

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE CEPAS *Bacillus* spp. AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE PAPA (*Solanum tuberosum*)

PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Bacillus* spp. STRAINS FROM POTATO (*Solanum tuberosum*) RHIZOSPHERE

Pamela Calvo¹ y Doris Zúñiga²

Resumen

Bacillus es un género altamente presente en la rizósfera de diversos cultivos debido a su capacidad de formación de esporas que le da una ventaja de supervivencia en la rizósfera vegetal. En el presente estudio se realizó una descripción morfológica de las colonias, caracterización fisiológica y bioquímica a 43 aislamientos de *Bacillus* spp. provenientes de la rizósfera del cultivo de papa de dos zonas altoandinas en Perú. Se encontró que la mayoría de estos aislamientos pertenecían al grupo de “*Bacillus subtilis*”. En cuanto a las pruebas fisiológicas de crecimiento a bajas temperaturas (4°C, 10 °C, 15°C y 20°C), de las 43 cepas probadas solo una creció a 4°C, sin embargo, el 98% creció a 10°C y el 100% a 15 °C y a 20°C. Por otro lado, respecto al pH, se observó que 100% de las cepas, crecieron bien en ambos pHs (4 y 5.5), lo que indica una buena adaptación del crecimiento a pH ácidos. La evaluación de los niveles de crecimiento tanto a bajo pH y temperatura baja en el tiempo, revelan un patrón bifásico que se explicaría por pequeños periodos de retraso del crecimiento en condiciones de estrés. Debido a las diferencias de adaptación fisiológica entre cepas de la misma especie se puede sugerir la existencia de una gran diversidad intraespecífica de los *Bacillus* aislados. Asimismo se encontraron correlaciones entre zonas de aislamientos con temperaturas de suelo más frías y las cepas con mejores niveles de crecimiento a 20°C.

Palabras clave: papa, rizósfera, *Bacillus* spp., pH, temperatura, diversidad

Abstract

Bacillus is an abundant genus in the rhizosphere of many crops due to its spore formation capacity that gives it an advantage to survive in the rhizosphere. In the present study we worked with 43 *Bacillus* spp. previously isolated from potato rhizosphere of two highland zones in Peru. We described the morphological characteristic of their colonies and tested them for their physiological and biochemical characterization. Almost all *Bacillus* strains belong to the “*Bacillus subtilis*” group. Also acid pH test plate (4 and 5.5) and low temperature plate test (4°C, 10°C, 15°C and 20°C) were done. Of the 43 tested strains only one grew at 4°C; therefore, 99% grew at 10°C, 100% grew at 15°C and 20°C. On the other hand, 100% of the strains grew at pH 4 and 5.5, which indicates an adaptation to acid pH. The evaluation of the growth levels at low pH and low temperature in time reveals a two-phase pattern that could be explained by small lag periods in stress conditions. Due to the differences in the physiological adaptation among strains of the same species; the occurrence of a great intraspecific diversity of *Bacillus* isolated from potato crop rhizosphere can be suggested. We also found correlations between low temperatures in the isolations zones and a better growth level at 20°C in the plates tested.

Key words: potato, rhizosphere, *Bacillus* spp., pH, temperature, diversity

Introducción.

Las poblaciones de bacterias en el suelo no se distribuyen al azar. Factores como la composición de los suelos, la materia orgánica, el pH, el agua y la disponibilidad de oxígeno, junto con la planta huésped, desempeñan un papel importante (Alexander, 1980). La concentración de bacterias por gramo de suelo que se haya alrededor de las raíces de las plantas en la llamada rizósfera es mucho mayor que en el resto del suelo (Lynch, 1990), esto se puede deber a

los altos niveles de nutrientes que se hayan en la zona que rodea a las raíces que permiten el desarrollo de poblaciones microbianas (Glick, 1995). La rizósfera ha sido definida en 1904 por Hiltner, como el volumen de suelo influenciado por la presencia de raíces de una planta viva, cuya extensión puede variar de acuerdo al tipo de suelo, la especie de planta, su edad y otros factores (Foster, 1998; Killian *et al.*, 2001). En la rizósfera la interacción entre las bacterias y las raíces de las plantas puede ser beneficiosa, en

este caso se puede considerar la rizósfera como una zona de amortiguamiento microbiológico en donde la microflora sirve de protección a la planta del ataque de patógenos (Krupa & Dommergues, 1981).

