



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**  
**ESCUELA DE POSGRADO**

**TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS**  
**CON MENCIÓN EN:**

**BIOTECNOLOGIA MOLECULAR**

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS**  
**CULTIVADAS Y NO CULTIVADAS ASOCIADAS A LA**  
**RIZÓSFERA DE *Opuntia ficus-indica* (L.) mill. (CACTACEAE)**  
**EN ECOSISTEMAS ÁRIDOS.**

**AUTOR**

**BERNABÉ SALOMÓN LUIS ALAYA**

**TUMBES, PERÚ**  
**2016**





**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**  
**ESCUELA DE POSGRADO**

**TESIS DE MAESTRO EN CIENCIAS**  
**CON MENCIÓN EN:**

**BIOTECNOLOGIA MOLECULAR**

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS**  
**CULTIVADAS Y NO CULTIVADAS ASOCIADAS A LA**  
**RIZÓSFERA DE *Opuntia ficus-indica* (L.) mill. (CACTACEAE)**  
**EN ECOSISTEMAS ÁRIDOS.**

**AUTOR**

**BERNABÉ SALOMÓN LUIS ALAYA**

**TUMBES, PERÚ**  
**2016**

## **DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD**

Yo Bernabé Salomón Luis Alaya declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.

---

Bernabé Salomón Luis Alaya



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES  
**ESCUELA DE POSGRADO**  
 Tumbes - Perú

## ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los trece días del mes de junio del año dos mil dieciséis, a las 2:40 horas, en el Auditorio de la Facultad Cs. Salud., se reunieron los miembros del Jurado designados con **Resolución Directoral N° 038-2016/UNT-EPG**, **Dr. VÍCTOR BENJAMÍN CARRIL FERNÁNDEZ** - Presidente; **Dr. AUBERTO HIDALGO MOGOLLÓN** Secretario; **Dr. ERIC MIALHE, PH.D. D.E** – vocal; y con **Resolución Directoral N° 57-2016/UNT-EPG-D** se fijó la fecha se sustentación y defensa de la tesis: **IDENTIFICACION MOLECULAR DE BACTERIAS CULTIVADAS Y NO CULTIVADAS ASOCIADAS A LA RIZOSFERA DE *Opuntia ficus – indica* (L) mill EN ECOSISTEMAS ÁRIDOS**; presentada por el egresado del Programa de maestría en Biotecnología Molecular **LUIS ALAYA, BERNABÉ SALOMÓN**, asesorado por el Ph.D **VIRNA CEDEÑO ESCOBAR**

Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: Aprobado por Unanimidad, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 3:05 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

Tumbes, 13 de junio de 2016

  
 Dr. VÍCTOR BENJAMÍN CARRIL FERNÁNDEZ  
 Presidente

  
 Dr. AUBERTO HIDALGO MOGOLLÓN  
 Secretario

  
 Dr. ERIC MIALHE, PH.D. D.E  
 Vocal

C.c. Jurado de Proyecto de Tesis (3), Asesor(1), sustentante (1), UI (2)

## RESPONSABLES

Bernabé Salomón Luis Alaya

---

EJECUTOR

Virna Alexia Cedeño Escobar

---

ASESORA

**JURADO DICTAMINADOR**

Dr. Víctor Carril Fernández

\_\_\_\_\_  
PRESIDENTE

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón

\_\_\_\_\_  
SECRETARIO

Dr. Eric Mialhe Matonnier , Ph.D. D.E.

\_\_\_\_\_  
VOCAL

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN.</b>	x
<b>ABSTRACT.</b>	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	12
<b>2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.</b>	14
<b>2.1. Antecedentes.</b>	14
<b>2.2. Bases Teórico- Científicas</b>	17
<b>2.3. Definición de términos básicos.</b>	21
Secuenciación de ADN	21
Metagenómica	21
Proteómica	21
Espectrometría de masas MALDI TOF TOF	22
Rizósfera	22
Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV)	22
<i>Opuntia ficus-indica</i>	23
Ecosistema árido	23
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	24
Área de estudio, plantas de cactus y muestreo	24
Análisis físico-químico del suelo	25
Aislamiento y purificación de bacterias cultivables	25
Extracción de ADN de bacterias cultivables	26
Amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	26
Electroforesis y secuenciación	27
Extracción de ADN de bacterias cultivables y no cultivables	27
Análisis de Datos	28



Pruebas de antagonismo bacteriano intra-género	28
Extracción de proteínas de bacterias	28
<b>4. RESULTADOS.</b>	<b>29</b>
Análisis físico-químico del suelo	29
Aislamiento e identificación molecular de bacterias cultivables	29
Análisis de la microbiota rizosférica por metagenómica	31
Antagonismo bacteriano intra-genérico	34
Caracterizaciones preliminares en espectrometría de masa	35
<b>5. DISCUSIÓN.</b>	<b>37</b>
<b>6. CONCLUSIONES.</b>	<b>41</b>
<b>7. RECOMENDACIONES.</b>	<b>42</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b>	<b>43</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>51</b>

## RESUMEN

Cerca de la mitad de las tierras continentales del planeta se consideran ecosistemas áridos o amenazados por sequía. Entre las plantas adaptadas a estos ecosistemas se destacan los cactus. Para poder desarrollarse, los cactus tienen varios mecanismos de adaptación, entre ellos la asociación con comunidades microbianas benéficas a nivel de su rizósfera. Entre estos microorganismos destacan las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), quienes contribuyen al desarrollo exitoso de la planta en condiciones de aridez. *Opuntia ficus-indica* es la cactácea más estudiada actualmente. La identificación de las bacterias asociadas a la rizósfera de *O. ficus-indica* es importante para lograr entender, en parte, la adaptación de los cactus a estos climas extremos y podría ayudar a desarrollar proyectos de agricultura en el desierto. La identificación de las bacterias asociadas a la rizósfera de *O. ficus indica* de cinco zonas de Tumbes (Perú) ha estado basada en análisis de metagenómica dirigida al gen del ADPr 16S con el programa MG Rast. Además, se utilizaron técnicas de microbiología e identificación molecular para bacterias cultivables, así como espectrometría de masas MALDI TOF TOF. Los resultados de metagenómica muestran una amplia diversidad bacteriana rizosférica con un total de hasta 683 especies de bacterias cultivables y no cultivables. Por otro lado, ha sido posible aislar 48 cepas bacterianas, entre las cuales se encuentran principalmente *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* y *Bacillus*. Finalmente, se logró identificar a *Serratia marcenses* y *Leclercia adescarboxilata* mediante su perfil proteómico usando la técnica de espectrometría de masa MALDI TOF TOF.

### Palabras clave:

Bacteria, rizósfera, *Opuntia ficus-indica*, suelos áridos, metagenómica, proteómica.

## ABSTRACT

Nearly half of the world's mainland are considered arid ecosystems or threatened by drought. Among the plants adapted to these ecosystems highlights the cactus. In order to grow up, cacti have various coping mechanisms, including the association with beneficial microbial communities at the level of their rhizosphere. These microorganisms include plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) that contribute to the successful development of the plant in dry conditions. *Opuntia ficus-indica* is the cactus most currently studied. Identification of bacteria associated with the rhizosphere of *O. ficus-indica* is important in order to understand in part cactus adaptation to extreme climates and could help to develop desert agriculture projects. Identification of bacteria associated to the rhizosphere of *O. ficus indica* from five areas of Tumbes (Peru) has been based on analysis of metagenomic directed to 16S rDNA gene with MG Rast program for identification of cultivable bacteria using microbiology and molecular techniques and lastly mass spectrometry MALDI TOF MS. Metagenomics results show a wide rhizosphere bacterial diversity with a total of up to 683 species of cultivable and non-cultivable bacteria. Furthermore, it has been possible to isolate 48 bacteria, among which are mainly *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* and *Bacillus*. Finally, mass spectrometry MALDI TOF TOF MS allowed to identify *Serratia marcenses* and *Leclercia adescarboxilata* by the proteomic profile.

### Keywords:

Bacterium, rhizosphere, *Opuntia ficus-indica*, arid soils, metagenomics, proteomics

## 1. INTRODUCCIÓN.

Las tierras secas incluyen una amplia gama de situaciones ambientales que van desde los desiertos extremos (hiperáridos) hasta los ecosistemas subhúmedos secos (MINAM, 2011). En términos científicos, el bioma de desierto puede definirse climatológicamente como la suma de todas las zonas áridas e hiperáridas del mundo y, físicamente, como amplias zonas contiguas con grandes extensiones de suelo desnudo y escasa cobertura vegetal (UNEP, 2006). Cerca de la mitad de suelos cultivables son áridos, semiáridos o viven bajo amenaza de sequía (Aguirre *et al.*, 2012).

En los ecosistemas áridos las plantas han sufrido un proceso evolutivo profundo que resulta en una amplia variedad de formas de vida especializadas adaptadas para sobrevivir en estos medios. (UNEP 2006; Aguirre *et al.*, 2012, Kawamura *et al.* 1, 2013). Las cactáceas (Cactaceae) corresponden a una de las familias de plantas adaptadas a suelos áridos, siendo *Opuntia ficus-indica* la especie más importante por ser un recurso de productos y usos múltiples, inicialmente como planta silvestre y luego como cultivo de subsistencia comercial, contribuyendo así a la seguridad alimenticia de poblaciones en áreas agrícolas marginadas (Nobel 2002; Reynolds 2003; Alary, Nefzaoui y Jemaa, 2007; Andrew *et al.*, 2012).

Para lograr convertir los suelos áridos en tierras arables, se requiere de una visión global de todo el ecosistema y de las interacciones planta-microorganismos (Marrasco *et al.*, 2011). La rizósfera es el hábitat ecológico en el cual los microorganismos están en contacto directo con las raíces de las plantas, donde existe un flujo de compuestos orgánicos, producto de la fotosíntesis, que son exudados por la raíz. Además, es el sitio donde se dan diversas interacciones benéficas que, en el caso de los cactus, les permiten desarrollarse en condiciones áridas (Loredo, López y Espinosa, 2004; Gómez *et al.*, 2012).

Bajo todas estas perspectivas de desarrollo de la agricultura de desierto basada en cultivos de cactáceas nativas, nuestra investigación planteó la identificación de bacterias cultivables y no cultivables asociadas a la rizósfera de *O. ficus-indica*, mediante un enfoque microbiológico con caracterización molecular de las cepas aisladas y enfoque metagenómico y proteómico para la microbiota global.

## 2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.

### 2.1. Antecedentes.

Lopez BR, Bashan Y. y Bacilio M, 2011. Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the southern Sonoran Desert. Environmental Microbiology Group, Northwestern Center for Biological Research (CIBNOR), Mar Bermejo 195, Colonia Playa Palo de Santa Rita, 23090 La Paz, BCS, México. En esta investigación se estudió las bacterias endófitas asociadas a la colonización sobre la roca en el cactus *Mammillaria fraileana*, estas bacterias tuvieron elevado potencial de lixiviación del nitrógeno, solubilización de fosfatos y degradación de la roca. Catorce bacterias endófitas fueron aisladas de las raíces y cuatro de ellas fueron identificadas por la secuenciación del gen 16S rRNA. Las pruebas de *in vitro* indicaron que *Azotobacter vinelandii* es un potencial lixivador de nitrógeno, así mismo se identificó solubilizadores de fosfato inorgánico en *Pseudomonas putida*, *Enterobacter sakazakii* y *Bacillus megaterium*, mientras que *A. vinelandii*, *P. putida* y *B. megaterium* degradan la roca por reducción de partículas probablemente por cambios de pH en el medio líquido. Este trabajo nos sirvió de referencia para lograr determinar en la tesis de bacterias ayudan al desarrollo de la planta.

Aguirre-Garrido JF. *et al* , 2012. Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. Doctorado en Ciencias Biológicas, UAM-Xochimilco, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Mexico y Estación Experimental del Zaidín CSIC, Granada, España. En esta investigación se evaluaron la diversidad y composición de comunidades bacterianas en el bulk soil y la rizósfera de tres especies de cactus *Mammillaria carnea*, *Opuntia pilifera* y *Stenocereus stellatus* utilizando métodos de cultivo y técnicas moleculares, considerando el posible de las estaciones lluviosa y seca. La composición de los géneros fueron similares en los aislados de rizósfera en cada estación. Los taxones más abundante fue las alfa Proteobacterias, Actinobacterias y Firmicutes, así mismo el género *Ochrobactrum* fue el más representativo en la muestras rizosférica cuando fueron cultivados en medio libre de nitrógeno. En este trabajo se enfocó a secuencias parciales del gen 16S rRNA, con ello nos ayuda a mejorar visualización de estudio planteado con respecto a la metodología y posterior análisis.

