



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

**Caracterización Molecular de Bacterias Promotoras de
Crecimiento Vegetal de Gossypium Barbadense del Arboreto de
la Universidad César Vallejo, Chiclayo.**

TESIS PARA OBTENER TÍTULO PROFESIONAL DE:

Ingeniero Ambiental

AUTORES:

Velez Chicoma, Ricardo Leonidas de Jesus (orcid.org/0000-0003-3153-8711)

Zuñiga Valera, Paola Raquel (orcid.org/0000-0002-8116-7480)

ASESOR:

Dr. Monteza Arbulú, César Augusto (orcid.org/0000-0003-2052-6707)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Calidad y Gestión de los Recursos Naturales

LÍNEA DE RESPONSABILIDAD SOCIAL UNIVERSITARIA:

Desarrollo Sostenible y Adaptación al Cambio Climático

CHICLAYO — PERÚ

2022

Dedicatoria

A nuestros padres, por ser el apoyo a lo largo de nuestra vida y ser para nosotros el pilar que nos sostiene y empuja para salir adelante y cumplir con nuestra meta de ser excelentes profesionales.

A nosotros mismos, por ser siempre perseverantes y no dejarnos vencer por los obstáculos que se nos presenten en la vida, lo mejor de la vida es la lucha con la que la enfrentamos.

Leonidas y Paola

Agradecimiento

En primera instancia agradecemos a Dios por brindarnos el conocimiento y la salud para el desarrollo de nuestro trabajo de investigación.

Agradecemos a nuestra familia por darnos la oportunidad y el apoyo de seguir estudios universitarios en este tiempo difícil de pandemia.

Finalmente agradecemos a nuestro asesor y docentes guías en esta investigación, por incentivar en nosotros la actitud investigativa y por su motivación constante a conocer los problemas que atentan con la sociedad y el ambiente; gracias a sus conocimientos impartidos en nuestra aula remota nos ha ayudado.

Leonidas y Paola

Índice de contenidos

Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Índice de contenidos	iv
Índice de tablas	iv
Índice de figuras	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
III. METODOLOGÍA	11
3.1. Tipo y diseño de investigación.....	11
3.2. Variables y Operacionalización	12
3.3. Población (incluir criterios de selección), muestra, muestreo, unidad de análisis	12
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.	12
3.5. Procedimiento	13
3.6. Método de análisis de datos.	15
3.7. Aspectos éticos	16
IV. RESULTADOS	17
V. DISCUSIÓN	29
VI. CONCLUSIONES	33
VII. RECOMENDACIONES	34
REFERENCIAS	35
ANEXOS	43

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Bacterias promotoras de crecimiento vegetal</i>	7
Tabla 2. <i>Tiempo de floración de especies de algodón peruano.</i>	8
Tabla 3. <i>Tiempo de desarrollo por especie.</i>	9
Tabla 4. <i>Clasificación de la técnica PCR.</i>	9
Tabla 5. <i>Identificación de microorganismos de la rizosfera de Algodón nativo (G.B).</i>	18
Tabla 6. <i>Pruebas bioquímicas Urea/Catalasa/Citrato de Simmons</i>	19
Tabla 7. <i>Prueba Bioquímica - Triple Sugar Iron Agar (TSI)</i>	19
Tabla 8. <i>Prueba Bioquímica SIM motilidad/Indol.</i>	20
Tabla 9. <i>Secuencia de primers para Bacillus Subtilis.</i>	23
Tabla 10. <i>Caracterización fisicoquímica del suelo del arboreto de algodón nativo.</i>	26
Tabla 11. <i>Promoción de crecimiento vegetal hasta la etapa de germinación.</i>	27

Índice de figuras

<i>Figura 01:</i> Muestra 2 y 4	17
<i>Figura 02:</i> Gel en agarosa corridos en la electroforesis.....	25

Resumen

El crecimiento demográfico amenaza con la sobreexplotación de los campos agrícolas para cubrir con la demanda de alimentos, en la actualidad los microorganismos promotores de crecimiento vegetal están siendo materia de estudio para emplearlos en la mejora de las condiciones del suelo, con el fin de solucionar problemas ambientales. Por ello, el objetivo de la investigación fue caracterizar a las bacterias promotoras de crecimiento vegetal desde un punto de vista molecular. Se aislaron 05 muestras de la rizosfera del *Gossypium barbadense* de los cuales la muestra 03 y 05 se identificaron bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, siendo la muestra 05 la especie *Bacillus Subtilis*, con dicha bacteria se trabajó la amplificación de ADN, obteniendo un resultado positivo de 1300 pb comprobando que pertenecía con el 99% de similitud al *B.subtilis*; asimismo se ensayó un experimento de germinación de semillas para contrastar el nivel de promoción de crecimiento vegetal con 05 colores diferentes, determinándose que la semilla de color pardo oscuro germinó a los 10 días a comparación de las demás. Se logró identificar de manera precisa el género bacteriano presente en la rizosfera de *Goossypium barbadense* y se confirmó la capacidad de *B. Subtilis* como promotor de crecimiento vegetal.

Palabras clave: Caracterización molecular, *Bacillus Subtilis*, promotora de crecimiento vegetal.

Abstract

Population growth threatens the overexploitation of agricultural fields to meet the demand for food, plant growth promoting microorganisms are now being studied for growth-promoting microorganisms are currently being studied for use in soil to be used to improve soil conditions in order to solve environmental problems to solve environmental problems. Therefore, the objective of the research was to characterize plant growth-promoting bacteria from a molecular point of view from a molecular point of view. A total of 05 samples were isolated from the rhizosphere of *Gossypium* rhizosphere of *Gossypium barbadense* of which sample 03 and 05 of which samples 03 and 05 identified bacteria belonging to the genus *Bacillus*, being the genus *Bacillus*, being sample 05 the species *Bacillus Subtilis* the species *Bacillus Subtilis*, with which the amplification DNA amplification was carried out with this bacterium, obtaining a positive result of 1300 bp, proving the positive result of 1300 bp, proving that it belonged with 99% similarity to *B. subtilis* germination experiment was also tested to contrast the level of plant growth promotion with 5 different growth promotion level with 05 different colors, determining that the dark brown seed germinated at a The dark brown seed germinated after 10 days compared to the others. It was possible to the precise identification of the bacterial genus present in the rhizosphere of *Goossypium barbadense* and confirmed the *B. subtilis* as a plant growth promoter was confirmed.

Keywords: Molecular characterization, *Bacillus Subtilis*, plant growth promoter.

I. INTRODUCCIÓN

El suelo es definido como el manto de la superficie de la tierra, es uno de los recursos que contribuye al desarrollo de los seres vivos, además presenta la capacidad de aportar los elementos necesarios como nutrientes, aire y agua para el crecimiento vegetal, esto se debe a la autoorganización que posee (Instituto Nacional de Innovación Agraria, 2015, p.6). Sin embargo, durante años el suelo ha sido amenazado por distintos factores directos e indirectos, entre ellos está la sobreexplotación de los campos agrícolas, la actividad industrial, el uso de agroquímicos y la deforestación, ocasionado la degradación de este recurso en los diversos países del mundo (Pachés, 2020, p.5).

Recientemente, la Union Europea (2020, parr.7) ha manifestado que más del 50% de sus suelos son degradados, como consecuencia directa de la ineficiente gestión de prácticas sostenibles. Asimismo, la Organización de las Naciones Unidas (ONU), estima para el 2050 existirá 9,4 a 10 mil millones de personas, lo que afectará negativamente al suelo, ya que se puede inferir que mientras más habitantes existan, menor número de campos agrícolas y mayores zonas urbanizadas (2015, parr.4).

En el estudio realizado por el Ministerio del Ambiente (2018, parr.6), dio como resultado que 22 248 100 ha de suelo se encuentra degradado, lo que equivale al 17.5% de la superficie del Perú; sin embargo, los datos de la Encuesta Nacional Agraria (2019, p.12) publicados por el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI), se determinó que el 12,6% del territorio se emplea para la actividad agropecuaria.

Para tratar de cubrir con la demanda de alimentos para la población mundial, la actividad agrícola opto por el uso de agroquímicos, no obstante, la aplicación excesiva y desequilibrada de dichas sustancias, está provocando daños al microbiota de los suelos (Asit et.al, 2020, p.9), debido a que solo el 0,1% de pesticidas e insecticidas llegan al organismo, mientras que el resto se filtra en el suelo, afectando el 98% de los microorganismos presentes (Swaroop et al. 2020, p.5)

Gracias al avance de la ciencia se ha logrado proponer diversas alternativas de solución encaminados a la disminución de la degradación de los suelos, algunas de ellas son: el abono verde, aplicación de materia orgánica, que permite mejorar las propiedades fisicoquímicas del suelo y alternativas biológicas (Bioadsorción por Covarrubias, Biolixiviación y Biovolatilización) (Fosado et al. 2017, p.11) y los microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PCV), ya que estos estimulan positivamente el desarrollo de las plantas, también aceleran la obtención de antibióticos, lo que evita enfermedades a la planta por microorganismos patógenos (Leal et al. 2018, p.2).

El estudio de González y Fuentes (2017, p.3), identifica a las *Pseudomonas sp.*, *M. Azospirillum* y *Rhizobium sp* como los géneros más conocidos en el PCV; por otro lado, logró clasificarlos en dos grupos: los microorganismos promotores de crecimiento en plantas y bacterias promotoras en plantas con capacidad de control biológico.

Mediante diversos estudios se ha aplicado la biología molecular como una nueva estrategia para utilizar de manera dirigida los microorganismos encontrados en el suelo y otros recursos, con el fin de solucionar problemas ambientales, dentro de esta ciencia se encuentra la caracterización molecular, que permite la identificación, estandarización y realización de diversas técnicas como: la extracción de la polimerasa (ADN y ARN) y el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el cual permite la amplificación de genes, ya sean de microorganismos y plantas; lo que facilita el mejoramiento genético por marcadores moleculares para resistencia a factores bióticos y abióticos de las especies mejoradas (Ancizar 2016, p.1).

Luego de contextualizar la temática abordada en la investigación se plantean la interrogante: ¿En qué medida la caracterización molecular facilita la identificación de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal de *Gossypium barbadense* en el arboreto de la Universidad César Vallejo?

La investigación caracterizó a las bacterias promotoras de crecimiento vegetal desde un punto de vista molecular, ya que nos ofrece la posibilidad de identificar de manera rápida y precisa el género bacteriano presente en las muestras

seleccionadas; asimismo brindó información relevante a la investigación al determinar que bacteria es responsable de estimular el crecimiento de la planta estudiada (*Gossypium barbadense*), lo que contribuyó a los argumentos descritos y comprobados por investigadores sobre el potencial de los PCV como bioestimulantes y biofertilizantes, permitiendo que se reduzca el uso de agroquímicos, conllevando a mejorar las condiciones del recurso suelo y la actividad agrícola.

Para el desarrollo de la investigación se formuló como objetivo general caracterizar molecular mente las bacterias promotoras de crecimiento vegetal de *Gossypium barbadense* y como objetivos específicos se planteó: aislar las bacterias presentes en la rizosfera de *Gossypium barbadense* en el arboreto de la Universidad César Vallejo, identificar las bacterias por medio técnicas microbiológicas, realizar la amplificar del ADN y por último contrastar el nivel de promoción de crecimiento en la etapa de germinación de la semilla del *Gossypium barbadense*.

La hipótesis para la investigación es: la caracterización molecular facilita la identificación de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal de *Gossypium barbadense* en el arboreto de la Universidad César Vallejo.

II. MARCO TEÓRICO

Méndez, Flores y Paramo (2017), Flores y Roque (2017), evaluaron a la especie *B. subtilis* como antagonista de los hongos fitopatógenos, mientras Ñacato y Valencia (2016), Astorga et.al (2013), determinaron la capacidad del *B.subtilis* como controlador biológico frente a agentes patógenos como *Penicillium sp* y *Alternaria spp* respectivamente. En las investigaciones mencionadas aislaron el *B.subtilis* de muestras de bioinsumos comerciales y de suelo (rizosfera), asimismo desarrollaron el método de diluciones para luego incubarlas en placas Petri en medios de cultivo Plate count agar y agar nutritivo; la temperatura y tiempo óptimo para el crecimiento de dichas especies fue de 24 a 48h a 35 – 37°C.

