



Ciencia Ergo Sum
ISSN: 1405-0269
ciencia.ergosum@yahoo.com.mx
Universidad Autónoma del Estado de México
México

Caracterización bioquímica y molecular de bacterias asociadas a nódulos de cuatro leguminosas en la provincia de Santa Elena, Ecuador

Soto Valenzuela, Javier Oswaldo

Caracterización bioquímica y molecular de bacterias asociadas a nódulos de cuatro leguminosas en la provincia de Santa Elena, Ecuador

Ciencia Ergo Sum, vol. 25, núm. 1, 2018

Universidad Autónoma del Estado de México, México

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10453975006>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional.

Caracterización bioquímica y molecular de bacterias asociadas a nódulos de cuatro leguminosas en la provincia de Santa Elena, Ecuador

Biochemical and molecular characterization of bacteria associated with nodules from four legumes in the province of Santa Elena, Ecuador

Javier Oswaldo Soto Valenzuela
Universidad Estatal Península de Santa Elena, Ecuador
jsotovalenzuela@yahoo.com

Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10453975006>

RESUMEN:

La caracterización de bacterias asociadas a nódulos de leguminosas en la provincia de Santa Elena, Ecuador, pretende contribuir a la identificación y tipificación bacteriana de la rizósfera con sus plantas hospederas en una zona con problemas de salinización, sistemas agrícolas poco tecnificados y con escasa información sobre microorganismos del suelo. Mediante técnicas morfológicas, bioquímicas y de microscopía electrónica de barrido (MEB), se identificaron y caracterizaron diez cepas bacilares Gram negativas, mucoproductoras, de rápido crecimiento y coloración característica de las rizobacterias, además de resistencia a salinidad y pesticidas. El análisis molecular del gen 16S muestra predominancia del género *Pseudomonas*, que es referida como una bacteria colonizadora de la rizósfera y PGPR, pero infrecuente en los nódulos de leguminosas.

PALABRAS CLAVE: *Pseudomonas*, nódulos, microscopía electrónica de barrido, 16S ARNr.

ABSTRACT:

The characterization of bacteria associated with legume nodules in the province of Santa Elena, Ecuador, aims to contribute to the identification and bacterial typing of the rhizosphere with its host plants in an area with problems of salinization, low-tech agricultural systems and with little information on microorganisms. Ten Gram negative, mucoproducer, fast growing and bacilli strains characteristic of rhizobacteria were identified and characterized by means of morphological, biochemical and scanning electron microscopy (SEM) techniques; as well as resistance to salinity and pesticides. Molecular analysis of the 16S gene shows predominance of the genus *Pseudomonas*, which is referred to as a rhizosphere colonizing bacteria and PGPR, but rare in legume nodules.

KEYWORDS: *Pseudomonas*, nodules, scanning electron microscopy, 16S rRNA.

INTRODUCCIÓN

La península de Santa Elena (provincia de Santa Elena, Ecuador) es una zona semiárida que por su origen y características edafoclimáticas puede generar problemas de salinización en los suelos, lo que conlleva a una disminución de la productividad de los cultivos y del valor de dichos suelos (Proaño y Briones, 2008).

Al estudiar el suelo hay que considerar la importancia vital que los microorganismos tienen para el mejoramiento de la producción y control ambiental, además de permitir el mantenimiento de la biodiversidad y sostenibilidad de los ecosistemas (Glass, 2003).

Las poblaciones microbianas que colonizan la raíz y su zona de influencia son denominadas rizobacterias. Son muy diversos los tipos de bacterias que pueden estar asociados a raíces, de manera que las interacciones entre éstas y la planta pueden tener resultados neutros, positivos o negativos. Las bacterias rizosféricas de vida libre o en simbiosis estimulan el crecimiento de las plantas a través de varios procesos, como la síntesis de reguladores del crecimiento vegetal, fijación de nitrógeno, solubilización de nutrientes, producción de sideróforos y control de fitopatógenos del suelo. Los géneros más estudiados pertenecen a *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*, entre otros. Se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Ferrera y Alarcón, 2001; Torriente, 2010; Glick, 2012).