Fonseca-García C, *et al.*, 2016. The Cacti Microbiome: Interplay between Habitat-Filtering and Host-Specificity. Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Irapuato, México. En esta investigación se estudió las comunidades microbianas asociadas a dos cactus: *Myrtillocactus geometrizans* y *Opuntia robusta.*, mediante análisis comparativo de los perfiles filogenéticos de sus respectivos microbiomas y relacionándolos con el lugar de la planta, el sitio de muestreo y la estación. Los resultados de este trabajo muestran que la diversidad bacteriana y de arqueas fue elevada en la filósfera en comparación con la rizósfera del cactus, así mismo los suelos semiáridos muestran un elevado nivel de diversidad microbiana en comparación con el tallo, la cual fue menor. La información generada en este trabajo brinda un conocimiento que ayudaría a mejorar la agricultura sustentable en regiones áridas y semiáridas del mundo. Esta referencia nos ayuda a mejorar la descripción del trabajo de tesis presentado sobre todo en el análisis bioinformático de la data generada.

Marrasco R. *et al.*, 2013. Are drought-resistance promoting bacteria cross-compatible with different plant models?. Department of Food, Environmental, and Nutritional Sciences, DeFENS; University of Milan; Milan, Italy; Department of Agricultural and Environmental Sciences - Production, Landscape, Agroenergy, DISAA ; University of Milan; Milan, Italy; Laboratory of Microbiology and Active Biomolecules; University of Tunis El Manar; Tunis, Tunisia. En esta investigación se estudió a las bacterias no cultivadas en suelo del desierto de la rizósfera de plantas de pimiento como comunidades agrícolas anfitriones que PGPB. Las plantas de pimientos expuestas a aislados bacterianos de plantas cultivadas bajo agricultura en el desierto exhibió una mayor tolerancia a la escasez de agua, en comparación con el control no tratado. Esta promoción fue mediado por un sistema más grande de la raíz (hasta 40%), estimulada por las bacterias. también se evidencia que las plantas con resistencia al estrés hídrico. Esta investigación nos sirve para lograr establecer los consorcios e inóculos posibles como promotores de crecimiento vegetal.



## 2.2. Bases Teórico - Científicas.

La identificación molecular es basada en el estudio de los genes, especialmente la pequeña subunidad rRNA, los cuales nos proporcionan retratos filogenéticos de las comunidades, incluyendo organismos que aún no han sido cultivadas, estos datos se enriquecen en valor con el pasar del tiempo y proporcionan más información que se relacionan la filogenia y la fisiología de los organismos. Una contribución esencial para la utilidad de este enfoque es la interspersión de secuencias más o menos conservadas dentro de los genes de ARNr. Las porciones más variadas distinguen los grupos filogenéticos, mientras que las porciones conservadas proporcionan secuencias universales para la unión de primers de PCR. Esto permite la amplificación específica de los genes de interés fuera del ADN genómico total de la comunidad (metagenoma) (Frank *et al.* 2008).

Las primeras técnicas de identificación de microorganismos estaban basadas en técnicas de cultivo en medios selectivos, coloración de Gram y pruebas bioquímicas. Estos aún siguen vigentes pero han demostrado algunas limitaciones en la identificación de bacterias. El problema se basa en la capacidad de variación genética de las bacterias, las que incluyen fenómenos de mutación, recombinación, intercambios de genes entre bacterias. Estos complejos fenómenos inducen que dos bacterias “morfológicamente” pertenecientes a la misma especie demuestren comportamientos distintos en términos de virulencia, relativizando así la noción de “especies” en estos microorganismos. (Venter *et al.*, 2004).

Con la aparición de las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS por sus siglas en inglés), se llevaron a cabo proyectos de secuenciación masiva de las comunidades bacterianas (Venter *et al.*, 2004; Tringe *et al.*, 2005; Hamady *et al.*, 2008). Esta metodología, denominada metagenómica, permite la secuenciación de toda la comunidad. La producción de grandes volúmenes de datos de secuencias nucleotídicas, en magnitudes pueden alcanzar terabytes (TB) de información para una muestra de suelo (Gans, 2005).

Tres categorías principales han sido utilizadas para la identificación y clasificación de las secuencias: búsqueda de similitudes de secuencias, composición de la secuencia y métodos filogenéticos (Bazinet y Cummings, 2012). Numerosas aplicaciones de software han sido lanzadas (Gerlach y Stoye, 2011; Schreiber *et al.*, 2010) y la mayoría utilizan sólo uno de los enfoques, a pesar de algunas excepciones en las que se utilizan dos métodos simultáneamente. Este enfoque se basa en la información obtenida por homología en búsquedas de bases de datos. (Gerlach y Stoye, 2011), clasificación fiable sobre los niveles taxonómicos superiores (por ejemplo, Súper reino o Filo). CARMA (Gerlach y Stoye, 2011), MARTA (Horton *et al.*, 2010), MetaPhyler (Liu *et al.*, 2011), MetaPhlAn (Segata *et al.*, 2012) o MG-RAST (Glass *et al.*, 2010) son algunas herramientas basadas en búsquedas de similitud y cada una tiene características complementarias para mejorar la clasificación.

En los últimos años, técnicas moleculares emergentes basadas en la caracterización del perfil proteico por MALDI TOF se ha introducido recientemente en laboratorios de microbiología como una tecnología emergente aplicada para la identificación de microorganismos basada en el análisis espectral de proteínas (Seng *et al.*, 2009). Esta técnica se realiza por comparación del espectro del microorganismo investigado con espectros en una base de datos de referencia que permite la identificación rápida de bacterias. (Sandrin *et al.*, 2013). El resultado es expresado en porcentaje de homología para la secuenciación y en un valor absoluto para el MALDI TOF y permite determinar la cercanía del perfil propuesto con los miles existentes en los bancos de datos. (Lay, 2001). Numerosos trabajos han demostrado las increíbles ventajas de esta técnica en términos de rapidez (identificación de una cepa en 3 segundos a 2 horas), disminución del costo operativo, simplicidad. (Seng *et al.*, 2009, Sala *et al.*, 2016).

Muchos aspectos importantes de las interacciones suelo-planta son mediados por procesos a nivel de la rizósfera, incluyendo la adquisición de nutrimentos por la planta, la colonización de las raíces por los microorganismos y la descomposición de la materia orgánica (Gómez *et al.*, 2012). En virtud de su capacidad de adaptación fisiológica y versatilidad metabólica, las bacterias asociadas a la rizósfera de las plantas son agentes claves del cambio del suelo en los agroecosistemas, con efectos positivos, en cuanto al desarrollo de la planta. Sin embargo, esta regulación está mediada por el *quórum sensing* de las bacterias, las cuales, deben adaptarse para alcanzar una alta proliferación y, de esta manera, estimularse, activarse y mantenerse en la zona radicular, por medio de la liberación selectiva de exudados y lixiviados, por parte de las planta y otros microorganismos (Cano, 2011). A su vez, las bacterias de la rizósfera son capaces de generar una amplia variedad de metabolitos secundarios que pueden tener una influencia positiva sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, mejora de la disponibilidad de minerales y nutrientes en el suelo, etc. (De-Bashan *et al.*, 2007; Lopez, Bashan and Bacilio, 2011; Kavamura *et al.*, 2013).

Los mecanismos de las RPCV para promover el crecimiento de las plantas son diversos, los que se mencionan con más frecuencia en la literatura son: fijación de nitrógeno, producción de sustancias reguladoras del crecimiento, incremento en el desarrollo de la raíz, producción de compuestos sideróforos que incrementan la disponibilidad del hierro en la rizósfera, alteraciones en el potencial de la membrana de la raíz, inducción de resistencia sistémica a patógenos, inhibición del crecimiento de organismos antagónicos, adaptación al estrés hídrico e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Loredo *et al.*, 2004). Un ejemplo del uso de organismo en cactus es el trabajo desarrollado por Pernasetti y Di Barbaro (2012) quienes ensayaron inoculando *Azospirillum brasilensis* en *Opuntia* (tuna) resultando en un aumento significativo de las raíces, característica de gran importancia para esta planta que se desarrolla en zonas de aridez, ya que amplía la posibilidad de toma de agua y nutrientes, sin olvidar también la importancia que tiene el mayor desarrollo radical en el anclaje de la planta en zonas ventosas.

Desafortunadamente, sólo una pequeña proporción de los microorganismos de la rizósfera puede ser cultivable, lo que significa que nuestra comprensión del mundo microbiano es altamente sesgada y no representa la realidad en la naturaleza (Amann, Wolfgang and Karl, 1995; Pace, 1997; Neelakanta y Sultana, 2013; Handelsman, 2004). Los primeros estudios en este mundo desconocido se centraron en el gen del ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) (Muyser *et al.*, 1993; Stein *et al.*, 1996; Hugenholtz *et al.*, 1998; Hugenholtz y Rubin, 2005) considerando, en particular, las regiones hipervariables (V1-V9) que permiten la discriminación de la diversidad bacteriana en muestras ambientales (Shah *et al.*, 2011).

## **2.2. Definición de términos básicos**

### Secuenciación de ADN

La secuenciación del ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en una molécula de ADN. La secuencia de ADN constituye la información genética heredable del núcleo celular, los plásmidos, la mitocondria y cloroplastos (en plantas) que forman la base de los programas de desarrollo de los seres vivos. Así pues, determinar la secuencia de ADN es útil en el estudio de la investigación básica de los procesos biológicos fundamentales, así como en campos aplicados.

### Metagenómica

Es el estudio del conjunto de genomas de un determinado entorno (metagenoma) directamente a partir de muestras de ese ambiente, sin necesidad de aislar y cultivar esas especies. La metagenómica es una de las nuevas aplicaciones que han sido posibles con la aparición de las tecnologías para secuenciar el ADN a bajo costo. Estas nuevas tecnologías permiten reducir el costo de secuenciar el ADN en comparación con aquellos basados en el método de Sanger.

### Proteómica

La proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas, en particular de su estructura y función. Las proteínas son partes vitales de los organismos vivos, ya que son los componentes principales de las rutas metabólicas de las células. El término proteómica fue acuñado en 1997 como una analogía con genómica, el estudio de los genes. La palabra "proteoma" es la fusión de "proteína" y "genoma", y fue acuñada por Marc Wilkins en 1994 mientras trabajaba en ese concepto como estudiante de doctorado. El proteoma es la dotación completa de proteínas, incluyendo las modificaciones hechas a un conjunto particular de proteínas, producidas por un organismo o sistema.

## Espectrometría de masas MALDI TOF TOF

La espectrometría de masas por desorción/ionización con láser asistido por matriz acoplada a un analizador por tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) es una herramienta útil para la caracterización de microorganismos que son difíciles de identificar utilizando métodos de rutina. Así, varios estudios han reportado el uso de MALDI -TOF MS para la identificación de bacterias por lo que se ha convertido en una herramienta potencial para la identificación más rápida, precisa y menos costosa de bacterias asociadas a la rizósfera de plantas.

## Rizósfera

El termino rizósfera ha sido derivado de la palabra griega “rhiza” que significa raíz y de “sphere”, que significa influencia. La primera definición fue por el científico German Hitler en 1904 la cual la definió como “La zona del suelo inmediatamente adjunta a las raíces de leguminosas que soportan elevados niveles de actividad microbiana”. La definición actual de la rizósfera es una estrecha región en el suelo que está directamente influenciada por las secreciones de las raíces y actividad microbiana asociada. Se divide en tres partes: la endorizósfera, el rizoplano y la ectorizósfera.

## Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV)

Las bacterias promotoras del crecimiento de plantas (RPCV) por sus siglas en inglés) se encuentran en la rizósfera de muchas especies de plantas y tiene efectos benéficos sobre la planta hospedadora. Las RPCV pueden influenciar a la planta de manera directa o indirecta. Un mecanismo directo puede ser el incremento del crecimiento mediante el suministro de nutrientes y hormonas. El mecanismo indirecto incluye la reducción de la susceptibilidad ante enfermedades y activación de formas de defensa como la inducción de un sistema de resistencia. Ejemplos de estas bacterias incluyen los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Arthrobacter*.

### *Opuntia ficus – indica*

Comúnmente conocida por como “tuna” o “nopal” es una planta de la familia Cactaceae, de gran importancia económica en ecosistemas áridos y semiáridos. Una hipótesis plantea que esta especie es originaria de América (México), sin embargo está distribuida por casi todo el mundo en donde se emplea para múltiples usos, en los que se mencionan: como productora de frutos para consumo humano, productora de verdura “nopalitos”, como planta forrajera, sustrato para la crianza del insecto del cual extraen el colorante natural denominado carmín entre otras. Así mismo *O. ficus-indica* es uno de los miembros de la familia cactácea que se usa como modelo para estudios de investigación en general.

### Ecosistema árido

Los ecosistemas áridos, son unidades geográficas y ecológicas en donde predominan condiciones de sequedad extrema, cobertura vegetal reducida o casi ausente; estas presentan periodos secos muy prolongados, lluvias irregulares con promedios bastante bajos y temperaturas muy fluctuantes en el día y en la noche. Se estima que cerca de la mitad de tierras continentales poseen zonas áridas, semiáridas o están en camino a la desertificación.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### Área de estudio, cactus y muestreo.