Los investigadores concuerdan que el *B. subtilis* posee un gran potencial como controlador biológico y antagonismo debido a la capacidad de inhibir el crecimiento de dichos agentes patógenos para los cultivos estudiados.

Alaylar (2022), Kalam, Basu y Podile (2020) y Rahman et al. (2018), determinaron la eficiencia de la bacteria *bacillus* como promotora de crecimiento vegetal en tres especies diferentes de plantas, en los tres estudios se realizaron ensayos de producción de ácido indolacético (IAA), ya que dicha auxina cumple un rol indispensable para el crecimiento de la planta. La finalidad de las investigaciones fue determinar si las cepas de *bacillus* eran beneficiosas para el crecimiento vegetal.

Asimismo, caracterizaron molecularmente el ADN de las especies bacterianas estudiadas, para ello los investigadores utilizaron los primers (27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')), mediante la electroforesis en gel de agarosa se observaron los pares de bases del material genético amplificado; asimismo emplearon el programa BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con el fin de comparar sus secuencias de ADN amplificadas con la base de datos del NCBI.

Llegaron a la conclusión que dicha bacteria presenta un gran potencial como promotora natural y bioestimulantes, que permite el crecimiento de las plantas,

brinda protección ante organismos patógenos e incrementa la productividad de los cultivos.

González et al. (2017), Urgiles et al. (2021), Menendez et al. (2017) y Aras et al. (2018), estudiaron a las rizobacterias (PGPR) presentes en el suelo como promotoras de crecimiento vegetal, en dichas investigaciones identifican los géneros bacterianos como *Rhizobium*, *Serratia*, *Bacillus*, *Azotobacter*, dichos microorganismos poseen la capacidad de ser biofertilizantes, para solubilizar fosfatos, fijar el nitrógeno y ayudan maximizar las herramientas biológicas en el suelo y así minimizar la dependencia de fertilizantes. La idea en común que comparten los autores con respecto a las PGPR, es que sería la solución para una agricultura sostenible, donde se pueda abastecer de alimentos al mundo y al mismo tiempo se conserve los ecosistemas.

Nehra, Singh y Choudhary (2016), investigaron la capacidad del *Brevibacillus brevis*, como un género de rizobacteria (PGPR) promotora del crecimiento extraído del cultivo *Gossypium hirsutum*, para ello se realizaron distintos procesos que permitan comprobar si dicha bacteria pertenecía a PGPR; se evaluó la producción de IAA, ya que es indispensable para para identificar si la cepa ayuda en el crecimiento de la planta, también se realizó la secuenciación de la cepa, se utilizó primers Cebador directo 27F (5'-AGAGTTTTGATCCTGGCT CAG-3') y cebador inverso 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'); para la cuantificación ADN desarrollaron la técnica de electroforesis en gel agarosa donde se visualizó los pares de bases de las secuencias genéticas amplificadas.

Llegando a la conclusión que el *Brevibacillus brevis* tiene la capacidad acelerar el crecimiento y desarrollo de la planta y además posee una característica particular, debido a que se adapta a temperaturas altas y al medio que le rodea.

Szilagyi et al. (2014) Hernández et, al (2018), ambas investigaciones trabajaron con los géneros de bacterias endófitas en dos distintos cultivos, donde se realizó el aislamiento y la caracterización molecular de dichas bacterias, dando como resultados que dentro del género de las bacterias endófitas se encuentra: *Bacillus*, *Enterobacter*, para conocer si dichas bacterias son promotoras de crecimiento vegetal, se realizó pruebas de la concentración de IAA para cada

cepa aislada. Se concluyó que ambos microorganismos son favorables como bioestimulantes para el desarrollo de las raíces y reducen el tiempo de germinación de los cultivos estudiados.

Campaña et al. (2018), Alcarraz, Heredia y Julian (2019), Coila, Bernabé y Ruelas (2021), identificaron y caracterizaron las bacterias aisladas de los cultivos de *Opuntia ficusindica*, *Coffea spp.* y *Elodea potamogeton* respectivamente, mediante el método de PCR, la discrepancia entre los autores fue el uso de los primers, Alcarraz, Heredia y Julian y Coila, Bernabé y Ruelas, emplearon los cebadores 27f (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492r (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), mientras que Campaña et al, utilizó los primers NS5+GLOM5.8R e ITS4+GLOM1310.

Sin embargo, usaron la misma técnica amplificación: PCR y para la visualización de las bandas emplearon el proceso de electroforesis el cual permite la observación de las moléculas de ADN según el tamaño de sus pares de bases; los resultados de las secuencias de ADN fueron alineados según el programa BLAST del NCBI. Los tres estudios coincidieron en la identificación de *pseudomonas* como bacteria promotora de crecimiento vegetal.

Clavijo et al. (2012), Condori et al. (2019), Liceta (2015), García, Solís y Llacsá (2016), analizaron la presencia de microorganismo en la rizosfera del suelo, Liceta y García, Solís y Llacsá, obtuvieron en el aislamiento y caracterización de diversos géneros bacterianos, teniendo en común la bacteria *Pseudomonas*, por el contrario, Clavijo, et al y Condori, et al, identificaron géneros bacterianos distintos a los mencionados anteriormente. Sin embargo, todos concuerdan que las bacterias identificadas en la rizosfera del suelo, son agentes que contribuyen como bioestimulantes para el crecimiento de las plantas.

García (2020), Chumpitaz (2015) y Corrales, et al (2020), determinaron el potencial de las bacterias con la capacidad de promover el crecimiento y fijar el nitrógeno en las plantas; para ello seleccionaron las bacterias con mayor eficiencia para la fijación de nitrógeno, García, García y Mogollón y Chumpitaz, reconocieron diversos géneros, de los cuales *Pantoea* y *Erwinia* se utilizaron en ambas investigaciones, mientras tanto, Corrales, et al, trabajó con géneros distintos a los mencionados anteriormente. No obstante, la conclusión a la que

llegaron todos es que dichas bacterias presentan capacidades de captación de nitrógenos y solubilidad en fosfato.

Las bacterias se definen como seres unicelulares y procariotas (carecen de membrana celular), su tamaño oscila entre 0,2µm y 50µm, a comparación a los virus, estas solo contienen un solo ácido nucleico; dicho organismo cumplen un rol indispensable en el ambiente y en la vida de los seres vivos (Fernández et al. 2011, p.7).

Por otro lado, dentro del mundo bacteriano, existen especies que poseen capacidades para aportar y captar nutrientes indispensables en el desarrollo de las plantas, las cuales han sido denominadas promotoras de crecimiento vegetal; Kloepper, 1980 utilizó por primera vez el término de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB), refiriéndose a las bacterias que se colonizan en la rizosfera del suelo y tiene un efecto positivo dentro del crecimiento de las plantas.

Existen métodos para determinar si la bacteria pertenecen al grupo de PGPB, entre ellos tenemos: la producción de ácido acético, la solubilización de fosfato y la fijación de nitrógeno, que facilitan desarrollo de las plantas, esto se ve reflejado en la vigorosidad de la planta, en el volumen de las hojas, el enraizamiento de la planta y en la mitigación de organismos patógenos que dificultan el crecimiento vegetal (Benjumeda 2017, p.8).

Tabla 1. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

PGPB	Medio de procedencia
<i>Azospirillum sp.</i>	Rhizosphere
<i>Azoarcus sp.</i>	Endophyte
<i>Azotobacter sp.</i>	
<i>Bacillus pumilus</i>	Rhizosphere
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Burkholderia sp.</i>	
<i>Gluconacetobacter sp.</i>	Endophyte
<i>Herbaspirillum sp.</i>	

Fuente: Benjumeda, 2017, p.9

Dentro de las PGPB destaca el género *Bacillus*, el cual pertenece a la familia *Bacillaceae* y la división filo Firmicutes; además está formado por

microorganismo Gram positivos, anaerobios o aerobio facultativos y con catalasa positiva. Sus células pueden ser bastones o filamentos esféricos, rectos o curvos, con o sin esporas con un tamaño aproximado de 0,5 a 2,5 µm x 1,2-10 µm; el hábitat donde se encuentra ampliamente es en el suelo (Ákos, 2019 y Cuervo, 2010).

La bacteria utilizada para la investigación es la especie *Bacillus Subtilis*, dicha bacteria es aeróbica, Gram positiva y con células en forma de bastoncitos que pueden llegar a medir 2 a 6 µm de largo y 1 µm de diámetro; la temperatura óptima para el crecimiento varia de 30 a 35°C, sin embargo, puede habitar a una temperatura de 55° a 70° C (Errington y T van der, 2020).

Dicha especie es una candidata muy eficiente para el crecimiento vegetal debido a que mejora la disponibilidad de nutrientes, ya que permite fijar el nitrógeno atmosférico, solubiliza el fósforo y acidifica la rizosfera para aumenta las concentraciones de hierro. Asimismo, otra de características particulares que posiciona al *B. subtilis* como una PGPB es la alteración de la homeostasis de la hormona de crecimiento, promoviendo la división celular y el crecimiento de las plantas (Blake, Nordgaard y Kov, 2021).

La planta utilizada para el estudio es la especie de algodón nativo *Gossypium barbadense*, la cual crece de forma subespontánea, de tipo arbustivo, se pueden encontrar en los bordes, cercos de campos de cultivos y huertos; esta especie puede ser cultivada como plantas ornamentales y como comerciarles. Asimismo, el MINAM, mediante el estudio se recopilaron datos que permitieron demostrar que el *Gossypium barbadense* es la especie más distribuida e en la costa peruana (71%), mientras que la especie *Gossypium Raimondi* se concentra 4.3% (Ministerio del Ambiente, 2020, p.54)

Tabla 2. Tiempo de floración de especies de algodón peruano.

Especie	Mínimo	Máximo
<i>Gossypium barbadense</i>	38 días	55 días
<i>Gossypium hirsutum</i>	27 días	33 días
<i>Gossypium raimondii</i>	43 días	47 días

Fuente: MINAM, 2020, p.58

Tabla 3. Tiempo de desarrollo por especie.

Especie	Color típico de la fibra	Días a máximo desarrollo de la flor (días)
<i>G. hirsutum</i>	Blanco	29
<i>G. Raimondi</i>	Sin fibra	34
<i>G. barbadense</i>	Blanco	45
	Crema	45
	Pardo	45
	Marrón	45
	lila	45

Fuente: MINAM, 2020, p.62

La caracterización molecular, utiliza marcadores moleculares (ADN, ARN y proteínas) para identificar y estandarizar las características genéticas de células, microorganismos y plantas; asimismo se ha convertido en una herramienta innovadora, que favorece a la búsqueda de soluciones ante problemas ambientales y biológico (Ancizar 2016, p.1)

La reacción en cadena de polimerasa (PCR), es la técnica de la biología molecular que permite la caracterización molecular, la cual fue propuesta por Kary B. Mulis y colaboradores en 1985, dicha técnica se define como la amplificación de pequeños segmentos que contiene diminutas cantidades de ADN, dicho método emplea secuencias cortas de ADN denominados primers, los cuales permiten la replicación en billones de copias de la secuencia en estudio (National Human Genome Research Institute, 2020, parr.1).

Tabla 4. Clasificación de la técnica PCR.

Tipos	Descripción	Aplicación
Estándar	Mediante el empleo del gel de agarosa se puede detectar la amplificación visualizando las regiones pequeñas en número de pares de bases	Detección de un segmento de ADN de manera cualitativa
Anidada	En este proceso el producto de la primera amplificación es utilizado como molde de para realizar otra amplificación.	Detección cualitativa de un segmento de ADN.

Altamente sensible y específico.

In situ	La visualización de la amplificación de las muestras biológicas (secreciones y tejidos) permite la detección de pequeñas cantidades de material genético.
---------	---

Fuente: Angarita, Torres y Díaz (2017, p.6)

III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de investigación

Tipo de investigación: Aplicada

Alvarez (2020, p.6) señala que la investigación aplicada está relacionada con la obtención de nuevos conocimientos que contribuyan a la solución de los problemas de la vida cotidiana. Esta investigación es tipo aplicada ya que se demostró que la mediante la caracterización molecular facilita la identificación de microorganismos (bacterias) presentes en la rizosfera de *Gossypium barbadense*.