Mediante la secuenciación del gen 16S ARNr, varias cepas bacterianas de *Pseudomonas* y rizobios fueron aislados del interior de los nódulos de las leguminosas *Trifolium pretense*, *Cicer arietinum*, *Amaranthus polygamus*, *Vigna mungo*, *Trigonella foenum* y *Vigna radiata* recogidos en la India y Pakistán (Issar *et al.*, 2012; Noreen *et al.*, 2015).

Los géneros *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Enterobacter* y *Pantoea* fueron aislados de nódulos de las raíces de la fabácea *Onobrychis* en el desierto de Uzbekistán (Shakirov *et al.*, 2010).

La identificación y clasificación de las bacterias aisladas a partir de nódulos de leguminosas puede ser de tipo fenético o filogenético, de acuerdo con sus características fenotípicas y relaciones evolutivas, respectivamente. Empleando la descripción morfológica de células aisladas en medios de cultivo libres de nitrógeno semisólidos, crecimiento ante parámetros físicos, asimilación de diferentes fuentes de carbono, poco o ningún crecimiento en peptona glucosa agar (PGA), producción de enzimas, resistencia natural a los antibióticos y habilidad para degradar herbicidas en condiciones *in vitro* (Colwell, 1970; Toniutti *et al.*, 2015; Elzanaty *et al.*, 2015).

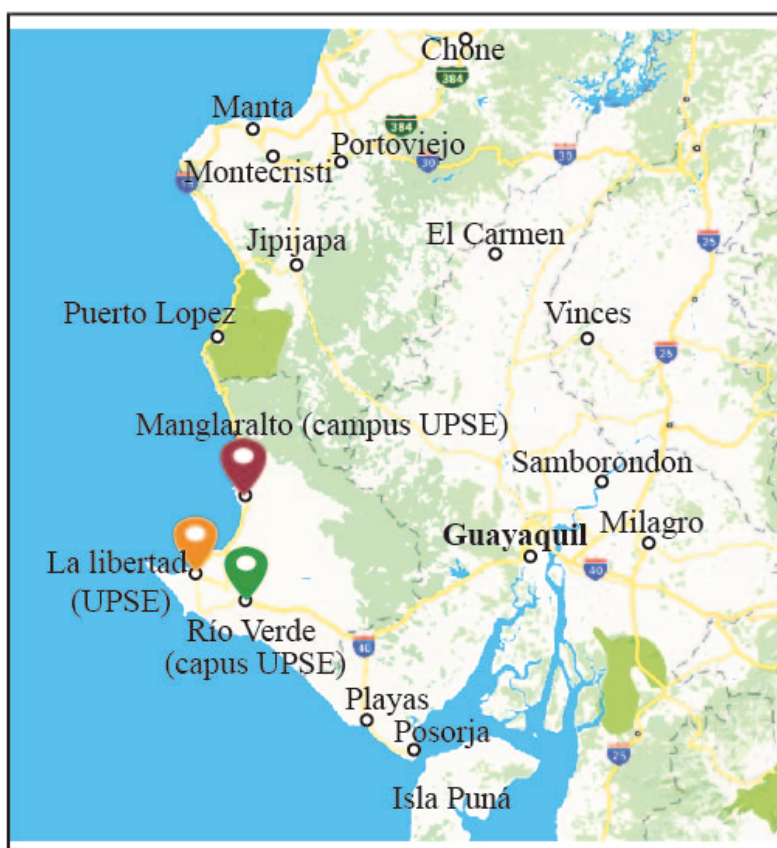
La aplicación de las técnicas moleculares permite establecer las relaciones filogenéticas entre los organismos procariotas, con enorme repercusión en la taxonomía bacteriana, lo cual ha dado lugar al sistema de clasificación vigente e identificación rápida y precisa de la microbiología del suelo (Rodicio y Mendoza, 2004; Nogales, 2005; Byung-Hyuk *et al.*, 2014).

