

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Aislamiento y caracterización de rizobacterias
solubilizadoras de zinc de la rizosfera de piña
(*Ananas comosus* (L.) Merr)

Trabajo de investigación presentado
por Donald Gustavo Tijerino Escobar
para optar al grado académico de
Licenciado en Biología

Guatemala
2019

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

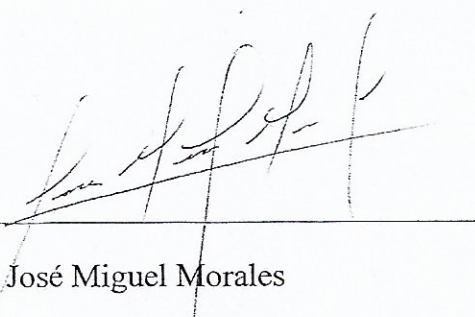


**Aislamiento y caracterización de rizobacterias
solubilizadoras de zinc de la rizosfera de piña
(Ananas comosus (L.) Merr)**

**Trabajo de investigación presentado
por Donald Gustavo Tijerino Escobar
para optar al grado académico de
Licenciado en Biología**

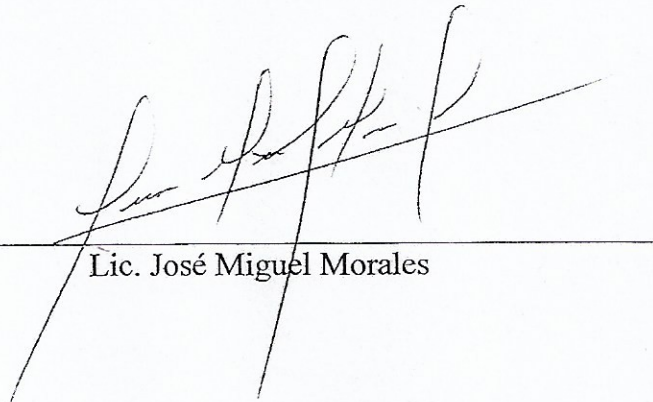
**Guatemala
2019**

Vo.Bo.: (f)


Lic. José Miguel Morales

Tribunal Examinador:

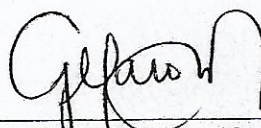
(f)


Lic. José Miguel Morales

(f)


Lic. Santiago Rodas

(f)


M.S. Gabriela Alfaro Marroquín

Fecha de aprobación: Guatemala, 11 de diciembre de 2019 ,

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios por siempre acompañarme durante esta época de mi vida que me encuentro por terminar.

Luego, agradecer a mi familia, Donald Tijerino (mi papá), Silvia de Tijerino (mi mamá) y Renato Tijerino (mi hermano) por todo su apoyo; sin el cual me hubiera sido difícil llegar hasta este momento de mi vida.

Este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo sin la valiosa colaboración de mi amigo Gabriel Ardón quien abrió las puertas de su finca “La Esperanza” para que pudiera realizar mi estudio con muestras de suelo provenientes de su propiedad.

Además, agradecer al Departamento de Biología de la Universidad del Valle de Guatemala, por su apoyo en brindar el material y equipo necesario para llevar a cabo el presente estudio.

También quiero agradecer a mi asesor, Lic. José Miguel Morales, quien desde un principio me apoyó y guió con mucha paciencia y profesionalismo durante esta investigación.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MÉTODOS	12
III. RESULTADOS	17
IV. DISCUSIÓN	22
V. CONCLUSIONES	27
VI. RECOMENDACIONES	28
VII. BIBLIOGRAFÍA	29

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Caracterización morfológica colonial y motilidad de las cepas solubilizadoras de zinc aisladas	18
2. Caracterización morfológica celular y tinción Gram	19
3. Cálculo de eficiencia de solubilización en medio TRIS modificado suplementado con óxido de zinc al 0.1%	20
4. Cálculo de porcentaje de éxito en el aislamiento de bacterias en dos versiones distintas del medio TRIS modificado suplementado con óxido de zinc al 0.1%	21
5. Ensayo en placa de las cepas aisladas en medio Tris suplementado con ZnO al 0.1%	36
6. Resultados de los triplicados del cálculo de eficiencia de solubilización en medio TRIS modificado suplementado con óxido de zinc al 0.1%	41
7. Composición del medio TRIS modificado suplementado con óxido de zinc al 0.1%	41

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	1
2. Mecanismos utilizados por las bacterias promotoras del crecimiento vegetal para promover el crecimiento de las plantas.....	2
3. Gráfica de barras que muestra los valores de eficiencia de solubilización y zona de solubilización obtenidos en el ensayo en placa	20

RESUMEN

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal representan a un grupo heterogéneo y benéfico de bacterias de la rizosfera, que son capaces de aumentar el crecimiento de las plantas por medio de distintos mecanismos. El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar la población de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal con capacidad de solubilizar zinc en un lote utilizado para el cultivo de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) de Finca La Esperanza, y determinar el potencial de las cepas aisladas para solubilizar el zinc y de esta manera promover información para el desarrollo de un biofertilizante que sustituya el uso de fertilizantes químicos en este tipo de cultivo. Se aislaron 12 cepas de rizobacterias solubilizadoras de zinc de la rizosfera de *Ananas comosus* (L.) Merr. Se evaluó la capacidad de estas para solubilizar óxido de zinc mediante un ensayo en placa en medio Tris suplementado con ZnO al 0.1% y posteriormente se efectuó el cálculo de eficiencia de solubilización. Asimismo, se llevó a cabo una caracterización morfológica colonial y celular de las cepas aisladas. Las doce cepas aisladas mostraron una morfología celular de bacilo, de las cuales once son gram positivas y una gram negativa. En cuanto a los valores de eficiencia de solubilización obtenidos, se encuentran en un rango de 111-141%, siendo la cepa Zn4 la que presentó el mayor valor (141%). Todas las cepas aisladas con medio Tris suplementado con ZnO al 0.1% asociadas a *Ananas comosus* (L.) Merr mostraron ser capaces de solubilizar zinc.

ABSTRACT

Plant growth promoting rhizobacteria represent a heterogeneous and beneficial group of rhizosphere bacteria, which are capable of increasing plant growth through different mechanisms. The objective of the present study was to isolate and characterize the population of plant growth promoting rhizobacteria with the ability to solubilize zinc in a lot used for the cultivation of pineapple (*Ananas comosus (L.) Merr*) from farm la Esperanza and determine the potential of strains isolated to solubilize zinc and thus promote information for the development of a biofertilizer that replaces the use of chemical fertilizers in this type of crop. Twelve strains of zinc solubilizing rhizobacteria were isolated from the rhizosphere of *Ananas comosus (L.) Merr*. Their ability to solubilize zinc oxide was evaluated by a plaque assay in Tris medium supplemented with 0.1% ZnO and then the solubilization efficiency calculation was made. Likewise, a colonial and cellular morphological characterization of the strains was carried out. The twelve isolated strains showed a Bacillus cell morphology, of which eleven are gram positive and one is gram negative. The solubilization efficiency values obtained ranged from 111%-141% which was maximum in strain Zn4. All strains isolated with Tris medium supplemented with 0.1% ZnO associated with *Ananas comosus (L.) Merr* were shown to be able to solubilize zinc.

I. INTRODUCCIÓN

A. Antecedentes

1. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) representan a un grupo heterogéneo y benéfico de bacterias de la rizosfera (compartimiento del suelo influenciado por las raíces de las plantas), que son capaces de aumentar el crecimiento de las plantas por medio de distintos mecanismos (Vejan *et al.*, 2016). Estas pueden clasificarse como bacterias promotoras del crecimiento vegetal extracelulares (ePGPR) o intracelulares (iPGPR) (Gray y Smith, 2005). Las primeras pueden encontrarse en la rizósfera, superficie de las raíces (rizoplano) o en los espacios entre las células de la corteza de la raíz. Mientras que las intracelulares colonizan el interior de los tejidos de la planta.