Tumbes es un departamento situado en el extremo noroeste de Perú, se caracteriza por poseer una alta temperatura y humedad relativa durante todo el año, siendo la temperatura promedio de 26 °C. Así mismo, el promedio de precipitación anual es de 464.1 mm con lluvias entre los meses de diciembre a abril (SENAMHI, 2015).

La selección de cada *O. ficus-indica* fue en función a su desarrollo normal como planta cultivada y/o silvestre en las zonas áridas del departamento de Tumbes, en las zonas conocidas como Corrales, Cabuyal, Casitas, Uña de Gato y Puerto Pizarro (Figura 1).

El muestreo se realizó tomando aproximadamente 2 kg de muestra de rizósfera de *O. ficus-indica*, seleccionadas por juicio no probabilístico o de conveniencia debido a que las plantas se encontraban en pequeñas cantidades y en estado silvestre. Se consideró como juicio crítico la vigorosidad de la planta y el tamaño, el material de colecta empleado se desinfectó con alcohol cada vez que se cambió de planta, las muestras fueron colocadas por separado en bolsas plásticas tipo ziploc, siendo trasladadas al laboratorio y puestas en refrigeración a 4°C hasta su uso.



**Figura 1.** Localización de las zonas de muestreo de rizósfera de *Opuntia ficus-indica*



### Análisis físico-químico del suelo

Luego de la recolección de las muestras se pesó 1 kg de suelo para determinar la textura, pH, materia orgánica, nitrógeno, fósforo y potasio. Esta determinación fue realizada en el Laboratorio de Agua, Suelo, Medio Ambiente y Fertilización de la Facultad de Ingeniería Agrícola de la Universidad Nacional Agraria La Molina, quienes proporcionaron los resultados para el análisis correspondiente.

### Aislamiento y purificación de bacterias cultivables

Se realizó utilizando la técnica de diluciones, la cual consistió en adicionar 2 g de muestra en 18 ml de caldo de cultivo Trypticase Soy Broth (TSB) y Luria Bertani (LB). Se colocó en agitador orbital por 12 horas para luego tomar 10 µl de cada dilución para siembra por aspersión en diferentes cajas de Petri conteniendo, por separado, medio de cultivo Trypticase Soy Agar (TSA) y Cetrimide, donde el primero es un medio de cultivo general y el segundo es un medio específico para Pseudomonas.

Posteriormente se purificaron las bacterias haciendo repiques hasta obtener cepas puras. Estas placas fueron usadas para seleccionar las colonias bacterianas basándose en su diferencia morfológica. Las colonias seleccionadas fueron mantenidas en el mismo medio de crecimiento de donde fueron obtenidas para luego mediante la técnica de tinción diferencial de Gram fueron observadas al microscopio.

### Extracción de ADN de bacterias cultivables

Se utilizó el método de extracción rápida de ebullición por Buffer Fosfato Alcalino (PBS). Las unidades formadoras de colonia (UFC) “puras putativas” se colocaron en microtubos con TSB o LB y luego fueron microcentrifugadas a 10 000 rpm por 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y se conservó solo el pellet. Para la lisis celular se agregó Tris HCl - Edta (1x) y se colocaron los tubos a ebullición por 10 minutos, seguido a esto se procedió a incubar los tubos en hielo por 5 minutos. Este shock de temperatura junto con los reactivos antes mencionados ayudó a la rotura de las paredes celulares bacterianas. Las muestras fueron centrifugadas a 10 000 rpm por 2 minutos y se retiró todo el sobrenadante posible, sin tocar el pellet; éste fue resuspendido en agua ultrapura y se adicionó ARNasa para luego ser puesto en incubación a 37°C por una hora.

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

Para realizar la PCR, se preparó un buffer mix, el cual contenía Buffer 10x, Agua Ultra Pura (AUP), dNTPs, Taq Polimerasa recombinante, de primer 27F Forward (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 0,6 pmol/μl de primer 1492R Reverse (GGYTACCTTGTTAGGACTT) (Frank *et al.*, 2008). Se adicionó 23 μl del mix en microtubos junto con 2 μl del ADN obtenido por extracción y fueron colocados en el termociclador con el programa establecido para los genes 16S: 94°C por 5 minutos, 94°C por 30 segundos, 58°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto y 72°C por 4 minutos.

### Electroforesis y secuenciación

Se preparó gel de agarosa al 1.5%, para ello se pesó 0.9 g de agarosa y se resuspendió en 60 ml de Tris Ac. Acético EDTA; se adicionó 3 µl de bromuro de etidio y se vertió sobre una cubeta de 20 pocillos, en cada pocillo se colocó la mezcla de azul de bromofenol con los amplicones obtenidos por PCR, cada uno por separado. Posteriormente la cubeta fue colocada en una cámara de electroforesis migrando las muestras por 30 minutos a 90 voltios. Posteriormente el gel fue colocado en un transiluminador UV donde se observaron bandas fluorescentes a una misma distancia. Las muestras positivas fueron enviadas a los laboratorios de la empresa MacroGen (USA), quienes remitieron los resultados para el alineamiento correspondiente.

### Extracción de ADN metagenómico de bacterias cultivables y no cultivables

La extracción de ADN metagenómico de bacterias cultivables y no cultivables se realizó empleando el Power® Soil DNA Isolation kit (Mo Bio Laboratories) según las indicaciones del proveedor. El ADN extraído fue cuantificado en un espectrofotómetro marca Eppendorf y luego llevado para análisis por PCR con primer 27F Forward (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y primer 1492R Reverse (GGYTACCTTGTTAGGACTT) (Frank *et al.*, 2008) para su confirmación en electroforesis en gel de agarosa. Las muestras positivas fueron enviadas a la compañía MRDNA lab quienes remitieron los resultados para su posterior análisis.

### Análisis de Datos

Los resultados de las secuencias de nucleótidos del gen del ARNr 16S se alinearon empleando el programa Mega 6 y se analizaron utilizando el BLAST de NCBI. Por otro lado, los OTU (Operational Taxonomic Unit) obtenidos por metagenómica fueron analizados mediante el programa bioinformático MG – RAST. Finalmente, los datos obtenidos de MALDI TOF TOF fueron analizados con el software Protein Pilot™ 4.0 con bases de datos específicas para cada microorganismo y se procedió a corroborar la secuencia de aminoácidos para cada proteína usando el programa bioinformático protein blast.

### Pruebas de antagonismo bacteriano intra-género

Estas pruebas se realizaron considerando tres géneros de bacterias: *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Acinetobacter*, para ello se utilizó Agar Cetrimide para hacer cultivo de *Pseudomonas* y Agar TSA para *Enterobacter* y *Acinetobacter*. Se agregó 100 µl de las bacterias mencionadas en una caja de Petri. Luego del sembrado se colocó papel filtro estéril inoculando 5µl de la bacteria a evaluar por su antagonismo y se procedió a observar halos de inhibición a partir de las 24 horas en adelante.

### Extracción de proteínas de bacterias

Para la extracción de proteínas de bacterias aisladas de la rizósfera de *O.ficus-indica* se utilizó el protocolo de QIAGEN KIT (Qproteome® Bacterial Protein Preparation Handbook catálogo 37900). El producto de la extracción se separó por SDS PAGE 10 %. La digestión en gel se realizó utilizando el protocolo de Shevchenko *et al.* (2007), que nos permitió la digestión eficiente de proteínas fijadas en gel de poliacrilamida. Finalmente se realizó análisis por espectrometría de masas MS MALDI TOF- TOF obteniendo mapeos de masas de alto rendimiento.

#### 4. RESULTADOS.

##### Análisis físico químico de los suelos

La determinación físico química de los suelos ha incluido la textura, pH, materia orgánica, nitrógeno, fósforo y potasio de cada punto de muestreo (Tabla 1).

**Tabla N°1.** Parámetros físico-químicos considerados en el análisis de las muestras de suelo de los diferentes puntos de muestreo.

Lugar de muestreo	Textura	pH relación 1:1	M.O. (%)	N (%)	P ppm	K ppm
Corrales	Arena franca	8.18	1.79	0.08	44.36	268.00
Cabuyal	Arena franca	8.37	1.30	0.06	39.95	190.80
Casitas	Franco Limoso	6.73	1.61	0.08	46.53	1,628.00
Uña de Gato	Franco Arenoso	8.13	0.71	0.04	32.05	137.60
Puerto Pizarro	Franco Arenoso	7.74	3.82	0.16	25.38	228.00

##### Aislamiento e identificación molecular de bacterias cultivables

Una colección de 198 cepas de bacterias nativas cultivables aisladas de la rizósfera de *O. ficus-indica* en los diferentes puntos de muestreo ha sido establecida basándose en las secuencias de los amplicones con análisis subsecuente por Blast (Altschul *et al.*, 1997) frente a datos del NCBI recogiendo la extensión del segmento solapado, el porcentaje de semejanza y el nombre del microorganismo con mayor grado de identidad de secuencia. Así, las 198 cepas aisladas han sido clasificadas en 48 especies y 16 géneros que son en su mayoría *Enterobacter* (87 cepas), *Pseudomonas* (46 cepas) y *Klebsiella* (23 cepas) (Tabla 2).

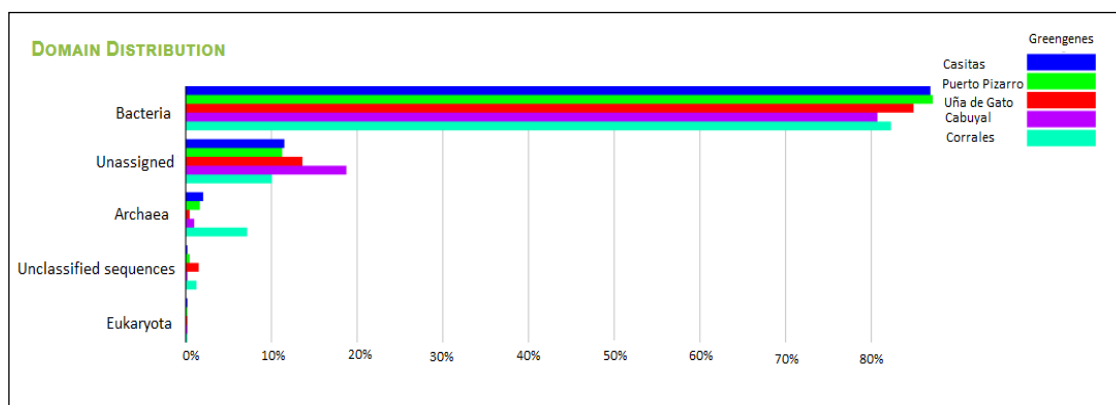
**Tabla 2.** Listado de bacterias nativas cultivables presentes en la rizósfera de *Opuntia ficus-indica* de suelos áridos de Tumbes. (CO) Distrito de Corrales, (CA) Distrito de Cabuyal, (CT) Distrito de Casitas, Distrito de Uña de Gato (UC), Distrito de Puerto Pizarro (PP).

N	Nombre Científico	Lugar de muestreo	Número de cepas encontradas
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	CO, CT	2
2	<i>Acinetobacter junii</i>	CO	1
3	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	CO	1
4	<i>Acinetobacter pittii</i>	CT	1
5	<i>Acinetobacter sp.</i>	CT, UC	8
6	<i>Aeromonas punctata</i>	CA	2
7	<i>Bacillus cereus</i>	CO, PP	2
8	<i>Bacillus megaterium</i>	CO	1
9	<i>Bacillus sp.</i>	CA	1
10	<i>Bacterium str. 61610</i>	CT	1
11	<i>Citrobacter freundii</i>	CA	1
12	<i>Citrobacter murlinae</i>	CA	1
13	<i>Endophytic bacterium</i>	CA	5
14	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CT,PP	34
15	<i>Enterobacter asburiae</i>	CO, PP	2
16	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	CO	3
17	<i>Enterobacter cloacae</i>	CA, PP	18
18	<i>Enterobacter cloacae subsp. cloacae</i>	CA	3
19	<i>Enterobacter hormaechei</i>	CT	3
20	<i>Enterobacter ludwigii</i>	CA	3
21	<i>Enterobacter sp.</i>	CA, CT	19
22	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	CO	2
23	<i>Escherichia hermannii</i>	CO	2
24	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CA, CT, UC, PP	16
25	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	PP	1
26	<i>Klebsiella sp.</i>	CA, PP	3
27	<i>Klebsiella oxytoca</i>	CT	1
28	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	PP	1
29	<i>Klebsiella variicola</i>	CA	1
30	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	CO	1
31	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	CO	2
32	<i>Lysinibacillus macroides</i>	UC	1
33	<i>Lysinibacillus sp.</i>	UC	1
34	<i>Pantoea agglomerans</i>	CA	1
35	<i>Pantoea sp</i>	CA	1
36	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CT	4
37	<i>Pseudomonas guariconensis</i>	CT	1
38	<i>Pseudomonas mendocina</i>	CA	1
39	<i>Pseudomonas monteilii</i>	CT, CO	5
40	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	CA, CT	11
41	<i>Pseudomonas putida</i>	CA, CO, CT	7
42	<i>Pseudomonas sp.</i>	CA, CT, UC	17
43	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium</i>	CO	1
44	<i>Serratia marcescens</i>	CO	1
45	<i>Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus</i>	CO	1
46	<i>Staphylococcus sciuri</i>	CA	1
47	<i>Staphylococcus warneri</i>	UC	1
48	<i>Vibrio sp.</i>	PP	1