Por lo mencionado, los objetivos planteados están dirigidos a la caracterización morfológica, bioquímica y molecular de los aislados bacterianos asociados a los nódulos radiculares de cuatro leguminosas localizadas en la provincia de Santa Elena, Ecuador.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1. 1. Aislamiento de los nódulos

Se colectaron muestras de raíces con nódulos de las leguminosas *Phaseolus vulgaris* L. (1), *Cajanus cajan* (2), *Vigna* sp. (3) y *Leucaena leucocephala* (4) localizadas en los campus de prácticas agrícolas de la Universidad Estatal Península de Santa Elena: Río Verde (-2.31096, -80.7056), Manglaralto (-1.937, -80.71689) y La Libertad (-2.24887, -80.858), las cuales fueron guardadas y rotuladas en bolsas estériles. En el laboratorio fueron lavadas cuidadosamente con agua corriente y destilada estéril (mapa 1) (Madigan *et al.*, 2004; Zúñiga, 2012).



MAPA 1

Localización de los sitios de muestreo en la provincia de Santa Elena, Ecuador

Fuente: elaboración propia.

Los nódulos se desinfectaron en alcohol de 95% y solución de cloro al 5% por 5 min respectivamente. Se enjuagaron también con agua destilada, macerados y sembrados por triplicado en cajas Petri con medio de cultivo extracto de levadura-manitol-agar rojo-congo (LMARC) (Zúñiga, 2012). Luego fueron rotulados, incubados y codificados por 72 horas a 27 °C (tabla 1).

TABLA 1

Origen y codificación de los aislados bacterianos

Especie vegetal/nombre vulgar	Lugar de origen	Código
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. (frejol vainita)	Río verde	VAIRV
<i>Cajanus cajan</i> (frejol de palo)	Río verde	FPRV
<i>Vigna sp.</i> (Tumbe)	Río verde	TUMRV
<i>Cajanus cajan</i> (frejol de palo)	Manglaralto	FPMG1
<i>Cajanus cajan</i> (frejol de palo)	Manglaralto	FPMG2
<i>Cajanus cajan</i> (frejol de palo)	Manglaralto	FPMG3
<i>Cajanus cajan</i> (frejol de palo)	Manglaralto	FPMG4
<i>Leucaena leucocephala</i> (leucaena)	Río verde	LEURV
<i>Leucaena leucocephala</i> (leucaena)	La Libertad	LEUPSE1
<i>Leucaena leucocephala</i> (leucaena)	La Libertad	LEUPSE3

Fuente: elaboración propia.

2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

2. 1. Descripción microscópica y macroscópica de los aislados

Se emplearon microscopios de luz, objetivo 100x inmersión en aceite para observar la forma y coloración de las bacterias (tinción Gram). La ultramicroscopía se realizó en el Instituto de Investigaciones en Salud Pública (INSPI) (Guayaquil, Ecuador) con un microscopio electrónico de barrido (MEB), en muestras del interior de los nódulos y cultivadas en cajas Petri. La descripción macroscópica también incluyó la producción de goma y velocidad de crecimiento de los aislados en los platos de cultivo (Ferrera y Alarcón, 2001).

3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Las pruebas bioquímicas realizadas fueron catalasa, ketolactosa, producción de ácido o álcali, crecimiento en peptona glucosa agar (PGA), cloruro de sodio, antimic con dos herbicidas y un pesticida: Aminaroc 6 (2, 4-dichlorophenoxy acetic acid.), Demoledor (glifosato) y Semevin 350 (thiodicarb), empleando discos de papel filtro estériles y luego embebidos en cada pesticida acorde con las instrucciones técnicas de cada producto y a la escala Span Diagnostics Ltd. para microorganismos Gram negativos (Microbial Sentivity Discs), inoculados con las cepas tratamiento y la resistencia al metal pesado cobalto (Co^{+2}) en solución al 0.4%. Todos los ensayos fueron sembrados en cajas Petri por triplicado incluyendo controles negativos en cada prueba (Ferrera *et al.*, 1993; Somasegaran y Hoben, 1994; Cuadrado *et al.*, 2009).

