bacillus, Paenibacillus y Acinetobacter*; mostrando propiedades simbióticas y una capacidad positiva en fijar nitrógeno atmosférico (Fterich *et al.,* 2011).

Investigaciones recientes en biotecnología Forestal (*Tabebuia chryanta* y *billbergii*), enfoca la identificación microbiana de la rizosfera, con la técnica de amplificación molecular del gen 16S ARN. Identificando 41 organismos, de 8 géneros diferentes (*Bacillus, Pseudomonas, Klebsiella, Azotobacter, Pantoea, Paenibacillus, Enterobacter, Serratia, Acinetobacter, Exiguobacterium y Lysinibacillus*). Las bacterias mostraron diversas interacciones raíz – microorganismos, en el desarrollo y salud de las plantas; también se obtuvo a las cepas *Lysinibacillus fusiformis* y *Enterobacter cloacae* como fijadoras de nitrogeno (Llacsa, 2016).

Cunningham y Leber (2018) determinaron que el género bacteriano *Pantoea sp*. se encuentra en frutos, semillas, suelos, aguas, heces de animales o humanos; describiendo a estos microorganismos como patógenos que atacan a humanos y plantas. En otro estudio realizado en Cuba, Torriente (2010), menciona a *Pantoea sp* como agente de control biológico, capaz de estimular el crecimiento de la planta con un alto grado de fijación de nitrógeno.

Xiong (2020), concluyó que *Bacillus flexus* como promotor de crecimiento vegetal, es capaz de proporcionar nutrientes para la planta *Limonium sinense*, a través de la fijación de nitrógeno; además, menciona que esta bacteria es resistente a condiciones climáticas adversas, agentes oxidantes, radiación UV, sequias y fuertes lluvias. Destaca, su actividad antagonista contra un gran rango de fitopatógenos bacterianos y fúngicos; gracias a la formación de esporas.

III. Materiales y Métodos

3.1. Ubicación del Área de estudio

El área de estudio para la obtención de muestras corresponde al campo experimental de la escuela de Ingeniería Forestal y Medio Ambiente de la Universidad Nacional de Tumbes, ubicada en el centro poblado Garbanzal, distrito San Juan de la Virgen (563036.96 N y 9601681.2 S), situado a 4 km de la ciudad de Tumbes. Se caracteriza por poseer un clima cálido y árido con una temperatura máxima de 31.2 °C y mínima de 22.8 °C; una humedad relativa promedio de 79% durante todo el año y una precipitación anual de 464.1 mm con lluvias que ocurren durante los meses de diciembre a abril (SENAMHI, 2018).

3.2. Fase de campo

Se realizó una prospección para reconocer y seleccionar plantas jóvenes de *Prosopis pallida* (Humb & Bonpl ex Willd.) Kunth “algarrobo”, con una expresión fenotípica adecuada; es decir, buena vigorosidad, libre de plagas y enfermedades y sin daños mecánicos. En condiciones asépticas, se tomaron tres submuestras de suelo rizosférico a una profundidad de 30 cm alrededor de una planta de *P. pallida*, homogenizándose en aproximadamente 1 kg (Fig. 6), el cual fue depositado en una bolsa ziploc y colocado en un cooler con Gelpack. El material se trasladó al laboratorio de microbiología de la empresa Inca Biotec SAC para su procesamiento.

Figura 6. Recolección de suelo rizosférico en planta de *P. pallida*

3.2. Fase de laboratorio

3.2.1. **Aislamiento y purificación de cultivos bacterianos** (Tortora *et al*., 2007)

9 g de suelo rizosférico se depositó en un tubo falcón de 50 ml que contenía 40 ml de agua destilada estéril y se homogenizó en un agitador Shaker (Biobase) a 200 rpm por 30 minutos. A partir de esta muestra se tomaron 100 µl para cada dilución microbianas seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) depositándose en tubos eppendorf de 1.5 ml (conteniendo 900 µl de agua destilada). Posteriormente, se inoculó 100 µl de las diluciones 10^{-3}, 10^{-5} y 10^{-6} en placas Petri conteniendo medio TSA (Trypticase Soy Agar), por triplicado e incubándolas por 24 horas para obtener las colonias bacterianas. Después, se realizó una purificación de estas bacterias en el mismo medio por el método de agotamiento e incubándolas por 48 horas a 28°C (Fig. 7).

El aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, se realizó en medio de cultivo específico libre de nitrógeno Asbhy, siguiendo el procedimiento de Jiménez (2011) y Ariza *et al*. (2020). Dos baterías de estas cepas que crecieron en el medio fueron sembradas en tubos de 1.5 ml conteniendo caldo Luria Bertani (LB) más glicerol para su conservación.

Figura 7. Aislamiento de colonias bacterianas a partir de suelo Rizosférico de una planta de *P. pallida*.

3.2.2. **Caracterización Morfológica** (Reza *et al*., 2019)

Se utilizó las cepas bacterianas purificadas en medio sólido TSA e incubadas a 28 ºC por 48 horas, momento en que se evaluó las características morfológicas de las colonias y también se realizaron tinciones de Gram para el estudio de la morfología celular.

La morfología se evaluó directamente a través de visualizaciones de las colonias bacterianas, registrándose la forma, margen, elevación, textura, tamaño, apariencia y pigmentación. La morfología celular se observó en el microscopio óptico Nikon Eclipse E100, utilizando la tinción de Gram (en la cual se utiliza el cristal violeta de Hucker, una solución de Lugol como mordiente, alcohol acetona como

descolorante y solución de safranina como colorante de contraste) que permite distinguir dos tipos de estructura de pared celular (Tabla 1).

Tabla 1

Parámetros evaluados en la caracterización morfológica de las bacterias aisladas de suelo rizosférico en plantas de *P. pallida*

Morfología	Parámetro	Descripción
Morfología de la colonia	Forma	Irregular, circular.
	Borde	Ondulado, entero, encrespado, Rizado.
	Elevación	Plana, elevada, convexo, umbonato.
	Tamaño	Mediana, puntiforme, grande, pequeño.
	Textura	Lisa, rugosa.
	Color	Crema Translucido Crema no Translucido, Blanca Translucida, Blanca no translucida, Amarilla Translucida, Amarilla no Translucida, Rojiza no translucida.
	Crecimiento	Moderado, Abundante.
Morfología celular	Tinción de Gram	Positivo, negativo.
	Forma	Bacilos, cocos, cocobacilos, diplococos.

3.2.3. Pruebas Bioquímicas de los aislados bacterianos:

a) Determinación de la Fijación de Nitrógeno

La determinación cualitativa para bacterias fijadores de Nitrógenos, se determinó según la metodología descrita por Jiménez *et al.* (2011) y Ariza *et al.* (2020), que se describe a continuación: se vertió el medio de cultivo Ashby (Anexo 1.3.) en placas Petri estériles, después de 10

minutos de haberse solidificado se depositaron discos de papel filtro de 5 mm de diámetro (Whatman: grado 44) y se incubaron por 24 horas a 28 °C para verificar alguna contaminación. Posteriormente, en los discos de papel, se inoculó 5 μl de cada suspensión bacteriana (1 * 10^8 UFC/ml de 48 horas de incubadas) en tres repeticiones. A las 24 y 48 horas de su incubación se realizaron mediciones del radio de las colonias con un pie de Rey digital, modelo Uyustools profesional para determinar el área de la corona circular, aplicando la fórmula matemática utilizada por Palmer y Fletcher (2003): $A= \pi.r^2$.

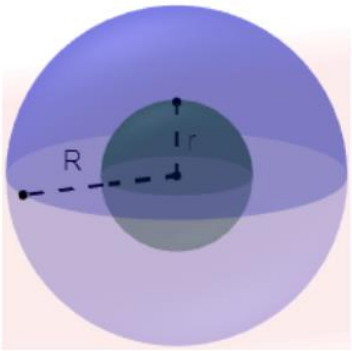

Figura 8. Representación de las circunferencias del radio exterior e interior

La corona circular, se determina encontrando la diferencia entre las áreas de los dos círculos concéntricos (el mayor con radio R y el menor con radio r).

$Ac – ac = \pi (R^2 - r^2)$

Ac: Área del circulo mayor

ac: Área del circulo menor (disco de papel)

R : Radio Mayor

r : Radio menor (la mitad del disco de papel = 2.5 mm)

π : valor constante (3,1416)

b) Determinación de la solubilización de fosfato

Se realizó una evaluación cualitativa, a través de la producción de ácido, indicado como un viraje del color azul a amarillo. Se siguió la metodología propuesta por Tejera *et al.* (2013): A placas Petri conteniendo medio de cultivo sólido NBRIP (Anexo 1.4), se le agregó azul de bromofenol (25 ppm) y posteriormente, una suspensión de 1 * 10^8 UFC/ml de las diferentes cepas bacterianas, las placa fueron encubadas a Temperatura de 26ºC por 24 y 48 horas, momentos en que se realizaron las mediciones del radio de las colonias con el pie de Rey digital para determinar el área del halo (solubilización del fosfato), utilizando la fórmula de la corona circular. Esta prueba se realizó en las 10 bacterias que mostraron un mayor potencial en la fijación de nitrógeno.