## Análisis de la microbiota rizosférica por metagenómica dirigida al gen del ARNr 16S

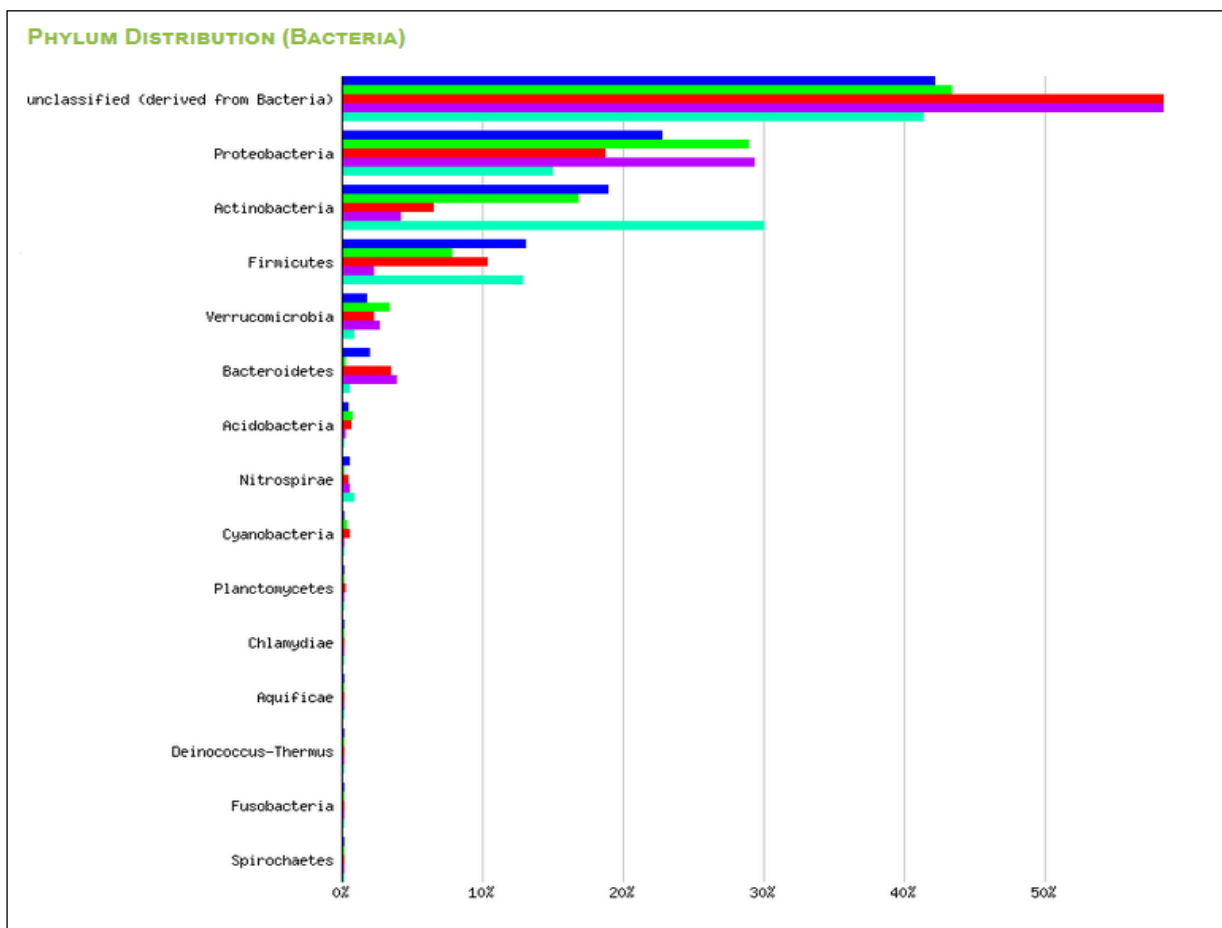
Por metagenómica dirigida al gen del ARNr 16S se pudo identificar las bacterias nativas presentes en la rizósfera de *O. ficus-indica* en suelos áridos de Tumbes, Perú. Se lograron identificar un total de 59 familias que incluye 90 géneros y 176 especies para Corrales; 89 familias con 161 géneros y 303 especies para Cabuyal; 127 familias que incluye 276 géneros y 683 especies para el distrito de Casitas; 104 familias con 191 géneros y 429 especies para Uña de Gato; 99 familias con 193 géneros y 452 especies para el distrito de Puerto Pizarro.

Los resultados analizados por el programa MG - RAST permitieron identificar los dominios: Bacteria, Arquea y Eucarya, así como también dominios no asignados y secuencias no clasificadas (Figura 2). En el distrito de Casitas se obtuvo 86.63% del dominio bacteria, en Puerto Pizarro un 87.03%, en Uña de Gato 84.72%, en Cabuyal 80.44% y en Corrales 82.06%.



**Figura 2.** Distribución de los dominios presentes en la rizósfera de *Opuntia ficus-indica* mediante metagenómica y analizados por MG-RAST

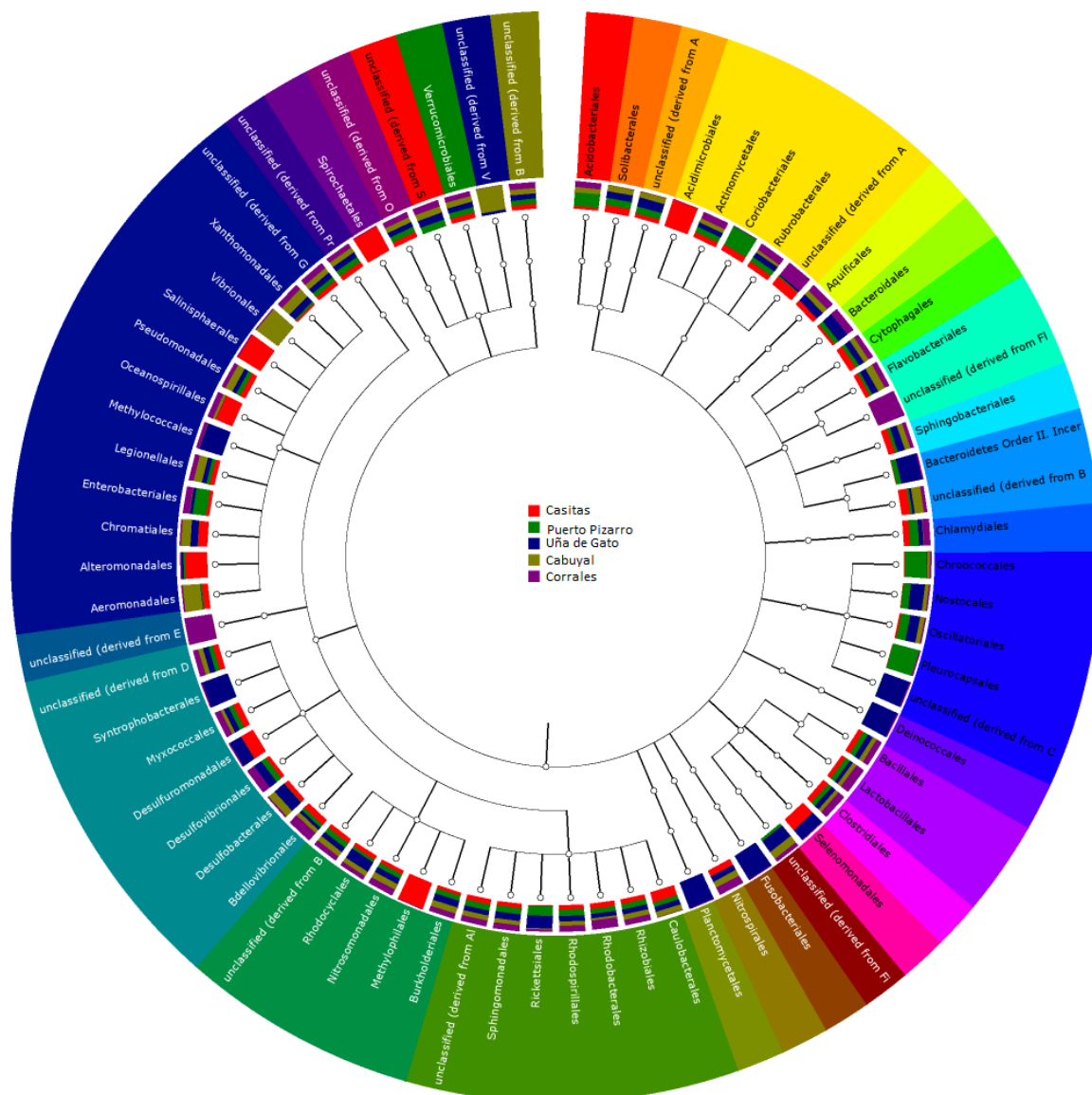
Así mismo, se identificó que dentro de la distribución del dominio bacteria se encuentran los Phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Acidobacteria, Nitrospirae y Cyanobacteria, y en un menor porcentaje a los Phyla Planctomycetes, Chlamydiae, Aquificae, Deinococcus – Thermus, Fusobacteria y Spirochaetes (Figura 3). A partir de las muestras procedentes de Cabuyal se identificó un mayor porcentaje de Proteobacterias (28.97%) en comparación con las muestras provenientes de Corrales (14.77%). Igualmente se identificaron Actinobacterias (29.65%) en las muestras de Corrales y Cabuyal (de 6.31% ). El phylum Firmicutes estuvo presente en un 12.90% en las muestras de Casitas y 2.15% en Cabuyal.



**Figura 3.** Distribución por Phylum de las bacterias presentes en la rizósfera de *Opuntia ficus-indica* identificados por metagenómica empleando el programa MG – RAST.

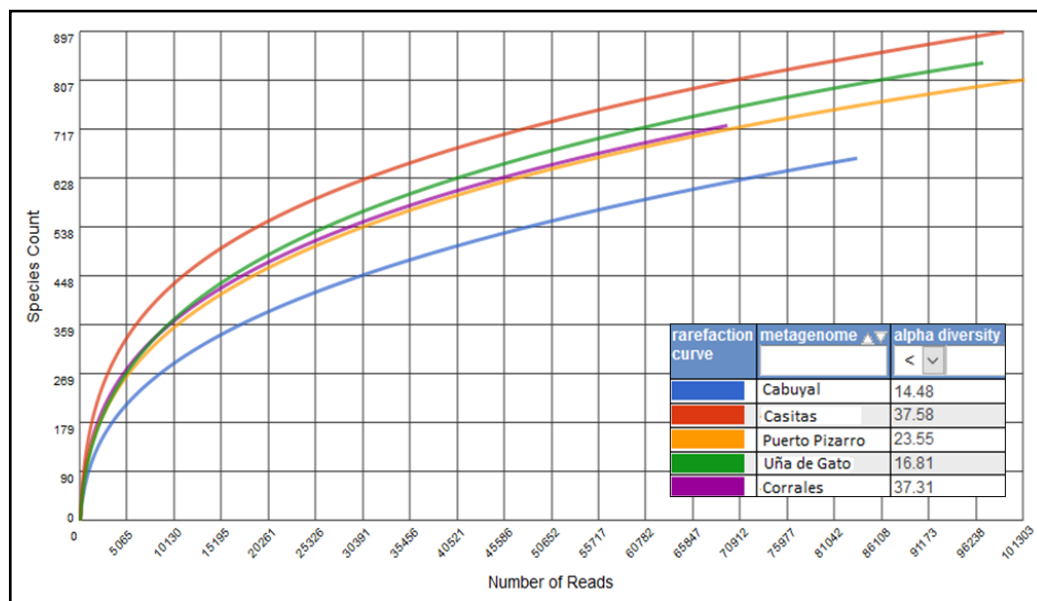


La Figura 4 muestra la clasificación taxonómica y funcional de las secuencias leídas en las muestras de la rizósfera de *O. ficus-indica* obtenida a través del MG – RAST. Cada cuadro representa a los órdenes de bacterias presentes en los 5 puntos de muestreo, los cuales están agrupados por colores pertenecientes a una misma clase.



**Figura 4.** Diversidad bacteriana a nivel de Orden en la rizósfera de *O. ficus-indica* mediante metagenómica dirigida al gen del ADNr 16S, correspondiente a los distritos de Uña de gato, Puerto Pizarro, Casitas, Corrales y Cabuyal. El análisis se realizó utilizando el programa Mega Rast.