4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

4. 1. Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó suspendiendo de una a dos colonias aisladas en 500 μl de medio PBS 1x (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4) en tubos de 1.5 ml y centrifugados por 3 min a 10 000 rpm, formando un pellet. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 μl de solución TE (Solución Tris-EDTA). La suspensión se llevó a ebullición por 10 min colocado sobre hielo por 5 min. Luego se centrifugó por 2 min a 10 000 rpm y se transfirieron 10 μl del sobrenadante a un nuevo microtubo que contenía 90 μl de agua ultra pura, desechando el pellet. Se aplicó 1 μl de ARNasa a cada tubo. La concentración y calidad del ADN de las muestras fue calculada por absorbancia a longitud de onda 260 y 280 nm con un Nanodrop 2000 C (Thermo, USA). La concentración de trabajo para las amplificaciones se calculó en 10 ng/ μl diluyendo el ADN puro con agua Milli-Q (Zúñiga, 2012).

4. 2. Amplificación del gen 16S ARNr

La amplificación de las muestras se realizó en un termociclador Biometra, con un volumen de reacción de 25 μl , conteniendo 12.5 μl de Master mix (Thermo Scientific Taq DNA Pol. with KCL Buffer), 9.3 μl de agua Milli-Q, 0.6 μl de primer 27F, 0.6 μl de primer 1492R y 2 μl de ADN bacteriano; la secuencia de los primeros universales: 27F-5'¹AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG3'¹ y 1492R-5'¹GGTTACCTTGTACGACTT3'¹. El procedimiento se inició rotulando los tubos de las muestras y luego mezclando la reacción Master Mix que contiene Buffer KCL, MgCl_2 , dNTPs, primer fD1, primer rD1, Taq

ADN Polimerasa, ADN (muestras) y agua Milli-Q. Se depositó en tubos limpios y estériles de primer uso para la PCR en el termociclador programado (Quatrini *et al.*, 2001), que amplificó la región de 1 500 pb correspondientes al gen 16S ARNr (cuadro 1). El resultado fue observado en gel de electroforesis al 1.5% de agarosa y buffer TBE 1x con 6 µl de bromuro de etidio a través del transiluminador (Lane, 1991).

CUADRO 1
Ciclos y temperaturas empleados en PCR del gen 16S
ARNr de los aislados bacterianos de nódulos de leguminosas

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	4 min
2	94	30 s
3	58	45 s
4	72	45 s
5	(paso 2 al 4 se repite 35 veces)	
6	72	4 min

Fuente: Quatrini *et al.*, 2001.

4. 3. Secuenciación del gen 16S ARNr

Una vez verificada la presencia de las bandas de 1 500 pb de todos los aislados bacterianos, se rotularon con el código y fecha respectiva. Se empleó el servicio de secuenciación de Macrogen Inc. y se adjuntó la muestra de los primers 27F y 1492R. Luego todas las secuencias generadas por la secuenciación de cada cepa fueron alineadas y corregidas manualmente empleando el *software* BioEdit y Chromas Lite. Para finalmente ser comparadas con la base de datos del National Center for Biotechnology Information^[1] empleando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Zúñiga, 2012).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. 1. Caracterización fenotípica

La microscopía de luz y electrónica, coloración y velocidad de crecimiento de los aislados mostraron la presencia de bacterias bacilares Gram negativas blanquecinas, transparentes-cremosas y mucoproducentes entre uno y siete días de crecimiento en todos los cultivos aislados en medio LMARC, típicos de la mayoría de rizobacterias (figuras 1 y 2) (Colwell, 1970; Ferrera *et al.*, 1993; Somasegaran y Hoben, 1994; Mantilla *et al.*, 2009).

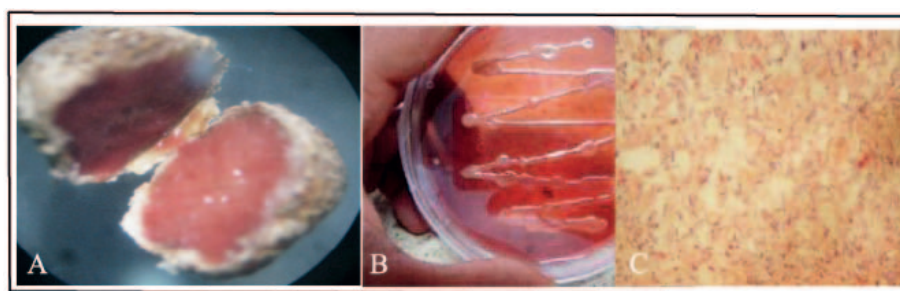


FIGURA 1

Caracterización fenotípica de los aislados bacterianos a partir de nódulos de leguminosas en la provincia de Santa Elena

Nota: (A) Corte transversal de nódulos de *Cajanus cajan* con coloración rojiza (leghemoglobina). (B) Aislados de nódulos sembrados en medio LMARC. (C) Bacilos Gram (-) observados con objetivo 100x (inmersión en aceite).