Diseño de investigación:

No Experimental

El diseño no experimental se caracteriza por no manipular de las variables, ya que solo se enfoca en la observación de los hechos, fenómenos o situaciones que ya existen en contexto natural (Hernández, Fernández y Baptista, 2014, p.55)

Por tanto, esta investigación es de diseño no experimental, ya que se enfocó en la descripción y obtención de datos e información sobre la caracterización de dichas bacterias.

Transversal descriptivo

El aporte de Hernández, Fernández y Baptista (2014, p.57), señalan que los estudios de naturaleza descriptiva buscan recopilar y medir la información de una variable, basándose en el análisis de conceptos y estudios acerca del fenómeno estudiado.

Por ello la presente investigación es descriptiva, pues se caracterizó molecularmente las bacterias promotoras de crecimiento vegetal presentes en la rizosfera de *Gossypium barbadense*.

3.2. Variables y Operacionalización

La variable del proyecto de investigación:

X1: Caracterización molecular de las bacterias promotoras de crecimiento.

3.3. Población (incluir criterios de selección), muestra, muestreo, unidad de análisis

La población estudiada en la investigación son las bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Muestra

Está determinada por la especie *B. subtilis* presente en el *Gossypium barbadense*.

Muestreo

Se realizó un muestreo probabilístico estratificado.

Unidad de análisis

Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (*B. subtilis*) presentes en el *Gossypium barbadense*.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.

En la primera etapa del desarrollo de la investigación se utilizó el análisis documental, donde se realizó la revisión de trabajos previos relacionados con investigaciones o estudios acerca de la caracterización molecular de bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Dulzaides y Molina (2004, p.4) señala que el análisis documental es una técnica que busca describir y analizar la bibliografía consultada para unificarla sistemáticamente permitiendo su traducción, extracción, la anotación, generando nuevos conocimientos y posturas acerca de un tema ya estudiado.

En la siguiente etapa mediante la observación experimental permitió registrar datos obtenidos en la etapa de experimentación para contrastarlos con la realidad estudiada.

Jiménez (2020, p.12) afirma que la observación no solo se basa en visualizar cualquier situación que suceda en función a los objetivos o problemática establecida, sino que se constituye en una técnica eficaz como registro de documentación, la cual permite al investigador recopilar y suministrar datos de interés a la realidad estudiada.

Instrumento de recolección de datos

La investigación empleó la ficha de análisis como instrumento para la recolección de datos, permitiendo organizar la información reunida sobre el tema de investigación. Asimismo, se empleó la ficha de registros de datos o bitácora, donde se plasmaron los procesos y resultados obtenidos en la fase experimental de la investigación.

Hernández, Fernández y Baptista (2014, p.64), manifiesta que la finalidad de las fichas de análisis es registrar, acopiar y constatar la información y datos recopilados en las bases de datos de revistas y libros.

3.5. Procedimiento

Después de haber planteado nuestra problemática, se aplicó la técnica de análisis documental, para recopilación de la información se consultó diversas bases de datos, repositorios y páginas web sobre la temática abordada.

La fase de experimentación se detalla a continuación:

1. Aislamiento de las especies bacterianas de la rizosfera
Se recolectaron 5 muestras (100 gramos c/u) de cinco diferentes colores de la planta *Gossypium barbadense*, seguido de ello se tamizó y pesó 1 g para realizar dos ensayos del método de diluciones seriadas para aislar los microorganismos presentes en la rizosfera del *Gossypium barbadense*
 - a) Diluciones seriadas con agua estéril.

En este método se realizó cinco repeticiones de cada una de las muestras, pero no se obtuvo crecimiento de microorganismo durante 48 horas

b) Diluciones seriadas con caldo nutritivo.

Siguiendo la misma metodología se inoculó las muestras y luego de 48 horas se obtuvo crecimiento de bacterias.

Se inocularon las veinte y cinco repeticiones en placas Petri con agar nutritivo, a una temperatura de 35°C durante 48h, después del tiempo transcurrido se observó crecimiento de colonias bacterianas.

2. Identificación de las especies bacterianas

2.1. Tinción Gram

Es una técnica desarrollada por Hans Christian Gram en 1880, cuyo fundamento se basa en la tinción que se realiza sobre las bacterias, clasificándolas en Gram positivas (color violeta) y Gram negativas (color rojo). Dicha tinción consta de 4 pasos primordiales: tinción (cristal violeta), fijación (lugol), decoloración (alcohol acetona) y contratinción (Safranina).

2.2. Observación en el microscopio.

Se observó en el lente número 100 las colonias aisladas de la especie bacteriana.

2.3. Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas determinan las características metabólicas de las bacterias, para ello se realizaron pruebas de catalasa, reducción de nitratos, citrato de Simmons, producción de gas, fermentación de glucosa, producción de ácido sulfhídrico, pH, posición de la espina y urea.

2.4. Producción de indol (ácido indolacético -AIA)

Mediante el método de producción de indol, se determinó si la bacteria estudiada forma parte del conjunto de microorganismos promotores de crecimiento vegetal, por ello se comparará con las cepas identificadas su capacidad de producción de la auxina AIA.

3. Incubación.

En este paso se sembró la bacteria identificada en viales para evitar la contaminación de las colonias en las placas y con el fin de obtener la cepa pura de la especie bacteriana estudiada.

4. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se empleó el kit Promega, en cual se detalla el protocolo y los reactivos utilizados en dicha etapa (Anexo 03)

5. Amplificación de ADN por PCR

En esta fase, se realizó una búsqueda de literatura, con la finalidad de determinar los ciclos y la temperatura óptima para el trabajo del termociclador equipo utilizado para PCR; asimismo se recopilará información para identificar los primers o cebadores que se utilizarán en la amplificación de ADN.

6. Visualización de las bandas, mediante el proceso de electroforesis.

Luego de la amplificación, se utilizará el proceso de electroforesis en gel de agarosa, el cual se corren los fragmentos de ADN depositados en pozos y por acción de la corriente que se aplica al gel, estas moléculas migran y se desplaza por el gel del polo negativo hacia el positivo, permitiendo su visualización según se pesó de sus bandas.

7. Contrastar el nivel de promoción de crecimiento vegetal en la etapa de germinación de la semilla de *Gossypium barbadense*.

Con la aplicación de dos experimentos en el cual a una de las semillas estarán inoculadas con agua normal y la otra esta inoculada por la bacteria *B. subtilis*, se evaluarán la promoción de crecimiento vegetal y la eficacia de dichos microorganismos.

Asimismo, se desarrolló un flujograma (Anexo 2), con un enfoque general de las etapas y proceso para la caracterización molecular de las bacterias.

3.6. Método de análisis de datos.

El desarrollo de la investigación se empleó trabajos previos, ya sean artículos y libros; lo que permitió construir el estado de arte de la investigación para luego establecer los marcos conceptuales y explicativos en el marco teórico de la investigación.

Asimismo, la revisión de artículos sobre el tema abordado, proporcionó datos acerca de los métodos, reactivos y materiales que se ha utilizado en otros estudios similares a la temática abordada. También se utilizó el programa Gen Bank, donde se encuentran registrados los códigos genéticos de cada organismo vivo.

3.7. Aspectos éticos

En el proyecto de investigación se ha teniendo en cuenta los principios de ética estipulados en el código de ética de la Universidad César Vallejo; cumpliendo con los principios de autonomía, respeto a la propiedad intelectual, competencia profesional y científica. Asimismo, cumplimos con la política de antiplagio y derechos del autor.

Cabe señalar que el proceso práctico de la investigación se ejecutó por los investigadores, permitiendo registrar los datos obtenidos en los procedimientos determinados por los objetivos preestablecidos.

Por ello, mediante estos principios se demostró la veracidad de nuestra investigación, el respeto y reconocimiento de los autores citados en el desarrollo de la temática abordada.

IV. RESULTADOS

Bacterias promotoras de crecimiento aisladas e identificadas de la rizosfera del *Gossypium barbadense* del arboreto de la UCV.

Aislamiento

Se recolectaron 5 muestras (100 gramos c/u) de cinco diferentes colores de la planta *Gossypium barbadense*, seguido de ello se tamizó y pesó 1 g para realizar dos ensayos del método de diluciones seriadas para aislar los microorganismos presentes en la rizosfera del G.B (Anexo 03).

a) Diluciones seriadas con agua estéril.

En este método se realizó cinco repeticiones de cada una de las muestras, pero no se obtuvo crecimiento de microorganismo durante 48 horas.

b) Diluciones seriadas con caldo nutritivo.

Siguiendo la misma metodología si inoculo las muestras y luego de 48 horas se obtuvo crecimiento de bacterias, de las cuales se compararon con la muestra patrón y según sus características físicas macroscópica se descartaron las siguientes muestras: M2 y M4 (Anexo 04).

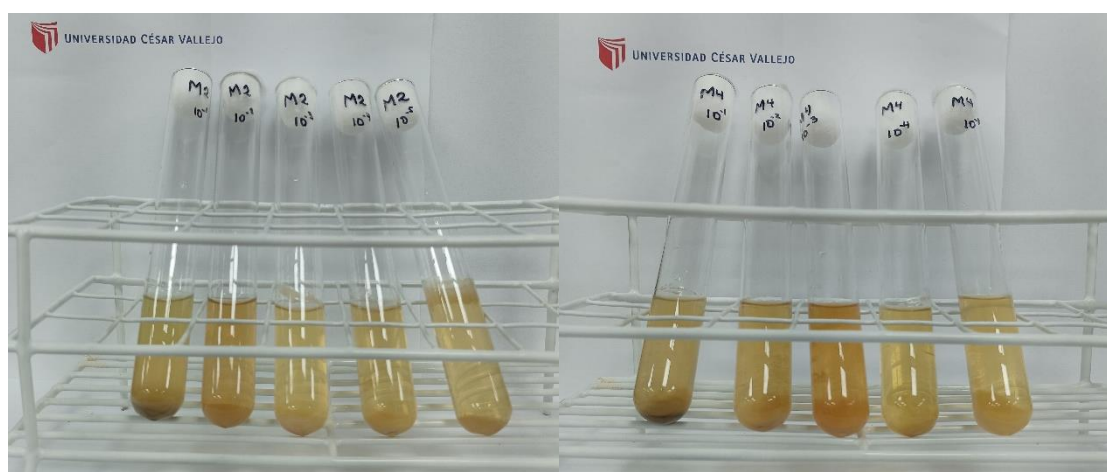


Figura 01: Muestra 2 y 4

Fuente: Elaboración propia

De las muestras seleccionadas se inocularon 11 placas Petri con agar nutritivo y agar TSA, a una temperatura de 35°C durante 48h, después del tiempo transcurrido se observó crecimiento de colonias bacterianas.

Identificación de la especie bacteriana.

Tabla 5. Identificación de microorganismos de la rizosfera de Algodón nativo (G.B).

Código de muestra	Cultivo de procedencia	Medio de Cultivo	Microorganismo
M1_S5-P12	<i>Gossypium barbadense</i>	Agar nutritivo/ Agar Triptona -Soja	<i>Bacillus sp</i>
M2_S3-P6	<i>Gossypium barbadense</i>	Agar nutritivo / Agar Triptona -Soja	<i>Costriduum tetani</i>
M3_S1-P4	<i>Gossypium barbadense</i>	Agar nutritivo / Agar Triptona -Soja	<i>Bacillus (Gram negativos)</i>
M4_S7-P11	<i>Gossypium barbadense</i>	Agar nutritivo / Agar Triptona -Soja	<i>Enterobacteria</i>
M5_S8-P18	<i>Gossypium barbadense</i>	Agar nutritivo / Agar Triptona -Soja	<i>Bacillus Subtilis</i>

Fuente: Elaboración propia

Para determinar que género y especie bacteriana está presente en las muestras aisladas se ejecutaron diferentes pruebas y procedimientos que permiten dicho objetivo.