3.2.4. Ensayos de compatibilidad bacteriana in vitro

Se realizaron pruebas de compatibilidad de las 10 cepas bacterianas con mayor potencial en la fijación de nitrógeno utilizadas en el ítem anterior (1 * 10^8 UFC/ml de 48 horas de incubadas). Para ello, se utilizó el método de difusión en placas (Kumar et al., 2016), que consistió en dispersar 100 μl de una cepa bacteria en medio TSA, sobre el cual se colocó 9 discos de papel filtro estéril conteniendo 10 μl de los otros cultivos bacterianos. Las muestras fueron incubadas a 28°C por 48 horas. La evaluación se realizó, observando el halo de inhibición de las distintas bacterias ensayadas.

3.2.5. Caracterización molecular de las bacterias aisladas

Se realizó, de acuerdo a la metodología utilizada por Bernabé (2016):

Extracción de ADN

La extracción de ADN se extrajo por ebullición en Buffer Fosfato Alcalino (PBS). Este procedimiento se inicia con las unidades formadoras de colonia (UFC) puras se colocaron en microtubos eppendorf con medio LB y fueron microcentrifugadas a 10 000 rpm por 2 minutos, eliminándose el sobrenadante y conservando solo el pellet. La ruptura de las paredes celulares de las cepas bacterianas se hicieron con Tris HCl (ácido clorhídrico) - Edta (1x) y se microcentrifuga nuevamente a 10 000 rpm por 2 minutos, eliminándose el sobrenadante y luego resuspendiendo el sedimento en 200 µl de TE 1X (137 mM de Cloruro de Sodio ($NaCl_2$), 2.7 mM de Cloruro de Potasio (KCl), 10 mM de Fosfato de Sodio Di básico (Na_2HPO_4), 8 mM de Fosfato de Potasio Di hidrogenado (KH_2PO_4), los tubos se sometieron a un shock térmico con ebullición por 10 minutos, seguido por un enfriamiento en hielo por 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm por 2 minutos y se retiró el sobrenadante sin tocar el pellet; este fue resuspendido en agua ultra pura, se adicionó ARNasa (0.1 mg/ml) y se incubó a 37°C por 1 hora.

a) Amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica se utiliza para sintetizar un fragmento de ADN utilizando una polimerasa que trabaja a temperaturas elevadas (bacteria Thermus aquaticus vive a temperaturas de 79°C a 85°C). Al realizar una reacción de PCR simulamos en la célula una sintetización del ADN y en el respectivo tubo son mezclados los ingredientes necesarios para hacerlo.

Se realizó la PCR utilizando los primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTG GCTC-3') y 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). El mix de reacción de la PCR incluyó concentraciones finales de: Buffer Taq 1X (Thermo Scientific); Taq DNA polymerase recombinant 0.04U/µl (Thermo Scientific); 2.5 mM $MgCl_2$ (Thermo Scientific); 0.2 mM dNTP's; 0.36 pmol de cada primers; 2 µl de ADN y llevados hasta un volumen final de 25 µl con agua ultra pura.

Los ciclos de amplificación fueron realizados en un termociclador (BLUE-RAY turbocicler) con un programa establecido para fragmentos del gen 16S: un paso inicial de pre-desnaturalización a 94° C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94° C por 30 s, 58° C por 45 s, 72° C por 90 s y un paso de elongación final de 72° C por 6 min.

b) Electroforesis

Los productos de PCR fueron migrados en gel de agarosa al 1.5% (Cleaver Scientific Ltd. AG500) a 90 Voltios por 30 minutos en 60 ml de buffer TAE 1X (40 mM Tris-Acetato; 1 mM EDTA). El gel se tiñó con 3 µl bromuro de etidio (10 mg/ml) y finalmente los amplicones se visualizaron en un transiluminador (Vilber Lourmot TFX20M) bajo luz ultravioleta (UV).

c) Secuenciación y análisis informático

Las amplicones fueron enviados al laboratorio de la empresa MACROGEN (USA) para su secuenciación. El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se realizó con la herramienta ClustalW incluida en el software bioinformático MEGA 6.0 (http://www.megasoftware.net/) y posteriormente analizadas en el programa online BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI

(National Center for Biotechnology,Information) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento y caracterización morfológica de bacterias rizosféricas

En medio TSA se encontraron un total de 50 aislados en suelo rizosférico, del *P. pallida* (Fig. 9). Estas bacterias fueron purificadas en el mismo medio, donde se procedió a la diferenciación de los mismos, mediante el análisis de las características morfológicas de las colonias y a nivel celular (Tabla 4). Se puede apreciar que todos los aislados tuvieron un crecimiento desde moderado (26 %) a abundante (74%), resultado similar a lo reportado por Pérez *et al* (2010) y Raymundo *et al* (2010), atribuido a la riqueza nutritiva de este medio de cultivo (Trypticase Soy Agar). Es interesante destacar los factores ambientales en que crece esta especie de *P.pallida*, como son el pH del suelo (6.8 a 8.0) (Dostert, 2012) y la temperatura (20 a 40°C) (Pasiecznik et al., 2001), que jugarían un rol importante en el desarrollo de grandes poblaciones microbianas.

La variabilidad de las poblaciones microbianas y su distribución geográfica en los bosques es clave en el equilibrio de los ecosistemas forestales. Ellos desempeñan un rol importante como descomponedores, simbiontes o patógenos, que influyen en la renovación de C y retención y disponibilidad de otros nutrientes (Trivedi *et al.*, 2012; Baldrian, 2017).

El 32% de las colonias bacterianas presentaron forma irregular y el 68 % circulares, mientras que, su borde varió en 80% entero, 12% ondulado, 4% encrespado y 4% rizado. En cuanto a la textura fue de un 82% lisa y 18% rugosa. El tamaño osciló desde un 36% para pequeño, 36% puntiforme, 26% moderado y 2% para grande. Las coloraciones fueron de 24% cremas translúcidas, 24% blancas no translúcidas, 12% blancas translúcidas, 14% amarillas translúcidas, 18% amarillas no translúcidas, 6% cremas no translúcidas y 2% rojas no translúcidas; en tanto que, la

elevación varió de 68% para planas, 10% elevadas, 8% convexas y 14% umbonadas.

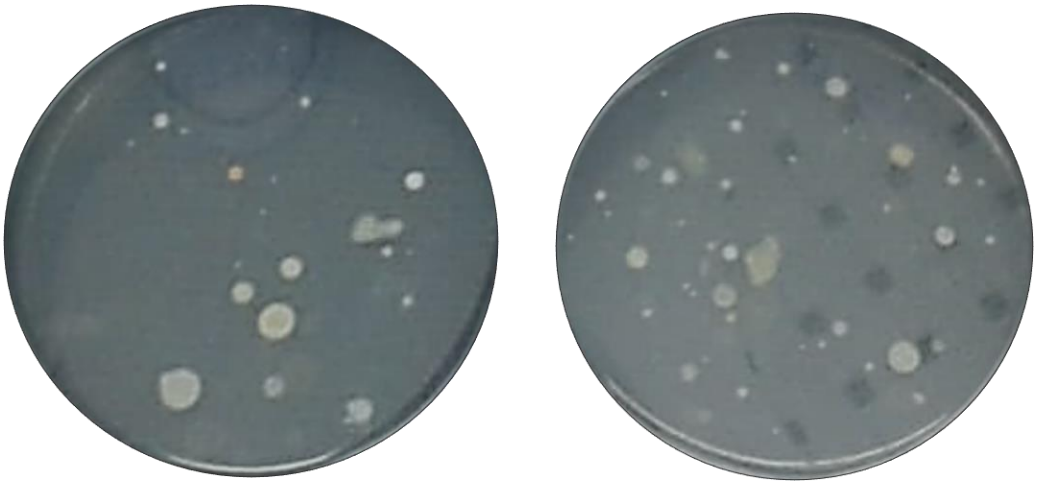

Figura 9. Crecimiento de los aislados bacterianos en medio general TSA

Por otro lado, la morfología celular de las cepas bacterianas observadas al microscopio óptico mostró que el 48% fueron bacilos, 24% cocos, 20% cocobacilos, 6% diplococos y 2% streptococos. La respuesta a la tinción Gram fue de 22% positivos y 78% Gram negativos. En la figura 10, se observan los aislados bacterianos Gram negativos (MK-9 y MK-14) y Gram positivo (MK-2).