Fuente: elaboración propia.

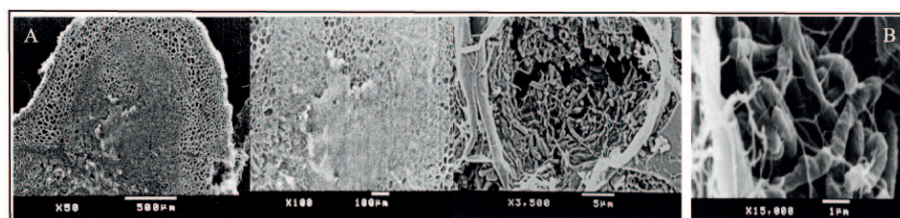


FIGURA 2

Microfotografías de cortes histológicos del interior de los nódulos

Nota: (A) Microfotografías en secuencia de microscopía electrónica de barrido (SEM) del interior de un nódulo de *Leucaena leucocephala* con presencia de bacilos. (B) Bacterias bacilares con flagelos mezclados con fibras a 15 000x de un aislado en medio LMARC.

Fuente: elaboración propia.

5. 2. Caracterización bioquímica

Las pruebas bioquímicas de catalasa y crecimiento en PGA confirman características bacterianas metabólicas apartadas del grupo *Rhizobium*. En tanto la prueba de ketolactosa descarta la presencia del género *Agrobacterium* (Bernal y Graham, 2001; Toniutti *et al.*, 2015). Ocho de las diez cepas aisladas son ácido productoras, al cambiar el color del medio de púrpura al amarillo. Las cepas LEUPSE 1 y LEUPSE 3 se pueden considerar neutras o alcalino productoras (figura 3).

Las pruebas de crecimiento en cloruro de sodio (NaCl) y Co^{+2} indican que las cepas FPMG2, FPMG3 y FPMG4 poseen muy alto crecimiento y resistencia para ambas sales. FPRV y FPMG1 presentan mediano crecimiento en NaCl y alta resistencia en Co^{+2} , las cepas LEURV, LEUPSE1 y LEUPSE3 mostraron de bueno a muy poco crecimiento en Co^{+2} respectivamente y sin tolerancia a la sal. TUMRV resultó con mediano crecimiento en NaCl y muy poca resistencia al Co^{+2} . La cepa VAIRV evidenció muy poco crecimiento en ambos.

En la prueba antimic con los pesticidas Aminaroc 6 (herbicida), Semevin 350 (plaguicida) y Demoledor (herbicida-glifosato), las cepas VAIRV, LEURV, FPMG1, FPMG4 y LEUPSE3 destacan en la resistencia a dos de tres pesticidas (figura 3).

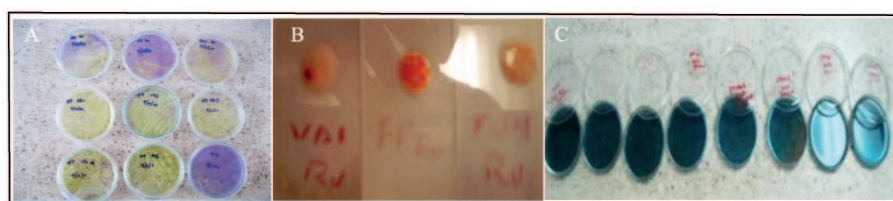


FIGURA 3

Caracterización bioquímica de los aislados obtenidos

Nota: (A) Prueba de crecimiento en PGA, en color amarillo las cepas ácido productoras. (B) Prueba catalasa positiva. (C) Prueba de cetolactasa, descartando presencia de *Agrobacterium*.