En un trabajo previo (Calvo *et al.*, 2008) se realizó el estudio de la diversidad microbiana en la rizósfera del cultivo de papa en los departamentos de Huancavelica y Puno. Se encontró que las bacterias del género *Bacillus* constituían un grupo importante. Este género de bacterias Gram positivas tienen la ventaja de poseer diversos mecanismos para asegurar su sobrevivencia ante condiciones físicas desfavorables, bajo estas condiciones *Bacillus* spp. inicia una serie de respuestas; si estas respuestas fallan para poder mantenerse en estado vegetativo se induce la esporulación (Petersohn *et al.*, 2001). La habilidad de las especies de *Bacillus* de formar endosporas altamente resistentes les da una ventaja competitiva muy importante en un ambiente como el suelo (Stephens, 1998). Así mismo, *Bacillus* spp. también se deben adaptar a cambios bruscos de temperatura, para esto cuentan con genes de shock térmico inducibles que incluyen proteínas chaperonas y proteasas (Petersohn *et al.*, 2001). Esta capacidad de ser metabólicamente muy diversos les permite tener una colonización exitosa en el ambiente rizosférico. Entre algunos mecanismos promotores de crecimiento identificados en el género *Bacillus*, se encuentran la solubilización de fosfato (Chatli *et al.*, 2008), la síntesis de fitohormonas como el ácido indol acético (Vessey, 2003) y la capacidad de controlar algunos hongos patógenos en la rizósfera (Larrea, 2001).

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar fisiológicamente el crecimiento de *Bacillus* spp. en condiciones de pH bajo y diferentes temperaturas bajas, que son condiciones características de las zonas altoandinas donde crece el cultivo de papa y de cuyas rizósferas fueron aisladas las diferentes cepas. Asimismo se realizaron correlaciones entre morfología de colonia, lugar de procedencia, crecimiento a temperatura baja y a pH bajo para llegar a conocer la existencia o ausencia de una relación que nos lleve a un mejor entendimiento del comportamiento de este género.

Materiales y métodos.

Cepas Bacterianas.

Se utilizaron 43 cepas de *Bacillus* spp. aisladas previamente de la rizósfera del cultivo de papa de 17 campos en Huancavelica y Puno (Tabla 1)(Calvo *et al.*, 2008) en los meses de enero y febrero. También se utilizaron cepas tipo de *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis* 168 del cepario del LEMYB Marino Tabusso (UNALM); las dos primeras cepas fueron aisladas de muestras de alimentos y la última proporcionada por el Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, México.

Tabla 1. Características físico químicas de los suelos muestreados.

Características físico-químicas	Puno	Huancavelica
pH (promedios)	6.25 +/- 0.13	5.8 +/- 0.28
C.E dS/m	0.46	0.58
CaCO ₃ (%)	0.00	0.00
M. O (%)	2.64	6.60
P(ppm)	20.195	8.40
K (ppm)	231.04	75.00
Arena (%)	63.96	51.00
Limo (%)	27.04	41.00
Arcilla (%)	9.00	8.00
Clase Textural	Franco arenoso	Franco
CIC* (me/100g)	10.695	19.85
Ca ² (me/100g)	2.93	6.56
Mg ² (me/100g)	0.635	0.84
K (me/100g)	0.34	0.10
Na (me/100g)	0.08	0.22
Al ³ +H (me/100g)	0.78	0.38
Temperatura(°C)*	10	8-9
Altura(msnm)	4200	3900 - 4000
Precipitación (mm)	650	700
Variedades de papa	Peruanita-Amarilla	Ccompis-Imilla Negra
Numero de campos	8	9

Caracterización morfológica y bioquímica de *Bacillus* spp.

Se realizó una descripción morfológica de cada una de las cepas de *Bacillus* spp. seleccionadas en agar Triptona Glucosa Extracto de levadura (TGE) en base a la apariencia de la forma, borde, superficie, tamaño, consistencia, color y elevación de las colonias. Esta descripción se realizó después de 48 h de crecimiento del cultivo, incubado a 28°C. Para la identificación bioquímica a nivel de especie se realizaron las siguientes pruebas según Claus & Berkeley (1986), HPA (2004), Lennette (1987): reducción de nitratos, hidrólisis de almidón, Voges-Proskauer (VP), lecitinasa, fermentación y producción de gas a partir de glucosa, crecimiento a 50°C, crecimiento a 7% de NaCl y crecimiento en anaerobiosis.

Caracterización fisiológica.

Crecimiento a temperaturas bajas.

Se colocaron 5 µl de cada una de las cepas seleccionadas (a una concentración de 10⁸ cel/ml) en placas conteniendo agar TGE por duplicado, y se incubaron a 4°C, 10°C, 15°C y 20°C; se evaluó el crecimiento de las cepas durante 15 días para determinar su capacidad adaptativa y se comparó con el crecimiento de la bacteria en una placa control incubada a 28°C. Se consideró como escala máxima el