Tabla 2. Descripción de la morfología colonial y celular de los aislados bacterianos sembrados en medio de cultivo TSA.

N.º	Código	Morfología celular		Morfología de la Colonia						
		Forma	Gram	Forma	Borde	Elevación	Tamaño	Textura	Color	Crecimiento
1	MK-3	B	+	IR	ON	PL	ME	LI	CN	+
2	MK-9	CB	-	CI	EN	PL	PU	LI	BN	++
3	MK-10	DC	-	CI	EC	PL	GR	LI	AT	++
4	MK-12	B	-	IR	EN	PL	PU	LI	AT	++
5	MK-14	B	-	IR	EN	PL	PU	LI	BT	++
6	MK-16	B	+	IR	EN	EL	PE	RU	BN	++
7	MK-40	B	-	IR	EN	CO	PE	LI	BN	++
8	MK-43	B	+	IR	EN	PL	PE	LI	BT	++
9	MK-44	B	+	IR	EN	PL	PU	RU	AN	++
10	MK-45	C	-	IR	EN	PL	PE	LI	AN	++
11	MK-2	C	-	CI	EN	PL	PU	LI	CT	++
12	MK-4	C	+	IR	ON	UM	ME	RU	CN	+
13	MK-5	CB	+	CI	EN	UM	ME	RU	BN	+
14	MK-6	CB	+	CI	EN	CO	PU	LI	BN	++
15	MK-21	C	-	IR	EC	UM	ME	LI	AT	+
16	MK-7	CB	-	CI	EN	PL	PU	LI	BT	++
17	MK-8	B	-	CI	EN	UM	ME	RU	RN	+
18	MK-11	B	-	CI	EN	CO	PE	LI	BN	++
19	MK-13	B	-	CI	EN	PL	ME	LI	CN	+
20	MK-15	B	-	CI	EN	EL	PE	LI	CT	++
21	MK-17	CB	-	CI	EN	PL	PE	LI	AT	++
22	MK-18	B	-	CI	EN	CO	PE	LI	BN	++
23	MK-20	C	+	CI	EN	EL	PE	LI	AN	++
24	MK-22	CB	+	IR	ON	PL	PE	LI	BT	++
25	MK-19	C	+	CI	EN	PL	PE	LI	AN	++
26	MK-25	CB	-	CI	EN	PL	PU	LI	CT	++
27	MK-26	B	-	CI	EN	PL	PU	LI	CT	++
28	MK-34	DC	-	CI	EN	PL	PE	LI	BN	+
29	MK-27	B	+	IR	RI	UM	ME	LI	BT	+
30	MK-28	CB	-	CI	EN	PL	PU	LI	AN	++
31	MK-29	CB	-	CI	EN	UM	PE	LI	CT	++
32	MK-30	CB	-	CI	EN	PL	PU	LI	AN	++
33	MK-31	C	-	CI	EN	PL	PU	LI	AN	++
34	MK-32	C	-	CI	EN	PL	PE	LI	BN	++
35	MK-33	DC	-	CI	EN	PL	PU	LI	AN	++
36	MK-35	B	-	CI	EN	PL	PU	LI	BT	++

37	MK-36	SC	-	CI	EN	PL	PE	RU	BN	++
38	MK-37	C	-	CI	EN	PL	PU	LI	CT	++
39	MK-38	B	-	CI	EN	PL	ME	RU	BN	+
40	MK-39	B	-	CI	EN	UM	PE	LI	AT	++
41	MK-41	B	-	CI	EN	EL	ME	LI	BN	+
42	MK-42	C	-	IR	ON	PL	ME	LI	CT	+
43	MK-46	B	-	IR	RI	EL	ME	LI	AT	+
44	MK-1	B	-	CI	EN	PL	PU	LI	CT	++
45	MK-48	B	-	CI	EN	PL	PU	LI	CT	++
46	MK-19	B	-	CI	EN	PL	PU	LI	AN	++
47	MK-21	C	-	CI	EN	PL	ME	RU	CT	+
48	MK-23	C	-	CI	EN	PL	ME	RU	AT	+
49	MK-24	B	-	IR	ON	PL	PE	LI	CT	++
50	MK-47	B	-	IR	ON	PL	PE	LI	CT	++

Parámetro	**Descripción**
Forma	(B) Bacilos (C) Cocos (CB) Cocobacilos (DC) Diplococos (SC) Estreptococos
Gram	(+) Positivo (-) Negativo
Forma	(IR) Irregular (CI) Circular
Borde	(ON) Ondulado (EN) Entero (EC) Encrespado (RI) Rizado
Elevación	(PL) Plana (EL) Elevada (CO) Convexa (UM) Umbonato
Tamaño	(ME) Mediano (PU) Puntiforme (GR) Grande (PE) Pequeño
Textura	(LI) Lisa (RU) Rugosa
Color	(CT) Crema Translucido (CN) Crema no Translucido (BT) Blanca Translucido (BN) Blanca no translucido (AT) Amarilla Translucido (AN) Amarilla no Translucido (RN) Rojiza no translucido
Crecimiento	(+) Moderado (++) Abundante

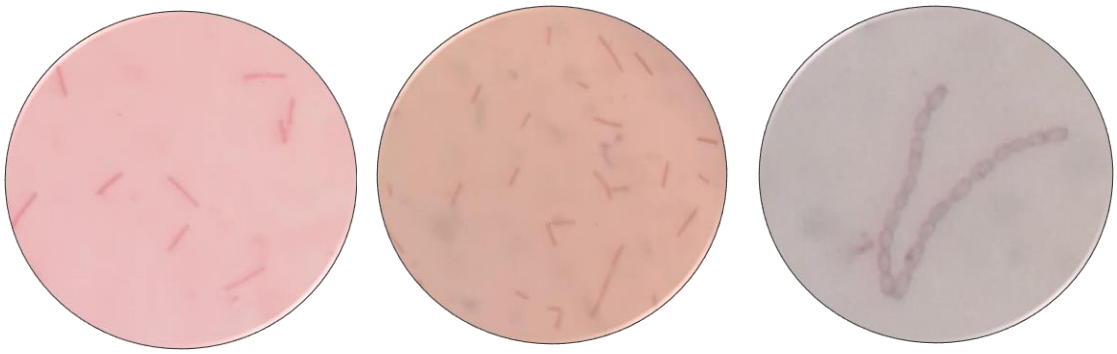

Figura 10. Tinción Gram en las cepas bacterianas observadas en microscopio óptico (100X)

4.2. Pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas

4.2.1. Fijación de Nitrógeno

Los aislados bacterianos crecidos en medio TSA aislados en suelo rizosférico, del *P. pallida* fueron transferidas al medio de cultivo libre de nitrógeno ASBHY, el cual es específico para bacterias fijadoras de nitrógeno (Fig. 11), donde crecieron 41 aislados, que representan el 82% del total de las bacterias encontradas, y cuyas características se detallan en la tabla 5. Se observa que las bacterias MK-3, MK-9, MK-10, MK-12, MK-14, MK-16, MK-40, MK-43, MK-44 y MK-45 tuvieron un crecimiento abundante a las 24 y 48 horas de incubación, determinado por la mayor área de la corona circular.