Fuente: elaboración propia.

Los resultados de la caracterización fenotípica y bioquímica de los aislados (cuadro 2), como coloración, consistencia, mucoproducción, velocidad de crecimiento, producción de ácido-álcali y crecimiento a diferentes porcentajes de salinidad y en presencia del metal pesado coinciden con la identificación clásica para rizobacterias, pero no del grupo *Rhizobium*, lo cual muestra la utilidad de complementar las pruebas morfo-bioquímicas y los análisis moleculares mencionadas por Cuadrado *et al.*, 2009, Zúñiga, 2012, Moreno y Galvis, 2013.

CUADRO 2

Resultado de las pruebas fenotípicas y bioquímicas

Código	Velocidad de crecimiento (días)	Caracterización morfológica	Muco productoras	Ácido productoras	Crecimiento PGA	Crecimiento en concentración NaCl			Prueba antimicrobica			Resistencia a Co+2
						2%	3%	5%	D	A	S	
VAIRV	4	I, T, G	++	+	++	-	+	-	r	t	r	+
FPRV	1 a 3	C, BR, F	++	+	+++	+	-	+	t	t	r	+++
TUMRV	1 a 3	C, BR, G	+++	+	++	+	+	-	t	t	t	+
FPMG1	7	C, BR, G	+++	+	+++	+	-	+	r	s	r	+++
FPMG2	5	C, BR, G	++	+	++	+	+	+	t	s	t	+++
FPMG3	1 a 3	C, BR, G	+++	+	+++	+	+	+	t	s	r	+++
FPMG4	5	C, BR, G	++	+	++	+	+	+	r	t	r	+++
LEURV	1 a 3	P, BR, G	+++	+	+++	-	-	-	r	r	t	+++
LEUPSE1	4	C, BR, G	+++	-	+++	-	-	-	s	r	t	++
LEUPSE1	4	C, BR, G	++	-	+++	-	-	-	s	r	r	+

Pruebas bioquímicas: buen crecimiento (+++), mediano crecimiento (++), poco crecimiento (+), sin crecimiento (-). **Antimicrobica:** Sensible (s), tolerante (t), resistente (r). Demoledor (D), Aminaroc (A), Semevin (S). **Caracterización morfológica:** Translúcida (T), Gomosa (G), Poco gomosa (F).

Fuente: elaboración propia.

6. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

6. 1. Extracción de ADN y amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr

Una vez extraído el ADN genómico de los diez aislados bacterianos, se realizaron las respectivas amplificaciones en PCR del gen 16S ARNr, con los primers universales 27F y 1492R, luego verificadas en gel de electroforesis al 1.5% de agarosa. La figura 4 muestra los productos de 1 500 pb esperados.

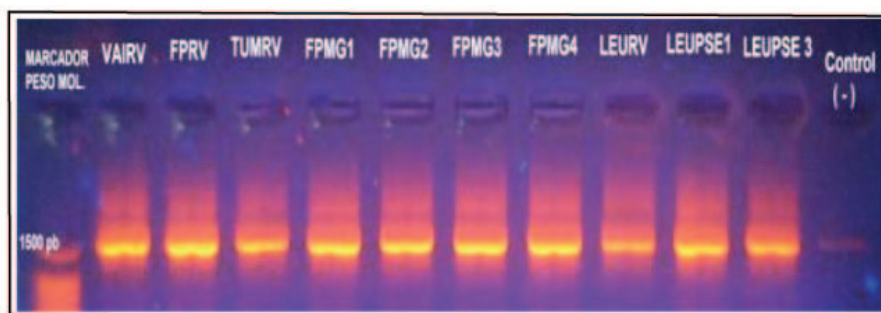


FIGURA 4
Amplificación del gen 16S ARNr de los 10 aislados asociados a
nódulos de leguminosas de la península de Santa Elena, Ecuador

Fuente: elaboración propia.