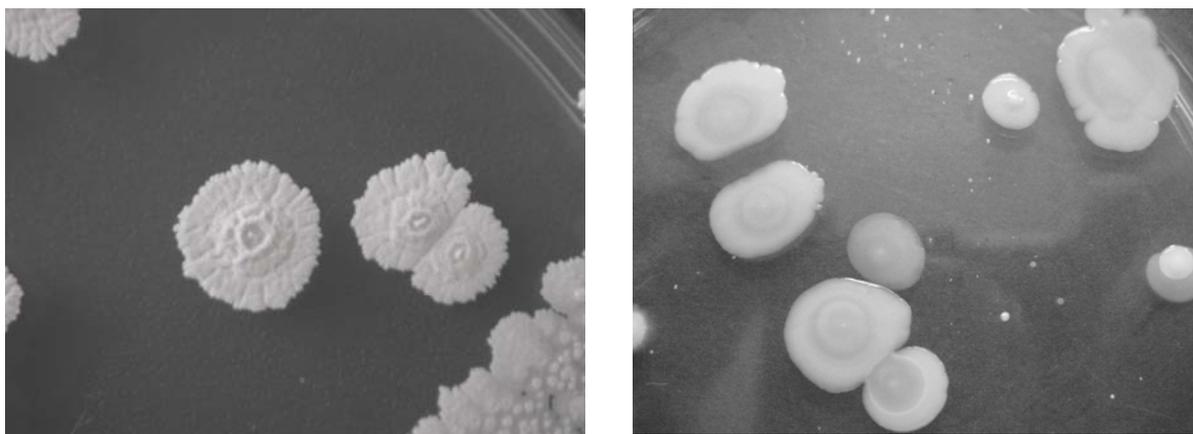


Figura 1. Morfología de diferentes colonias de *Bacillus* en medio TGE. Colonia con consistencia seca (izquierda). Colonia con consistencia cremosa (derecha).

número 4, que fue el máximo crecimiento de colonia logrado en la placa control. A partir de esto se clasificó el crecimiento de las cepas del 0 al 4.

Crecimiento a pH bajo.

Se colocaron 5 μ l de cada una de las cepas seleccionadas (a una concentración de 10^8 cel/ml) en placas conteniendo agar TGE con pH regulado a 4, 5.5 y 7.0. Las pruebas se hicieron por duplicado. El pH 7 se utilizó como control. Las placas se incubaron a 28°C por 7 días, al cabo de ese tiempo se evaluó el crecimiento de las cepas para determinar la capacidad adaptativa a suelos de pH bajo que se presentan en algunas zonas altoandinas. Se utilizó el mismo sistema de evaluación que para la temperatura, basado en una escala del 0 al 4, siendo este último el máximo crecimiento de colonia alcanzado por la placa control.

Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de correlación de Cramer ($p < 0.05$) (Milton, 2001) con el programa R (R Project, 2008) y el programa SAS (SAS Institute Inc, 1996) para hallar correlaciones entre las diferentes características morfológicas y condiciones de

temperatura y pH.

Resultados y discusión.

Se realizó la descripción de la morfología de las colonias de 43 cepas de *Bacillus* spp. (Tabla 2). Se observa que una característica común en todas las colonias de *Bacillus* es su forma irregular y color crema, la apariencia de los bordes de las colonias varía entre aserrada, lobulada, digitiforme y ondulada; las elevaciones de las colonias suelen ser planas o acuminadas, en este último caso presentan el centro más elevado en forma de anillo, la consistencia suele ser seca pero también se presentan colonias cremosas y ligosas (Figura 1). La gran mayoría presenta una superficie opaca, y la consistencia y tamaño es variable. Wakita *et al.* (2007) reportan que las colonias de *Bacillus* presentan la característica de formar un anillo concéntrico y borde irregular en el centro. Esto es lo que se observó en muchas de las cepas aisladas. Los resultados de las pruebas bioquímicas se muestran en la Tabla 3; el 84% de las cepas aisladas muestran un comportamiento que las

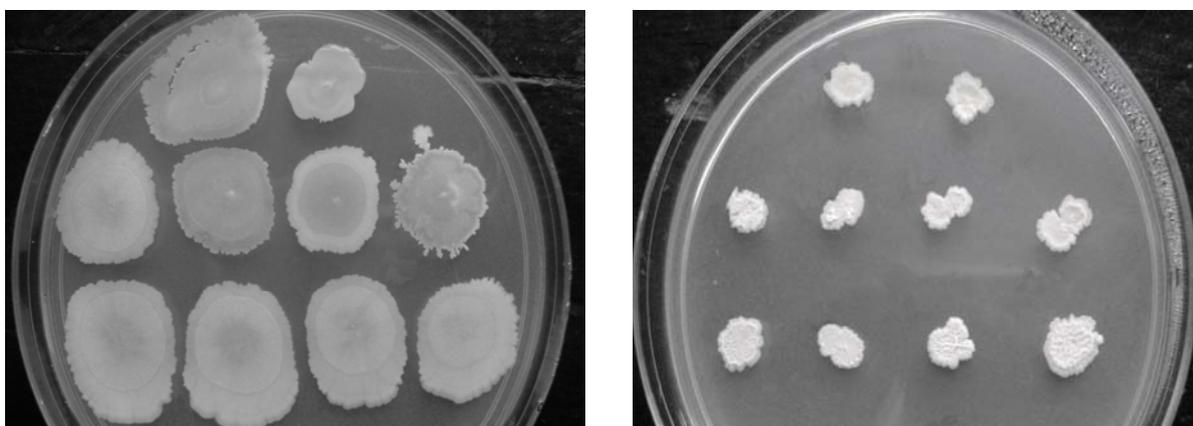


Figura 2. Evaluación de niveles de crecimiento en medio de cultivo a los 15 días. Placa a 28°C (control) con nivel de crecimiento máximo de 4 (izquierda). Placa a 10°C con nivel de crecimiento 2 (derecha).