Tinción Gram

Este método permite identificar a las especies bacterianas según su estructura y el color que se torne nos muestra si son positivas o negativas, según las muestras que se les ha realizado este método se logró identificar especies de *Bacillus gram positivas y gram negativa*, dicha especie pertenece al género *Bacillus*, el cual pertenece a la familia *Bacillaceae* y la división filo Firmicute, dicha especie en gram positiva y aeróbica (Anexo 05).

Luego se efectuaron cinco pruebas bioquímicas permitiendo determinar las características metabólicas de las bacterias estudiadas, un principal indicador es el viraje de color que permite determinar si los resultados son positivo o negativo según la prueba que es sometido los microorganismos.

Tabla 6. Pruebas bioquímicas Urea/Catalasa/Citrato de Simmons

Resultados/Muestra	Catalasa	UREA	Citrato de Simmons
Muestra Patrón	+	+	+
Muestra 5	+	+	+
Muestra 3	+	+	-
Muestra 1	+	+	-

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 06, todas las muestras dieron positivo a la prueba de catalasa, ya que las especies bacterias hidroliza el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, en la prueba de Urea las muestras fueron controladas en tiempos de 24 y 48 horas, donde se obtuvo como resultado que las 3 muestras e incluida la muestra patrón son positivos, debido viraje de color; pero los microorganismos de la muestra patrón y la M5 a diferencia de la M3 y M1, la degradación de UREA es más lenta. (Anexo 06)

En el citrato de Simmons la muestra patrón y la M5 la producción azul es más lenta que las otras dos muestras; esto nos permite determinar que presentan *Bacillus gran positivas*, mientras que en las M3 y M1 contienen *Bacillus gran negativas* (Anexo 06)

Tabla 7. Prueba Bioquímica - Triple Sugar Iron Agar (TSI)

Resultados/Muestra	Pico/Fondo	Producción de gas	Producción de ácido sulfhídrico
Muestra Patrón	Pico alcalino	-	-
Muestra 5	Pico alcalino	-	-
Muestra 3	Pico alcalino	+	+
Muestra 1	Pico alcalino	+	+

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 8 se puede observar que los picos de las muestras son alcalinos con el fondo sin inocular, lo cual se podría decir que estos microorganismos no son fermentadores de azúcar, a la vez se puede identificar que la M3 y M1 son productores de gas y ácido sulfhídrico (Anexo 06).

Tabla 8. Prueba Bioquímica SIM motilidad/Indol

Resultados/Muestra	Motilidad	Indol
Muestra Patrón	Positivo	Positivo
Muestra 5	Positivo	Positivo
Muestra 3	Positivo	Positivo
Muestra 1	Positivo	Negativo

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 08 se muestran los datos que resultaron de las dos pruebas en donde se utilizó el agar SIM y el reactivo Kovasc, esto permitió determinar si las bacterias presentaban movimiento, las 4 muestras sometidas a esta prueba son móviles debido a que producen turbidez en el medio y se extienden más allá de la línea de siembra. En el caso de la prueba indol obtuvimos cepas de indol positivas en la muestra patrón, M5 y M3, esto se debe al color rojo que se torna luego de agregar el reactivo Kovac's (Anexo 07)

Extracción de ADN de la bacteria *Bacillus subtilis*

Aislamiento de ADN genómico de bacterias Gram positivas y Gram negativas
(Anexo 08)

Materiales a ser suministrados por el usuario

- Tubos de microcentrifuga de 1,5ml.
- Baño maría 80°C y 37°C.
- Isopropanol, temperatura ambiente.
- Etanol al 70%, temperatura ambiente.
- Baño de agua, 65°C (opcional para una rehidratación de ADN).
- EDTA 50ml (pH 8) (para bacterias Gram positivas).
- 10mg/ml de lisozima (para bacterias Gram positivas) (Se desarrolló un choque térmico con la finalidad de reemplazar la acción de la lisozima)

Procedimiento

1. Agregue 1 ml de un cultivo de toda la noche a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
2. Centrifugar a 13 000 – 16 000 x g durante 2 minutos para sedimentar las células. Retire el sobrenadante.
3. Resuspender completamente las células en 480µl de EDTA 50 Nm.
4. Agregue las enzimas líticas adecuadas al sedimento celular resuspendido en un volumen total de 120 µl y pipetee suavemente para mezclar. El propósito de este procedimiento es debilitar la pared celular para que pueda tener una lisis celular eficiente.
5. Incube la muestra a 37 °C durante 30 a 60 minutos. Centrifugar durante 2 minutos a 13 000 – 16 000 x g y retirar el flotante.
6. Agregue 600 µl de solución de lisis de núcleos. Pipetear suavemente hasta que las células se vuelvan a suspender.
7. Incubar a 80°C durante 5 minutos para lisar las células; luego enfriar a temperatura ambiente.
8. Agregue 3 µl de solución de ARNasa al lisado celular. Invierta el tubo de 2 a 5 veces para mezclar.
9. Incube a 37°C durante 15 a 60 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.

10. Agregue 200 μ l de solución de precipitación de proteínas al lisado celular tratado con RNasa. Vortex vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos para mezclar la solución e precipitación de proteínas con el lisado celular.
11. Incube la muestra en hielo durante 5 minutos.
12. Centrifugar a 13 000 – 16 000 x g durante 3 minutos.
13. Transfiera el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo limpio de 1,5 ml que contenga 600 μ l de isopropanol de temperatura ambiente.
14. Mezcle suavemente por inversión hasta que las hebras de ADN parecidas a hilos formen una masa visible.
15. Centrifugar a 13 000 – 16 000 x g durante 2 minutos.
16. Retire con cuidado el sobrenadante y escurra el tubo sobre papel absorbente limpio. Agregue 600 μ l de etanol al 70% a temperatura ambiente e invierta suavemente el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN.
17. Centrifugar a 13 000 – 16 000 x g durante 2 minutos. Aspirar con cuidado el etanol.
18. Drene el tubo sobre papel absorbente limpio y deje que el sedimento se seque al aire durante 10 a 15 minutos.
19. Guarde el ADN a 2 – 8 °C.

Amplificación del ADN bacteriano con la técnica de PCR

Dentro de la revisión de literatura, se recopiló información de los cebadores o primers que han empleado otros investigadores para amplificar el ADN de *Bacillus Subtilis*; mediante el uso de herramientas digitales e informáticas como In silico PCR amplification y herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) del NCBI, permitió discrepar sobre los cebadores empleados para la amplificación de la muestra de ADN de la especie bacteriana estudiada (Anexo 09).

Tabla 9. Secuencia de primers para *Bacillus Subtilis*.

N°	Título de la investigación	Secuencia de los primers	URL/DOI
1	<i>Bacillus subtilis</i> aislado cepa 330-2 y sus genes antagónicos identificados por PCR de eliminación	27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA G-3') como inverso 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')	DOI:10.1038/s41598-017-01940-9
2	Aislamiento y caracterización de bacilos promotores del crecimiento de plantas endófitas cultivables especies de <i>Mentha longifolia L</i>	27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCA G-3') y 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACT T-3')	http://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/
3	Caracterización funcional y molecular de promotores de crecimiento vegetal Aislados de <i>bacillo</i> de la rizosfera de tomate	27F (5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1494R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')	https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(20)31577-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844020315772%3Fshowall%3Dtrue
4	Bacterias endófitas de nódulos radiculares de <i>Ormosia macrocalyx</i> con potencial como promotores del crecimiento vegetal y actividad antifúngica	D1-5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' and rD1-5'AAGGAGGTGATCCAGCC 3'	http://doi.org/10.22438/jeb/39/6/MRN-693
5	Actividad antifúngica e identificación molecular de cepas nativas de <i>bacillus subtilis</i>	Bsub5F (5'-AAG TCG AGC GGA CAG ATG G-3') y Bsub3R (5'-CCA GTT CCA ATG ACC CTC CCC3')	https://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v50n2/1405-3195-agro-50-02-00133.pdf
6	Evaluación de <i>Brevibacillus brevis</i> como Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal potencial para cultivo de algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>)	27F (5'-AGAGTTTTGATCCTGGCT CAG-3') y cebador inverso 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').	DOI 10.1186/s40064-016-2584-8

7	Caracterización molecular de la microbiota rizosférica nativa de <i>Opuntia ficus-indica</i> y evaluación de los efectos de cepas microbianas aisladas sobre el desarrollo del cactus	NS5+GLOM5.8R e ITS4+GLOM1310	https://erp.untumbes.edu.pe/revistas/index.php/manglar/article/view/65 .
8	Cebadores de oligonucleótidos específicos para la detección de <i>Bacillus subtilis</i> endoglucanasa positivo por PCR	EN1F (103–124 pb) 5'-CCAGTAGCCAAGAATGGCC AGC-3', EN1R (1413–1393 pb) 5'-GGAATAATCGCCGCTTGTG C-3')	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4162904/

Fuente. Elaboración de la revisión de literatura.

En la tabla 09, se ha organizado los datos extraídos de los artículos revisados con la finalidad de poder basear los cebadores, para determinar que secuencia genética de primers es la adecuada para ser usada en la amplificación del ADN de *B.subtilis*.

Producto de la amplificación de ADN de *B. subtilis*.

En la investigación se empleó la técnica de electroforesis en gel de agarosa para la visualizar las muestras de ADN de *B. subtilis* amplificadas, para ello se preparó el gel de agarosa, luego fue vertido en pocillo de electroforesis en donde se colocaron las muestras amplificadas para ser corridas, el resultado de dicha técnica se muestra a continuación

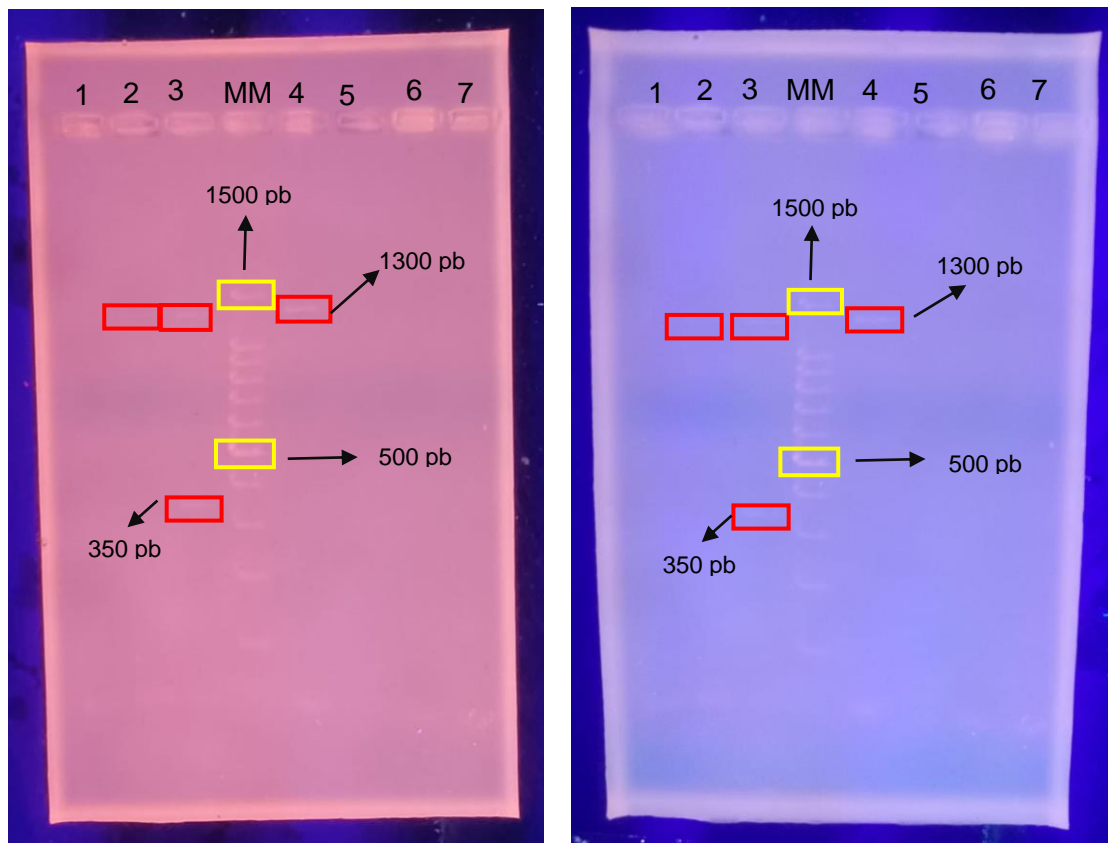


Figura 02: Gel en agarosa corridos en la electroforesis.