En la Figura 5 se observa la curva de rarefacción la cual muestra la riqueza de especies de los cinco puntos de muestreo, la misma que indica el número de especies en relación al número de lecturas realizadas. Así mismo, esta figura revela la biodiversidad alfa presente en las muestras analizadas.



**Figura 5.** Curva de rarefacción y diversidad alfa de los cinco puntos de muestreo de la rizósfera de *Opuntia ficus-indica*. Se utilizó el programa MG – RAST.

### Antagonismo bacteriano intra-genérico

Se lograron obtener tres consorcios correspondientes a tres géneros bacterianos (*Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*) a través de ensayos de antagonismo intra-genérico para evitar el uso de cepas no compatibles en cultivo.

El consorcio correspondiente al género *Enterobacter* está compuesto de cepas identificadas como *E. asburiae*, *E. xianfrangensis*, *E. cloacae*, *E. cloacae sub. cloacae*, *E. aerogenes* y *E. hormaechei*. El consorcio correspondiente al género *Pseudomonas* está compuesto de cepas identificadas como *P. mosseli.*, *Pseudomonas sp.* y *P. putida*. El consorcio correspondiente al género *Acinetobacter* está compuesto de cepas identificadas como *A. junii.*, *A. iwofii.*, *Acinetobacter sp.1*, *A.pitti*, y *A. baumannii*. Estos consorcios serán evaluados ulteriormente como inóculos bacterianos para favorecer el desarrollo de cactus.

### Caracterizaciones preliminares en espectrometría de masa MALDI TOF TOF

Los análisis de espectrometría de doble masa MALDI TOF TOF permitieron identificar, a partir de la rizósfera de *Opuntia ficus-indica*, dos cepas bacterianas con 99% de confianza; *Serratia marcescens* y *Leclercia adecarboxylata*. (Tabla 3 y 4).

**Tabla 3.** Secuencia de aminoácidos de iones precursores fragmentados establecida por espectrometría de masas MALDI TOF-TOF de *Serratia marcescens* con identificación subsecuente de la proteína correspondiente.

Spectrum	Prec MW	Prec m/z	Best Sequence	Conf (%)	Nombre de la proteína	Base de datos de Microorganismo
1.E7.9.1.3	1080.5687	1081.576	DVHPHYGR	99	DNA-directed RNA polymerase sub unit beta.	<i>Serratia marcescens</i>
1.E8.9.1.2	1969.0046	1970.012	FIEQDPEGQYGLEAAFR	99	DNA-directed RNA polymerase sub unit beta.	<i>Serratia marcescens</i>

**Tabla 4.** Secuencia de aminoácidos de iones precursores fragmentados establecida por espectrometría de masas MS MALDI TOF-TOF de *Leclercia adecarboxylata* con identificación subsecuente de la proteína correspondiente.

Spectrum	Prec MW	Prec m/z	Best Sequence	Conf (%)	Nombre de la proteína	Base de datos de Microorganismo
1.E11.9.1.1	1304.7057	1305.713	GADLVVTAMAEGR	99	Glutamate synthase	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
1.E11.9.1.3	1819.9886	1820.996	EFNVEANVGKPVAYR	99	Elongation factor G	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
1.E11.9.1.7	1744.8906	1745.898	YDDAPNNVAQAVIEAR	99	Elongation factor G	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
1.E11.9.1.10	2053.1187	2054.126	VNIIDTPGHVDFTEVER	99	Elongation factor G	<i>Leclercia adecarboxylata</i>

**Protein Sequence Coverage - DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Serratia marcescens BIDMC 50 GN=rpoB PE=3 SV=1**

```

MVVSYTEKKRIRKDFGKRPQVLDIPYLLSIQLDSFQKFTIEQDPEGQYGLEAAFRSVFP IQSYSGNSELQVYSYRLGEPVFDVKECQIRGVTFSAPLRLVRLRVIIYEREAPEGTVKDIKEQEVYMGELPLMTENGTFVINGTERVIVSQLHRSPGVFFSDSKGKTHSSGKVLVYARIIPYRGSWLDFFDFPKDNLFVRIIDRRRKLPA
ATIILRALNYYTEQILDLDLDFDKIVFEIRDNKLQHELVPERLRGETASFIDEANGKIYVEKRRITARHRIQLEKDDIQSIEVVPVEYIAGKVVAKDYIDTNTGELICAAANMELSLDLAKLSQSGHKRIETLFTNDLDHGAYISETLRVDPDNDRLSSLVEIYRHMHPGEPPTREAAESLFENLFFSEDRYDLSAVGRMKFNRSLL
RDEIEGSGILSKDDIIEVNMKLIIDIRNGKGEVDDIDHLGNRRIRSVGEMAENQFRVGLVVRVERAVKERLSLGLDLTLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITHKRRISALGPGGLTRERAGFEVDVHPTHYGRVCP IETPEGPNIGLINSLSVYAQTNEYGFLETPYRRVRDGVVTEINVLSAIEEGNFV
IAQANSNLDEEGRFVEDLVTCRSRGESSLFSRDQVDYMDVSTQQVSVGASLIPFLEHDDANRALMGANNQRQAVPTLRADKPLVGTGHERAVAVDSGVTAVAKRGGVIQYVDASRIVIKVNEDEMYPEAGIDINYLTTRYTRSNQNTCINQMPCVNLGEP IERGDVLDGSPDLDGELALGQNMRFAMPUNGYNFEDSILVSE
RVVQEDRFTTIHIQELACVSRDTRLGPEEITADIPNVGEAALSKLDESGIVYIGA EVTGGDILVGKVPKGETQLTPEEKLLRAIFGEKASDVKDSSLRVPNGVSGTVIDVQVFTRDGVEKDKRALEIEEMQLKQAKKDLTEELQILEAGLFARITHAVLVAGGTEADKLSKLPDRWLELGLTDEEKQNOLEQLAEQYDELKSDF
EKKLEAKRRKITQGDLDLAPGVLKIVKVVLAVKRQIQPGDKMAGRHGKGVISKINPIEDHPVDENGTQVDIVLNLGVPSSRMNIGQILETHLGMAAKGIGEKINQMLKQQEVAKLREFIQKAYDLGDDVQCQVLDLNTFSDDEVLRLEAENLKKGMPIATPVFDGAKETEIKKLEHGGIPTSGQITLFDGRTGEQFERQVTVGYM
YMLKLNHLVDDKMHARSTGSYSLVTQQPLGGKAQFGGQRF GEMEVWALEAYGAAVTLQEMLTVKSDDVNGRTKMYKNIVDGDHRMEPGMPEFNVLLKEIRSLGINIELEDE
    
```

**Figura 6.** Secuencia de aminoácidos de la subunidad Beta de la ARN polimerasa dirigida al ADN de *S. marescens*. EN negrillas esta indicada la secuencia de los péptidos analizados por el software Protein Pilot™.

(a)

**Protein Sequence Coverage - Glutamate synthase [NADPH] small chain OS=Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595 GN=GLAD\_01130 PE=4 SV=1**

```

MNHFI MANSQLCIGCRACEVACVMAHNEQHALSARHFTPRIIVVKEGNKHSAVTCHHCENAPCIQSCPNGAIGRMRDSVQVDEQKCI GCKACVVA C PFGTMEVVTTAQAATAQKCDLCLDRPQGPACVANCVPVDALSRVTPDTLNQLARTRRVRTARHEAQPWQTGEAATS RKNHGKRERMFALAAARGEPDKRSPEARNDNFD E I
YLPFSAVQAQREADRCLTCGESHVCEVTCPLHNHQPWIERVKAGDIDA AVELSHQTNCLPEITGRVCPQDLCEGACTVRDVAGSVTIGNIERIYISDQALAKGWRPDLRHVTPVNRQVAIVGAGPAGLACADALIRRGIRVTVFDRHPEIGGLLTFGIPAFKLDKSLARRREIFTAMGIRFELNCEVGKDIPLAQLLSEYDAL
FVVGVTYRSMKAGIPHEEAPGVYDALPFLVGNTRQLMGLPPSGE E PFI D TAGLNWVVLGGDTAMDCVRTALRHGAASVTCAYRDEANMPSGKKEVKNA REEGATFEFNVQPVALLTDDTGRVNGIRLLRTRLGE PDAQGRRRMPVVDGSEFVMPADAVIMAFGNPHGMPWLQAQGVVEVDANGRI AASVETRYRYQTNTNPQIF
AGGD A V R GADLVVTAMAEGR HAAQGIADWLGVDA PAAH
    
```

(b)

**Protein Sequence Coverage - Elongation factor G OS=Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595 GN=fusA PE=3 SV=1**

```

MARTTP IARYRNIGISAHIDAGKTTTTTERILFYTGVMHKIGEVHDGAATMDVHEQEQRGITITSAAATFWSGMAKQYEPHRVNIIDTPGHVDFTEIEVERSHRVLGDGAVHVVCAVGGVQVQSETVVRQANKYKVPRIAFVNKMDRMGANFLKVVGQIKSRLGANPVPLQLAIGAEEGFTGVIDLVKNKA INWNEEDAGVTFTEY
DIPADMQDLADEVHQNLIESAAEASEELMEKYLGGEEITEEI K KALRQRVLNNEI I LVTCGSFAFNKGVQAMLDAVVDYLPSPVDVPAINGLDDGKDTPAERHASDEEPPAALAFKIAATDPFVGNLTFFRVYSGVNSGDTILNSVKAAREFRGRIVQM HANKREEIKEVRAGDIAAAIGLKDVTGDTL CNPDHP I ILERME
FPEPVISIAVEPRTKADQEKMLALGRLAKEDPSFRVWUDEESNQTI I A G M G E L H L D I I V D R M R EFNVEANV G K P Q V A Y R E A I R Q K V S D V E G K H A K S G G R G Q Y G H V I D M Y P L E P G S N P K G Y E F I N D I K G V I P G E Y I P A V D K G I Q E Q L K S G P L A G Y P V V D N G V R L H F G S Y H D V D S S E L A F K L A A S I A F K E G F K K A K P V L L E P
I N K V E V T P E E N T G D V I G D L S R R R G M L R G Q E S V T G V K I H A E V P L S E M F G Y A T Q L R S L T K G R A S Y T M E F L K Y D D A P N W A Q A V I E A R G K
    
```

**Figura 7.** Secuencia de aminoácidos de (a) Sintetasa de Gutamato y (b) Factor de elongación G de *L. adecarboxylata* ATTC 23216.

## 5. DISCUSIÓN.

El análisis físico químico de los suelos mostró que éstos son bajos en nitrógeno (0.04 a 0.16) (Tabla 1), lo que podría corresponder al bajo contenido de materia orgánica (0.71 a 3.82). Los suelos que contienen fósforo mayor a 36 ppm y potasio mayor a 175 ppm son óptimos para cultivos agronómicos (Espinoza *et al.*, 2006). Así, en nuestros resultados podemos observar que el contenido de fósforo es óptimo en todos los puntos de muestreo excepto en Puerto Pizarro. En lo que concierne al potasio se determinó que se encuentra en niveles óptimos en todos los puntos de muestreo. Los datos de Gallego (1943), Sivila y Hervé (1994) y Ramos y Zúñiga (2008) que reportan que las bacterias son favorecidas por valores de pH alcalinos y neutros lo cual concuerdan con los resultados del presente estudio considerando que los suelos de las cinco zonas analizadas poseen un pH entre 6,73 – 8,37 lo que podría explicar la elevada presencia de bacterias en las muestras.

Por otro lado, en los resultados de la tabla 1 se observa que tanto los suelos de Corrales como de Cabuyal tienen texturas de tipo arena franca mientras que Uña de Gato y Puerto Pizarro poseen textura tipo franco arenosa. En ambos tipos de suelos se determinó una buena diversidad bacteriana lo que se debería a que las porosidades entre partículas arenosas de diversos tamaños ayudan al desarrollo de las comunidades microbianas incluyendo las bacterias en suelos áridos (Rao *et al.*, 2015).

Sin embargo, en el suelo con textura franco Limoso (Casitas) se ha encontrado una mayor diversidad bacteriana en comparación a las texturas arenosas, esto podría ser debido a que en un suelo bien graduado (muchos diferentes tamaños de partículas mezclados entre sí), las partículas de limo recubren las superficies de los granos de arena y actúan como puentes entre ellos, permitiendo un mejor flujo de agua y nutrientes que son aprovechados por las bacterias (Chau, Bagtzoglou and Willi, 2011).

Los resultados presentados en la tabla 2, muestran el listado de bacterias cultivables presentes en la rizósfera de *O. ficus-indica* en las cinco zonas de muestreo, de ello podemos indicar que este listado corresponde a un bajo porcentaje (1%) de bacterias de la rizósfera que se pueden obtener en medios de cultivo en comparación a las especies determinadas por metagenómica (Prashar and Kapoor, 2014).