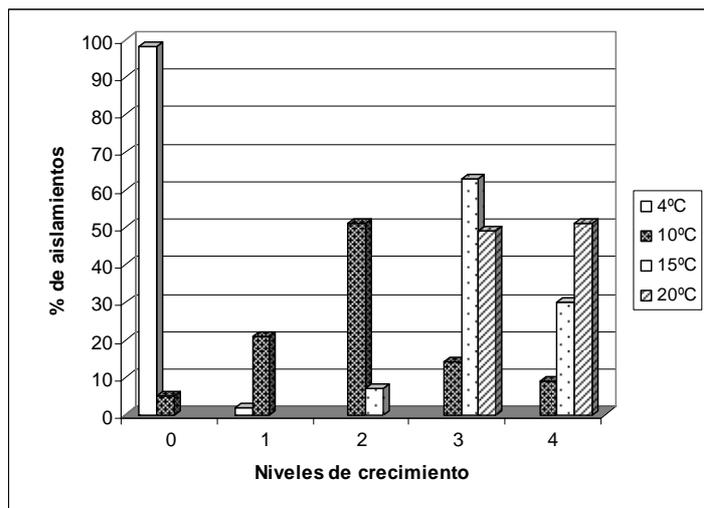


Gráfico 1. Porcentaje de aislamientos en base a 4 niveles de crecimiento en medio de cultivo a bajas temperaturas (15 días) de las cepas de *Bacillus* spp.

relacionan con la especie *B. subtilis*, las cepas 2, 13 y 25 solo se diferencian de las demás por crecer en anaerobiosis lo que las relaciona más con el género *B. licheniformis*, la cepas 21 y 30 muestran una reacción variable a la prueba de VP, la variabilidad en el resultado de esta prueba ya ha sido reportado por Lennette (1987) por esta razón no se puede afirmar o descartar que pertenezcan al grupo de *B. subtilis*. La

cepa 9 muestra un resultado variable en la producción de acidez en presencia de glucosa, esta prueba no es determinante para la identificación de *Bacillus* y al igual que la prueba de VP puede presentar este tipo de resultados. Las cepas 28 y 37 no crecen a 50°C, Claus & Berkeley (1986) mencionan que la capacidad de crecimiento a 50°C es variable entre cepas de la misma especie, los rangos de temperatura de crecimiento altas son muy sensibles tanto que a una variación de un grado puede influenciar en el crecimiento vegetativo de la bacteria. Una de las pruebas más determinantes mencionadas por la HPA (2004) es la prueba de producción de lecitinasa. Esta prueba mide la capacidad de producir esta enzima que degrada la lecitina presente en la yema de huevo. Las 4 principales especies que son lecitinasas positivas son *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. cereus* y *B. thuringiensis*; las tres primeras

especies se caracterizan por ser patógenas humanas. En la prueba de lecitinasa realizada ninguna de las cepas aisladas fue lecitinasa positiva, sólo el *Bacillus cereus* usado como control dio una reacción positiva. Esto es importante ya que en el futuro se podría producir biofertilizante a partir de estas cepas sin correr el riesgo de que sean potencialmente patógenas. La poca variabilidad de especies aparentemente