Fuente: Elaboración propia

En las figuras se observan las bandas amplificadas del marcador molecular (MM) y de las muestras estudiadas; la escala que presenta MM es 100 en 100 pares bases (pb), esto permite comparar las bandas amplificadas de las muestras y conocer el peso molecular de estas. Para la lectura de las bandas se utilizó la aplicación Gel Analizer, obteniendo como resultado que el carril 3 ($MP 10^{-2}$), el carril 4 ($M5 10^{-5}$) y el carril 2 ($M5 10^{-1}$) fueron las muestras que se visualizaron bandas y que al momento de proyectar se pudo reconocer que cuentan con un peso molecular de 1300 pb ($MP 10^{-2}$ / $M5 10^{-5}$ / $M5 10^{-1}$), también se puede observar en la parte inferior

una banda de 350 pb la cual pertenece a un producto inespecífico que logró ser amplificado en el proceso de PCR (Anexo 10).

Contrastación del nivel de promoción de crecimiento vegetal.

Como parte del estudio del *B. Subtilis* en el *Gossypium barbadense* se realizó un análisis fisicoquímico del suelo del arboreto, para conocer los niveles en los que están los parámetros como pH, sólidos totales disueltos, conductividad entre otros; asimismo se determinó en un experimento la capacidad de dicho *bacillus* para germinar la semilla del *Gossypium barbadense* (Anexo 11).

Tabla 10. Caracterización fisicoquímica del suelo del arboreto de algodón nativo.

Parámetros	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
pH	7.76	8.11	8.33	7.96	7.94
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	525.5	304	251	705	357
Demanda de Oxígeno (ppm)	15.8	13.18	13.67	12.5	13.40
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	17.31	18	18.24	20.31	20.16
Salinidad (PSU)	0.255	0.145	0.12	0.35	0.175
Sólidos Totales Disuelto (ppm)	263	151.5	125.5	352	179

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 10, se muestra los de los parámetros medidos en el análisis fisicoquímico, todas las muestras presentan un pH neutro y ligeramente alcalino, ya que los valores oscilan entre 7.6 y 8.3; asimismo la conductividad eléctrica de las muestras está por debajo el nivel recomendado ($1\text{ds}/\text{m}^{-1}$) por lo que se demuestra que presentan una conductividad baja en el suelo analizado.

Tabla 11. Promoción de crecimiento vegetal hasta la etapa de germinación.

Control de Germinación						
Color de la semilla	Días	3d.	6d.	9d.	12d.	15d.
Pardo Oscuro	Semilla inoculada agua.	Ruptura de la semilla	Abrió la semilla	Empezó a brotar	Presencia de pequeñas hojas	Brote de raíz
	Semilla inoculada la bacteria patrón.	Abrió la semilla	Empezó a brotar	Presencia de pequeñas hojas	Crecimiento de hojas	Brote de raíz
	Semilla inoculada con la cepa identificada.	Abrió la semilla	Empezó a brotar	Presencia de pequeñas hojas	Crecimiento de hojas	Brote de raíz
Pardo Claro	Semilla inoculada agua.	Nada	Ruptura de la semilla	Empezó a brotar	Presencia de pequeñas hojas	Brote de raíz
	Semilla inoculada la bacteria patrón.	Abrió la semilla	Empezó a brotar	Presencia de pequeñas hojas	Crecimiento de hojas	Brote de raíz
	Semilla inoculada con la cepa identificada.	Abrió la semilla	Crecimiento de abertura	Empezó a brotar	Presencia de pequeñas hojas	Brote de raíz
Chocolate	Semilla inoculada agua.	Nada	Ruptura de la semilla	Empezó a brotar	Presencia de pequeñas hojas	Brote de raíz
	Semilla inoculada la bacteria patrón.	Nada	Abrió la semilla	Empezó a brotar	Presencia de pequeñas hojas	Brote de raíz

	Semilla inoculada con la cepa identificada.	Nada	Abrió la semilla	Empezó a brotar	Presencia de pequeñas hojas	Brote de raíz
	Semilla inoculada agua.	Nada	Nada	Abrió la semilla	Empezó a brotar	Presencia de pequeñas hojas
Marrón	Semilla inoculada la bacteria patrón.	Nada	Ruptura de la semilla	Empezó a brotar	Presencia de pequeñas hojas	Brote de raíz
	Semilla inoculada con la cepa identificada.	Nada	Ruptura de la semilla	Empezó a brotar	Presencia de pequeñas hojas	Brote de raíz
	Semilla inoculada agua.	Ruptura de la semilla	Ruptura de la semilla	Empezó a brotar	Presencia de pequeñas hojas	Brote de raíz
Blanco Arena	Semilla inoculada la bacteria patrón.	Nada	Abrió la semilla	Empezó a brotar	Presencia de pequeñas hojas	Brote de raíz
	Semilla inoculada con la cepa identificada.	Nada	Abrió la semilla	Empezó a brotar	Presencia de pequeñas hojas	Brote de raíz

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 11 se detalla el control de la germinación de las semillas con un periodo de 15 días de las cuales se les realizó un monitoreo cada 3 días, dando como resultado que la gran mayoría de las semillas inoculadas con la bacteria germinaron en menor tiempo a comparación de las semillas inoculadas con agua.

V. DISCUSIÓN

En la investigación de Ñacato y Valencia (2016) y Astorga et.al (2013) aislaron el *B. subtilis* de la rizosfera del suelo en campos de cultivo de brócoli, desarrollaron el método de diluciones seriadas y utilizaron un medio de cultivo de PCA enriquecido con bromocresol en el caso de Astorga usó agar nutritivo y la temperatura de incubación fue de 28°C, mientras que Ñacato y Valencia incubaron a 37°C en un lapso de tiempo de 48 horas. Por el contrario Méndez (2017) y Flores y Roque (2017) asilaron la bacteria *B. Subtilis* de bioinsumos comerciales, desarrollando el mismo método de diluciones seriadas y empleando los medios de cultivo mencionados en las investigaciones anteriores.

En nuestra investigación se emplearon los pasos y procedimientos de ambos estudios, pues desarrollamos el método de diluciones seriadas con agua estéril como las investigaciones mencionados, no obstante, utilizamos caldo nutritivo, pues no obtuvimos resultados positivos con la dilución con agua estéril, además el caldo nos permitió tener una mayor certeza en el crecimiento de microorganismos antes de ser inoculados a las placas con los medios de cultivo seleccionados; asimismo los medios de cultivo que se utilizó para el aislamiento fueron Agar Plate Count (PCA) y Agar Nutritivo sin ser enriquecido por ninguna solución, el tiempo y temperatura de incubación fue de 37°C por 48h.

Después del tiempo de incubación se pudo observar el crecimiento de *B. subtilis*, *Enterobacteria* y cocos, teniendo en cuenta las características macro y fonológicas de dichas bacterias; sin embargo, se monitorio a las 24 h de a ver sido sembradas y se realizó un control de calidad de los medios de cultivo antes de inocular la muestra para eliminar agentes contaminantes presentes en las placas que dificultaría la identificación de la bacteria estudiada.

En la etapa de identificación de la bacteria aislada se siguieron las técnicas básicas de microbiología una de ellas fue la tinción Gram, ya que mediante el uso de reactivos como cristal de violeta, lugol, decolorante y safranina permiten la visualización de los micoorganismos aislados, entre ellos identificamos que la muestra 1 presentaba colonias de *Enterobacteria*, muestras 2 y 4 se evidenció el crecimiento de *Clostridium tetani*. Las muestras 3 y 5 presencia de *bacillus sp* y *bacillus subtilis* respectivamente, todas las muestras se observaron en el lento

Nº100X y con ayuda de aceite de inmersión. Luego de ello, se comparó con la literatura citada, donde se manifiesta que el *B. Subtilis* es una bacteria Gram positiva, esporulada y de forma de bastones, características que pudieron ser observadas en el microscopio.

Por otro lado, existen pruebas a las que se someten a los microorganismos para conocer su metabolismo y las sustancias o compuestos químicos que son capaces de degradar y las enzimas que pueden producir, en nuestra investigación se realizaron cinco pruebas bioquímicas (Urea, citrato de Simmons, SIM motilidad, TSI, Catalasa), las cuales fueron comparadas con los resultados que obtuvo de la muestra patrón, siendo la muestra 5 la que mayor similitud presentó con respecto al indicador de color que mostraron dichas pruebas.

Alaylar (2022), Kalam, Basu y Podile (2020) y Rahman et al. (2018), realizaron la prueba de producción de ácido indolacético, ya que dicha auxina cumple un rol indispensable para el crecimiento de la planta, de igual manera Nehra, Singh y Choudhary (2016), Szilagyi et al. (2014) y Hernández et, al (2018) utilizaron dicha prueba para determinar si el bacillus pertenecían al grupo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal; de la misma forma para determinar si la bacteria de estudio es promotora del crecimiento vegetal se realizó la prueba de indol.

Para la caracterización molecular de la bacteria estudiada se consultó y recopiló información útil de artículos científicos, para poder seleccionar el kit adecuado para la extracción de ADN de *B. Subtilis*; asimismo permitió determinar los cebadores o primers, las temperaturas y ciclos adecuados para lograr una óptima amplificación en PCR de las muestras de ADN de *B. subtilis*. Cabe señalar que en la mayoría de artículos consultados no mencionan el kit de extracción que han empleado para la extracción.

Para la detección de los primers se emplearon herramientas tecnológicas como PCR in silico, BLAST de NCBI, donde se consultaron en su base de datos si los cebadores a utilizar en la investigación eran óptimos para la amplificación de ADN de *B. subtilis*; para ello se realizó un ensayo de las secuencias genéticas de los primers en dichos programas para comprobar si eran capaces de amplificar la secuencia de ADN de interés.

Los primers utilizados en los estudios de Ahmad et.al (2017), Alaylar (2022), Kalam, Basu y Podile (2020), Rahman et al. (2018), Nehra, Singh y Choudhary (2016) fueron el 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y el 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), dichos cebadores son considerados universales, pues son utilizados para amplificar cualquier muestra de ADN de bacteria. Por el contrario Campaña et al, empleó los primers NS5+GLOM5.8R e ITS4+GLOM1310 los cuales permitieron la amplificación de muestras de ADN de *pseudonoma*.

Sin embargo, en nuestra investigación no se optaron por dichos primers, ya que no son específicos para el *B.subtilis*, provocando que aumente el margen de error al amplificar; por ende, se utilizaron los cebadores EN1F (103–124 pb) 5'-CCAGTAGCCAAGAATGGCCAGC-3', EN1R (1413–1393 pb) 5'-GGAATAATCGCCGCTTGTGC-3') de la investigación de Ashe et al. (2014), ya que las secuencias genéticas de los cebadores son específicas para la detección de *Bacillus Subtilis*.

Cabe señalar que las investigaciones anteriormente mencionadas realizaron el método de PCR convencional para amplificar sus muestras de ADN, en nuestro caso desarrollamos una variante en la PCR, la cual se denomina touch down, este tipo de PCR permite una mayor especificidad en la amplificación, además asegura que los cebadores no amplifiquen secuencias genéticas no específicas.

Luego de la amplificación de ADN se realiza el proceso de electroforesis en gel de agarosa, el cual nos permite visualizar las bandas en un corrido de ADN sobre este gel, en las investigaciones de Ahmad et.al (2017), Alaylar (2022), Kalam, Basu y Podile (2020), Rahman et al. (2018), Nehra, Singh y Choudhary (2016), Coila, Bernabé y Ruelas (2021) señalan que la concentración de gel de agarosa debe oscilar entre 1.5 a 2%, en nuestro caso preparamos el gel a la concentración de 2% y 3% lo que facilitó la visualización de las bandas.

En la investigación se emplearon dos tipos de marcadores molecular el del kit promega (100bp DNA ladder) y el Bench top ladder, cuya función es estimar el peso molecular de las proteínas en la separación electroforética; el marcador 100bp DNA tubo una menor visualización en el gel de agarosa a comparación del Bench top el cual se mostró de manera más nítida las escalas de proteínas facilitando un mejor

reconocimiento y valoración de los pares de bases de las muestras previamente amplificada.