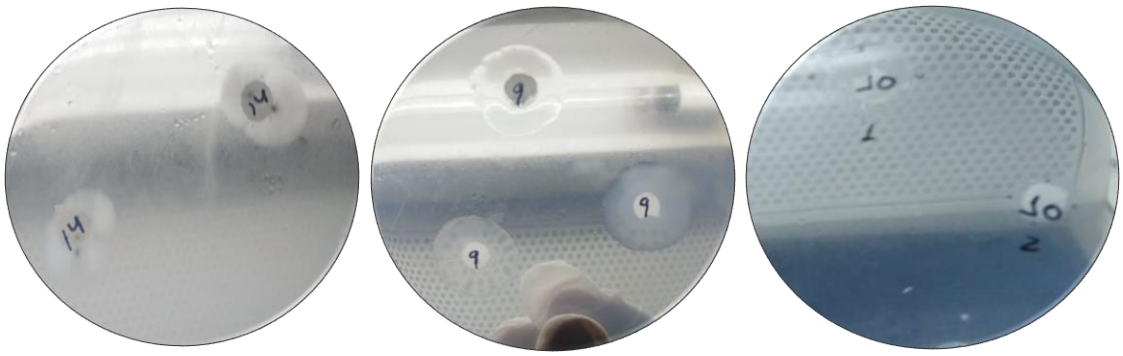

Figura 11. Crecimiento de bacterias fijadoras de Nitrógeno en medio específico ASBHY

Tabla 3. Crecimiento de aislados bacterianos fijadores de Nitrógeno en medio ASBHY

N.º	Código	Crecimiento de la colonia	Área de corona circular (mm^2)	
			24 horas	48 horas
1	MK- 43	+++	62.31	68.97
2	MK-3	+++	43.96	67.36
3	MK-9	+++	56.28	64.95
4	MK-16	+++	56.54	64.20
5	MK-10	+++	48.76	61.83
6	MK-44	+++	51.22	59.71
7	MK-45	+++	39.34	47.74
8	MK-12	+++	40.71	47.44
9	MK-14	+++	39.38	44.38
10	MK-40	+++	39.29	43.91
11	MK-47	++	34.06	39.25
12	MK-7	++	38.84	39.11
13	MK-4	++	37.36	38.84
14	MK-33	++	33.80	38.70
15	MK-26	++	33.55	38.57
16	MK-11	++	33.42	38.43
17	MK-27	++	35.63	38.30
18	MK-31	++	32.26	38.16
19	MK-25	++	30.99	38.03
20	MK-21	++	24.89	37.76
21	MK-35	++	32.39	37.76
22	MK-24	++	33.16	37.63
23	MK-1	++	20.39	37.09
24	MK-8	++	28.63	36.69
25	MK-23	++	31.75	36.69
26	MK-32	++	28.01	36.56
27	MK-41	++	31.88	36.29
28	MK-39	++	30.87	36.16
29	MK-5	++	30.11	36.03
30	MK-29	++	31.50	35.90
31	MK-28	++	28.01	34.98
32	MK-20	++	24.77	34.58
33	MK-26	++	29.00	33.67
34	MK-6	++	29.86	33.55
35	MK-30	++	24.65	32.77
36	MK-19	++	29.86	32.64
37	MK-21	++	27.52	32.13
38	MK-48	++	26.68	31.75
39	MK-38	++	25.96	31.37
40	MK-2	++	23.71	30.74
41	MK-22	+	25.72	26.32

Crecimiento; Leve (+), Moderado (++) y abundante (+++)

4.2.2. Solubilización de fosfato

A partir de las bacterias con mayor potencial de fijación de nitrógeno, se realizó la prueba de solubilización de fosfato en medio de cultivo específico NBRIP. Los resultados mostraron que las bacterias MK-16, MK-40, MK-43, MK-44 y MK-45 dieron positivo, al formar un halo estable de color amarillento translúcido, característico de esta prueba (Fig. 12). El tamaño del halo (medido como área de la corona circular en mm^2) a las 24 y 48 horas de incubación fue mayor en las cepas MK-16 y MK-40 (Fig.13),

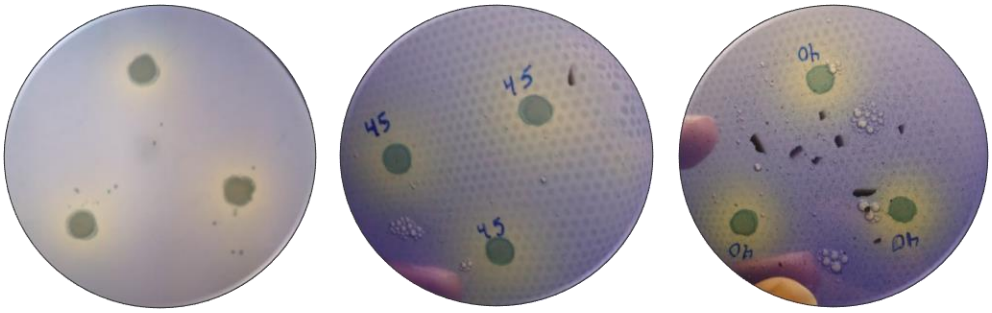

Figura 12. Crecimiento de bacterias solubilizadoras de fosfato en medio específico NBRIP

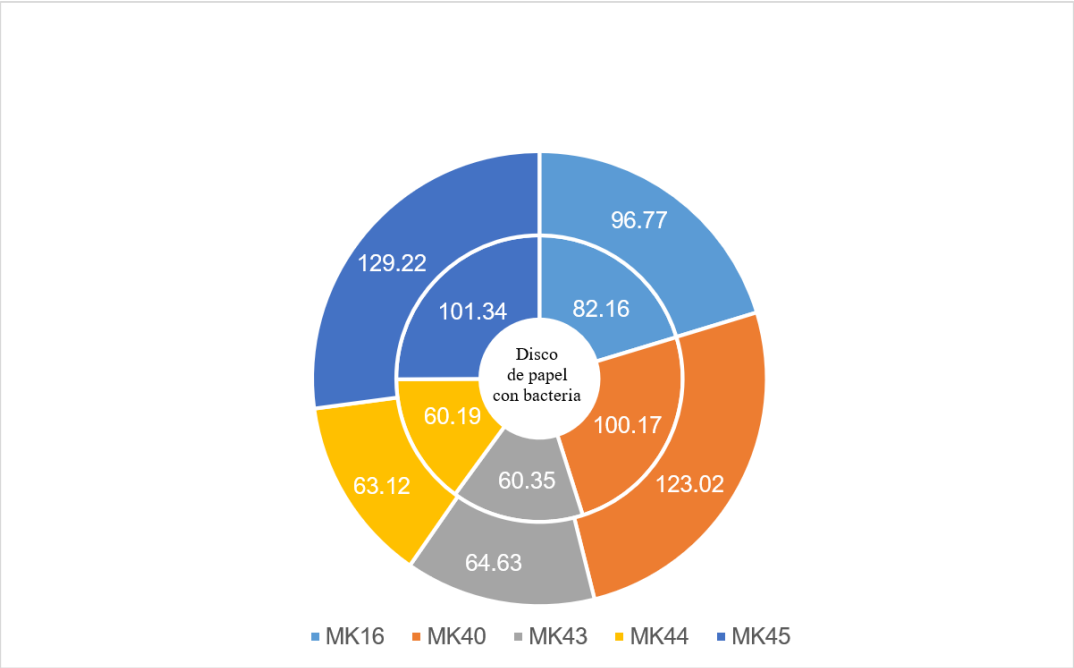

Figura 13. Área del halo de solubilización de fosfato (mm2) de las bacterias aisladas de la rizósfera del *P.pallida*, incubadas a 26°C por 24 hora (círculo menor) y 48 horas (círculo mayor).

Esta prueba permitió confirmar la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno, de las cuales las de mayor potencial pertenecen a los géneros *Bacillus, Olivibacter, Pantoea, Lysinibacillus* y *Erwinia*. Diversos estudios también reportan especies de estos géneros como fijadores de nitrógeno y solubilizadoras de fostatos: *Bacillus sp*, *Bacillus megaterium, B. cereus, B. flexus, B. amyloliquiefaciens* (LLacsa, 2016; Wang et al., 2017), *Erwinia sp* (Farzana et al., 2007; Soto et al., 2010), y *Pantoea sp* (Loiret et al., 2004; Ortega et al., 2004; Fayrouz et al., 2018), *Lysinobacillus sp*, (Restrepo et al., 2020; Pulido, 2016; Angulo et al., 2014).

Estas bacterias diazotróficas asociadas con las raíces y rizosfera de las plantas podrían constituir una alternativa a la aplicación de fertilizantes nitrogenados y fosfatados inorgánicos, favoreciendo el crecimiento y la producción de las plantas en forma sostenible.

4.3. Ensayos de compatibilidad bacteriana in vitro

En la figura 14 se puede apreciar las pruebas de compatibilidad *in vitro* en medio TSA realizado con las 10 bacterias con mayor potencial de fijación de nitrógeno. Las cepas MK-43 y MK-10 esparcidas en el medio de cultivo independientemente fueron enfrentadas con las otras nueve, todas ellas presentaron un crecimiento característico y no mostraron antagonismo.