Los cromatogramas obtenidos de la secuenciación de los genes 16S ARNr de las 10 cepas fueron depurados y ensamblados empleando la herramienta CAP contig del *software* BioEdit y Chromas (v 2.5.1). Luego, se compararon con la base de datos del GenBank mediante el programa BLAST 2.2.20 (Basic Local Alignment Search Tool) (Yoon *et al.*, 2017) (cuadro 3). Las cepas FPRV y FPMG3 obtuvieron la mayor similitud, 99% con *Pseudomonas putida* y *Enterobacter* sp. respectivamente, reportadas también por Shakirov *et al.* (2010). Los demás porcentajes oscilan entre 88 y 96% de similitud, con mayor presencia el género *Pseudomonas*, en seis de los diez aislados, y *Pseudomonas putida* la más frecuente (FPRV, TUMRV y FPMG1), lo cual coincide con Issar *et al.* (2012) y Noreen *et al.* (2015), quienes reportan la presencia de este género en nódulos de varias leguminosas de la India y Pakistán empleando el gen 16S. Lo anterior acorde con Larsen *et al.* (1993) y Perret *et al.* (2000) referente a la existencia en el suelo y raíces de las plantas de grandes comunidades interespecíficas microbianas cuyas interrelaciones determinan cuál es la comunidad dominante, reprimida o inhibida e incluso aquellas que coexisten sin afectar positiva o negativamente la producción agrícola y con habilidad para degradar herbicidas en condiciones *in vitro* (Elzanaty *et al.*, 2015).

CUADRO 3
Identificación molecular de los aislados bacterianos asociados a nódulos
de leguminosas de tres zonas de la Península de Santa Elena, Ecuador

Aislamiento	16S ARNr	Número de acceso de secuencia comparada	Máximo identificado
VAIRV	<i>Pseudomonas syringae</i>	NR_074598.1	95%
FPRV	<i>Pseudomonas putida</i>	AF307869.1	99%
TUMRV	<i>Pseudomonas putida</i>	AF307869.1	90%
FPMG1	<i>Pseudomonas putida</i>	AF307869.1	92%
FPMG2	<i>Klebsiella variicola</i>	KJ803944.1	92%
FPMG3	<i>Enterobacter</i> sp.	JQ912517.1	99%
FPMG4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NR_102835.1	95%
LEURV	<i>Enterobacter</i> sp.	JQ912517.1	96%
LEUPSE1	<i>Erwinia rhapontici</i>	NR_119365.1	88%
LEUPSE3	<i>Pseudomonas</i> sp.	JX909000.1	94%

Fuente: elaboración propia.

CONCLUSIONES

Si bien la literatura señala al género *Rhizobium* como predominante de la formación y colonización de los nódulos en las leguminosas, el aislamiento e identificación de otros grupos bacterianos a través del medio de cultivo LMARC, junto a la microscopia óptica de luz y electrónica de barrido evidenciados en este trabajo, presumen la presencia y posible interacción con otras bacterias asociadas a la rizósfera de las leguminosas. Sin embargo, el análisis molecular basado en la comparación de secuencias modelo sólo consideraría identificadas a las cepas FPRV y FPMG3 con 99% de similitud a nivel de género, como *Pseudomonas putida* y *Enterobacter* sp. respectivamente.

molecular

ANÁLISIS PROSPECTIVO

Los resultados de este trabajo permitirán implementar sistemas de producción agropecuarios menos contaminantes, información valedera y confiable de microorganismos rizosféricos nativos para su empleo como bioinsumos, así como el desarrollo de normativas y políticas que contribuyan en un futuro mediato la sostenibilidad de los ecosistemas en comunidades con suelos salinos o afectados por el cambio climático.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Estatal Península de Santa Elena, en especial al ingeniero Néstor Orrala B., MSc., director CIAP-UPSE y al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública “Leopoldo Izquieta Pérez (INSPI), especialmente a Yasuji Amano, PhD., y a la doctora Linda Díaz, MSc., por la ayuda y facilidades prestadas para la culminación de este artículo.