Según Schoebitz (2006) y Prashar *et al.* (2014) aproximadamente alrededor de 2 – 5% de las bacterias presentes en la rizósfera son Rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (RPCP). En los resultados presentados en la tabla 2 se destaca la presencia de géneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Acinetobacter* que son conocidos por ser RPCP (Döbereiner, 1995). Entre las principales características de estos géneros se encuentran el mejoramiento del contenido de nitrógeno en el suelo y por ende el mejoramiento del crecimiento de la planta, producción de sideróforos y fitohormonas, conversión de las formas insolubles del fósforo para hacerlo más accesible para la planta, resistencia a metales, etc. (Loredo, 2004; Schoebitz, 2006; Prashar and Kapoor, 2014).

Avances recientes en técnicas moleculares han permitido determinar cepas de bacterias no cultivables, generando información vital relacionada a las comunidades bacterianas de la rizósfera (Nogales, 2005; Prashar *et al.*, 2014). El estudio global de los genomas de todos los microorganismos presentes en una comunidad se denomina metagenómica y ya ha sido realizado con éxito en comunidades microbianas de suelo (Rondon *et al.*, 2000). Las estimaciones más conservadoras acerca de la complejidad genética de comunidades microbianas de suelos indican la presencia de entre 6.000 y 10.000 genomas diferentes en suelos orgánicos no perturbados y un número menor (entre 350 y 1.500) en suelos agrícolas (Nogales, 2005). Nuestros resultados se asemejan a lo descrito por Nogales (2005) en cuanto al número de especies encontradas en los cinco puntos de muestreo que oscilan entre 176 a 683. Basándose en esto podemos tener una idea de la magnitud de información nueva que se genera a partir de los análisis metagenómicos que no se logran a través de las técnicas convencionales.

Ottesen *et al.* (2013) estudiaron la ecología microbiana asociada a la raíz del tomate utilizando para el análisis de datos, el programa MG – Rast, al igual que Fonseca *et al.* (2016), quienes trabajaron el microbiota de la raíz de dos tipos de cactus. Basados en estas referencias nosotros usamos el mismo programa cuyos resultados son mostrados en la figura 3, en donde se detalla a los órdenes de las bacterias presentes en los cinco puntos de muestreo, los mismos que se agrupan por clase, siendo la clase Gammaproteobacteria la que alberga el mayor número de géneros, seguida de las clases Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Actinobacteria, Betaproteobacteria, Verrucomicrobiae, Acidobacteriia, entre otras. Estas descripciones son similares a las hechas por Nogales (2005) y Turner *et al.* (2013) quienes mediante estudios moleculares de suelos detectaron a los grupos filogenéticos bacterianos como Alphaproteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteriia y Verrucomicrobiae presentes más frecuentemente en las muestras; así mismo, evidenció que algunos grupos microbianos se encontraban presentes de forma ubicua.

En la figura 5 se observa la curva de rarefacción que muestra la riqueza de especie de los cinco puntos de muestreo. Las muestras procedentes de Casitas presentan mayor riqueza de especie a aproximadamente 90 000 números de lecturas, a diferencia de las muestras obtenidas de Corrales las cuales presentan menor número de riqueza de especie en aproximadamente 70 000 número de lecturas. Esto es similar a lo obtenido por Ottesen, *et al.* (2013) quienes realizaron la curva de rarefacción para determinar la cantidad de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU) en relación a todas las secuencias muestreadas para todos los órganos de la planta estudiada.

En cuanto a la biodiversidad alfa, la misma que sirve para comparar directamente la  $\alpha$ -diversidad (dentro de la muestra la diversidad o la estimación de la riqueza de especies) (Peiffer *et al.*, 2013) los resultados mostraron que las muestras colectadas en Casitas y Corrales presentan mayor porcentaje de biodiversidad con un 37.58% y 37.31%, respectivamente, y un menor porcentaje en las muestras procedentes de Cabuyal y Uña de Gato, con 14.48% y 16.81%, respectivamente.

El antagonismo entre bacterias se caracteriza por la inhibición del crecimiento de una contra la otra, por diversos factores como nutrientes, espacio, luz y/o a través de la producción de diversos metabolitos secundarios entre ellos sustancias antibacterianas (Fernández y Vega, 2001). Esto puede ser observado en nuestros resultados, en donde las bacterias aun siendo del mismo género ocasionan este fenómeno antagónico. En los consorcios de *Enterobacter* y *Acinetobacter* se observan halos de inhibición en solo dos especies para cada consorcio. Por otro lado, las especies del consorcio *Pseudomonas* mostraron mayor antagonismo, esto también fue observado por Validov (2005) quien observa alta actividad antagónica en este género.

Finalmente, el análisis proteómico por espectrometría de doble masas MALDI TOF-TOF resulta una técnica con elevado nivel de confianza en la identificación molecular de microorganismos, como por ejemplo las bacterias de importancia económica (Sala *et al.*, 2016). En nuestro trabajo ha sido posible la identificación de *Serratia marcescens* y *Leclercia adecarboxylata*, esto demuestra que esta técnica sería aplicable para la identificación de otras cepas bacterianas promotoras del crecimiento en plantas aisladas de la rizósfera de *Opuntia ficus-indica*.



## 6. CONCLUSIONES.

- Se identificó mediante análisis de secuencias nucleotídicas del gen ARNr 16S bacterias presentes en la rizósfera de *O. ficus-indica* en ecosistemas áridos de Tumbes, Perú.
- Un total de 48 especies de bacterias fueron identificadas por cultivo *in vitro*.
- Hasta 683 especies de bacterias por zona de muestreo fueron identificadas mediante la metodología de metagenómica dirigida independientemente de cultivo *in vitro*.
- Se pudo evaluar la capacidad de la técnica de espectrometría de masas MALDI TOF TOF en la identificación de dos especies de bacterias.
- A través del presente estudio fue posible establecer un cepario de bacterias identificadas molecularmente y con un potencial benéfico como son las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal que deberá ser evaluado.

## 7. RECOMENDACIONES.

- Disponer de más consorcios bacterianos potencialmente benéficos para el cultivo de *O. ficus-indica* en ecosistemas áridos de Tumbes.
- Determinar la naturaleza probiótica de las bacterianas cultivables, ya sea de manera individual o en consorcio, así como para aislar cepas fúngicas, en particular los hongos micorrízicos.
- Explorar la caracterización por metagenómica y el uso de consorcios de microorganismos en co-cultivos, debiendo tales consorcios ser más complejos y más representativos de la microbiota nativa y subsecuentemente, más eficientes para el cultivo del cactus.
- Realizar estudios similares para otros cactus, en particular especies endémicas del Perú y productoras de metabolitos de alta valor y subsecuentemente candidatas para el desarrollo de programas de cultivo en zonas de desierto sin posibilidad de irrigación.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Aguirre-Garrido J. F.; Montiel-Lugo D.; Hernández Rodríguez C.; Torres-Cortes G. ; Milan V.; Toro N. ; Martinez Abarca F.; Ramirez Saad H. 2012. Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek* 101:891–904.
- Alary, V., Nefzaoui, A. y B. Jemaa. 2007. Promoting the adoption of natural resource management technology in arid and semi-arid areas: modelling the impact of spineless cactus in alley cropping in Central Tunisia. *Agricultural systems*, 94 (2): 573-585.
- Amann, R., Wolfgang, L., y Karl, S. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59 (1): 143-69.
- Andrew DR, Fitak RR, Munguia-Vega A, Racolta A, Martinson VG, Dontsova K. 2012. Abiotic factors shape microbial diversity in Sonoran Desert soils. *Appl Environ Microbiol*;78(21):7527-37.
- Bazinet, L., y Cummings, P. 2012. A comparative evaluation of sequence classification programs. *BMC bioinformatics*, 13 (1), 92.
- Cano, M., Alejandro. 2011. Interacción de Microorganismos Benéficos en Plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 14(2), 15 – 31.
- Chau, J., Bagtzoglou, A. y Willig, M. 2011. The Effect of Soil Texture on Richness and Diversity of Bacterial Communities. *Environmental Forensics*, 12, 333–341.

- De-Bashan, L., Holguin, E., Glick, G., y Bashan, Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In: Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo. Mexico: *Trillas*. Pág. 170-224.
- Döbereiner, J., Urquiaga, S., Boddey, M. y Ahmad, N. 1995. Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. *Nitrogen economy in tropical soil. Fertil. Res.* 42, 339-346.
- Espinoza, L., Slaton, N., Mozaffari, M. 2006. Como Interpretar los Resultados de los Análisis de Suelos. *University of Arkansas System*. Disponible en : <https://www.uaex.edu/publications/PDF/FSA-2118SP.pdf>
- Fernández O. y Vega L. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario, *En: Manejo integrado de plagas, Costa Rica*; (62). p. 96-100.
- Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied And Environmental Microbiology*, p. 2461–2470.
- Fonseca-García, Coleman-Derr, Garrido Visel A3, Tringe, Partida-Martínez. (2016). The Cacti Microbiome: Interplay between Habitat-Filtering and Host-Specificity. *Front Microbiol.* 12;7:150.
- Gallego, F. 1943. Compendio de microbiología del suelos. *Instituto Forestal de Investigaciones y experiencias*. 163 pág.
- Gans, J., Wolinsky, M., y Dunbar, J. 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 309 (5739), 1387 - 1390.

- Gerlach, W., y Stoye, J. 2011. Taxonomic classification of metagenomic shotgun sequences with CARMA3. *Nucleic acids research*, 39 (14), e91.
- Glass, E., M., Wilkening, J., Wilke, A., Antonopoulos, D., y Meyer, F. 2010. Using the metagenomics RAST server (MG-RAST) for analyzing shotgun metagenomes. *Cold Spring Harbor protocols*, 2010 (1), pdb.prot5368.
- Gómez, L., Hernández, M., Herrera, M., Arroyo, F., Vargas, R., Olalde, P. 2012. Aislamiento de Bacterias Promotoras del Crecimiento de la Rizósfera de Plantas de Guayaba (*Psidium guajava*). *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable Ra Ximhai*, 8(3). pp. 97-102.
- Hamady, M., Walker, J., Harris, J., Gold, N., y Knight, R. 2008. Errorcorrecting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nature methods*, 5 (3), 235-7.
- Handelsman J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* .68:669–85.
- Horton, M., Bodenhausen, N., y Bergelson, J. 2010. MARTA: a suite of Java-based tools for assigning taxonomic status to DNA sequences. *Bioinformatics*, 26 (4), 568-569.
- Hugenholtz, P., Brett, G., y Norman, P. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of bacteriology*, 180 (18), 4765-4774.
- Kavamura Nessner V, Taketani RG, Lançon MD, Andreote FD, Mendes R, Soares de Melo I. 2013. Water regime influences bulk soil and Rhizosphere of *Cereus jamaicaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. *PLoS One*.;8(9):e73606.

- Kavamura N, Santos SN, Silva JL, Parma MM, Avila LA, Visconti A, Zucchi TD, Taketani RG, Andreote FD, Melo IS. 2013. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiol Res.* ;168(4):183-91.
- Lay J. 2012. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews.*;172:194.
- Liu, B., Gibbons, T., Ghodsi, M., Treangen, T., y Pop, M. 2011. Accurate and fast estimation of taxonomic profiles from metagenomic shotgun sequences. *BMC genomics*, 12 (2), S4.
- Loredó, O., López, R., Espinosa, V. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *TERRA Latinoamericana, Universidad Autónoma Chapingo México.*, 22(2). pp. 225-239.
- Lopez BR, Bashan Y, Bacilio M. 2011. Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock colonizing cactus of the southern Sonoran Desert. *Arch Microbiol.* 193(7):527-41.
- Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., Abou-Hadid, A., El-behairy, U., Sorlini, C., Cherif, A., Zocci, G. y D. Daffonchio. 2012. A Drought Resistance-Promoting Microbiome Is Selected by Root System under Desert Farming. *PLoS ONE* 7(10): e48479.
- Ministerio del Ambiente MINAM. 2011. La desertificación en el Perú. Cuarta Comunicación Nacional del Perú a la Convención de Lucha contra la Desertificación y la Sequía. *Impreso por Moving Pack.* 77 pags.

- Muyzer, G., de Waal, E., y Uitterlinden, A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59 (3), 695 - 700.
- Neelakanta G.y Sultana H. 2013. The Use of Metagenomic Approaches to Analyze Changes in Microbial Communities. *Microbiology Insights*:6 37–48.
- Nobel, P. 2002. Cacti: Biology and use. University of California press. Berkley, Los Angeles, Londres. Pag. 291.
- Nogales, B. 2005. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*, 14 (2), 41-51.
- Ottesen, A., González, A., White, J., Pettengill, J., Li, C., Allard, S., Rideout, S., Allard, M., Hill, T., Evans, P., Strain, E., Musser, S., Knight, R. y Brown, E. 2013. Baseline survey of the anatomical microbial ecology of an important food plant: *Solanum lycopersicum* (tomato). *BMC Microbiology*, 13, 114.
- Pace N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*.2;276(5313):734-40.
- Peiffer, J., Sporb, A., Korenb, O., Jinb, Z., Tringed, S., Dangle, J., Bucklera, E. y Ley, R. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *PNAS*, 110(16), 6548 – 6553.
- Pernasetti, S., y Di Barbaro, G. 2012. Rizobacterias Promotoras Crecimiento Vegetal como Biofertilizantes. *Biología en Agronomía*, 2 (2).
- Prashar Pratibha; Kapoor N. Sachdeva S. 2014. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Rev Environ Sci Biotechnol* 13:63–77.