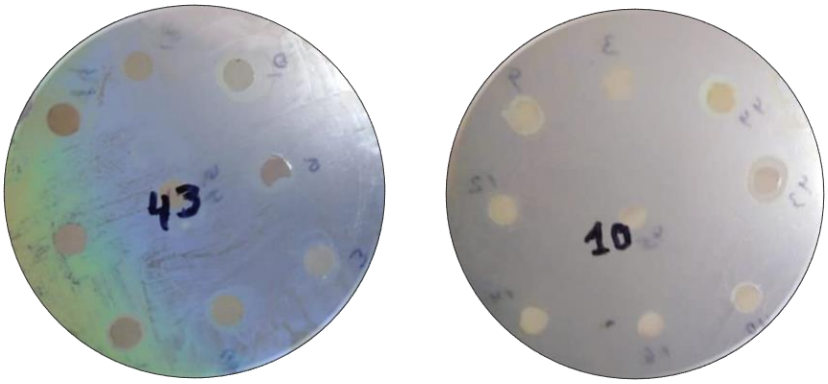

Figura 14. *Ensayo de compatibilidad in vitro de 10 cepas bacterianas con mayor potencial de fijación de nitrógeno aisladas de la rizosfera de P. pallida.*

Trabelsi y Mhamdu (2013), menciona la interacción de los microorganismos para actuar en asociaciones sinérgicas es de suma importancia en la naturaleza; puesto que la inoculación a nivel individual de microorganismos foráneos puede competir con microorganismos nativos ocasionando su desaparición y la pérdida del efecto benéfico sobre un determinado proceso. Investigaciones realizadas por Kumar et al., (2016) y Ávila et al., (2015) demostraron la compatibilidad de cepas bacterianas del género *Bacillus y Lysinibacillus.* Estos resultados, indican la posibilidad de su aplicación en consorcios para evaluar el efecto en el crecimiento de las plantas.

4.4. Caracterización molecular de las bacterias aisladas

Las 10 bacterias con mayor crecimiento en el medio de cultivo ASBHY, aisladas de la rizósfera de *P. pallida* fueron identificadas basándose en las secuencias de los amplicones, mediante análisis del programa online BLAST y comparándolos con la base de datos del NCBI, tomando en cuenta el tamaño del fragmento, el porcentaje de homología y el microorganismo con mayor grado de identidad de la secuencia. Las especies identificadas pertenecen a los filos Bacteroidetes, Proteobacteria y Firmicutes agrupadas en 5 géneros: *Bacillus* (4 especies), *Pantoea* (2 especies), *Lysinibacillus* (2 especies) y *Olivibacter* y *Erwinia* (1 especie) (Tabla 4). Estudios realizados también reportan a estos 3 filos como los más abundantes en la rizósfera de plantas forestales (Díaz et al., 2009; Llacsa, 2016; Gschwendtner et al., 2016).

Las especies identificadas en este estudio pertenecen al grupo de las rizobacterias de vida libre en el suelo, que incluyen a otros géneros como *Acinetobacter, Arthrobacter, Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Burkholderia, Enterobacter*, Pseudomonas, etc. (Podile y Kishore, 2006; Babu et al., 2015; Gowtham et al., 2016).

Tabla 4.

Identificación molecular de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de la rizósfera de *P. pallida*, mediante secuenciación del ARNr 16S.

Aislamiento	Identidad en GenBank	Número de acceso	Tamaño del Fragmento (pb)/cobertura (%)	Identidad (%)	Valor e
MK-3	*Bacillus endophyticus*	MH144228.1	954/100	98	0.0
MK-9	*Olivibacter sp.*	CP041643.1	933/100	100	0.0
MK-10	*Pantoea séptica*	MH017410.1	954/100	100	0.0
MK-12	*Lysinibacillus xylanilyticus*	MF582342.1	892/100	100	0.0
MK-14	*Lysinibacillus xylanilyticus*	MF188191.1	941/100	100	0.0
MK-16	*Bacillus megaterium*	HQ898863.1	768/100	96	0.0
MK-40	*Erwinia sp*	MK070126.1	928/100	99	0.0
MK-43	*Bacillus flexus*	KX242399.1	956/100	98	0.0
MK-44	*Bacillus amyloliquefaciens*	CP054415.1	952/100	99	0.0
MK-45	*Pantoea sp*	CP040095.1	925/100	100	0.0

Aunque, reportes de microbiota en la rizósfera del *P. pallida* son escasos (Gupta et al., 2015, Moreno et al., 2015 y Fterich, 2011), diversos estudios también reportan la identificación de algunas de estas bacterias en otras especies forestales, como guayacán (*Tabebuia Chrysantha y billbergi*) (Llacsa, 2016), eucalipto (*Eucaliptus nitens*) (Angulo et al., 2014), *Eucaliptus globulus* (Díaz et al., 2009), *Weinmannia tomentosa* (Martínez y García, 2010) y *Pinus patula* (Orozco y Jaramillo, 2009).

Estas bacterias juegan un rol importante como promotoras del crecimiento de plantas, las mismas que proporcionan sustancias químicas que estimulan el crecimiento de las plantas y las protegen contra organismos patógenos (Bhattacharyya and Jha, 2012; Vacheron et al., 2013; Ma, 2019). Además, intervienen en la adaptabilidad de las plantas mejorando su tolerancia al estrés abiótico, como es el caso de la sequía (Yan et al.,

2016; Takishita et al., 2018), factor importante en el crecimiento de las especies forestales de bosques seco, como es el caso del *P.pallida*.

Este trabajo, resulta de gran importancia, pues constituye los primeros datos de bacterias identificadas en el *P. pallida*, que podrían ser influyentes en ese ecosistema; por lo que es necesario mayores estudios sobre su mecanismo de acción y su utilización como alternativa ecológica en la estimulación del crecimiento de esta especie singular y representativa de la costa norte del Perú.

V. Conclusiones

A partir de la rizósfera de *Prosopis pallida* se obtuvieron selectivamente un total de 50 aislamientos en medio general TSA, de las cuales 41 se catalogaron como fijadoras de Nitrógeno cultivadas en medio específico ASHBY. Sin embargo, solo 10 cepas bacterianas con mayor potencial de fijación de nitrógeno fueron identificadas, mediante análisis de secuencia del gen ARNr 16S, pertenecientes a los géneros *Lyxinibacillus, Olivibater, Bacillus, Pantoea* y *Erwinia,* 5 bacterias de estos 3 últimos géneros fueron también solubilizadoras de fosfato.

VI. Recomendaciones

1. Realizar una caracterización metagenómica de la rizosfera del *P. pallida*, para determinar el grado de diversidad genética y la distribución de la población total de microorganismos presentes.

2. Efectuar un análisis proteómico y metabolómico de las bacterias identificadas.

3. Evaluar ensayos de promoción de crecimiento en *P. pallida*, inoculando las cepas bacterianas en semillas y plántulas a nivel de laboratorio, invernadero y campo.

4. Realizar pruebas de control biológicos de estas cepas frente a patógenos en las diversas especies forestales.

VII. Bibliografía

Angulo, V. C., Sanfuentes, E. A., Rodríguez, F., y Sossa, K. E. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista argentina de microbiología*, *46*(4), 338-347.

Argudo, M., Gich, F., Bonet, B., Espinosa, C., Gutiérrez, M., y Guasch, H. (2020). Responses of resident (DNA) and active (RNA) microbial communities in fluvial biofilms under different polluted scenarios. *Chemosphere*, *242*, 125108.

Ariza, S., González, O., y López, J. (2020). Evaluación de fijadores biológicos de nitrógeno libres sobre el crecimiento de gramíneas en suelo degradado. *Revista Colombiana de Biotecnología,* 22(1), 87-97.

Armenta, A., García, C., Camacho, J., Apodaca, M., Gerardo, L. y Nava, E. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*, *6*(1), 51-56.

Ávila, E., Lizarazo, L., y Cortés, F. (2015). Promoción del crecimiento de *Baccharis macrantha* (Asteraceae) con bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a su rizósfera. *Acta Biológica Colombiana*, *20*(3), 121-131.

Babu, A., Jogaiah, S., Ito, S., Nagaraj, A., y Phan, L. (2015). Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. *Plant Science,* 231, 62-73.

Baldrian, P. (2017). Forest microbiome: diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiology reviews*, *41*(2), 109-130.

Bernabé, L. (2016). *Identificación molecular de bacterias cultivadas y no cultivadas asociadas a la rizosfera de Opuntia ficus-indica (L.) mill. (Cacataceae) en*

ecosistemas áridos invernadero (Tesis de Pos-Grado, Universidad Nacional de Tumbes, Perú).

BIOTEC (2015). PCR gen 16S ARNr bacteriano. https://www.bioted.es/protocolos/PCR-GEN-16S-ARNr-BACTERIANO.pdf

Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J., y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, *29*(8), 601-608.

Bhattacharyya, P., y Jha, D. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(4), 1327-1350.

Cairati, E. (2013). Historia cultural del algarrobo, desde la cuenca del Mediterráneo hasta la Costa Norte de Perú. *Altre Modernità*, (10), 186-204.

Cardenas, O. (2017). *Actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de Prosopis pallida "algarrobo"* (Tesis de Pre Grado, Universidad Mayor de San Marcos, Perú).