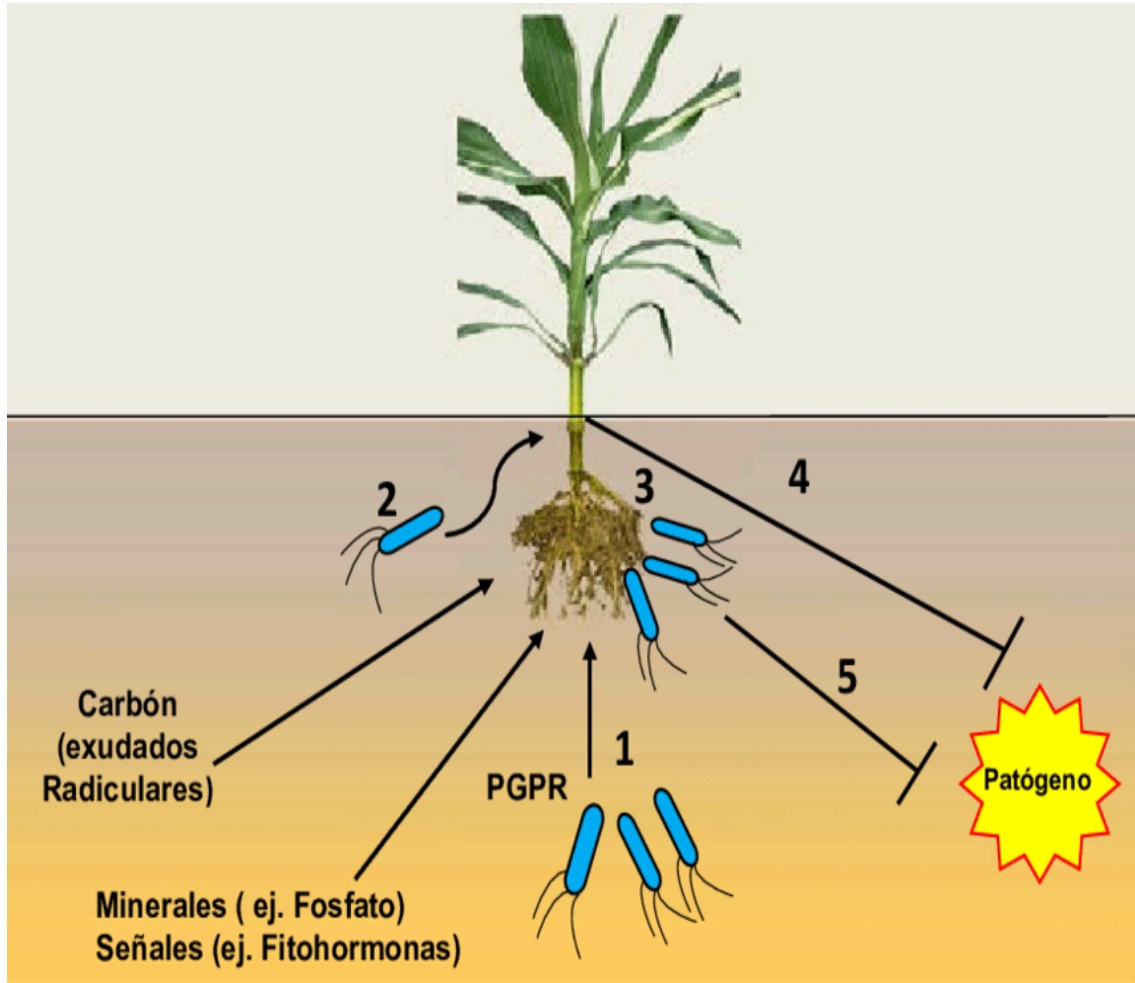


Figura.1. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

(Nadeem *et al.*, 2013)

Ambos tipos de rizobacterias PGPR pueden promover el crecimiento de las plantas de manera directa o indirecta. La promoción directa por parte de éstas implica, ya sea, proporcionar a la planta un compuesto sintetizado por la bacteria o facilitarle la obtención de determinados nutrientes del ambiente (Glick, 1995). La promoción indirecta ocurre cuando las rizobacterias PGPR disminuyen o previenen los efectos nocivos de uno o más fito-patógenos (Glick, 1995).

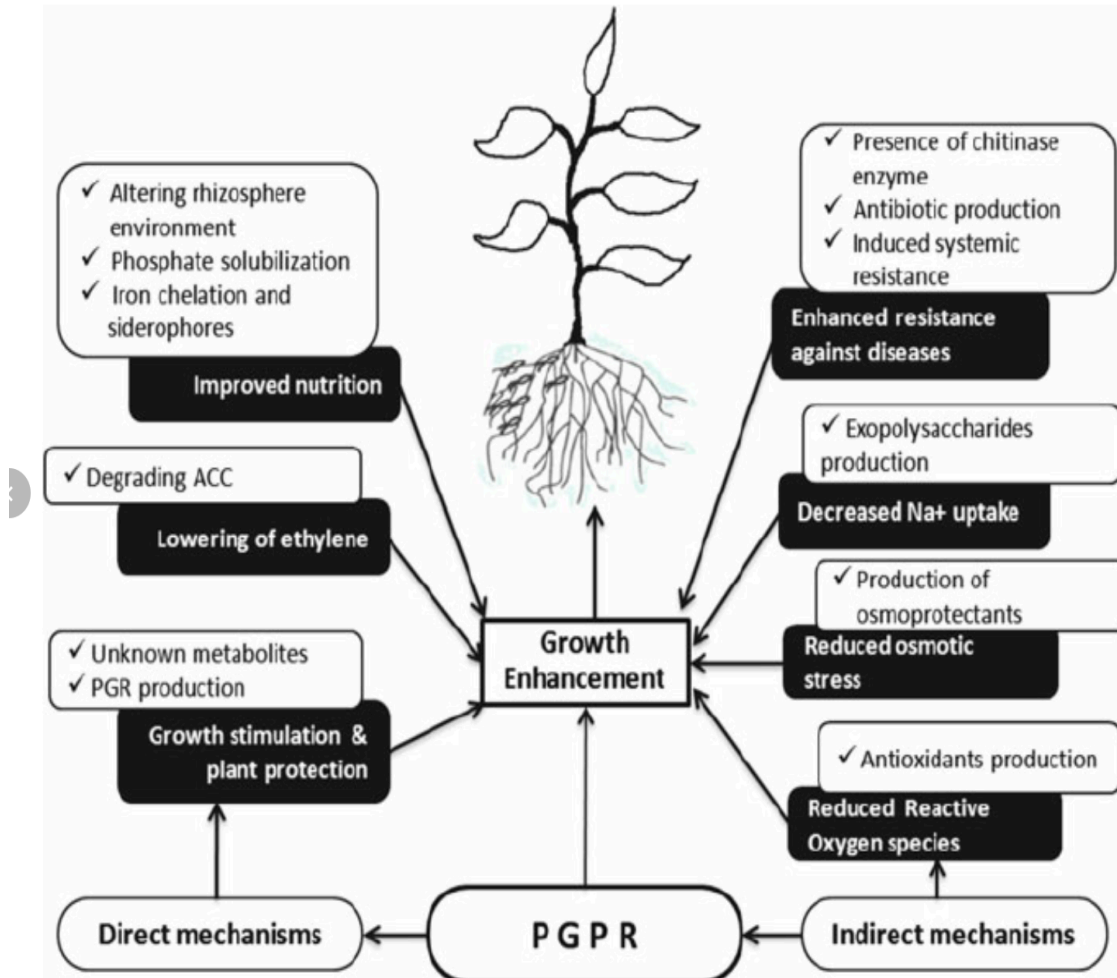


Figura.2. Mecanismos utilizados por las bacterias promotoras del crecimiento vegetal para promover el crecimiento de las plantas.

(Nadeem *et al.*, 2013)

Las bacterias PGPR se han utilizado para la producción de bio-fertilizantes debido a los mecanismos que poseen para promover el crecimiento de las plantas. Los biofertilizantes se pueden definir como productos que contienen microorganismos vivos; cuando se aplican a las semillas, las superficies de las plantas o el suelo, colonizan la rizosfera o el interior de la planta, y promueven el crecimiento de las mismas al aumentar el suministro o la disponibilidad de nutrientes (Vejan *et al.*, 2016)(Malusá *et al.*, 2012)

(Malusá y Vassilev, 2014). Los bio-fertilizantes, han mostrado tener un alto potencial para sustituir el uso de fertilizantes químicos. Hoy en día existe una amplia variedad de rizobacterias que se han comercializado, dentro de las cuales se encuentra: *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas solanacearum*, *Rhizobia spp.*, *Burkholderia spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, (Glick, 2012) .

La aplicación de estos productos ha aumentado debido a la demanda de la sociedad por tecnologías más verdes. Pero la gran mayoría de los bio-fertilizantes que se han comercializado, se han formulado con bacterias PGPR que solubilizan, fijan y movilizan macronutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio o con bacterias productoras de fitohormonas. Por lo que recientemente ha habido un aumento en estudios enfocados en el aislamiento y caracterización de bacterias PGPR asociadas a diferentes cultivos que solubilizan o movilizan micronutrientes. Esto, para poder desarrollar nuevas líneas de bio-fertilizantes que mejoren las deficiencias de micronutrientes de los cultivos.

a. Mecanismos directos promotores del crecimiento vegetal de las rizobacterias PGPR

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal que poseen mecanismos directos, facilitan la obtención de nutrientes o aumentan la disponibilidad de estos. Dentro de los mecanismos directos se encuentran: Fijación de nitrógeno, solubilización de nutrientes minerales, mineralización de compuestos orgánicos y producción de fitohormonas. Estos mecanismos son: Fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo, solubilización de potasio, solubilización de micronutrientes, producción de sideroforos y fitohormonas como el ácido indolacético y el etileno (Shailendra, 2015).

1) Fijación de nitrógeno.

Durante el proceso de fijación biológica de nitrógeno, el nitrógeno atmosférico, se transforma en amonio por medio de un complejo enzimático conocido como nitrogenasa (Kim y Reece, 1994). Este complejo involucra a una metaloenzima de dos componentes: (1) una dinitrogenasa reductasa que es la proteína de hierro y (2) una dinitrogenasa que tiene un cofactor de metal (Ahemad y Kibret, 2014). La dinitrogenasa reductasa proporciona electrones con un alto poder reductor, mientras que la dinitrogenasa utiliza estos electrones para reducir el N_2 a NH_3 . Esta fijación de nitrógeno puede ocurrir por medio de dos mecanismos el simbiótico y el no simbiótico. En la fijación de nitrógeno simbiótica, existe una relación mutualista entre la bacteria y la planta, en la cual la bacteria ingresa al interior de las raíz y luego forma nódulos en donde ocurre la fijación del nitrógeno. Mientras que la fijación de nitrógeno no simbiótica la llevan a cabo diazótrofos de vida libre, asociativos y endófitos (Shailendra, 2015).