El resultado de la amplificación de las muestras estudiadas visualizadas en el gel de agarosa al 3%, facilitó la lectura de los pesos moleculares de las bandas, obteniendo que MP 10^{-2} , M5 10^{-5} y M5 10^{-1} presentan un peso molecular 1300 pb, a comparación Ashe (2014) que en su investigación utilizaron los mismo cebadores consiguieron un producto de amplificación con un peso molecular de 1311 pb, cabe señalar que los 11 pb de diferencia se debe a los distintos marcadores molecular que se han utilizado al momento de correr el ADN en gel de agarosa.

En la comparación de la germinación de las semillas inoculadas con agua y con la solución de bacterias se pudo diferenciar que no todos los colores han logrado germinar al ser inoculadas con la bacteria; las semillas de color marrón demoraron en abrir aun estando inoculadas con el *B. Subtilis*, a diferencia del pardo oscuro donde a los 3 días se pudo observar una ruptura en la semilla dando paso al primer brote de la planta.

No obstante, el color blanco arena existió una particularidad donde la semilla inoculada con agua rompió a los 03 días, mientras que las semillas con la bacteria *B. Subtilis* demoraron en romper, pero luego de 05 días las semillas con *B. Subtilis* empezó el proceso de germinación. Por último, de los cinco diferentes colores de semillas el que mejor se comportó fue el pardo oscuro, pues mostró una mejor respuesta con el inoculo de la bacteria.

VI. CONCLUSIONES

1. La bacteria estudiada *B. subtilis* se aisló de la rizosfera del *Gossypium barbadense* del arboreto de la UCV, para ello se desarrolló el método de diluciones seriadas como se señala en la investigación, con la finalidad de observar si existe presencia de bacterias en las muestras extraídas antes de ser inoculadas en placas con los medios de cultivo según las necesidades de la bacteria a encontrar.
2. Se logró identificar mediante métodos microbiológicos una de las especies bacterias correspondía al *Bacillus Subtilis* de acuerdo a sus características tanto fenotípicas y biológicas; mientras que en las demás muestras de suelo se determinó la presencia de *clostridium tetani*, *enterobacteria* y *bacillus sp.* Asimismo, el ensayo de producción de ácido indolacético, determinó si la bacteria estudiada era promotora de crecimiento vegetal, cuyos resultados fueron positivo al *bacillus subtilis*, debido al viraje de color rojo en la parte superior de la muestra.
3. La extracción de ADN del *B. subtilis* se empleó el KIT de extracción promega, mediante el blaseado se logró definir los cebadores (ERN1R-F) adecuados para la amplificación de dicho material genético; asimismo el proceso de electroforesis facilitó la visualización de bandas de las muestras de ADN de *B. subtilis* amplificadas, dando como resultado 1300 pb en la lectura del peso molecular.
4. Finalmente se pudo contrastar el nivel de promoción de crecimiento en la etapa de germinación de la semilla del *Gossypium barbadense*, en un experimento donde se monitorio durante 15 días la germinación de cinco semillas de algodón de diferentes colores, obteniendo que la semilla de color pardo oscuro que fue inoculada con la solución de la bacteria *B. subtilis* germinó en el menor tiempo a comparación de la semilla inoculada con agua del grifo.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar control de calidad a los medios de cultivos previamente antes de ser inoculados con la muestra de bacterias.
2. Para determinar si el cebador a utilizar lograra amplificar la muestra de ADN es necesario realizar un blaseado, con la finalidad de identificar si la secuencia genética será útil o no, para ellos se puede utilizar PCR in silico o BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

REFERENCIAS

ALAYLAR, B., 2022. Isolation and characterization of culturable endophytic plant growth-promoting *Bacillus* species from *Mentha longifolia* L. Turkish Journal of Agriculture and Forestry [en línea], vol. 46, no. 1, pp. 73-82. [Consulta: 23 abril 2022]. ISSN 1300-011X. DOI 10.3906/tar-2109-24. Disponible en: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000754141800003>.

ÁKOS, T. *Bacillus subtilis*. Trends in Microbiology [en línea], vol. 27, no.8, pp. 724-725. [Consulta: 23 agosto 2022]. ISSN 1878-4380. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.008>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0966842X19300721?via%3Dihub>

ALCARRAZ, M., HEREDIA, V. y JULIAN, J., 2019. Cepas bacterianas nativas con actividades promotoras del crecimiento vegetal aisladas de la rizosfera de *Coffea* spp. en Pichanaqui, Perú. Biotecnología Vegetal [en línea], vol. 19, no. 4, pp. 285-295. [Consulta: 23 mayo 2022]. ISSN 2074-8647. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/645>.

ANCIZAR, F., 2016. Evolución en caracterización molecular en procesos de investigación biológica. Revista Colombiana de Biotecnología [en línea], vol. 18, no. 2, pp. 5-5. [Consulta: 23 mayo 2022]. ISSN 1909-8758. DOI 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61559. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/61559>.

ANGARITA, M., TORRES, M. y DÍAZ, A., 2017. Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. Revista Habanera de Ciencias Médicas [en línea], vol. 16, no. 5, pp. 796-807. [Consulta: 24 mayo 2022]. ISSN 1729-519X. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1729-519X2017000500012&lng=es&nrm=iso&tlng=es.

ARAS, S., ARIKAN, Ş., İPEK, M., EŞİTKEN, A., PIRLAK, L., DÖNMEZ, M. y TURAN, M., 2018. Plant growth promoting rhizobacteria enhanced leaf organic acids, FC-R activity and Fe nutrition of apple under lime soil conditions. Acta

Physiologiae Plantarum [en línea], vol. 40, no. 6, pp. 120. [Consulta: 23 mayo 2022]. ISSN 1861-1664. DOI 10.1007/s11738-018-2693-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2693-9>.

ASHE, S., MAJI, U., SEN, R., MONHANTY, S. y MAITI, N. Specific oligonucleotide primers for detection of endoglucanase positive *Bacillus subtilis* by PCR. 3 Biotech [en línea], vol.4, no. 5, pp. 461-465. [Consulta: 23 agosto 2022]. ISSN 2190-5738. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4162904/>

ASTORGA, K., MENESES, K., ZÚÑIGA, C., BRENES, J. y RIVERA, W. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. Tecnología en Marcha [en línea], vol.27, no. 02, pp. 82-91. [Consulta: 23 agosto 2022]. ISSN: 2215-3241. Disponible en: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v27n2/a08v27n2.pdf>

BENJUMEDA, D.M., 2017. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones. [en línea], pp. 44. Disponible en: <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/65140/BENJUMEA%20MU%C3%91OZ%20DANIEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

BLAKE, C., NORDGAARD, C. y ÁKOS, T. Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by *Bacillus subtilis*. Society for Molecular Plant-Microbe Interactions ([en línea], vol.34, no.1, pp. 15-25. [Consulta: 23 agosto 2022]. DOI. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR> Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR#>

CAMPAÑA, J., ALAYA, B., MENDEZ, S., QUEZADA, M., NOUCHI, E., MUNAYA, N., SÁNCHEZ, H., PRADA, E. y MIALHEL, E., 2018. Caracterización molecular de la microbiota rizosférica nativa de *Opuntia ficus-indica* y evaluación de los efectos de cepas microbianas aisladas sobre el desarrollo del cactus. Manglar [en línea], vol. 14, no. 1, pp. 3-11. [Consulta: 18 mayo 2022]. ISSN 1816-7667. Disponible en: <https://erp.untumbes.edu.pe/revistas/index.php/manglar/article/view/65>.

CHUMPITAZ, C.A., 2015. Caracterización de la diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno con capacidad promotora de crecimiento vegetal asociada a una Brassicaceae altoandina, *Lepidium meyenii* Walp. En: Accepted: 2017-07-

26T13:58:46Z, Universidad Nacional Agraria La Molina [en línea], [Consulta: 23 mayo 2022]. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/2695>.

CLAVIJO, C., CHIPANA, V., CENTENO, J., ZÚÑIGA, D. y GUILLÉN, C., 2012. Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea* «olivo» en Tacna Perú. *Ecología Aplicada* [en línea], vol. 11, no. 2, pp. 89-102. [Consulta: 23 mayo 2022]. ISSN 1726-2216. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1726-22162012000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=en.

COILA, P.U.C., BERNABE, J.C.O. y RUELAS, D.A., 2021. Caracterización molecular de bacterias endofíticas de *Elodea potamogeton* ("llachu") del Lago Titicaca. *Manglar* [en línea], vol. 18, no. 3, pp. 289-294. [Consulta: 18 mayo 2022]. ISSN 1816-7667. DOI 10.17268/manglar.2021.038. Disponible en: <https://erp.untumbes.edu.pe/revistas/index.php/manglar/article/view/268>.

CONDORI, S., FERNÁNDEZ, P. y VALDERRAMA, M., 2019. Aislamiento y caracterización de *Streptomyces* spp rizosféricos promotores del crecimiento vegetal. *Idesia (Arica)* [en línea], vol. 37, no. 2, pp. 109-116. [Consulta: 18 mayo 2022]. ISSN 0718-3429. DOI 10.4067/S0718-34292019000200109. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0718-34292019000200109&lng=es&nrm=iso&tlng=p.

CUERVO. J. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Pontificia Universidad Javeriana. [en línea], [Consulta: 23 agosto 2022]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/54683/CuervoLozada,JennyPaola.pdf?sequence=1>

ERRINGTON, J y T VAN DER, L. Perfil microbiano: *Bacillus subtilis* : organismo modelo para el desarrollo celular y caballo de batalla industrial. *Microbiología* [en línea], vol. 165, no. 5, pp. 425-427. [Consulta: 23 agosto 2022]. ISSN 1465-2080.

DOI <https://doi.org/10.1099%2Fmic.0.000922>. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7376258/>

FERNÁNDEZ, A., GARCÍA, C., SÁEZ, J., VALDEZATE, S. y BOU, G., 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [en línea], vol. 29, no. 8, pp. 601-608. [Consulta: 23 mayo 2022]. ISSN 0213005X. DOI 10.1016/j.eimc.2011.03.012. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X11001571>.

FLORES, M y ROQUE, E. Aislamiento y caracterización microbiana (microbiológica y molecular) en la búsqueda de *Bacillus subtilis* a partir de bioinsumos comerciales y pruebas de antagonismo frente a hongos fitopatógenos Universidad Nacional de Ingeniería [en línea], [Consulta: 23 agosto 2022]. Disponible en: <https://ribuni.uni.edu.ni/1745/>

FOSADO, O.F., GARCÍA, J.L.C., OBREGÓN, E.F., GARCÍA, A.T., AGUILAR, R.L. y MUÑOZ, J.M., 2017. Selección de alternativas en el tratamiento de suelos degradados utilizando métodos multicriterio. *La Técnica* [en línea], no. 17, pp. 6-17. [Consulta: 23 mayo 2022]. ISSN 1390-6895, 2477-8982. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6087572>.

GARCÍA, M.F., 2020. Identificación molecular de bacterias con potencial fijador de nitrógeno, asociadas a la rizósfera de *Prosopis pallida* "algarrobo". En: Accepted: 2020-12-17T22:57:07Z, Universidad Nacional de Tumbes [en línea], [Consulta: 29 junio 2022]. Disponible en: [http://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/123456789/repositorio.untumbes.edu.p e/handle/123456789/2197](http://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/123456789/repositorio.untumbes.edu.pe/handle/123456789/2197).

GARCÍA, R., SOLÍS, R. y LLACSA, L., 2016. Rol de los microorganismos activos, aislados de la rizósfera y filósfera en la propagación de las especies forestales *tabebuia chrysantha* y *tabebuia billbergii*, con fines de conservación y explotación comercial. Tumbes - Perú - 2014-2015. En: Accepted: 2018-05-17T16:05:35Z, Universidad Nacional de Tumbes [en línea], [Consulta: 29 junio 2022]. Disponible en:

<http://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/20.500.12874/repositorio.untumbes.edu.pe/handle/20.500.12874/173>.