Calle, G., y Palacios, A. (2018). *Caracterización farmacognóstica y fitoquìmica de la especie Prosopis pallida, cultivada en la comuna Chanduy-Santa Elena* (Tesis de Pre-Grado, Universidad de Guayaquil, Ecuador).

Cooperación Alemana al Desarrollo (GIZ, 2020). Adaptación al cambio climático para la competitividad agraria: Experiencias exitosas en cultivos de algarroba, cacao y café (segundo boletín), *Estudio en Perú,* http://infocafes.com/portal/wpcontent/uploads/2016/10/adaptacion_algarroba_cacao.pdf

Cunningham, D., y Leber, A. (2018). *Enterobacter, Cronobacter*, and *Pantoea species. In Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* (pp. 824-827). Elsevier.

Criollo, P., Obando, M., Sánchez, L., y Bonilla, R. (2012). Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 189-195.

Díaz, K., Valiente, C., Martínez, M., Castillo, M., y Sanfuentes, E. (2009). Root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(5), 867.

Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M., y Weigend, M.(2012). Hoja botánica: Algarrobo. Prosopis pallida (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Kunth. *Estudio de Perú, MINAM.* https://repositoriodigital.minam.gob.pe/bitstream/handle/123456789/184/BIV01201.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Farzana Y., Othman, R., Sijam, K., y Saad, M. S. (2007). Effect of PGPR inoculation on growth and yield of *Sweetpotato*. *J. Biol. Sci*, *7*(2), 421-424.

Fayrouz H., El-Megeed, A., y Youseif, S. (2018). Molecular identification and plant growth pro-moting activities of endophytic *Pantoea sp*. isolat-ed from *Zygophyllum album* medicinal plant. *Egyptian Journal of Genetics And Cytology*, *47*(1).

Fterich, A., Mahdhi, M., Caviedes, M., Pajuelo, E., Rivas, R., Rodriguez, I., y Mars, M. (2011). Characterization of root-nodulating bacteria associated to *Prosopis farcta* growing in the arid regions of Tunisia. *Archives of Microbiology*, 193(6), 385-397.

García, S. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Cuadernos del Tomás*, (3), 173-186.

Gowtham, H., Hariprasad, P., Nayak, S., y Niranjana, S. (2016). Application of rhizobacteria antagonistic to *Fusarium oxysporum f. sp*. lycopersici for the management of *Fusarium* wilt in tomato. *Rhizosphere*, 2, 72-74.

Gupta, R., Kale, P., y Rathi, M. (2015). Isolation, characterization and identification of endophytic bacteria by 16S rRNA partial sequencing technique from roots and leaves of *Prosopis cineraria* plant. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(6):36-43

Gschwendtner, S., Engel, M., Lueders, T., Buegger, F., y Schloter, M. (2016). Nitrogen fertilization affects bacteria utilizing plant-derived carbon in the rhizosphere of *beech seedlings*. *Plant and soil*, *407*(1-2), 203-215.

Hirsch, A., y Kaplan, D. (2019). Plant growth - promoting microorganisms and methods of use thereof. *BG Negev Technologies and Applications Ltd University of California*.

Jiménez, D., Montaña, J., y Martínez, M. (2011). Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus Azotobacter in organic vegetable-grown Colombian soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 846-858.

Kometter, R. (2020). Diagnóstico situacional de los bosques de “algarrobo” en el norte del perú. *Conferencias del MINAM, Piura, Perú.* http://www.bosquesandinos.org/wp-content/uploads/2020/04/Presentaci%C3%B3n-KometterPIURAConferencia04marzo.pdf

Kumar, M., Mishra, S., Dixit, V., Kumar, M., Agarwal, L., Chauhan, P., y Nautiyal, C. (2016). Synergistic effect of *Pseudomonas putida* and *Bacillus amyloliquefaciens* ameliorates drought stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant signaling & behavior*, 107-1004e ,1-9.

Loiret, F., Ortega, E., Kleiner, D., Ortega, P., Rodes, R., y Dong, Z. (2004). A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea sp*. from sugarcane. *Journal of applied microbiology*, *97*(3), 504-511.

Llacsa, L. (2016). *Identificación molecular de microorganismos asociados a la rizosfera y filosfera de los guayacanes (Tabebuia chrysantha y Tabebuia billbergii) y evaluación de cepas aisladas en el proceso inicial de desarrollo de plántulas* (Tesis de Pos-Grado, Universidad Nacional deTumbes, Perú).

Lyu, D., Backer, R., Robinson, W., y Smith, D. (2019). Plant-growth promoting rhizobacteria for *Cannabis* production: Yield, cannabinoid profile and disease resistance. *Frontiers in microbiology*, *10*, 1761.

Ma, Y. (2019). Biotechnological potential of plant-microbe interactions in environmental decontamination. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1519.

Martínez, P., y García, D. (2010). Bacterias diazotroficas y solubilizadoras de fósforo aisladas de las especies forestales altoandinas colombianas *Weinmannia tomentosa* y *Escallonia myrtilloides*. *Intropica*, 63-76.

Ministerio Nacional de Agricultura y Riego (2015). Sector agrario recurso de biodiversidad. *Estudio de Perú, MINAGRI*, https://www.minagri.gob.pe/portal/47-sector-agrario/recurso-biodiversidad/345-diversidad-de-especies

Ministerio Nacional de Agricultura y Riego (2015). La zonificación ecológica económicapotencial de los suelos. *Estudios de Perú, MINAGRI*. https://www.minagri.gob.pe/portal/43-sector-agrario/suelo

Moreno, L., González, D., Cecena, C., y Grimaldo, O. (2015). Molecular identification of phosphate-solubilizing native bacteria isolated from the rhizosphere of *Prosopis glandulosa* in Mexicali valley. *Genetics and Molecular Research*, *14*(1), 2793-2798.

Muñoz, H. (2013). Una superpotencia de biodiversidad: retos de adaptación para América Latina y el Caribe. Revista Copyright © UNDP, 73, 4-8.

Navarro, Y., Martínez, E., y Hernández, C. (2013). Potential Plant-Growth-Promoting and Nitrogen-Fixing Bacteria Associated with Pioneer Plants Growing on Mine Tailings. *Molecular microbial ecology of rhizosphere*, 2, 1003-1011.

Nasto, M., Alvarez, S., Lekberg, Y., Sullivan, B., Townsend, A., y Cleveland, C. (2014). Interactions among nitrogen fixation and soil phosphorus acquisition strategies in lowland tropical rain forests. *Ecology Letters*, 17(10), 1282-1289.

Nasto, J. (2014). *Análisis de germinación de la semilla botánica de algarrobo (Prosopis pallida Kunth) utilizando cinco tratamientos pre germinativos* (Tesis de Pre-Grado, Universidad Nacional de Cajamarca, Perú).

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2014). El genero Prosopis “Algarrobo” en America Latina y el Caribe. Distribución, bioecoloía, usos y manejo. *Estudios de Perú, FAO*. http://www.fao.org/3/AD314S/AD314S08.htm

Osorio, N. (2007). Efectos benéficos de bacterias rizosféricas en la disponibilidad de nutrientes en el suelo y la absorción de nutrientes por las plantas. *Facultad Nacional de Agronomía. Medellín, Colombia*, 60(1), 3621-3643.

Osorio, N. (2009). Microorganismos del suelo y su efecto sobre la disponibilidad y absorción de nutrientes por las plantas. *Cenicafé (pp. 43–71).*

Ortega, E., Fernández, L., Ortega, P., y Rodés, R. (2004). La fijación biológica del nitrógeno en la caña de azúcar. *Mol Biol Evol*, *21*, 541-554.

Orozco, C., y Martínez, P. (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *Bosque (Valdivia)*, *30*(2), 70-77.

Palmer, C., y Fletcher, S. (2003) *Matemáticas prácticas, segunda Edición*, Reverté.

Pasiecznik, N., Felker, P., Harris, P., Harsh, L., Cruz, G., Tewari, J., ... y Maldonado, L. (2001). The *Prosopis juliflora-Prosopis pallida* complex: a monograph (Vol. 172). *Coventry: HDRA*.

Perú-Ecologico (2009). Algarrobo (*Prosopis pallida*) Generaciones de Vida en el desierto. *Estudio de Perú. Perú ecologico*. https://www.peruecologico.com.pe/flo_algarrobo_1.htm

Perez, E. (2017). *Micropropagación y biotización de jojoba (Simmondsia chinensis L. [Schneider]) mediante bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal.* (Tesis de Doctorado, Centro de Investigaciones Biologicas del Norte, S.C., Perú).

Pérez, F., Santana, R., Capó, Y., Martín, B., y Gutiérrez, R. (2010). Aislamiento y caracterización morfológica de bacterias endófitas en sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Centro Agrícola*, 37(3), 61-66.