2) Solubilización de fósforo.

El fósforo, es el segundo nutriente más importante después del nitrógeno, cuya deficiencia limita el crecimiento de las plantas. Este se encuentra disponible de forma abundante en los suelos, tanto en formas orgánicas como inorgánicas (*Oteino et al.*, 2015). Pero a pesar de este gran depósito de fósforo en el suelo, las formas disponibles para las plantas son reducidas, debido a que la mayoría del fósforo del suelo se encuentra en formas insolubles. Las plantas absorben el fósforo en dos formas solubles, los iones monobásico $H_2PO_4^-$ y dibásico $H_2PO_4^{2-}$ (Bhattacharyya y Jha, 2012). Las rizobacterias PGPR emplean distintas estrategias para hacer uso de las diferentes formas de fósforo no disponible en el suelo y, a su vez, ayudan a la nutrición de las plantas haciendo disponible el fósforo para estas (Shailendra, 2015). Los mecanismos principales de solubilización del fósforo empleados por estas bacterias incluyen: Liberación de compuestos que forman complejos o disolventes minerales como ácidos orgánicos, protones, iones hidroxilo,

dióxido de carbono, liberación de enzimas extracelulares como las fosfatasas y la liberación de fosfato durante la degradación de sustrato (mineralización biológica de fosfato) (Illmer *et al.*, 1995) (Rodríguez *et al.*, 2006) .

3) Solubilización de potasio.

El potasio es el tercer macronutriente esencial para el crecimiento de las plantas. Pero es un nutriente que se encuentra en muy bajas concentraciones en el suelo y, a su vez y más del 90% se encuentra en su forma insoluble en rocas y minerales de silicato (Shailendra, 2015). Los mecanismos de solubilización de potasio empleados por las rizobacterias PGPR son por: Disminución de pH, mejorando la quelación de los cationes unidos a potasio y por medio de la acidólisis del área circundante de la bacteria (Uroz *et al.*, 2009). La disminución del pH del medio, sugiere la liberación de ácidos orgánicos y protones por parte de las bacterias. Esta acidólisis producida por los ácidos orgánicos, puede disolver directamente el potasio mineral como resultado de lentas liberaciones de potasio intercambiable o puede quelar iones de Si y Al asociados a K mineral (Römheld y Kirkby, 2010). Por lo tanto, la síntesis y descarga de ácidos orgánicos por parte de las rizobacterias PGPR en su ambiente circundante, provoca la liberación de iones de potasio del mineral K por medio de protonación y acidificación (Sheng y He, 2006) (Keshavarz *et al.*, 2013) (Wu *et al.*, 2005).

4) Solubilización de zinc.

El zinc es un micronutriente importante necesario para el crecimiento óptimo de las plantas. La disponibilidad de este en el suelo y su concentración dentro de los tejidos de las plantas son directamente afectadas por la composición y la abundancia de las comunidades microbianas de la rizosfera. Este micronutriente a nivel metabólico juega un papel importante como constituyente estructural y co-factor de un amplio rango de enzimas y proteínas en varias rutas metabólicas. Dentro de estas rutas metabólicas se

encuentran: El metabolismo de los carbohidratos, en la fotosíntesis durante la conversión de azúcares a almidón, metabolismo de proteínas, producción de auxinas, formación del polen, mantenimiento de la integridad biológica de las membranas y en la resistencia ante la infección de ciertos patógenos (Alloway, 2008) . Las plantas pueden absorber el zinc como un catión divalente, pero solamente una porción pequeña del zinc total, se encuentra presente en el suelo en su forma soluble. Debido a esto, la deficiencia de zinc es una de las deficiencias de micronutrientes más comunes en el mundo. Dentro de los mecanismos empleados por las rizobacterias PGPR para solubilizar el zinc se encuentran: La acidificación por medio de la producción de ácidos orgánicos que secuestran los cationes de zinc y disminuyen el pH del suelo, además, los aniones también pueden quelar el zinc y mejorar la solubilidad de este (Alexander, 1997). Otros mecanismos involucrados son la producción de sideroforos y protones, sistemas oxido-reductores en membranas celulares y ligandos quelados (Saravanan *et al.*, 2011).

2. Bacterias PGPR asociadas a *Ananas Comosus (L.) Merr.*

Se ha reportado una amplia variedad de bacterias PGPR de la rizosfera y de los tejidos internos de *Ananas comosus*, y su potencial para promover su crecimiento, aumentando la altura, peso seco, peso fresco, área foliar y tamaño de la raíz (Gonzales *et al.*, 2011). Dentro de las rizobacterias PGPR aisladas de la rizosfera y de los tejidos de *Ananas comosus* se encuentran: *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum amazonense*, *Burkholderia spp.*, *Burkholderia silvatlantica*, *Burkholderia tropicalis*, *Bacillus subtilis*, *Azospirillum spp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Asaia bogorensis*. Todos estos estudios en los cuales se han aislado y caracterizado estas bacterias, se han enfocado en evaluar la capacidad de estas de fijar nitrógeno, solubilizar fósforo, solubilizar potasio y en la producción de fitohormonas. Pero ninguno hasta el momento se ha enfocado en la capacidad de estas de solubilizar micronutrientes importantes como lo es el zinc (Baldotto *et al.*, 2010) (Baldotto *et al.*, 2010) (Weber *et al.*, 1999) (Muthukumarasamy *et al.*, 2002) (Cruz *et al.*, 2001) (Weber *et al.*, 2003) (Kongbrailatpam y Putatunda, 2018). Estas

bacterias pueden utilizarse para solubilizar fuentes insolubles de zinc en el suelo como el óxido de zinc, carbonato de zinc y fosfato de zinc.

a. Medios selectivos para el aislamiento de las rizobacterias solubilizadoras de zinc.

Para el aislamiento de bacterias PGPR solubilizadoras de zinc, se utiliza el medio mínimo TRIS o el medio de sales minerales. Estos son medios que se suplementan con diferentes fuentes insolubles de zinc para poder determinar la capacidad de las bacterias de solubilizarlo. Las fuentes insolubles de zinc que se utilizan son el ZnO, ZnPO₄ y ZnS; lo cual se debe a que son fuentes insolubles de zinc que se encuentran frecuentemente en los suelos pero que no se encuentran fácilmente disponibles para las plantas. Es por esto que el medio selectivo usualmente se prepara por separado con estas diferentes fuentes insolubles de zinc, para de esta manera poder evaluar de que clase de compuestos las bacterias son capaces de solubilizar el zinc para hacerlo disponible para las plantas. El indicador que se utiliza para poder determinar la capacidad de la bacteria de solubilizar el zinc, es la formación de un halo de solubilización alrededor de la colonia bacteriana.

3. Prueba *in vitro* para evaluar la capacidad de las rizobacterias PGPR de solubilizar el zinc.

Para poder estimar la capacidad de solubilizar el zinc por parte de las cepas bacterianas, se utiliza el cálculo de eficiencia de solubilización (ES), cuya fórmula es ES: Diámetro de la zona del Halo/ diámetro de la colonia x 100. Para poder efectuar el cálculo se debe de inocular con las cepas bacterianas aisladas el medio TRIS suplementado con ZnO y ZnPO₄ al 0.1% y incubarlas durante 7 días en oscuridad a 28 °C. Esto, con el fin de observar la formación de halos alrededor de las colonias, para posteriormente medir el diámetro de la zona del halo y el de la colonia bacteriana. Las cepas que muestran los mayores valores de ES, son las que presentan la mayor capacidad para solubilizar el zinc (Nyugen *et al.*,1992).