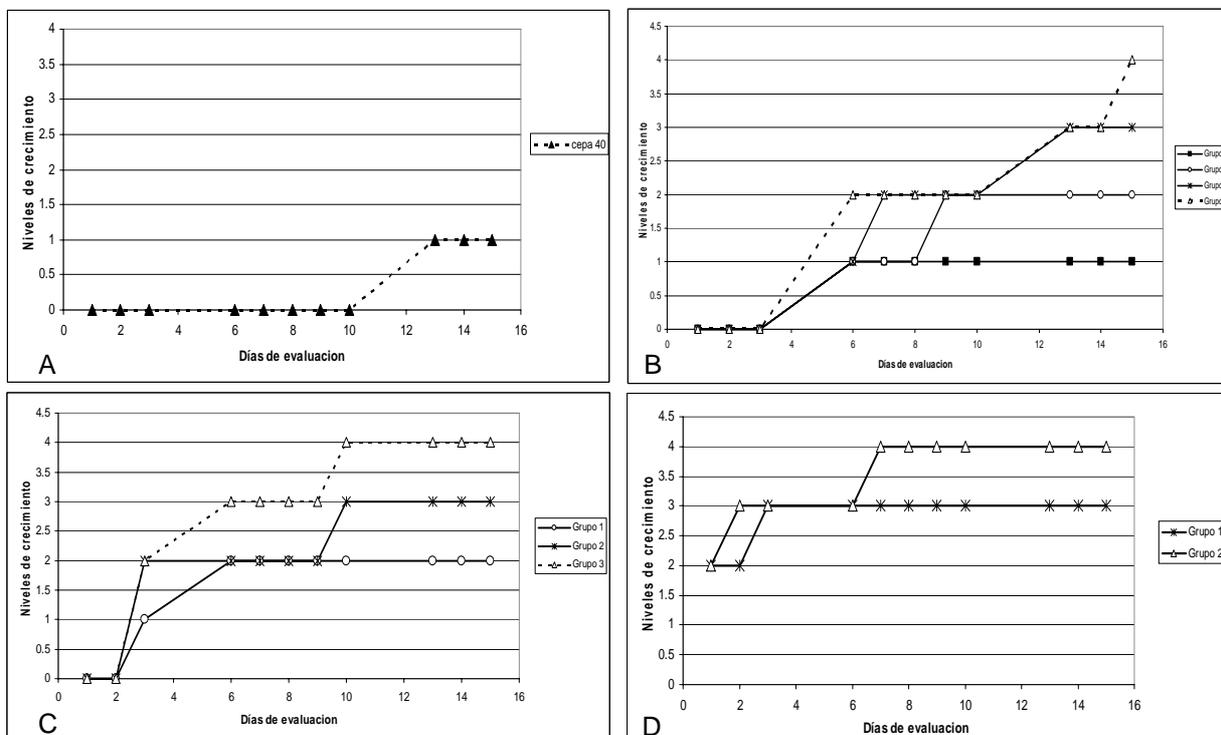


Gráfico 2. Efecto de las temperaturas bajas en el crecimiento de cepas de *Bacillus* spp. A. Crecimiento a 4°C. B. Crecimiento a 10°C. C. Crecimiento a 15°C. D. Crecimiento a 20°C.

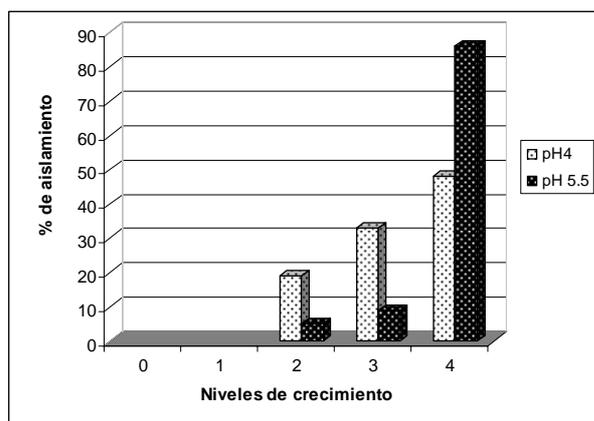


Gráfico 3. Porcentajes de aislamiento en base a los niveles de crecimiento a pH ácidos en medio de cultivo (7 días) de las cepas de *Bacillus* spp.

encontradas no significa necesariamente que la diversidad del suelo sea pobre. McSpadden (2004) menciona que entre las especies más comúnmente halladas en suelo están *B. subtilis* y *B. cereus* sin embargo, no se ha ratificado que una u otra especie de *Bacillus* este relacionada más a un tipo de suelo que a otro. Estudios a nivel de ADN han confirmado que la mayoría de las especies de *Bacillus* que se logran aislar, son aquellas que se caracterizan por ser las más

fáciles de cultivar, sin embargo, muchas otras no se descubren por ser difícil la obtención de su cultivo en medios artificiales. Además se debe tener en cuenta que las especies del género *Bacillus* son genéticamente muy heterogéneas, alcanzando diferencias interespecíficas de un 30% en la cantidad de G-C (Claus & Berkeley, 1986).

Las pruebas fisiológicas de temperatura y pH (Gráficos 2 y 4) indicaron que los porcentajes de cepas que alcanzaron los máximos crecimientos a diferentes temperaturas son muy variables (Gráfico 1), es así que a 4°C solo la cepa 40 creció y aún así no alcanzó el máximo nivel de crecimiento. Este comportamiento ya ha sido observado por Ingraham (1958) con bacterias de suelo capaces de crecer incluso a 1°C después de un mes. A 10°C el porcentaje de cepas que creció fue en aumento pero sólo un 9% alcanzó el máximo crecimiento. También se observó que un 5% de las cepas no creció. A 15°C todas crecieron y un 30% alcanzó un crecimiento máximo y a 20°C 51% alcanzó el máximo nivel de crecimiento 4 y el 49% el crecimiento en nivel 3. En cuanto al crecimiento en el tiempo en el Gráfico 2 se observa la adaptación de grupos de cepas conformados por cepas con mismos patrones de crecimiento a temperatura baja. Este crecimiento se realizó de manera escalonada, las colonias fueron aumentando de tamaño poco a poco a medida que pasaban los días. A 4°C la cepa 40 recién mostró algún crecimiento al día 13, a 10°C las cepas mostraron algún tipo de crecimiento entre los 3 y 6 días y a partir de allí el aumento en el tamaño de la colonia fue escalonado. Las cepas que llegaron al nivel 2 mantuvieron este nivel hasta el final, sin embargo, las que crecieron hasta los niveles 3 y 4 aumentaron poco a poco el tamaño de colonia hasta el último día de evaluación. Este aumento progresivo en el tamaño de colonia podría estar revelando la capacidad de crecimiento que presentan las bacterias a temperaturas bajas. Mientras más baja sea la temperatura, la bacteria tarda más en crecer. En el caso de *B. subtilis*, las temperaturas bajas inducen modificaciones estructurales que se encuentran correlacionadas con patrones de crecimiento atípicos. Se ha observado la existencia de crecimiento celular pero sin división; las bacterias sobreviven, pero por un tiempo no hay división, después de un tiempo de adaptación hay una recuperación y comienza de nuevo la división (Neale & Chapman, 1970). Por otro lado Méndez *et al.* (2004) y Budde *et al.* (2006), mencionan que para *Bacillus subtilis* las condiciones de baja temperatura inducen en muchos casos los factores de transcripción involucrados en el proceso de esporulación, lo que favorece más aún el proceso de adaptación.