Podile, A., y Kishore, G. (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria in Plant-associated bacteria. ed. S. S. Gnanamanickam. *Dordrecht, Netherlands: Springer*, 195–230.

Pulido, A. (2016). *Evaluación del efecto de Bacillus subtilis EA-CB0575 en la promoción de crecimiento de Zea mays y Solanum lycopersicum a nivel de invernadero* (Tesis de Pre-Grado, Universidad de las Américas, Ecuador).

Raymundo, F., Cupull, R., Alvarado, Y., Bladimir, M., y Torres, R. (2010). Aislamiento y caracterización morfológica de bacterias endófitas en sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Centro Agrícola, 37(3), 61-66.

Restrepo, G., Marulanda, S., De la Fe, Y., Díaz, A., Lucia, V., y Hernández, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en

la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, *46*(1), 63-76.

Reza, I., Téllez, C., Medina, M., Mendoza., S., Lara, A., y Sánchez, S. (2019). *Manual de Prácticas de Biología de Procariotas y Virus* (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México), 61.

Rodicio, M., y Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 22(4), 238-245.*

Soto, H., Choquehuanca, D., Bravo N., Sarmiento A., Carpio B., Rodríguez F., y Ramos H. (2010). Caracterización molecular de bacterias endofíticas diazotróficas aisladas de *Saccharum sp* (caña de azúcar). *Primer congreso peruano de mejoramiento genético y biotecnología agrícola* (p. 36).

Servicio nacional de areas naturales protegida por el estado (2019). Guia Oficial de Áreas Naturales Protegidas y Perú Ecológico. *Estudio de Perú, SERNANP*, https://www.sernanp.gob.pe/flora-emblematica-en-areas-naturales-protegidas

Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (2018). *Estudios de Perú, SENAMHI,* https://wwwsenamhi.gob.pe/main.php?dp=estaciones

Silva, V. (2017). *Aislamiento e identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, y evaluación de la capacidad de crecimiento en medios de cultivo a gran escala como alternativa de biofertilizante en cultivos de rosa sp* (Tesis de Pre-Grado, Universidad de las Américas, Ecuador).

Takishita, Y., Charron, J. y Smith, D. (2018). Biocontrol rhizobacterium Pseudomonas sp. 23S induces systemic resistance in tomato (Solanum

lycopersicum L.) against bacterial canker Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2119.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.

Tan, K., Radziah, O., Halimi, M., Khairuddin, A. y Shamsuddin, Z. (2015). Assessment of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and rhizobia as multi-strain biofertilizer on growth and N2 fixation of rice plant*. Australian Journal of Crop Science*, 9(12), 1257.

Tejera, B., Heydrich, M. y Rojas, M. (2013). Aislamiento de Bacillus solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agronomía Mesoamericana*, 24(2), 357-364.

Torriente, D. (2010). Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. perspectivas de su uso en cuba. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 19-26.

Tortora, J., Funke, B. y Case, C. (2007) Introducción a la microbiología, *Novena Edición, Panamericana*.

Trabelsi, D. y Mhamdi, R. (2013). Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. *BioMed research international*, 1-11.

Trivedi, P., Anderson, I. y Singh, B. (2013). Microbial modulators of soil carbon storage: integrating genomic and metabolic knowledge for global prediction. *Trends in Microbiology*, *21*(12), 641-651.

Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M., Touraine, B., Moënne, Y., Muller, D., ... y Prigent, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant science*, *4*, 356.

Van, R. y Campbell, S. (2001). The biology of Australian weeds Prosopis L. species. *Plant Protection Quarterly*, 16(1), 2-20.

Villegas, J., Rueda, E., Murillo, B., Puente, M., Ruiz, F., Zamora, S. y Beltran, F. (2014). Bacterias promotoras de crecimiento de plantas autóctonas y su efecto en Prosopis chilensis (Molina) Stunz. *Revista mexicana de ciencias* agrícolas, 5(6), 1041-1053.

Wang, T., Ding, P., Chen, P., Xing, K., Bai, J., Wan, W., ... y Qin, S. (2017). Complete genome sequence of endophyte Bacillus flexus KLBMP 4941 reveals its plant growth promotion mechanism and genetic basis for salt tolerance. *Journal of biotechnology*, *260*, 38-41.

Xiong, Y., Li, X., Wang, T., Gong, Y., Zhang, C., Xing, K., y Qin, S. (2020). Root exudates-driven rhizosphere recruitment of the plant growth-promoting rhizobacterium Bacillus flexus KLBMP 4941 and its growth-promoting effect on the coastal halophyte Limonium sinense under salt stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 194, 110374.

Yan, H., Liu, L., Li, L., Zhang, P., Liang, W. y Zhao, H. (2016). Research progress on agriculture of plant growth promoting rhizobacteria. *Heilongjiang Agric. Sci*, *6*, 148-151.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Composición química de medios de cultivos

1.1. Trypticase Soy Agar (TSA)

Reactivo	Concentración (g/l)
Digerido pancreático de caseína	15
Digerido papaínico de soja	5
Cloruro sódico (NaCl)	5
Agar	15

pH final: 7.3

1.2. Luria Bertani (LB)

Reactivo	Concentración (g/l)
Peptona tríptica de caseína	10
Extracto de levadura	5
Cloruro de Sodio (NaCl)	10

pH final: 7.3

1.3. Medio Especifico Ashby

Reactivo	Concentración (g/l)
$C_{12}H_{22}O_{11}$	5
KH_2PO_4	1
$MgSO_4.7H_2O$	0.2
$FeSO_4.H_2O$	0.005
NaCl	0.2
$CaCl_2.2H_2O$	0.2
Agar	15

pH final: 7.3

1.4. Medio Especifico NBRIP

Reactivo	Concentración (g/l)
C6H12O6	10
MgCl2.6H2O	5
MgSO4.7H2O	0.25
KCl	0.2
(NH4) SO4	0.1
Ca (PO4)2 o Roca fosfórica	5
Extracto de Levadura	0.1
Agar	15
azul de bromofenol	0.025

pH final: 7.3

ANEXO 2. Componentes de Extracción de ADN y PCR

1. Concentración por ebullición en Buffer Fosfato Alcalino (PBS)

Reactivo	Concentración
TAE	1%
$NaCL_2$	137 mM
KCl	2.7 mM
Na_2HPO_4	10 mM
KH2PO4	1.8 mM

pH de 7.4

2. Mix de Reacción de PCR

Reactivo	Concentración
Agua Ultra Pura	25 µl
Buffer	1X (2.5 µl)
DNTPs	0.2 mM (0.5 µl)
Cloruro de Magnesio (MgCl2)	2 mM (2 µl)
Forward Primer	0.36 uM (0.6 µl)
Reverse Primer	0.36 uM (0.6 µl)
Taq. Polimerasa	0.5 U/µl (0.1 µl)
ADN molde	2 µl

ANEXO 3. Galería de Fotos

Figura 15. Recolección de muestra de la Rizosfera de Prosopis pallida en el distrito San Juan de la Virgen

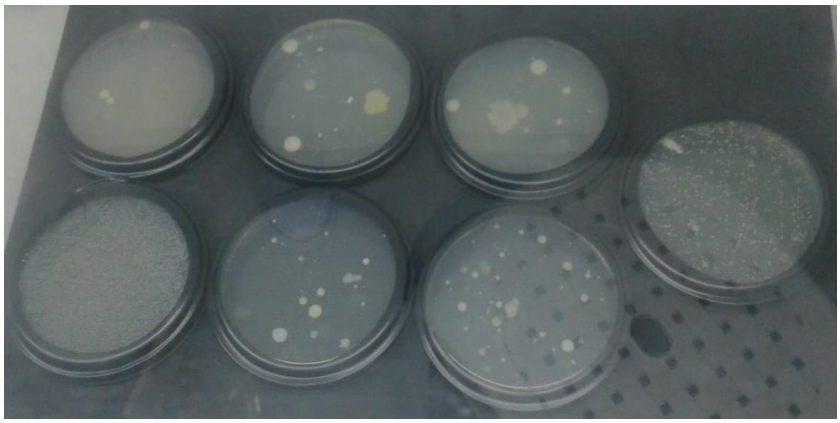

Figura 16. Aislamiento de Bacteriano

Figura 17. Aislamiento y siembra de bacterias

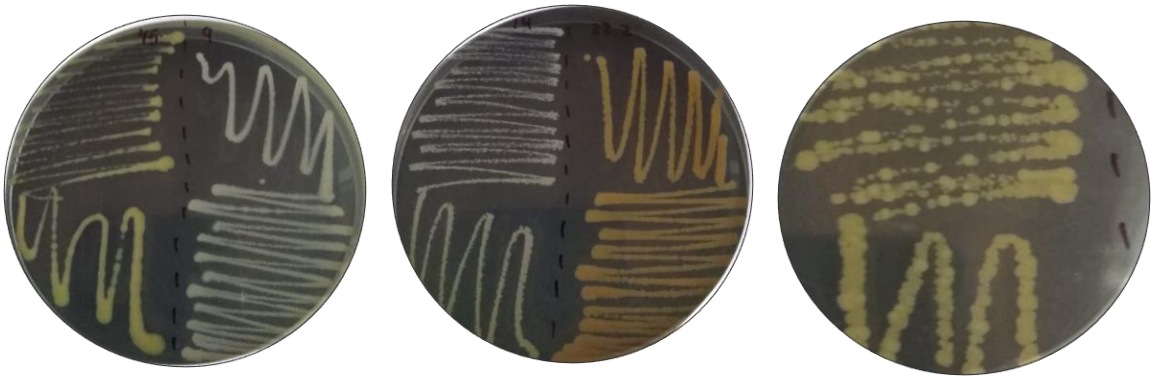

Figura 18. Bacterias purificadas.