B. Justificación

El cultivo de piña (*Ananas comosus (L.) Merr.*) es una fuente importante de ingresos para Guatemala. Siendo el quinto país exportador de piña a nivel Centroamericano, con cifras de 9 millones de dólares reportadas en ventas hacia el exterior en el 2018. Los países a los cuales se exporta piña son Estados Unidos, Alemania, México, El Salvador, Honduras y Nicaragua. Siendo Estados Unidos y Alemania los países que más importan piña proveniente de Guatemala. En el país los principales departamentos productores de piña son Guatemala 36%, Izabal 14%, Escuintla 11% y los demás departamentos suman el 39% restante (MAGA, 2017). Lo cual equivale a 11,970 hectáreas de área cultivada de piña. Para la obtención de rendimientos altos en la producción, se requieren de grandes cantidades de agroquímicos que contengan los elementos esenciales como nitrógeno, fósforo, potasio y micronutrientes. Utilizando dosis que oscilan entre los 440-670 Kg N/ha, 170-280 Kg de P₂O₅/ha y 220-460 Kg de K₂O/ha (Sajquim.2015). La constante aplicación de estos, provoca cambios en las condiciones del suelo que afectan directamente la fertilidad del mismo, tales como amplias fluctuaciones de pH, desequilibrio de nutrientes y disminución de las poblaciones benéficas de fauna del suelo (Clarke y Hodges, 1998) (Aeron. *et al*, 2011) (Chen, 2006). Asimismo, contaminan el manto freático y los cuerpos de agua aledaños a los cultivos, lo cual representa un peligro para la salud de los humanos y fauna silvestre. Los cambios que se producen en el suelo debido al uso excesivo de agroquímicos, pueden causar pérdidas económicas debido a un decrecimiento en el rendimiento de la producción (Clarke y Hodges, 1998) (Aeron. *et al*, 2011). Es por esto que surge la necesidad de nuevas prácticas agrícolas que sean sostenibles, con el fin de mantener el delicado balance de la ecología del suelo. Una de las estrategias es el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal como biofertilizantes, los cuales han mostrado tener un alto potencial como sustituto a los fertilizantes químicos (Berg, 2009) (Cock. *et al*, 2011) (Pliego. *et al*, 2011), debido a la capacidad de estas de promover el

crecimiento de las plantas por medio de diferentes mecanismos. Dentro de estos mecanismos se encuentran la capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fósforo, solubilizar potasio y solubilizar micronutrientes importantes para el desarrollo de las plantas como lo es el zinc (Gupta. *et al*, 2015). Asimismo, en diversos estudios se ha demostrado que la inoculación de la piña con bacterias promotoras del crecimiento vegetal resulta en un aumento del área foliar, número de raíces, longitud de raíces y tamaño del fruto (Gonzales *et al.*, 2011) (Indriyanti *et al.*2017) (Gonzales-Rodríguez *et al.*2013) (Baldotto *et al.* 2011) (Baldotto *et al.*2014). Es por esto que el desarrollo de un biofertilizante para el cultivo de piña sería importante para Guatemala, mejorando la calidad del cultivo y evitando la degradación de los suelos y el daño ecológico paralelo.

El objetivo de esta investigación es aislar y caracterizar la población de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal con la capacidad de solubilizar zinc en un suelo dedicado al cultivo de piña en Guatemala, para así enriquecer la información que se tiene sobre la temática en el país, debido a que en Guatemala no existen estudios con respecto a bacterias solubilizadoras de zinc asociadas a la piña. Asimismo, con este estudio se pretende promover información para el desarrollo de un biofertilizante que sustituya el uso de fertilizantes químicos en este tipo de monocultivo.

C. Objetivos:

Objetivo general:

Describir la población de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal con capacidad de solubilizar zinc en un lote dedicado al cultivo de *Ananas comosus* (L.) Merr.

Objetivos específicos:

1. Aislar rizobacterias nativas de la rizosfera de *Ananas comosus* (L.) Merr utilizando un medio enriquecido con óxido de zinc.

2. Determinar el potencial de las cepas aisladas para solubilizar zinc mediante un ensayo en placa.

D. Hipótesis:

Ho: Todas las cepas aisladas de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en un lote dedicado al cultivo de piña, presentarán la misma capacidad de solubilizar zinc.

Ha: Las cepas aisladas de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en el lote dedicado al cultivo de piña, presentarán diferencias en la capacidad de solubilizar zinc.

II. MÉTODOS

A. Sitio de estudio

La toma de muestra de suelo rizosférico será llevada a cabo en un lote dedicado al cultivo de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) de Finca La Esperanza ubicada en el municipio de Villa Canales, Guatemala.

B. Sujeto de estudio

El estudio tiene como objetivo describir la población de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal con capacidad de solubilizar zinc en un lote dedicado al cultivo de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr), y promover información para el desarrollo de un biofertilizante para este cultivo en Guatemala. Por lo tanto, los sujetos de estudio de esta investigación serán las cepas de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal que sean aisladas en el lote dedicado al cultivo de piña.

C. Diseño, enfoque y tipo de investigación

El estudio tiene un diseño de tipo no experimental de corte transversal, debido a que únicamente se aislarán bacterias y se medirán las variables de interés, que es solubilización de zinc, en un momento determinado.

El tipo de investigación que se llevará a cabo es descriptiva y posee un enfoque cualitativo. Esto debido a que únicamente se describirá las poblaciones de bacterias promotoras del crecimiento vegetal que tengan la capacidad de solubilizar zinc en el sitio de estudio. Así como también, se llevarán a cabo pruebas cualitativas para medir la variable de interés mencionada.

Criterios de inclusión y exclusión: Para tomar las muestras de suelo rizosférico se tomarán en cuenta solo aquellas plantas que presenten signos de salud, tales como: Hojas sanas sin signos de necrosis, depredación o con manchas foliares.

Criterio de inclusión: solamente las cepas de bacterias aisladas que presenten un índice de solubilización alto, serán seleccionadas para ser identificadas.

D. Muestreo

La selección del sitio de muestreo será por conveniencia. En este se tomará una muestra compuesta que consiste en seleccionar aleatoriamente 8 submuestras de suelo rizosférico proveniente de 8 plantas adultas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr).

Operacionalización de variables:

Variable	Definición	Clasificación			Operacionalización
		Escala de medición	Naturaleza	Interrelación	
Solubilización de zinc	zinc solubilizado por parte de bacterias.	De razón	Culitativa	Dependiente	% eficiencia de solubilización
Cepa de rizobacteria	Rizobacteria promotora del crecimiento vegetal aisladas de la rizosfera de un cultivo de piña.	Nominal	Cualitativa	Atributiva	Numero de cepas de rizobacterias aisladas solubilizadoras de zinc en el lote dedicado al cultivo de piña.

E. Metodología.

1. Recolección de las muestras.

Se tomó aleatoriamente una muestra compuesta que consiste en un total de N= 8 submuestras de suelo rizosférico de un sitio dedicado al cultivo de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr). Estas fueron recolectadas directamente de las raíces de plantas adultas de piña, tomándolas desde una profundidad de 20 cm utilizando una pala esterilizada previo a su uso con etanol al 95% y luego estas se depositaron en bolsas plásticas estériles para ser transportadas bajo refrigeración hacia el laboratorio de la Universidad del Valle de Guatemala. Únicamente se tomaron muestras en plantas que presentaban signos de buena salud (Hojas sanas sin signos de necrosis, depredación o con manchas foliares). Luego bajo condiciones estériles se mezclaron las 8 submuestras para conformar una sola muestra de suelo rizosférico. Para la obtención del suelo rizosférico, cada muestra se sacudió a mano vigorosamente para remover el suelo no adherido a las raíces.

2. Aislamiento de las bacterias.

Se tomó 1g de suelo rizosférico y se diluyó en 9 mL de una solución de agua peptonada, seguido de una agitación a 100 rpm por 15 minutos. Se realizaron diluciones seriadas de 10^{-2} - 10^{-7} , inoculando con 0.5 mL de las diluciones 10^{-4} a 10^{-7} el medio de cultivo selectivo: medio mínimo TRIS suplementado con óxido de zinc como fuente insoluble de zinc al 0.1% para aislar solubilizadoras de zinc ($C_6H_{12}O_6$ 10 g/L; K_2HPO_4 0.25 g/L ; $MnSO_4$ 0.01 g/L; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L; $(NH_4)SO_4$ 0.5g/L; KCl 0.2 g/L; extracto de levadura 0.5 g/L; agar 20 g/L (Nagaraju *et al.*, 2016). Los medios de cultivo se incubaron a 30 °C por 48 horas. Luego del período de incubación, las colonias que mostraban un halo de solubilización alrededor se volvieron a sembrar en el medio selectivo respectivo para poder obtener cultivos puros.

3. Caracterización de cepas bacterianas.

a. Caracterización morfológica colonial y celular.

Para la identificación de los aislados bacterianos en base a la morfología colonial, se registró para las colonias el color y forma luego de 24h de haberlas inoculado en el medio selectivo mencionado. Para evaluar la motilidad, se transfirió con un asa microbiológica una sola colonia de las placas con los medios de cultivo a un portaobjeto con una gota de agua estéril y se observaron con un microscopio de luz con un aumento de 40x. Se registro como motilidad positiva, si se observa al menos de 5-10 bacterias recorrer el campo visual.

Tinción Gram: Para observar las características morfológicas de los aislados bacterianos en un microscopio de luz, estos se prepararon de la siguiente manera: Se agregó al portaobjetos solución de cristal-violeta y se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente; El exceso de colorante se lavó con H₂O destilada; Luego se agregó lugol al portaobjeto y se incubó por 1 minuto. Se realizó un lavado con H₂O destilada. Seguido se agregó de 4-6 gotas de solución alcohol-acetona y se lavó de inmediato con H₂O destilada; Se colocó safranina y se incubó 1 minuto a temperatura ambiente. Se lavó con H₂O destilada y finalmente se secó al aire por 10 minutos aproximadamente. Para cada cepa se registraron sus características morfológicas y se clasificaron de acuerdo al resultado obtenido en la tinción Gram, como Gram positivas o Gram negativas.

4. Ensayo de eficiencia de solubilización.

Eficiencia de solubilización: Se vertió medio TRIS en cajas Petri esterilizadas. Después de la solidificación de este, se tomó 50 microlitros de un cultivo 10^5 ufc/ml de las colonias de bacterias solubilizadoras de zinc previamente aisladas y se inocularon con estas las cajas Petri con el medio selectivo. Las cajas Petri con bacterias solubilizadoras de zinc se incubaron a 30°C durante 7 días. Luego la capacidad de las bacterias para solubilizar la fuente insoluble de zinc en los medios, se evaluó mediante el cálculo de eficiencia de solubilización. Estos se midieron con un vernier electrónico. Se trabajó en triplicado.