- Ramos, E., Zuñiga D. 2008. Efecto de la humedad, temperatura y ph del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecología Aplicada*, 7 (1,2).
- Rao S, Chan Y., Bugler-Lacap D.C., Bhatnagar A., Bhatnagar M., Pointing SB (2015). Microbial Diversity in Soil, Sand Dune and Rock Substrates of the Thar Monsoon Desert, India. *Indian J Microbiol*. 2016 Mar;56(1):35-45.
- Reynolds, S. 2003. "El nopal (*Opuntia spp.*) como forraje" en Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura y la Alimentación. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/y2808s/y2808s04.htm#BM04>
- Rondon, R., August, R., Bettermann, D., Brady, F., Grossman, H. y Liles, R. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol*, 66, 2541-2547.
- Sala-Comorera L, Vilaró C, Galofré B, Blanch AR, García-Aljaro C. 2016. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for bacterial monitoring in routine analysis at a drinking water treatment plant. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 12897; No. of Pages 8
- Sandrin T, Goldstein J, Schumaker S. 2013. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrometry Reviews*.32(3): 188–217.
- Schoebitz, C., Mauricio. 2006. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* sp.). Tesis Licenciado Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia – Chile.
- Schreiber, F., Gumrich, P., Daniel, R., and Meinicke, P. 2010. Treephylor: fast taxonomic profiling of metagenomes. *Bioinformatics*, 26 (7), 960 - 961.



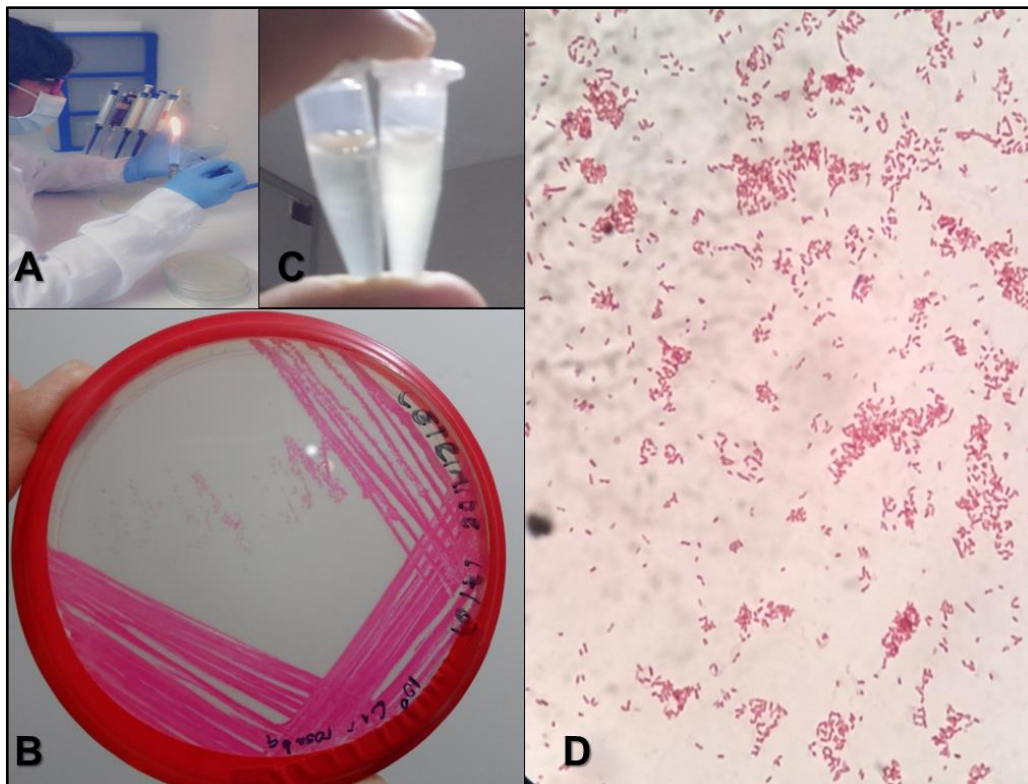
- Segata, N., Waldron, L., Ballarini, A., Narasimhan, V., Jousson, O., and Huttenhower, C. 2012. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nature methods*, 9 (8), 811-4.
  
- SENAMHI. 2015 Disponible en: [http://www.senamhi.gob.pe/include\\_mapas/\\_dat\\_esta\\_tipo.php?estaciones=000132](http://www.senamhi.gob.pe/include_mapas/_dat_esta_tipo.php?estaciones=000132)
  
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain J, Raoult D. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*.49(4):543–551
  
- Shah, N., Tang, H., Doak, T., G., and Ye, Y. 2011. Comparing bacterial communities inferred from 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomics. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 16, 165 - 176.
  
- Shevchenko Andrej, Henrik Tomas, Jan Havlis, Jesper V Olsen and Matthias Mann. 2007. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* VOL.1 NO.6.
  
- Sivila de Cary, R. y Hewé, D. 1994. El estado microbiológico del suelo, indicador de una restauración de la fertilidad. *Dinámicas del descanso de la tierra en los Andes* IBTA - ORSTOM, La Paz, 185-197
  
- Stein, J., Terence, M., Ke Ying, W., Hiroaki, Sh., y DeLong, E. 1996. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *Journal of bacteriology*, 178 (3), 591 - 599.

- Tringe, S., G., von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A., Chen, K., Chang, H., W., Podar, M., Short, J., M., Mathur, E., J., Detter, J., C., Bork, P., Hugenholtz, P., and Rubin, E., M. 2005. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, 308 (5721), 554 - 557.
  
- Turner, T., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., Osbourn, A., Grant, A., y Poole, P. 2013. Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *The ISME Journal*, 7, 2248–2258.
  
- United Nations Environment Programme - UNEP. 2006. Los desiertos: perspectivas 2006.
  
- Validov S1, Mavrodi O, De La Fuente L, Boronin A, Weller D, Thomashow L, Mavrodi D. 2005. Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiol Lett.* 2 242(2):249-56.
  
- Venter, J., Remington, K., Heidelberg, J., Halpern, A., Rusch, D., Eisen, J., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K., Nelson, W., Fouts, D., Levy, S., Knap, A., Lomas, M., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y - H y Smith, H. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304 (5667), 66-74.

## 9. ANEXOS



**Figura 8.** Toma de muestra. **(A)** Preparación del material para la toma de muestra. **(B)** Toma de muestra de la rizósfera de *Opuntia ficus – indica* en el distrito de Casitas.



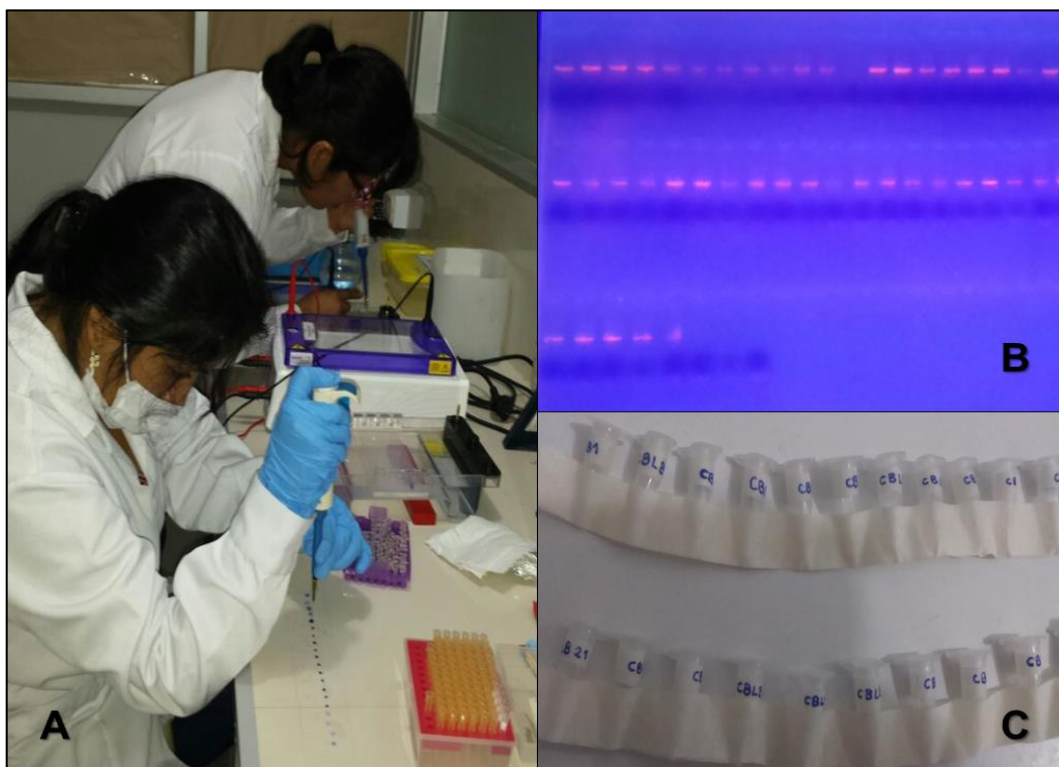
**Figura 9.** Aislamiento y purificación de bacterias cultivables **(A)** Siembra de bacterias. **(B)** Purificación de bacterias. **(C)** Bacterias purificadas sembradas en caldo nutritivo. **(D)** Vista al microscopio de las bacterias purificadas.



**Figura 10.** Extracción de ADN de las bacterias cultivables presentes en la rizósfera de *O. ficus-indica*.

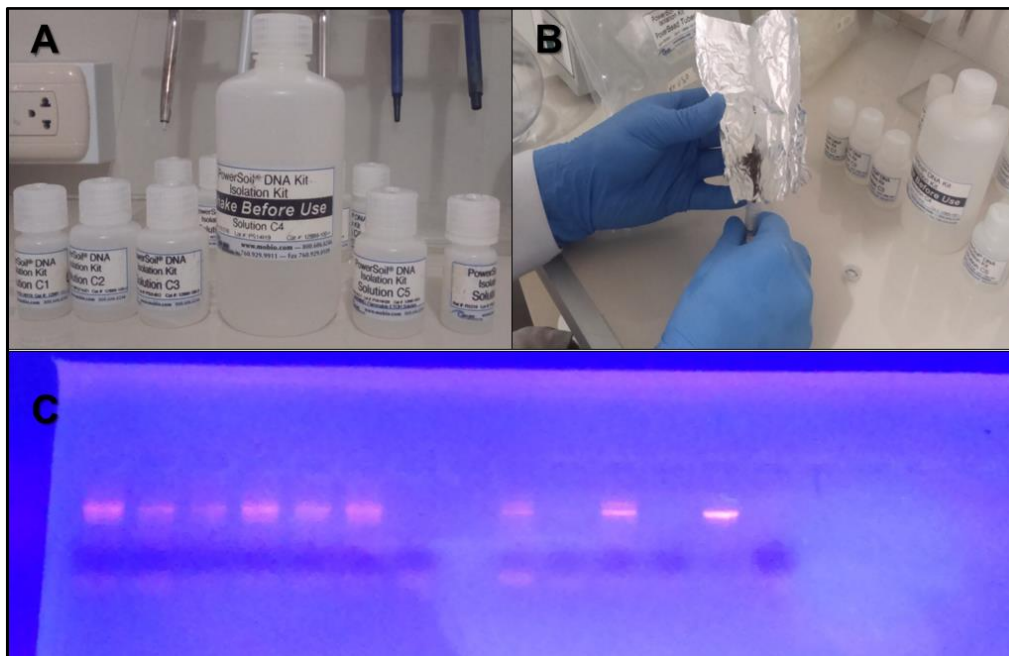


**Figura 11.** Amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Termociclador con el programa 16S para bacterias.

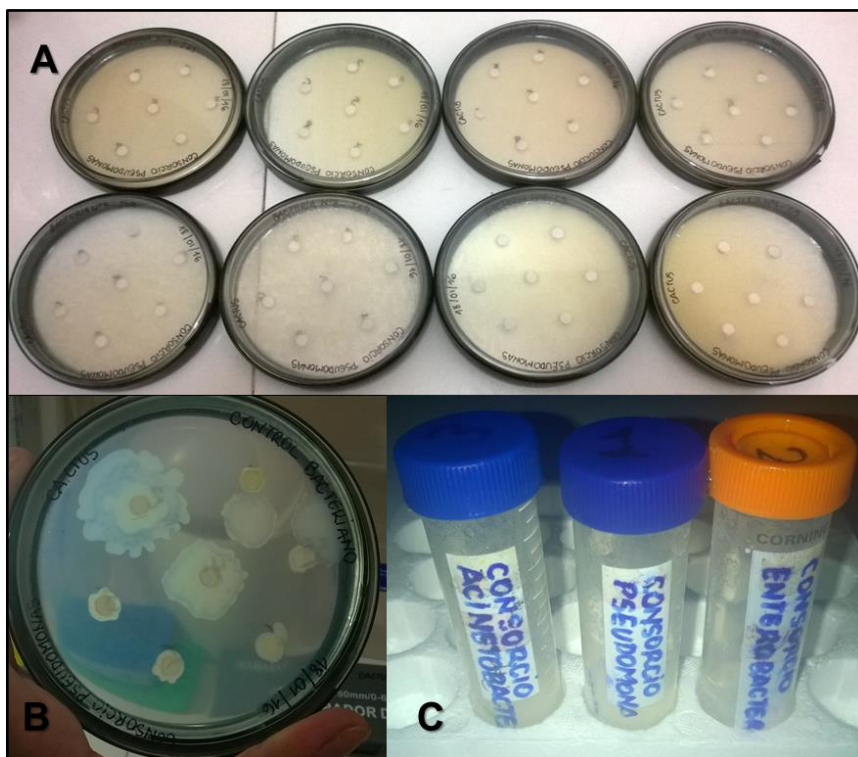


**Figura 12.** Electroforesis y secuenciación. **(A)** Depositando las muestras de ADN en gel de agarosa para el corrido electroforético. **(B)** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) del ADN bacteriano de la rizósfera de las muestras de Casitas. **(C)**. Muestras de amplicón de ADN listos para enviar a secuenciar.