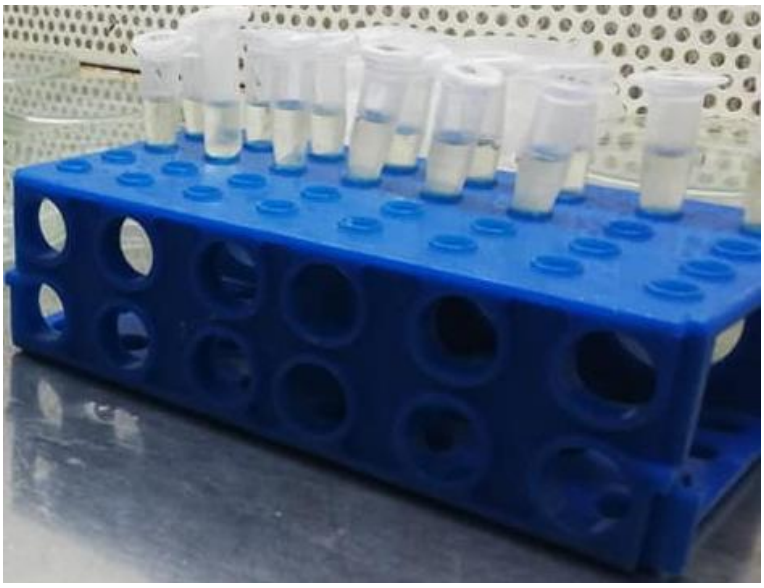

Figura 19. Bacterias purificadas cultivadas en medio de cultivo Lb agar.

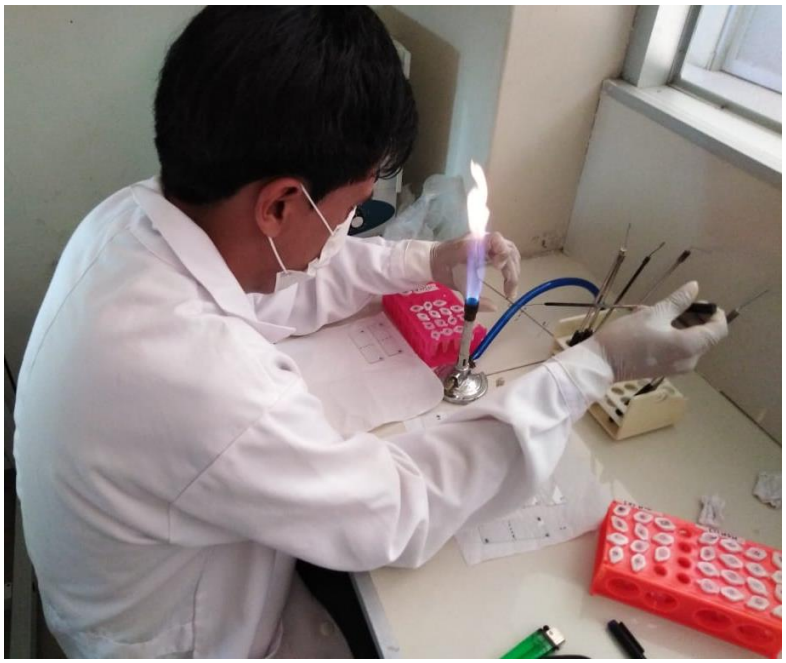

Figura 20. Prueba de tinción Gram

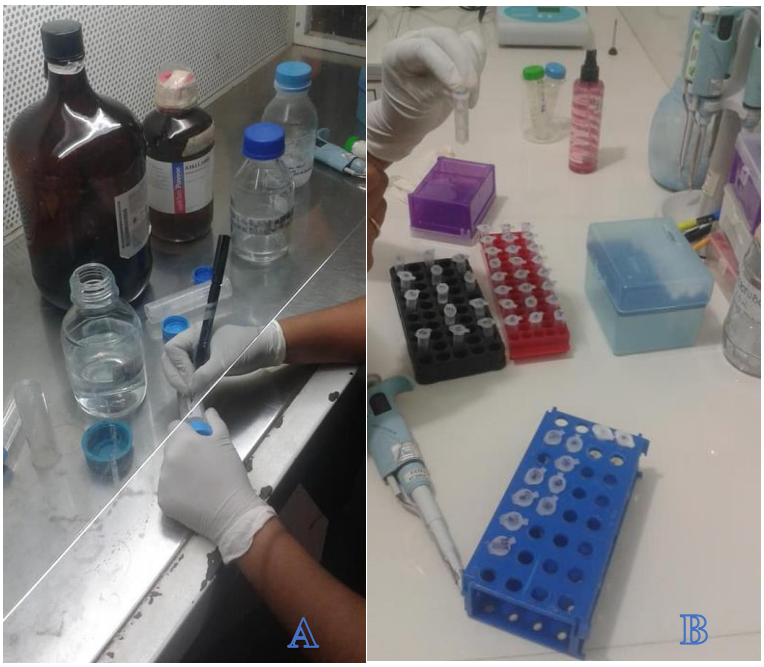

Figura 21. Extracción de ADN de la Cepas con Potencial Fijador de Nitrógeno, aisladas de la Rizosfera del Prosopis pallida. A) Reactivos utilizados para la extracción. B) Pellet resuspendido en agua ultrapura, para adicionar ARNasa.

Figura 22. Amplificación mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). A) Realizando el mix de reacción de PCR. B) Termociclador BLUE-RAY TurboCicler

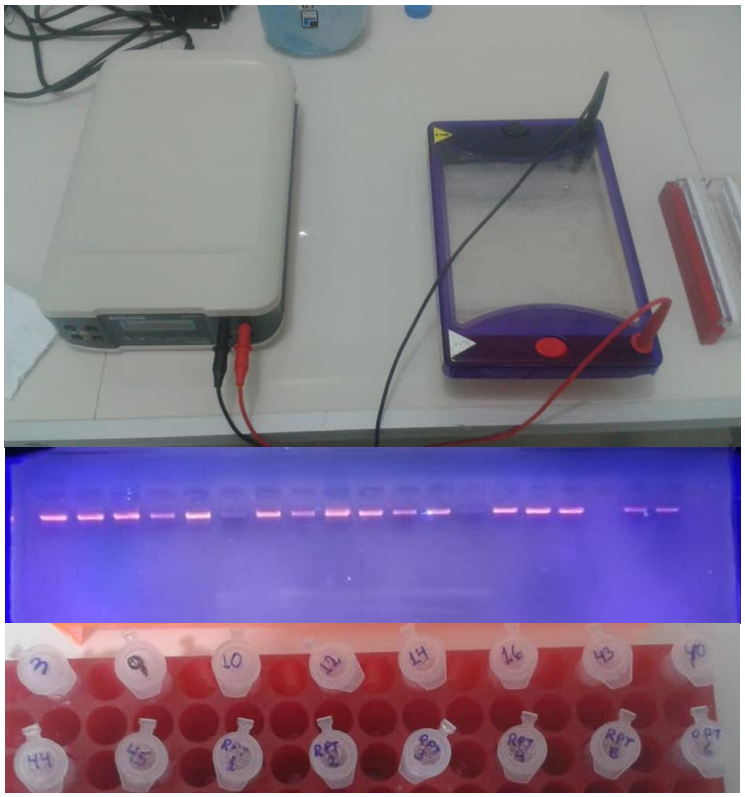

Figura 23. Visualización de amplicone en un transiluminador (Vilber Lourmot TFX20M).