REFERENCIAS

- Bernal, G. y Graham, P. (2001). Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparissons with Mexican bean rhizobia. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(6), 526-534.
- Byung-Hyuk, K., Ramanan, R., Dae-Hyun, C., Hee-Mock y O. Hee-Sik, K. (2014). Role of Rhizobium, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. *Biomass and Bioenergy*, 69, 95-105.
- Colwell, R. (1970). Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *Journal Bacteriology*, 104, 410-433.
- Cuadrado, B., Rubio, G. y Santos, W. (2009). Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bionóculos. *Revista Colombiana de Ciencias Químicas y Farmacéuticas*, 38(1), 78-104.
- Elzanaty, A., Hewedy, O., Nagaty, H. y Abd-Elbany, M. (2015). Molecular and Biochemical Characterization of Some Egyptian Genotypes *Rhizobium* (*Vicia Faba*) Isolates. *Journal of Bioengineering and Biomedical Science*, 5, 1.
- Ferrera, R., González, M. y Rodríguez, M. (1993). *Manual de Agromicrobiología*. México: Trillas.
- Ferrera, R. y Alarcón, A. (2001). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *CIENCIA ergo-sum*. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10402108>
- Glass, D. (2003). Nitrogen use efficiency of crop plants: Physiological constraints upon nitrogen absorption. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22, 453-470.
- Glick, B. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientica*. Vol. 2012, Article ID 963401, 15 pages, 2012. doi:10.6064/2012/963401vol.
- Issar, S., Sharma, S., Choudhary, D., Gautam, H. y Gaur, R. (2012). Molecular Characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated from Root Nodules of Various Leguminous Plants of Shekhawati Region, Rajasthan, India. *American Journal of Plant Sciences*, 3(1), 60-63.
- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing, en E. Stackebrandt y M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*.
- Larsen, N., Olsen, G., Maidak, B., McCaughey, M., Overbeek, R., Macke, T., Marsh, T. y Woese, C. (1993). The ribosomal database project. *Nucleic Acids Research*, 21, 3021-3023.
- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2004). *Brock Biología de los microorganismos*. Décima edición. Madrid: Pearson Educación.
- Mantilla, A., Cardona, G., Peña, C., Murcia, U., Rodríguez, M. y Zambrano, M. (2009). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros físicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. *Revista Biología Tropical*, 57(4), 915-927.
- Moreno, L. y Galvis, F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótrofes aisladas de muestras de suelo rizosférico. *Pastos y Forrajes*, 36(1), 33-37.
- Nogales, B. (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*, 14(2), 41-51.
- Noreen, R., Abid Ali, S., Ali Hasan, K., Sultana, V., Ara, J. y Ehteshamul-Haque, S. (2015). Evaluation of biocontrol potential of fluorescent *Pseudomonas* associated with root nodules of mungbean. *Crop Protection*, 75, 18-24.
- Perret, X., Stahelin, C. y Broughton, W. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 180-201.
- Proaño, J. y Briones, C. (2008). Gestión del riesgo y la salinidad en los cultivos de la península de Santa Elena y la cuenca baja del río Guayas. Resumen del XI Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Quito. Octubre de 2008. Disponible en www.secsuelo.org/wp-content/uploads/2015/06/5.-Jaime-Proano.-Riego.pdf
- Quatrini, P., Scaglione, G., Cardinale, M., Caradonna, F. y Puglia A. (2001). *Bradyrhizobium* sp. nodulating the Mediterranean shrub Spanish broom (*Spartium junceum* L.), *Journal of Applied Microbiology*, 92, 13-21.

- 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), 238-45.
- Shakirov, Z., Khakimov, S., Shomurodov, K. y Umarov, B. (2010). Nodulation in Onobrychis Perennial Legume Plants. *American Journal of Plant Sciences*, 1, 119-130.
- Somasegaran, P. y Hoben, H. (1994). *Handbook for Rhizobia Methods in Legume Rhizobium Technology*. New York: Springer-Verlag.
- 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.
- Toniutti, M., Fornasero, L., Trod, B., Zuber, N. y Córdoba, M. (2015). Caracterización fenotípica y funcional de rizobios noduladores de dos especies del género *Macroptilium*. *Fave. Sección Ciencias Agrarias*, 14(1).
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. y Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5).
- Zúñiga, D. (2012). *Manual de microbiología agrícola Rhizobium, PGPRs, indicadores de fertilidad e inocuidad*. Universidad Nacional Agraria La Molina.

NOTAS

- [1] Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>