ES: Diámetro de la zona del Halo/ diámetro de la colonia x 100

III. RESULTADOS

La mayoría de las cepas solubilizadoras de zinc aisladas (BSZ) muestran características morfológicas similares en cuanto al color, forma, elevación y margen de la colonia bacteriana. Diferenciándose entre sí mayormente en la forma del margen de la colonia. Solamente la cepa Zn9 mostró las mayores diferencias en cuanto color, forma y margen de la colonia. Por otro lado, se puede observar que solamente la cepa bacteriana Zn6 mostró no ser móvil. Ver Cuadro 1.

La mayoría de las cepas aisladas son Gram + con excepción de la cepa Zn12. En cuánto a la morfología celular se puede observar que todas las cepas aisladas son bacilos, siendo en su mayoría estreptobacilos. Ver Cuadro 2.

Las cepas aisladas que presentaron los mayores valores de eficiencia de solubilización después de 7 días fueron Zn4, Zn5 y Zn10. Siendo la que presentó el menor valor de eficiencia de solubilización la cepa Zn12. Ver Cuadro 3, 4 y Figura 3.

Se obtuvo un mayor porcentaje de éxito en el aislamiento de las bacterias, utilizando la versión del medio tris modificado que contiene extracto de levadura y sulfato de hierro en comparación al que no contiene ninguno de estos componentes.

CUADRO 1.

Caracterización morfológica colonial y motilidad de las cepas solubilizadoras de zinc aisladas. Donde (+) es motil y (-) no motil.

No.	Cepa aislada	Color	Forma	Elevación	Margen	Motilidad
1	Zn1	Blanca	Irregular	Plana	Ondulada	+
2	Zn2	Blanca	Irregular	Plana	Ondulada	+
3	Zn3	Blanca	Irregular	Plana	Ondulada	+
4	Zn4	Blanca	Irregular	Plana	Lobulada	+
5	Zn5	Blanca	Irregular	Plana	Ondulada	+
6	Zn6	Blanca	Irregular	Plana	Lobulada	-
7	Zn7	Blanca	Irregular	Plana	Ondulada	+
8	Zn8	Beige	Irregular	Plana	Ondulada	+
9	Zn9	Amarilla	Circular	Plana	Entero	+
10	Zn10	Blanca	Irregular	Plana	Ondulada	+
11	Zn11	Blanca	Irregular	Plana	Ondulada	+
12	Zn12	Blanca	Irregular	Plana	Ondulada	+

A cada cepa se le asignó un código Zn del 1 al 12 y un signo + para bacterias motiles y - para no motiles.

CUADRO 2.

Caracterización morfológica celular y tinción Gram.

No.	Cepa aislada	Gram	Morfología celular
1	Zn1	+	Bacilo
2	Zn2	+	Estreptobacilo
3	Zn3	+	Estreptobacilo
4	Zn4	+	Estreptobacilo
5	Zn5	+	Estreptobacilo
6	Zn6	+	Estreptobacilo
7	Zn7	+	Estreptobacilo
8	Zn8	+	Bacilo
9	Zn9	+	Estreptobacilo
10	Zn10	+	Estreptobacilo
11	Zn11	+	Estreptobacilo
12	Zn12	-	Bacilo

Un signo + significa Gram positivas y un signo – Gram negativas.

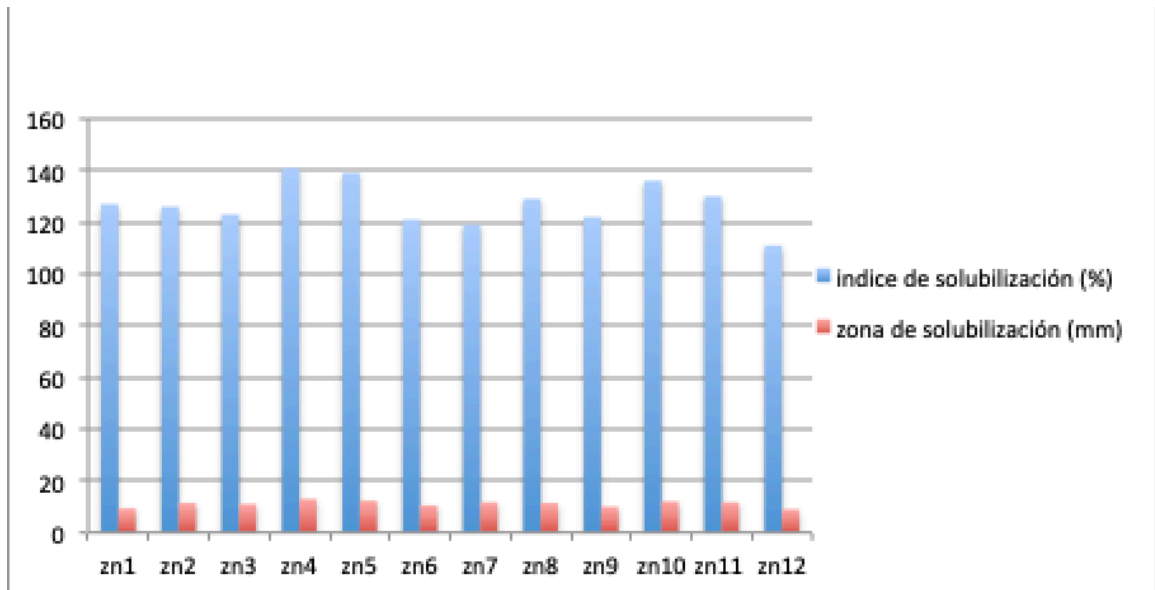
CUADRO 3.

Cálculo de eficiencia de solubilización en medio TRIS modificado suplementado con óxido de zinc al 0.1%.

No.	Cepa aislada	Solubilización de óxido de zinc como fuente insoluble de zinc (mm)
		ES%
1	Zn1	127
2	Zn2	126
3	Zn3	123
4	Zn4	141
5	Zn5	139
6	Zn6	121
7	Zn7	119
8	Zn8	129
9	Zn9	122
10	Zn10	136
11	Zn11	130
12	Zn12	111

FIGURA 3.

Gráfica de barras con los porcentajes de eficiencia de solubilización y zona de solubilización obtenidos en el ensayo en placa en medio Tris con ZnO al 0.1%.



Eje “Y” representa los valores de eficiencia de solubilización y zona de solubilización y eje “x” representa a las cepas bacterianas aisladas.

CUADRO 4.

Cálculo de porcentaje de éxito en el aislamiento de bacterias en dos versiones distintas del medio TRIS modificado suplementado con óxido de zinc al 0.1%.

Versión del medio	Total de cajas Petri utilizadas por medio para el aislamiento de las bacterias	Total de cajas Petri con éxito de aislamiento de bacterias	Porcentaje de éxito
Tris modificado suplementado con ZnO al 0.1% Medio con extracto de levadura y sulfato de hierro	200	24	12.00%
Medio sin extracto de levadura y sulfato de hierro	200	3	1.5%

IV. Discusión

A. Aislamiento de las cepas bacterianas solubilizadoras de zinc

En el presente estudio se utilizó como medio selectivo medio Tris suplementado con óxido de zinc al 0.1%. El cual es un medio selectivo que en diferentes estudios se muestra con variaciones en su composición. Esto debido a que en algunos estudios su composición contiene extracto de levadura y sulfato ferroso, mientras que en otros este no contiene ninguno de los reactivos mencionados anteriormente. Debido a esto en el presente estudio se probó utilizar ambas versiones del medio selectivo para aislar las rizobacterias solubilizadoras de zinc. De ambas versiones del medio selectivo, se tuvo éxito solamente con una, siendo esta la que presenta en su composición extracto de levadura y sulfato ferroso (Cuadro 5). Lo cual puede deberse principalmente al extracto de levadura, el cual provee a los microorganismos con fuentes de nitrógeno, carbono, sulfuro y otras trazas de nutrientes. Por otro lado, en la mayoría de los estudios recomiendan inocular el medio selectivo a utilizar solamente con 100 microlitros de agua peptonada con bacterias de las diluciones 10^{-4} a 10^{-7} . Pero el éxito de aislar bacterias utilizando ese volumen fue muy bajo. Mientras que con 500 microlitros, el éxito de aislar bacterias fue mucho mayor. Por lo que se recomienda utilizar este último volumen para inocular el medio selectivo para aislar las bacterias.

1. Caracterización de las cepas bacterianas:

Según los resultados obtenidos (Cuadros 2 y 3), la mayoría de las cepas solubilizadoras de zinc aisladas mostraron características morfológicas coloniales y celulares similares. Era de esperarse que la mayoría de las cepas aisladas fueran Gram positivas y que presentaran una morfología celular de bacilo. Esto, debido a que en la rizosfera del suelo el género de bacterias *Bacillus* es el más predominante (VijaiPAYal. *et al*, 1998).

Asimismo, varios estudios han reportado diferentes rizobacterias pertenecientes al género *Bacillus* que promueven el crecimiento de las plantas por medio de la solubilización de diferentes nutrientes en el suelo (Kongbrailatpam y Putatunda, 2018; Shalini. *et al*, 2019; Ramesh. *et al*, 2014; Vidyashree. *et al*. 2018).