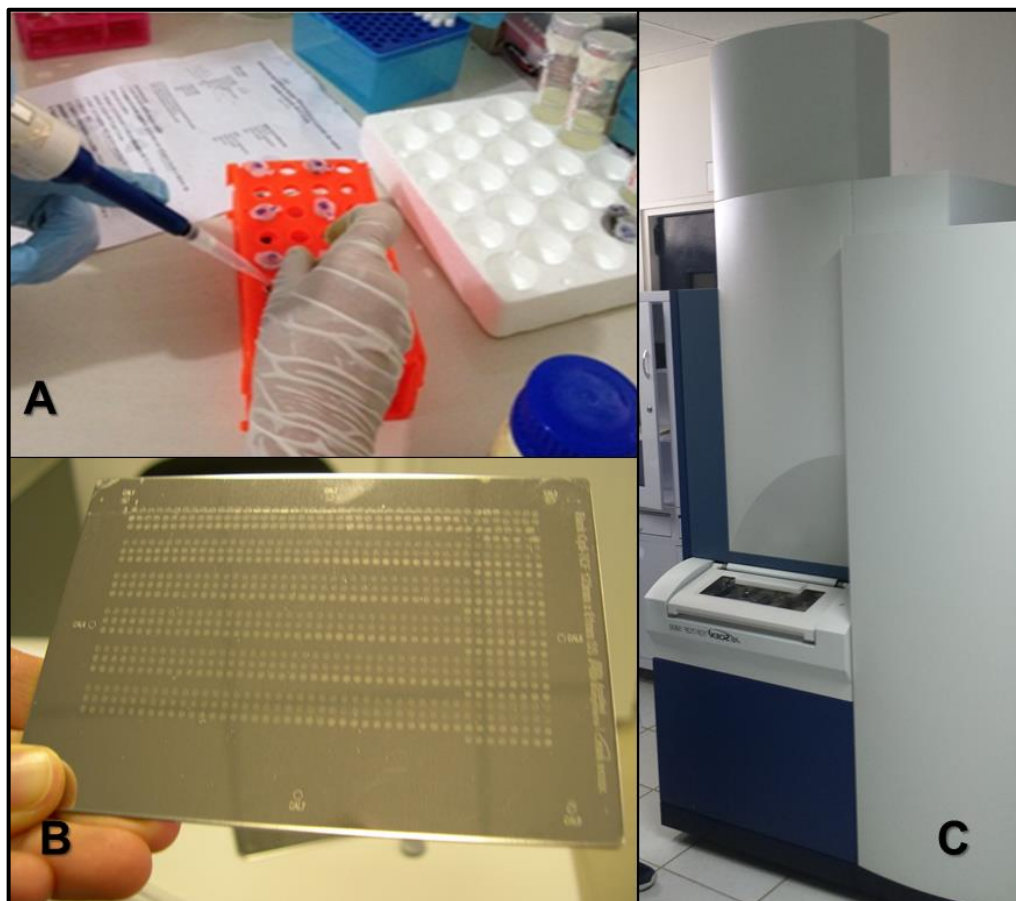


**Figura 13.** Extracción de ADN metagenómico de bacterias cultivables y no cultivables. **(A)** Kit Power Soil para la extracción de ADN por Metagenómica. **(B)** Extracción de ADN metagenómico del suelo rizosférico empleando el Kit Power soil. **(C)** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) del ADN bacteriano obtenido por Metagenómica.

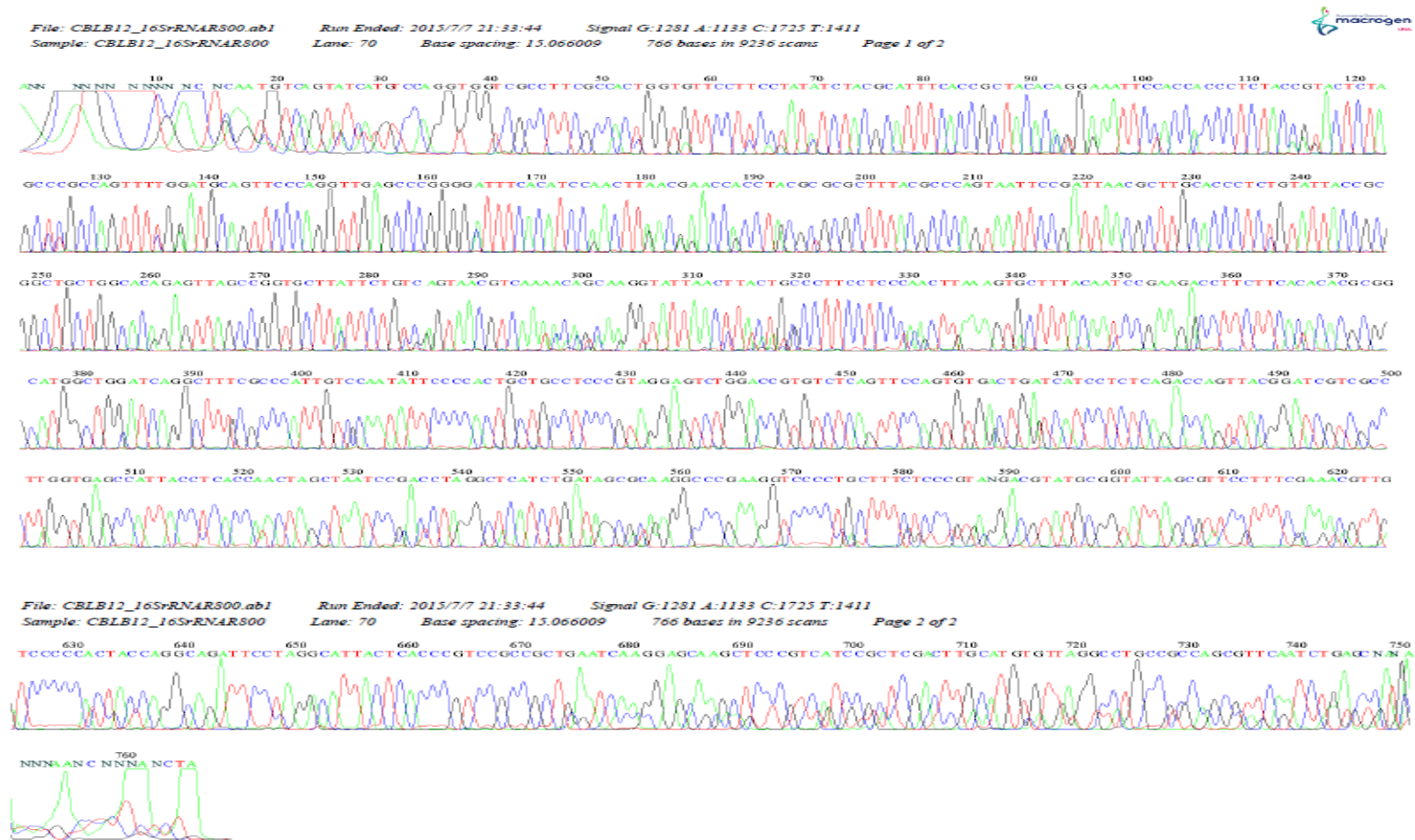


**Figura 14.** Pruebas de antagonismo bacteriano intra-género. **(A)** Antagonismo intra-genero de bacterias asociadas a la rizósfera de *O. ficus indica*. **(B)** Formación de halos de inhibición **(C)** Consorcios bacterianos intra-género.





**Figura 15.** Extracción de proteínas de bacterias. **(A)** Extracción de proteínas de bacterias con el protocolo de QIAGEN KIT (Qproteome® Bacterial Protein Preparation Handbook catálogo 37900). **(B)** Placa de MALDI con muestras espoteadas. **(C)** Equipo Espectrómetro de masas MALDI TOF-TOF



**Figura 16.** Cromatograma obtenidos con los primers 518F y 800R que amplifican el gen 16S rRNA en la cepas bacterianas obtenidas de muestras de rizósfera de *Opuntia ficus-indica*.

## **DEDICATORIA**

*Dedico este trabajo de tesis en primer lugar a Dios, por darme la fuerza para no rendirme en el camino e iluminar mi mente en cada momento de estos más de dos años en Tumbes.*

*A la Sra. Julia Alaya y el Sr. Luis Natividad, por ser los pilares fundamentales de todo lo que he logrado, por su incondicional apoyo y por sus enormes esfuerzos para lograr lo mejor en mi vida profesional y personal. Esta nueva meta es de ustedes, los amo.*

*Finalmente dedico este esfuerzo a todos aquellos que obran más allá de lo que dicta el deber, y están convencidos de que este mundo se puede cambiar con trabajo y voluntad, porque si lo puedes soñar lo puedes hacer.*

## AGRADECIMIENTOS

*Este logro no ha sido fácil, sin embargo la perseverancia de seguir no ha dejado de estar presente, y al igual que ustedes que de una u otra manera han estado apoyándome convirtiéndose en mis aliados estratégicos para lograr el objetivo final, por ello, muchas gracias a todos.*

*Gracias al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), por el apoyo con la beca de maestría y a la Universidad Nacional de Tumbes por el programa de Maestría en Biotecnología Molecular, así como el apoyo mediante el Financiamiento de Canon con el cual se desarrolló esta tesis de maestría.*

*Gracias al jurado calificador de esta tesis Víctor Carril, Auberto Hidalgo y Eneida, además de mi asesora de tesis Virna y a los profesores de la maestría Emerick, Paolita, Ricardo Juan y un muy especial a Eric por ser más que el líder, un amigo y ejemplo de persona que admiro.*

*Muchas gracias a mi Trujillo y “Los Luis Alaya”, mi gran Familia, quienes a su modo han estado siempre presentes apoyándome, por generar en mí una de las alegrías más grandes cada vez que regreso a mi ciudad y estar a su lado, los quiero y extraño mucho.*

*A Tumbes y su cálida gente, quienes me recibieron en su tierra y me permitieron formar parte de ella, en especial a aquella persona que hizo de mi estadía más intensa, gracias por tu apoyo en lo profesional y personal, por tu paciencia y hacer mejores mis días en esta ciudad. Gracias JGMC.*

*A mis compañeros de la maestría Ruth y Cinthia por hacer de las clases más entretenidas, he disfrutado mucho de su amistad durante estos dos años. Así mismo gracias mis compañeros del departamento de Biotecnología Vegetal en especial a los Cactofilos: Aimi, Sandra, Marilyn, Nayda y Roxana. Ha sido un verdadero placer trabajar a su lado.*

*A todos los compañeros de trabajo en IncaBiotec, Cesar, Peter, Pedro, Jordana y Angelo, gracias por permitir lograr aprender mucho de cada uno de ustedes. Del mismo modo gracias a Teresa, Elki y Gabriel, personal administrativo de la Universidad Nacional de Tumbes, por su paciencia y apoyo en todo el proceso del desarrollo de la investigación en la maestría, hemos aprendido mucho juntos.*

*Gracias a mis incondicionales amigos: Pedro, Freddy, Malena y Eny. Por ser como son, por apoyarme en las buenas y no tan buenas, por mantenernos juntos a pesar de la distancia y el tiempo y por ser parte importante de mi vida. Los estimo mucho.*

*Finalmente un agradecimiento muy especial a aquellas personas quienes me mostraron con sus acciones y estilo de vida, un ejemplo de todo lo que una persona de bien no debe realizar. Sigo aprendiendo.*