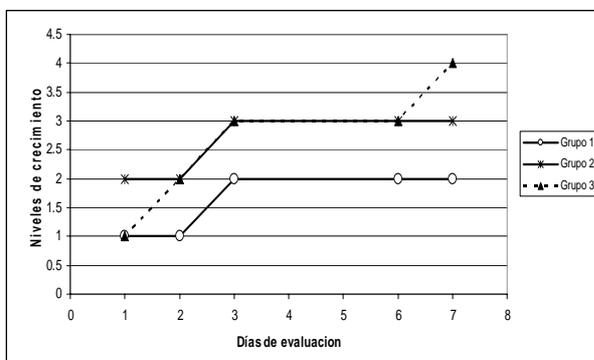
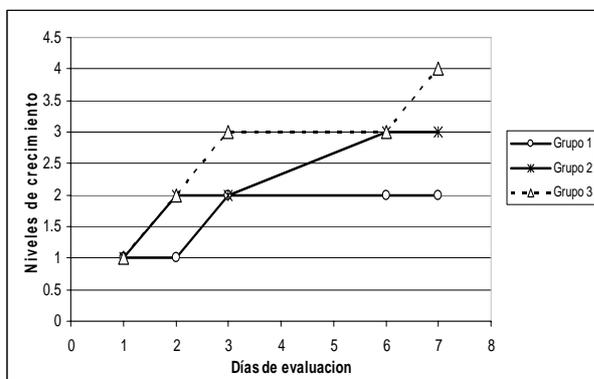


Gráfico 4. Efecto del pH en el crecimiento de las cepas de *Bacillus* spp., evaluadas a pH 4 (arriba) y pH 5.5 (abajo).

En el Gráfico 3 se observa que en general, todas las cepas probadas a pH 4 y 5.5 mostraron algún nivel de crecimiento. A pH 4, 48 % de las cepas llegaron al crecimiento máximo de 4, mientras que a pH 5.5, el

88 % mostró un crecimiento completo en relación al control. Al igual que en el caso de las temperaturas, la capacidad de adaptación aumenta conforme el pH se acerca al óptimo, *Bacillus* es un género muy asociada a pH neutros, sin embargo, esta capacidad de adaptación a pH bajo ya ha sido reportada por Pal (1998) que menciona que la cepa de *Bacillus* PAS-2 es capaz de crecer a pH 4.8. Así también otras cepas aisladas de *Bacillus* spp. pueden crecer a este pH, pero mostrando diferentes tasas de crecimiento. En el Gráfico 4 se observa que el crecimiento de las cepas también aumenta de manera escalonada a medida que pasan los días, confirmando una vez más su capacidad de crecer en condiciones adversas a través del tiempo.

En el análisis de correlación de Cramer ($p < 0.05$) se encontró que las cepas con característica de consistencia seca poseen un mejor nivel de crecimiento a pH 4 en medio de cultivo mostrando un coeficiente de correlación de 0.453. Además, estas mismas cepas presentaron una mejor adaptación a 10°C en medio de cultivo, mostrando un coeficiente de correlación de 0.4219. Esto nos indica que la morfología de consistencia seca de la colonia de los *Bacillus* spp. estaría relacionada con una mejor adaptación a condiciones de estrés.

Por otro lado, a pesar que los valores bajos de pH no son los valores óptimos de crecimiento para *Bacillus*, estudios previos llevados a cabo con valores de pH bajos en suelo (Nishijima *et al.*, 2005) han demostrado la presencia activa de especies de *Bacillus*.

En cuanto a la procedencia de las cepas (Huancavelica o Puno) y su crecimiento a 20°C, existe una asociación altamente significativa de 0.674. Las cepas procedentes de Huancavelica llegaron a un nivel máximo de crecimiento de la colonia en medio de cultivo (4), mientras que aquellas aisladas de Puno sólo llegaron a un nivel de crecimiento menor (3). Asimismo la cepa 40 que fue la única que creció a 4°C también fue aislada de Huancavelica. Esto nos permite concluir que la adaptación a temperatura baja estaría relacionada con el lugar de procedencia, y las cepas de Huancavelica estarían mejor adaptadas a esas condiciones en comparación a las de Puno. Se realizó también un análisis de correlación entre las temperaturas de los lugares de procedencia de las cepas y el crecimiento a temperatura de 20°C en medio de cultivo. En Huancavelica las temperaturas variaron entre 8 y 9 °C mientras que en Puno se mantuvieron alrededor de 10°C (Calvo *et al.*, 2008). Se encontró una correlación significativa con un coeficiente de -0.675, lo que confirma que las cepas provenientes de zonas de menor temperatura presentan un mejor nivel de crecimiento a 20°C en el medio de cultivo.