Por otro lado, la mayoría de las cepas aisladas mostraron ser motiles (Cuadro 1), lo cual ha demostrado ser una característica importante en las bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Esto, debido a que la motilidad juega un papel importante en la competencia por nutrientes a través de la quimiotaxis bacteriana. Lo cual es una característica importante para que se dé una colonización exitosa de las raíces y de la rizosfera por parte de las bacterias. (Czaban. *et al*, 2007) en su estudio mostró utilizando más de 800 cepas de rizobacterias que las cepas motiles gradualmente aumentaban desde la rizosfera, hacia el rizoplano y al endorhiza. Resultados que sugieren fuertemente que la motilidad de las bacterias es un factor importante en la colonización de las raíces. Siendo esto importante al momento de evaluar que rizobacterias pueden ser empleadas para el desarrollo de biofertilizantes. Ya que el éxito de un biofertilizante al momento de ser aplicado en condiciones de campo, se encuentra directamente correlacionado con la capacidad de las bacterias de colonizar la rizosfera y las raíces de las plantas.

2. Ensayo de eficiencia de solubilización de zinc:

En los ensayos en placa, todas las cepas aisladas produjeron un halo de solubilización en medio Tris suplementado con óxido de zinc al 0.1% como fuente insoluble de zinc (Cuadro 4). Indicando de esta manera que son cepas bacterianas capaces de solubilizar zinc a partir de una fuente insoluble. Los mecanismos por los cuales estas cepas solubilizan zinc de fuentes insolubles, tales como el óxido de zinc, puede ser consecuencia de la liberación de protones, producción de ácidos orgánicos y de agentes quelantes como los sideroforos de origen bacteriano. Esta solubilización de compuestos de zinc mediada por medio de estos mecanismos ha sido reportada en diferentes estudios (Ramesh. *et al*, 2014; Dacosta y Duta, 2001). Dentro de las fuentes insolubles de zinc (fosfato de zinc, carbonato de zinc y óxido de zinc) que comúnmente se emplean en estos estudios, la mayoría de bacterias que se han reportado muestran una mayor capacidad de solubilizar el fosfato de zinc seguido del óxido de zinc y carbonato de zinc.

En este estudio las cepas que mostraron los valores más altos de eficiencia de solubilización luego de 7 días de haber sido inoculadas en medio Tris suplementado con ZnO al 0.1%, fueron Zn4, Zn5 y Zn10. Las cuales presentaron valores de eficiencia de solubilización de 141 % (Zn4), 139% (Zn5) y 136% (Zn10). En comparación con otros estudios donde se ha evaluado el cálculo de eficiencia de solubilización en cepas de rizobacterias en medio Tris suplementado con óxido de zinc, se han reportado valores de 150% a 330% (Ramesh. *et al*, 2014; Dacosta y Duta, 2001). Siendo valores que se consideran altos, por lo que se puede decir que la cepa Zn4 se acerca mucho a estos valores. Lo cual la convierte en una buena candidata para realizar estudios posteriores y evaluar su capacidad de promover el crecimiento de plántulas de piña. Asimismo, sería bueno evaluar la capacidad de esta para solubilizar otras fuentes insolubles de nutrientes y para producir fitohormonas como el ácido indolacético. Ya que en otros estudios se han reportado rizobacterias que poseen múltiples mecanismos que promueven el crecimiento

de las plantas (Dhaked. *et al*, 2017; Nagaraju. *et al*, 2017). En cuanto a las otras cepas solubilizadoras de zinc que se aislaron, pero presentaron porcentajes de eficiencia de solubilización bajos, no significa que no sean buenas candidatas para evaluar su potencial de promover el crecimiento en plantas de piña. Ya que existe la posibilidad de que algunas de estas sean más eficientes para solubilizar otras fuentes insolubles de zinc como el fosfato de zinc y el carbonato de zinc. Asimismo, la gran mayoría de bio-fertilizantes que se han comercializado han sido elaborados con más de una cepa o especies de microorganismos, esto para que tenga un efecto sinérgico.

A diferencia de otros cultivos, en piña existen muy pocos estudios con respecto a rizobacterias asociadas a esta especie. Hasta el momento las especies bacterianas que se han reportado estar asociadas a este cultivo se encuentran *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum amazonense*, *Burkholderia spp.*, *Burkholderia silvatlantica*, *Burkholderia tropicalis*, *Bacillus subtilis*, *Azospirillum spp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Asaia bogorensis*. Pero en todos estos estudios en los cuales se han aislado y caracterizado estas bacterias, solamente se han enfocado en evaluar la capacidad de estas de fijar nitrógeno, solubilizar fósforo y solubilizar potasio (Baldotto *et al.*, 2010; Baldotto *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 1999; Muthukumarasamy *et al.*, 2002; Cruz *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2003; Kongbrailatpam y Putatunda,2018). Pero ninguno hasta el momento se ha enfocado en la capacidad de estas de solubilizar micronutrientes importantes como lo es el zinc. Por lo que estudios como este son importantes para poder desarrollar nuevos productos para sustituir el uso de fertilizantes químicos en este tipo de cultivo, en este caso bio-fertilizantes que contengan bacterias con la capacidad solubilizar macronutrientes y micronutrientes. Debido a que con los pocos estudios que se han llevado a cabo con bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a piña, se han obtenido muy buenos resultados. Donde se ha visto un mejoramiento en el crecimiento de piña, aumentando la altura, peso seco, peso fresco, área foliar y tamaño de la raíz. Es importante mencionar que en ninguno de estos se ha llegado a pruebas en campo,

solamente en condiciones de invernadero. Por lo que es importante que en este tipo de estudios se llegue hasta pruebas en campo, para poder verificar que la bacteria realmente puede promover el crecimiento de las plantas en campo.

V. CONCLUSIONES

El éxito de aislamiento de bacterias fue mayor utilizando la versión del medio Tris suplementado con ZnO al 0.1% que contiene extracto de levadura y sulfato ferroso.

Todas las cepas aisladas con medio Tris suplementado con ZnO al 0.1% asociadas a *Ananas comosus (L.) Merr* mostraron ser capaces de solubilizar zinc.

Todas las cepas bacterianas solubilizadoras de zinc aisladas mostraron una morfología celular de bacilo.

Once de las cepas aisladas mostraron la habilidad de ser motiles, lo cual es una característica importante para que se de una colonización exitosa de las raíces y de la rizosfera.

La cepa Zn4 mostro el mayor potencial para solubilizar óxido de zinc.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar la versión del medio selectivo Tris que contiene sulfato ferroso y extracto de levadura para el aislamiento de rizobacterias solubilizadoras de zinc.

Se recomienda inocular 500 microlitros de las diluciones 10^{-4} a 10^{-7} en el medio selectivo para tener un mayor éxito en el aislamiento de bacterias solubilizadoras de zinc.

Se recomienda para estudios posteriores evaluar la capacidad de las cepas aisladas para solubilizar otras fuentes insolubles de zinc como el carbonato de zinc y el fosfato de zinc.

Se recomienda para estudios posteriores evaluar la capacidad de la cepa Zn4 para solubilizar otras fuentes de nutrientes, así como también, evaluar su capacidad de producir fitohormonas.

Se recomienda que las cepas se caractericen bioquímicamente y se identifiquen para continuar con el estudio.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aeron, A. *et al.* 2011. ***Emerging role of plant growth promoting rhizobacteria in agrobiología***.pp.1-36. En: Maheshwari, D.K. (ed.). *Bacteria in agrobiología: Crop ecosystems*. Springer, Berlin.
- Dacosta,A.C. y F.P. Duta.2001. ***Bioacummulation of copper, zinc, cadmium, and lead by Bacillus sp., Bacillus cereus, Bacillus sphaericus, and Bacillus subtilis***. Brazilian journal of microbiology 32(3):1-5.
- Ahemad, M. y M. Kibret.2014. ***Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective***. Journal of King Saud University 26 (1):1-20.
- Alexander,M. 1997. *Introduction to soil microbiology*. John Wiley and Sons, New York. 140-190 pp.
- Alloway, B.J.2008. *Zinc in soils and crop nutrition*. Segunda edición. IZA and IFA,Brussels.113-129 pp.
- Baldotto, L.E. Olivares, F. y R. Bressan-Smith.(2011). ***Structural interaction between GFP-labeled diazotrophic endophytic bacterium Herbaspirillum seropedicae RAM10 and pineapple plantlets 'Vitória'***. Brazilian Journal of Microbiology 42(1): 114-125.
- Baldotto, L.E.Baldotto, M.A.Olivares, F.L. Viana, A.P. y R. Bressan-Smith. 2010. ***Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (Ananas comosus L. Merrill) cultivar Vitória durante a aclimatização***. Revista brasileira de ciencia do solo 34(2):349-360.