GONZÁLEZ, A., ALMAR, J., FERRERATO, R., RODRÍGUEZ, M., TABOADA, O., TRINIDAD, A. y ALARCÓN, A., 2017. CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN PLÁNTULAS DE CHILE POBLANO (*Capsicum annuum* L.). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* [en línea], vol. 33, no. 3, pp. 463-474. [Consulta: 23 abril 2022]. ISSN 01884999. DOI 10.20937/RICA.2017.33.03.09. Disponible en: <http://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/RICA.2017.33.03.09/46702>.

GONZÁLEZ, H. y FUENTES, N., 2017. Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista de Ciencias Agrícolas* [en línea], vol. 34, no. 1, pp. 17-31. [Consulta: 23 mayo 2022]. ISSN 0120-0135. DOI 10.22267/rcia.173401.61. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-01352017000100002&lng=en&nrm=iso&tlng=es.

JIMÉNEZ, L., 2020. IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN CUANTITATIVA EN LA ACTUALIDAD. , vol. 4, no. 1,59-68, pp. 59-68. ISSN 2737-6087.

KALAM, S., BASU, A. y PODILE, A.R., 2020. Functional and molecular characterization of plant growth promoting *Bacillus* isolates from tomato rhizosphere. *Heliyon* [en línea], vol. 6, no. 8, pp. e04734. [Consulta: 23 abril 2022]. ISSN 2405-8440. DOI 10.1016/j.heliyon.2020.e04734. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7452486/>.

LEAL, J., GUTIÉRREZ, M., LARES, F., CORTEZ, J. y SANTOS, S., 2018. Microorganismos promotores de crecimiento vegetal con yeso agrícola en papa (*Solanum tuberosum* L.) bajo casa sombra. *Agrociencia* [en línea], vol. 52, no. 8, pp. 1149-1159. [Consulta: 24 mayo 2022]. ISSN 1405-3195. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1405-31952018000801149&lng=es&nrm=iso&tlng=es.

LICETA, M., 2015. Aislamiento y caracterización de Pseudomonas y Bacillus provenientes de la rizósfera de diferentes variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y su uso como potenciales promotoras del crecimiento vegetal. En: Accepted: 2017-07-25T14:30:30Z, Universidad Nacional Agraria La Molina [en línea], [Consulta: 23 mayo 2022]. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/2690>.

MENENDEZ, E. y GARCIA, P., 2017. Plant probiotic bacteria: solutions to feed the world. *AIMS Microbiology* [en línea], vol. 3, no. 3, pp. 502-524. [Consulta: 23 abril 2022]. ISSN 2471-1888. DOI 10.3934/microbiol.2017.3.502. Disponible en: <http://www.aimspress.com/article/10.3934/microbiol.2017.3.502>.

MÉNDEZ, J, FLORES, M Y PÁRAMO, L. Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente hongos Fitopatógenos *Nexo Revista Científica* [en línea], vol. 30, no. 02, pp. 96-100. [Consulta: 23 agosto 2022]. ISSN 1995-9516. DOI <http://dx.doi.org/10.5377/nexo.v30i2.5530>. Disponible en: <https://www.lamjol.info/index.php/NEXO/article/view/5530/5208>

MINISTERIO DEL AMBIENTE, 2018. Perú prioriza medidas para contribuir al manejo sostenible de la tierra. Plataforma digital unica del Estado [en línea]. [Consulta: 23 mayo 2022]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minam/noticias/187438-peru-prioriza-medidas-para-contribuir-al-manejo-sostenible-de-la-tierra>.

MINISTERIO DEL AMBIENTE, 2020. Línea de base de la diversidad del algodón peruano con fines de bioseguridad [en línea]. [Consulta: 23 mayo 2022]. Disponible en: https://bioseguridad.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2021/04/libroalgodon_final_16mb.pdf

NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE, 2020. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | NHGRI. *Genome.gov* [en línea]. [Consulta: 24 mayo 2022]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa>.

NEHRA, V., SINGH, B. y CHOUDHARY, M., 2016. Evaluation of *Brevibacillus brevis* as a potential plant growth promoting rhizobacteria for cotton (*Gossypium hirsutum*) crop. SpringerPlus, vol. 5, pp. 948. DOI 10.1186/s40064-016-2584-8.

ÑACATO, C y VALENCIA, M. Aislamiento, identificación y pruebas in vitro de cepas autóctonas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria* spp en *Brassica oleracea* var.italica, Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito [en línea], [Consulta: 23 agosto 2022]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/12144>

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS, 2015. Desafíos Globales Población [en línea], [Consulta: 23 de mayo 2022]. Disponible en: <https://www.un.org/es/global-issues/population>

PACHÉS, G., María Aguas Vivas, 2020. Degradación de suelos. En: Accepted: 2020-05-07T05:54:32Z [en línea], [Consulta: 23 mayo 2022]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/142676>.

RAHMAN, W., PRINCE, F., HAQUE, E., SULTANA, F., WEST, H.M., MONDOL, A., RAHMAN, Mahbubu, RAHMAN, Mahfuz, CLARKE, M. y ISLAM, T., 2018. Endophytic *Bacillus* spp. from medicinal plants inhibit mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and promote plant growth. Zeitschrift für Naturforschung C [en línea], vol. 73, no. 5-6, pp. 247-256. [Consulta: 23 mayo 2022]. ISSN 1865-7125. DOI 10.1515/znc-2018-0002. Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/znc-2018-0002/html>.

SWAROOP, R., KUMAR, S., DATTA, R., LAL, R., VIJAYAKUMAR, V., BRTNICKY, M., SHARMA, M., YADAV, G., JHARIYA, M., JANGIR, C., PATHAN, S., DOKULILOVA, T., PECINA, V. y MARFO, T., 2020. Impact of Agrochemicals on Soil Microbiota and Management: A Review. Land [en línea], vol. 9, no. 2, pp. 34. [Consulta: 23 mayo 2022]. ISSN 2073-445X. DOI 10.3390/land9020034. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-445X/9/2/34>.

UNION EUROPEA, 2020. Statistics | Eurostat. [en línea]. [Consulta: 23 mayo 2022]. Disponible en: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/es/ip_21_5916.

URGILES, N., AVILA, M., LOJAN, P., ENCALADA, M., HURTADO, L., ARAUJO, S., COLLAHUAZO, Y., GUACHANAMA, J., POMA, N., GRANDA, K., ROBLES, A., SENES, C. y CORNEJO, P., 2021. Plant Growth-Promoting Microorganisms in Coffee Production: From Isolation to Field Application. *Agronomy-Basel* [en línea], vol. 11, no. 8, pp. 1531. [Consulta: 23 abril 2022]. DOI 10.3390/agronomy11081531. Disponible en: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000688590100001>.

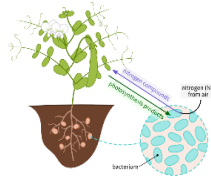
ANEXOS

Anexo 01.Operacionalización de las variables

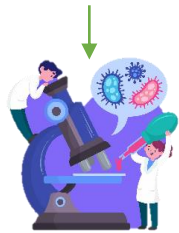
Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Ítems	Escala de medición
Caracterización Molecular de Bacterias Promotoras de crecimiento vegetal	Es una serie de técnicas que permite utilizar los marcadores moleculares (ADN, ARN y proteínas) para identificar y estandarizar las características genéticas de células, microorganismos y plantas; asimismo se ha convertido en una herramienta innovadora, que favorece a la búsqueda de soluciones ante problemas ambientales y biológico (Ancizar, 2016).	Para realizar la caracterización molecular, se utilizará la técnica de PCR, la cual permite la amplificación del ADN de las BPCV, posterior a ello, se realizará el proceso de electroforesis, lo que nos facilitará conocer los números de pares de bandas para cada muestra analizada.	Extracción	Formación de colonias (UFC)		Razón
			Amplificación Y Visualización (electroforesis)	Caracterización de propiedades de la banda en el gel de agarosa		Nominal
			Comparación de secuencias genéticas	Pares de bases (Pb) [A-T,C-G]		Ordinal

Anexo 02. Flujograma

Caracterización Molecular de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de *Gossypium barbadense*.



Aislamiento las bacterias de la rizosfera del *Gossypium barbadense*.



Identificar los géneros bacterianos por medio de Tinción Gram

Caracterización molecular de las bacterias

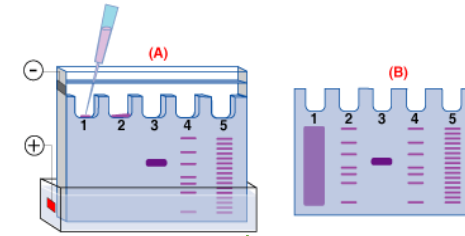
Visualización de bandas



Amplificación de ADN por PCR



Extracción de ADN



Contrastar el nivel de promoción de crecimiento



Anexo 03. Toma de muestra de suelo de la rizosfera del *Gossypium barbadense*.




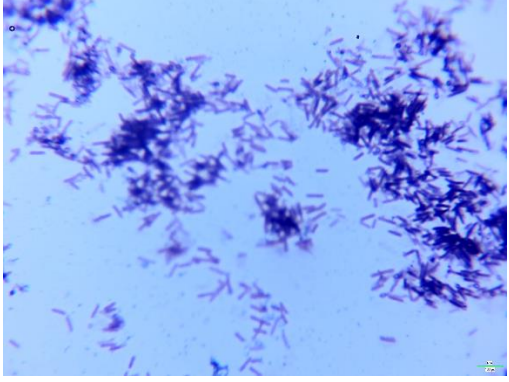



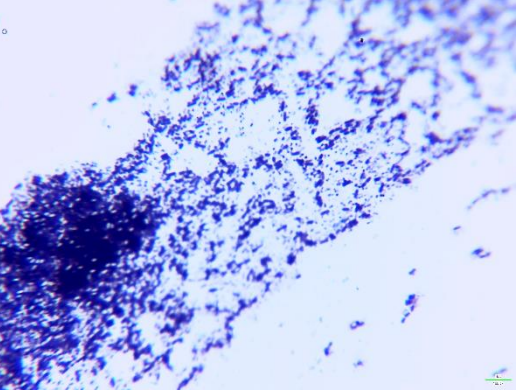
Toma de muestra en el arboreto de la Universidad César Vallejo.

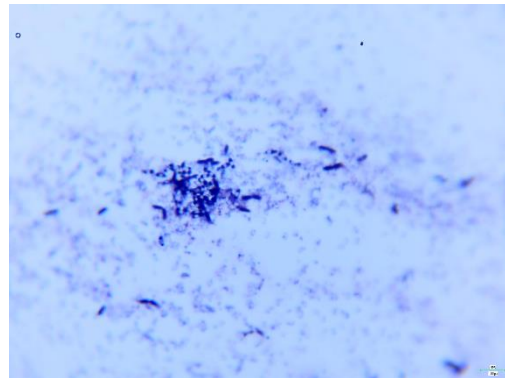
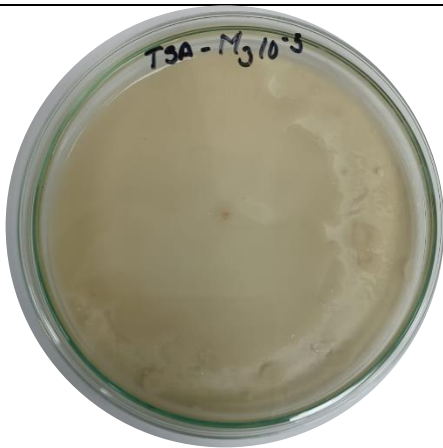
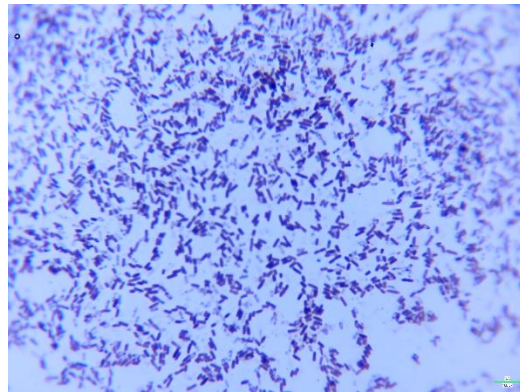
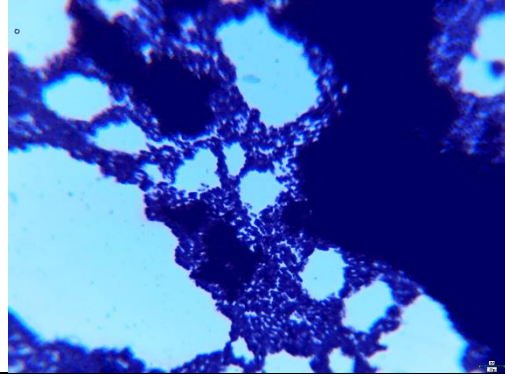
Anexo 04. Aislamiento de la bacteria de interés.