Conclusiones.

Se puede concluir que la especie *B. subtilis* es un habitante muy común en la rizósfera del cultivo de papa, que a su vez demuestra una gran diversidad intraespecífica que se confirma con las diferentes capacidades de crecimiento, tanto a temperaturas bajas como a pH ácidos. Es muy importante conocer esta diversidad dada la importancia de la relación no patogénica microorganismo-planta en la rizósfera, donde los microorganismos como *Bacillus* ejercen una acción específica mediante la producción de metabolitos secundarios, resistencia a estreses biótico y abióticos y facilitando la toma de nutrientes del suelo; todas estas actividades podrían favorecer el desarrollo del cultivo de papa.

Agradecimientos.

Dr. Andreas Oswald, Ing. Felipe de Mendiburu del CIP y Bach. Cesar La Torre del LEMYB Marino Tabusso-UNALM. El trabajo ha sido financiado por el Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Concytec), Centro Internacional de la Papa (CIP), Oficina de Investigación - UNALM y FDA Biol-111/UNALM.

Literatura citada.

- Ahmed H., Labuschagne N. & Korsten L. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological Control*. 40: 97-106.
- Alexander M. 1980. Transformaciones microbianas del fósforo. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor. México. : 355- 371.
- Budde I., Steil L., Scharf C., Völker U. & Bremer E. 2006. Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiology*. 152: 831-853.
- Calvo P., Reymundo L. & Zúñiga D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*. 7 (1,2): 141-148.
- Chatli A.S., Beri V. & Sidhu B.S. 2008. Isolation and characterisation of phosphate solubilising microorganisms from the cold desert habitat of *Salix alba* Linn. in trans Himalayan region of Himachal Pradesh. *Indian Journal of Microbiology*. 48: 267-273.
- Claus D. & Berkeley R.C.W. 1986. Genus *Bacillus*. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Eds. P. H.Sneath, N. Mair, M. E. Sharpe and J.G. Holt, Baltimore, Williams and Wilkins, 9 na. Edición. Vol. 2.: 1105-1139.
- Drucker D.B. & Whittaker D.K. 1971. Microstructure of Colonies of Rod-Shaped Bacteria. *Journal of Bacteriology*. 108: 515-525.
- Foster R.C. 1998. Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*. 6: 189-203.
- Glick B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 41: 109-117.

- Health Protection Agency (HPA). 2004. National Standard Method: Identification of *Bacillus* species. Inglaterra. pp. 7
- Hiltner L. 1904. Über neuer erfahrung und problem auf dem gebeit der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksinchtung der grundung und brache. Arbeiten Deutscher Landwirtschafts Gesellschaft. 98: 59-78.
- Ingraham J.L. 1958. Growth of Psychrophilic bacteria. Journal of Bacteriology. 76: 75-80.
- Killian M., Steiner U., Krebs B., Junge H., Schmiedeknecht G. & Hain R. 2001. FZB24 *Bacillus subtilis* mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenschut - Nachrichten Bayer. 1: 72-93.
- Krupa S.W. & Dommergues Y.K. 1981. Ecology of root pathogens; 2da. ed. Elsevier scientific publishing company. EEUU.
- Larrea O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 62: 96-100.
- Lennette E.H. 1987. Manual de Microbiología Clínica. Editorial médica panamericana. Buenos Aires (Argentina).
- Lynch J.M. 1990. The rhizosphere. Willey-Interscience, Chichester, (Inglaterra). : 55-66.
- McSpadden B.B. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. Phytopathology. 94: 1252-1258.
- Méndez M.B., Orsaria L.M., Philippe V., Pedrido M.E. & Grau R.R. 2004. Novel Roles of the Master Transcription Factors Spo0A and σ^B for Survival and Sporulation of *Bacillus subtilis* at Low Growth Temperature. Journal of Bacteriology. 186: 989-1000.
- Milton S. 2001. Estadística para Biología y Ciencias de la Salud. Ed.: McGraw-Hill España. : 407-432.
- Neale E.K. & Chapman G.B. 1970. Effect of low temperature on the growth and fine structure of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology. 104: 518-528.
- Nishijima T., Toyota K. & Mochizuki M. 2005. Predominant culturable *Bacillus* species in Japanese Arable soils and their potencial as biocontrol agents. Microbes and Environment. 20: 61-68.
- Pal S.S. 1998. Interactions o fan acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerate crops. Plant and Soil. 198: 169-177.
- Petersohn A., Brigulla M., Haas S., Hoheisel J., Lker U. & Hecker M. 2001. Global Analysis of the General Stress Response of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology. 183: 5617-5631.
- R Project for Statistical Computing Version: 2.7.0. 2008. R Development Core Team.
- SAS Institute Inc. 1996. SAS/STAT software: Changes and enhancements for release. 6.12 SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Stephens C. 1998. Bacterial sporulation: A question of commitment?. Current Biology. 8: 45-48.
- Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil. 255: 571-586.
- Wakita J., Shimada H., Itoh H., Matsuyama T. & Matsushita M. 2001. Periodic Colony Formation by Bacterial Species *Bacillus subtilis*. Journal of the Physical Society of Japan. 70: 911-919.