- Baldotto, L.E. Altoe Baldotto, M. Pasqualoto, C. Bressan-Smith, R. y F. Lopes. 2010. *Growth promotion of pineapple Vitoria by humic acids and Burkholderia spp. during acclimatization*. Revista brasileira de ciencia do solo 34(5):1593-1600.
- Baldotto, L.E. Baldotto, M.A. Olivares, F.P. y A.N. Souza. 2014. *Desempenho do abacaxizeiro inoculado com bactérias diazotróficas solubilizadoras de fosfatos em conjunto com fosfato de rocha*. Revista Ceres 61(3):414-423.
- Berg, G. 2009. *Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture*. Applied microbiology and biotechnology 84(1):11-18.
- Bhattacharyya, P.N. y D.K. Jha. 2012. *Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture*. World Journal of Microbiology and biotechnology 28 (4): 1327–1350.
- Chen, J.H. 2006. *The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility*. International Workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use, Bangkok, 1-11.
- Clarke, C.A. y R.D. Hodges, 1988. *The environmental effects of conventional and organic/biological farming systems. II*. Soil ecology, soil fertility and nutrient cycles. Biological agriculture and horticulture 5 (2): 223-287.
- Cruz, L.M. De Souza, E.M. Weber, O.B. Baldani, J.I. Dobereiner, J. y F.O. Pedrosa. 2001. *16S Ribosomal DNA characterization of nitrogen fixing bacteria isolated from Banana (Musa spp.) and pineapple (Ananas comosus)*. Applied Environmental microbiology 67(5): 2375-2379.
- Czaban, J. Gajda, A. y B. Wroblewska. 2007. *The motility of bacteria from rhizosphere and different zones of winter wheat roots*. Journal of environmental studies: 16 (2): 301-308.

- Dhaked, B.S. Triveni, S. Subhash, R. y G. Padmaja. 2017. *Isolation and screening of potassium and zinc solubilizing bacteria from different rhizosphere soil*. International Journal of current microbiology and applied sciences 6 (8): 1271-1281.
- Fasim, F. Ahmed, N. Parson, R. y G.M. Gadd. 2002. *Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from air environment of a tannery*. FEMS Microbiology journal 2(1):1-6.
- Glick, B.R., 1995. *The enhancement of plant growth by free-living bacteria*. Canadian Journal of Microbiology 41(2): 109–117.
- Glick, B.R., 2012. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Scientifica 2(1): 1–15.
- González, R. Laudat, T. Arzola, M. Mendez, R. Marrero, P. Pulido, L.E. Dibut, B. y J.C. Lorenzo. 2010. *Effect of Azotobacter chroococcum on in vitro pineapple plants growth during acclimatization*. In vitro cellular and developmental biology 47(3):387-390.
- González-Rodríguez, R.M. Serrato, J. Molina, C.E. Aragon, V. Olalde, L.E. Pulido, B. y J.C. Lorenzo. 2013. *Biochemical and physiological changes produced by Azotobacter chroococcum (INIFAT5 strain) on pineapple in vitro-plantlets during acclimatization*. Acta physiologiae plantarum 35 (12):3483-3487.
- Gothwal, R. K. Nigam, V. K. Mohan, M. K. Ghosh, P y D. Sasmal. 2008. *SCREENING OF NITROGEN FIXERS FROM RHIZOSPHERIC BACTERIAL ISOLATES ASSOCIATED WITH IMPORTANT DESERT PLANTS*. Applied ecology and Environmental research 6(2): 101–109.
- Gray, E.J. Smith, D.L. 2005. *Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes*. Soil Biology and Biochemistry 37 (3): 395–412.

- Gupta, G. Parihar, S.S. Ahirwar, N.K. Snehi, S.K. y V. Singh. 2015. ***Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture***. Journal of Microbial and Biochemical Technology 7(2): 96-102.
- Humaira, Y. y A. Bano. 2011. ***Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soil of weeds of khewra salt range and attock***. Pakistan Journal of Botany 43 (3): 1663–1668.
- Illmer, P. Barbato, A. y F. Schinner. 1995. ***Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms***. Soil Biology and Biochemistry 27(3): 265–270.
- Indriyanti, I. Dewi, E.N. y E. Susanto. 2000. ***"PENGARUH PENAMBAHAN PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) dan BUAH NANAS (Ananas comosus) TERHADAP SPESIFIKASI PUPUK ORGANIK CAIR RUMPUT LAUT *Euchema cottonii* (Effect of Adding PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) and Pineapple (Ananas comosus) for Specifications of Organic Liquid Fertilizer *Euchema cottonii****. Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology 12 (2): 139-145.
- Keshavarz Zarjani, J. Aliasghar zad, N. Oustan, S. Emadi, M. y A. Ahmadi. 2013. ***Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria in some Iranian soils***. Archives of Agronomy and Soil Science 59(12):1713–1723.
- Kim, J. y D.C. Reece. 1994. ***Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation***. Biochemistry 33(2): 389–397.
- Kongbrailatpam, B. y C. Putatunda. 2018. ***In vitro phosphate solubilization by Bacillus subtilis PSBN B4 obtained from pineapple (Ananas comosus) rhizosphere***. International journal of applied environmental sciences 13(9):833-842.
- Shalini, T. Prasad, V. y Lata, C. 2019. ***Bacillus: Plant growth promoting bacteria for sustainable agriculture and environment***. En: Shankar, J. e D.P Singh, (eds.). New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. El Sevier, New jersey. Pp.43-55.

- Malhaes, E.M. De Souza, O.B. Weber, J.I. Baldani, J. Dobereiner, F.O. 2001. **16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill).** Appl Environ Microbiol 67(5): 2375-2379.
- Malusá, E. Sas-Paszt, L. y J. Ciesielska. 2012. **Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers.** Scientific World Journal 2(1): 1–12.
- Malusá, E. y N. Vassilev. 2014. **A contribution to set a legal framework for biofertilisers.** Applied Microbiology and Biotechnoly 98(15):6599–6607.
- Meena, V.S. Maurya, B.R. y J.P. Verma. 2014. **Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils?** Microbiological research 169(5): 337–347.
- Muthukumarasamy, R. Revathi, G. Seshadri, S. y C. Lakshminarasimhan. 2002. **Glucanacetobacter diazotrophicus (syn. Acetobacter diazotrophicus) a promising diazotrophic endophyte in tropics.** Current science 83(2):137-145.
- Nagaraju, Y. Triveni, S. y B. Subhash. 2016. **Screening of zinc solubilizing and potassium releasing bacterial and fungal isolates from different rhizosphere soils.** Journal Bioscan 11(4):2187-2192.
- Nadeem, S. Naveed, M. Zahir, Z. y N.A. Naeem. 2013. **Plant microbe interactions for sustainable agriculture: Fundamentals and recent advances.** (Ed.). Springer, New Delhi.
- Nguyen, C. Yan, W. Le Tacon, F. y F. Lapeyrie. 1992. **Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria abicolor* (maire).** Plant soil 4 (1): 193-199.
- Oteino, N. Lally, R.D. Kiwanuka, S. Lloyd, A. Ryan, D. Germaine, K.J. y D.N. Dowling. 2015. **Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates.** Frontiers in Microbiology 6(4): 745.



- Roholla, S. Mohammad, G. y R. Maryam. 2013. **Zinc (Zn) importance for crop production**. International journal of agronomy and plant production 4(1):64-68.
- Pliego, C. Kamilova, F. y B. Lugtenberg. 2011. **Plant growth promoting bacteria: Fundamentals and exploitation**.pp.295-343.En: Maheshwari, D.K. (ed.). Bacteria in agrobiología: Crop ecosystems. Springer, Berlin.
- Ramesh, A. Suchil,K. Sharma,M. Yadav,N. y P. Joshi. 2014. **Inoculation of zinc solubilizing Bacillus aryabhatai strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in vertisols of central India**.Journal of applied soil ecology 73 (4):87-96.
- Rodríguez, H. Fraga, R. Gonzalez, T. y Y, Bashan.2006. **Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria**. Plant and Soil 287 (2): 15–21.
- Römheld, V. y E.A. Kirkby.2010. **Research on potassium in agriculture: needs and prospects**. Plant Soil 335(2): 155–180.
- Sajquim, P.J. 2005. **Experiencias del cultivo de piña (Ananas comosus (L) Merr.) con el híbrido MD2 en la finca la plata, Coatepeque, Quetzaltenango**. Investigaciones agronómicas 3(1):1-47.
- Saravanan V. S. Kumar M. R. y T. M. Sa. 2011. **Microbial zinc solubilization and their role on plants**.pp.47–63.En: Maheshwari, D.K. (ed.). Bacteria in agrobiología: Crop ecosystems. Springer, Berlin.
- Shailendra Singh, G.G.*et al.* 2015. **Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture**. Journal of Microbiology and Biochemical Technology 7(2):96-102.
- Sheng, X.F. y L.Y. He. 2006. **Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of Bacillus edaphicus and its mutants and increased potassium uptake by wheat**. Canadian Journal of Microbiology 52(1):66–72.