Diluciones seriadas de las muestras recolectadas.

Anexo 05. Identificación de la especie bacteriana aislada.

Muestra	Tinción Gram
	
	
	



Fuente: Elaboración propia

Anexo 06. Pruebas Bioquímicas

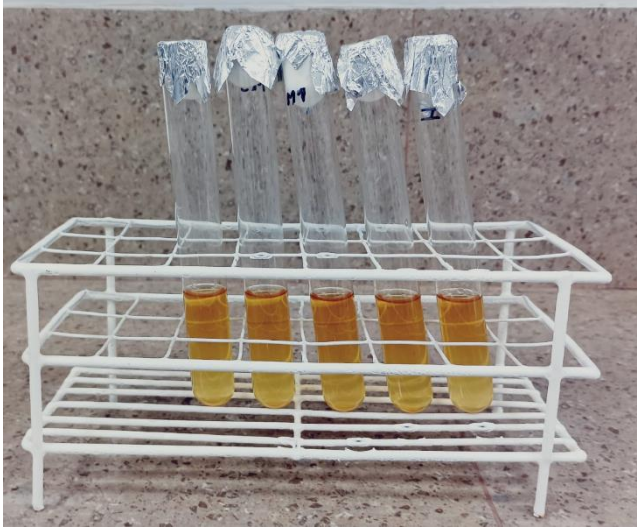


Comparación de los resultados de las pruebas bioquímicas entre la muestra patrón y la muestra 05



Resultados de las pruebas bioquímicas (Urea/Citrato de Simmons/TSI)

Anexo 07.Prueba de SIM movilidad/Indol

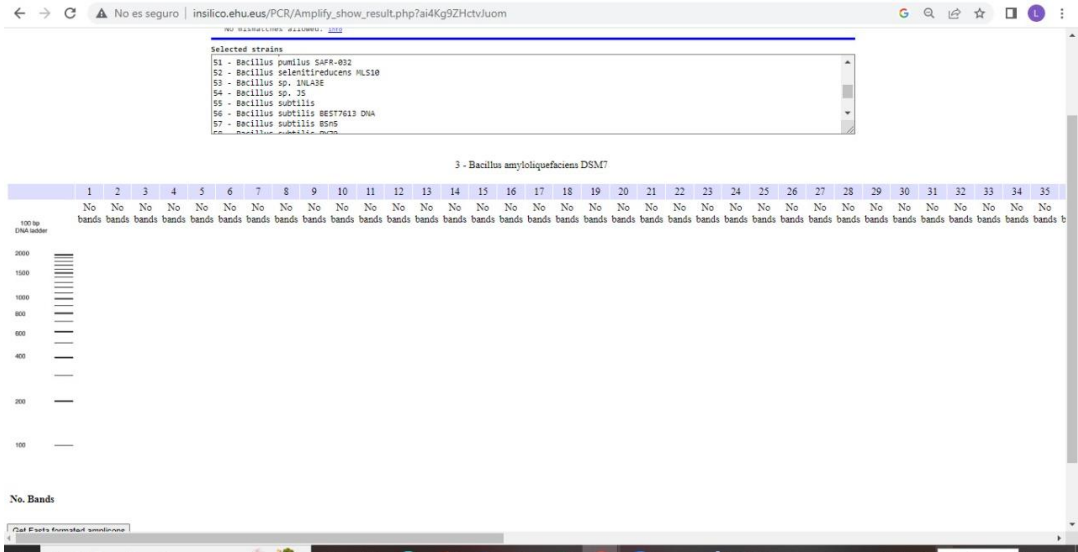


Anexo 08. Extracción de ADN



Extracción de ADN de *Bacillus subtilis*.

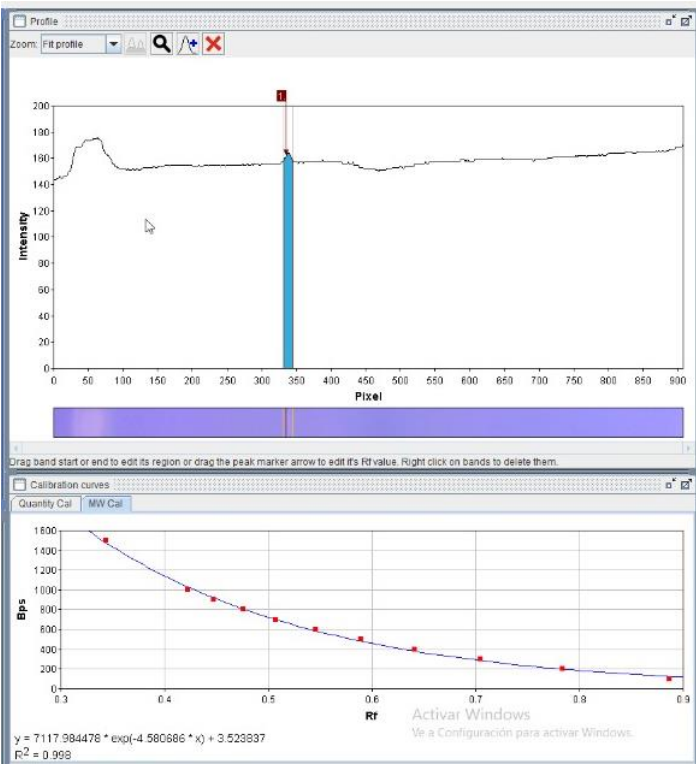
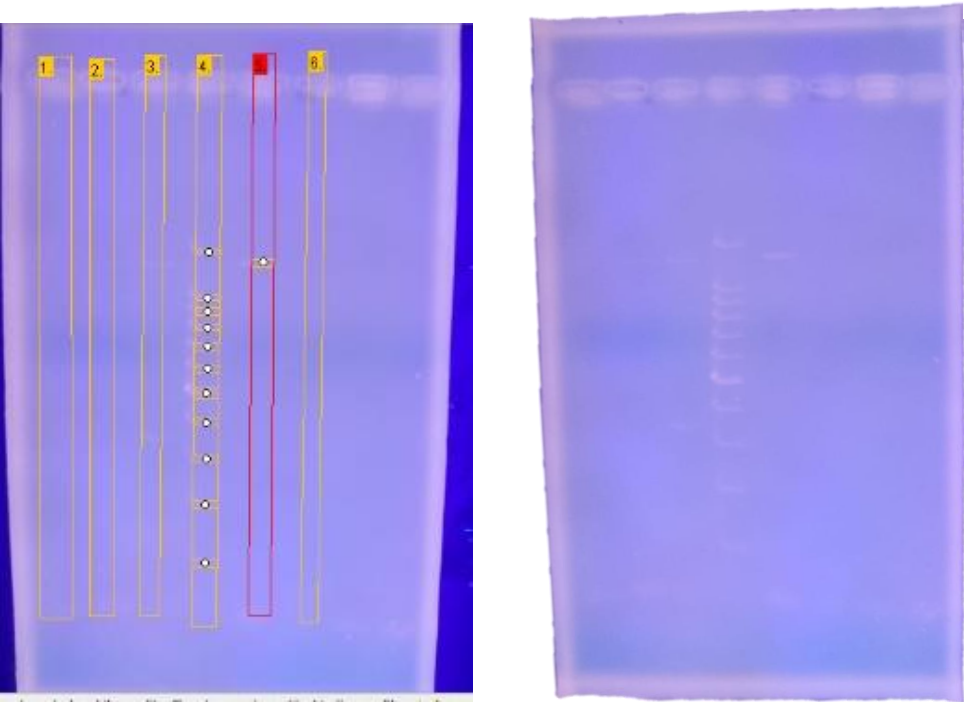
Anexo 09. Amplificación de ADN por PCR.



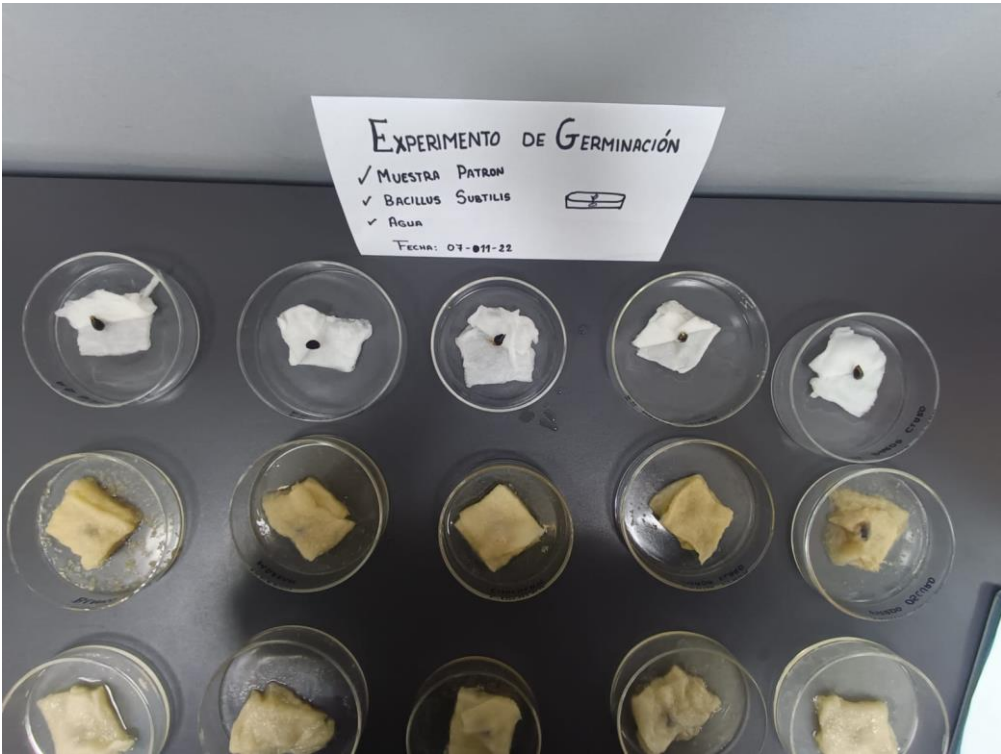
Blaseado de los Primers



Anexo 10. Visualización de las bandas de ADN amplificadas.



Anexo 11. Experimento de germinación del *Gossypium barbadense* con la inoculación del *B. Subtilis*.



Semillas inoculadas con agua y con la bacteria de interés.



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

Declaratoria de Autenticidad del Asesor

Yo, MONTEZA ARBULÚ CÉSAR AUGUSTO, docente de la FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA de la escuela profesional de INGENIERÍA AMBIENTAL de la UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO SAC - CHICLAYO, asesor de Tesis titulada: "Caracterización Molecular de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de *Gossypium barbadense* del arboreto de la Universidad César Vallejo, Chiclayo.", cuyos autores son VELEZ CHICOMA RICARDO LEONIDAS DE JESUS, ZUÑIGA VALERA PAOLA RAQUEL, constato que la investigación tiene un índice de similitud de 14.00%, verificable en el reporte de originalidad del programa Turnitin, el cual ha sido realizado sin filtros, ni exclusiones.

He revisado dicho reporte y concluyo que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la Tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad César Vallejo.

En tal sentido, asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada, por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

CHICLAYO, 10 de Noviembre del 2022

Apellidos y Nombres del Asesor:	Firma
MONTEZA ARBULÚ CÉSAR AUGUSTO DNI: 16681280 ORCID: 0000-0003-2052-6707	Firmado electrónicamente por: MARBULUCA el 12- 12-2022 09:52:41

Código documento Trilce: TRI - 0438627