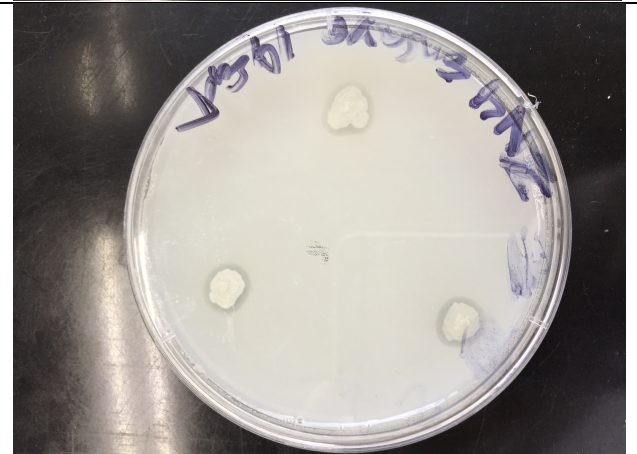
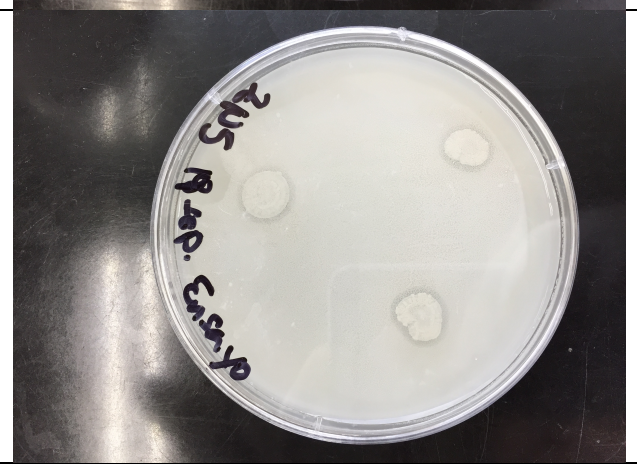
- Uroz, S. Calvaruso, C. Turpault, M. y P.Frey-Klett. 2009. ***Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms***. Trends in Microbiology 17(8): 378–387.
- Vejan, P. Abdullah, R. Khadiran, T. Ismail, S. y A. Nasrulhaq. 2016. ***Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review***. Molecules 21(5): 573.
- Vijaypayal, I. Jalalipal, V. y I. Jalali. 1998. ***Rhizosphere bacteria for biocontrol of plant diseases***. Indian Journal of Microbiology 38 (3):187–204.
- Vidyashree, D.N. Muthuraju, R. y P. Panneerselvam.2018. ***Evaluation of zinc solubilizing bacterial (ZSB) strains on growth, yield and quality of tomato (Lycopersicon esculentum)***. International journal of current microbiology and applied sciences 7(4): 2319-7706;
- Weber, O.B. Baldani, V.L.D. Teixeira, K.R.S. Kirchhof, G. Baldani, J.I. y J. Dobereiner. 1999. ***Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants***. Plant and soil 210(1):103-113.
- Weber, O.B. Correa, D. Souza da Silveira, M.R. Araujo Crisostomo, L. y E. Marhino. 2003. ***Efeito da bacteria dizotrófica em mudas micropropagadas de abacaxeiros Cayenne Champac em diferentes substratos***. Pesq. Agropecuaria Brasil 38 (3): 689-696.
- Wu, S.C. Cao, Z.H. Li, Z.G. Cheung, K.C. y M.H. Wong. 2005. ***Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial***. Geoderma 125(1-2): 155–166.

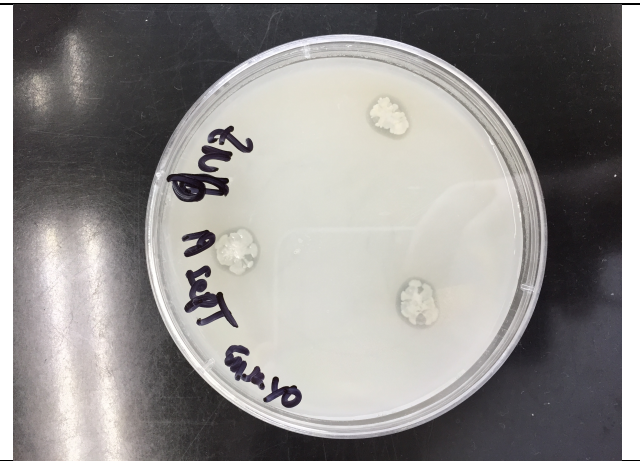
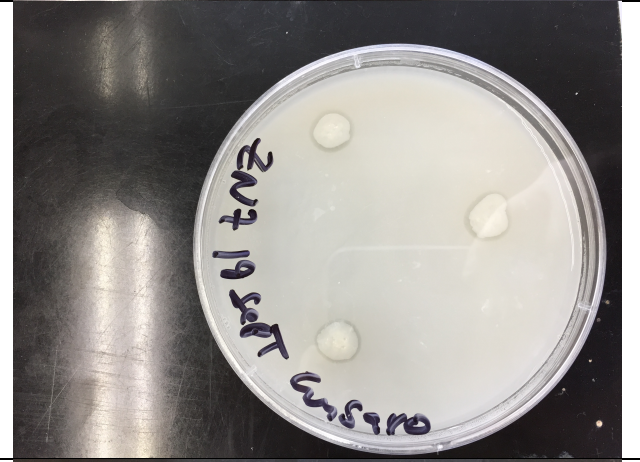

VII. ANEXOS



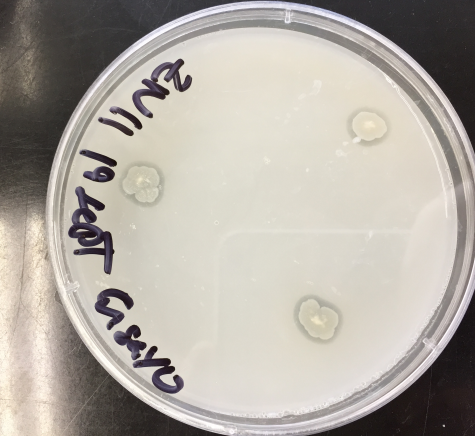
CUADRO 5.

Ensayo en placa de las cepas aisladas en medio Tris suplementado con ZnO al 0.1%.

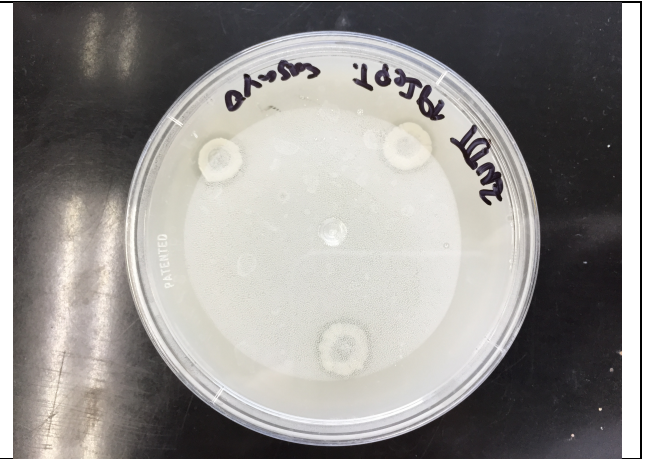
Cepa	Fotografía de ensayo de solubilización de zinc en placa
Zn1	
Zn2	

Zn3	 A petri dish containing a clear agar medium with three small, circular, white bacterial colonies. The lid of the dish is marked with handwritten text in black ink: "Zn3 Rep. Curvato".
Zn4	 A petri dish containing a clear agar medium with three small, circular, white bacterial colonies. The lid of the dish is marked with handwritten text in blue ink: "Zn4 Rep. Curvato".
Zn5	 A petri dish containing a clear agar medium with three small, circular, white bacterial colonies. The lid of the dish is marked with handwritten text in black ink: "Zn5 Rep. Curvato".

<p>Zn6</p>	
<p>Zn7</p>	
<p>Zn8</p>	

Zn9	 <p>A petri dish with a clear agar surface. There are four small, yellowish, circular spots. The dish is labeled with handwritten text: 'Zn9' at the top, 'CNS' on the left, and '19 Sept' on the right.</p>
Zn10	 <p>A petri dish with a clear agar surface. There are four small, yellowish, circular spots. The dish is labeled with handwritten text: 'Zn10' at the top, 'CNS' on the left, and '19 Sept' on the right.</p>
Zn11	 <p>A petri dish with a clear agar surface. There are four small, yellowish, circular spots. The dish is labeled with handwritten text: 'Zn11' at the top, 'CNS' on the left, and '19 Sept' on the right.</p>

Zn12



CUADRO 6.

Resultados de los triplicados en el cálculo de eficiencia de solubilización en medio TRIS modificado suplementado con óxido de zinc al 0.1%.

No.	Cepa aislada	Solubilización de óxido de zinc como fuente insoluble de zinc (mm)			
		Valores de los triplicados ES%			ES%
1	Zn1	128	122	132	127
2	Zn2	136	120	122	126
3	Zn3	127	119	124	123
4	Zn4	136	141	147	141
5	Zn5	148	131	139	139
6	Zn6	120	125	118	121
7	Zn7	120	121	116	119
8	Zn8	122	131	133	129
9	Zn9	125	119	123	122
10	Zn10	144	133	131	136
11	Zn11	126	136	129	130
12	Zn12	108	110	115	111

CUADRO 7.

Composición del medio TRIS modificado suplementado con óxido de zinc al 0.1%.

Medio	Composición del medio
Tris modificado con ZnO al 0.1%	C ₆ H ₁₂ O ₆ 10 g/L; K ₂ HPO ₄ 0.25 g/L ; MnSO ₄ 0.01 g/L; FeSO ₄ * 7H ₂ O 0.01 g/L; (NH ₄)SO ₄ 0.5g/L; KCl 0.2 g/L; extracto de levadura 0.5 g/L; agar 20 g/L