Tabla 2. Descripción morfológica de colonias de *Bacillus* spp. aisladas de rizósfera de papa.

cepa	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Color	Consistencia	Tamaño (cm)	Procedencia
1	Irregular	Aserrado	Plana	Opaca	crema	Muy Ligosa	0.2-0.3	Huancavelica
2	Irregular	Aserrado	Acuminada	Opaca	crema	Seca	0.2-0.3	Huancavelica
3	Irregular	Digitiforme	Acuminada	Opaca	crema	Ligosa	0.3-0.4	Huancavelica
4	Irregular	Digitiforme	Plana	Opaca	crema	Seca	0.1-0.2	Huancavelica
5	Irregular	Ondulado	Acuminada	Opaca	crema	Poco Ligosa	0.3-0.4	Huancavelica
6	Irregular	Ondulado	Plana	Brillosa	crema	Creмоса	0.3-0.4	Huancavelica
7	Irregular	Aserrado	Acuminada	Rugosa	crema	Seca	0.2-0.4	Huancavelica
8	Irregular	Ondulado	Plana	Opaca	crema	Seca	0.2-0.3	Huancavelica
9	Irregular	Digitiforme	Acuminada	Opaca	crema	Poco Ligosa	0.4-0.5	Huancavelica
10	Irregular	Aserrado	Acuminada	Opaca	crema	Poco Ligosa	0.2-0.3	Huancavelica
11	Irregular	Aserrado	Plana	Opaca	crema	Ligosa	0.3-0.4	Huancavelica
12	Irregular	Aserrado	Plana	Opaca	crema	Seca	0.2-0.3	Huancavelica
13	Irregular	Aserrado	Acuminada	Opaca	crema	Seca	0.3-0.4	Huancavelica
14	Irregular	Aserrado	Acuminada	Opaca	crema	Creмоса	0.1	Puno
15	Irregular	Digitiforme	Pana	Opaca	crema	Seca	0.1-0.2	Puno
16	Irregular	Ondulado	Acuminada	Opaca	crema	Seca	0.2-0.4	Puno
17	Irregular	Aserrado	Acuminada	Opaca	crema	Creмоса	0.1	Puno
18	Irregular	Ondulado	Acuminada	Opaca	crema	Seca	0.1-0.3	Puno
19	Irregular	Ondulado	Acuminada	Opaca	crema	Seca	0.2	Puno
20	Irregular	Digitiforme	Acuminada	Opaca	crema	Seca	0.2	Puno
21	Irregular	Difuminado	Plana	Opaca	crema	Seca	0.3-0.5	Puno
22	Irregular	Ondulado	Plana	Opaca	crema	Seca	0.2-0.3	Puno
23	Irregular	Digitiforme	Acuminada	Opaca	crema	Poco Ligosa	0.2-0.5	Puno
24	Irregular	Ondulado	Acuminada	Opaca	crema	Creмоса	0.2-0.5	Puno
25	Irregular	Digitiforme	Acuminada	Opaca	crema	Seca	0.3-0.5	Puno
26	Irregular	Ondulado	Plana	Opaca	crema	Seca	0.4	Puno
27	Irregular	Ondulado	Acuminada	Opaca	crema	Seca	0.3-0.5	Puno
28	Irregular	Ondulado	Plana	Brillosa	crema	Ligosa	0.2-0.3	Puno
29	Irregular	Digitiforme	Plana	Opaca	crema	Ligosa	0.2-0.3	Puno
30	Irregular	Digitiforme	Acuminada	Centro Brilloso	crema	Ligosa	0.1-0.2	Puno
31	Irregular	Aserrado	Plana	Opaca	crema	Seca	0.1-0.2	Puno
32	Irregular	Aserrado	Acuminada	Opaca	crema	Seca	0.1-0.2	Puno
33	Irregular	Ondulado	Plana	Opaca	crema	Seca	0.1	Puno
34	Irregular	Digitiforme	Plana	Opaca	crema	Seca	0.3-0.4	Huancavelica
35	Irregular	Ondulado	Plana	Opaca	crema	Seca	0.1-0.2	Huancavelica
36	Irregular	Aserrado	Acuminada	Opaca	crema	Seca	0.2-0.4	Huancavelica
37	Irregular	Digitiforme	Plana	Opaca	crema	Creмоса	0.1-0.2	Huancavelica
38	Irregular	Aserrado	Acuminada	Opaca	crema	Seca	0.1-0.3	Huancavelica
39	Irregular	Ondulado	Acuminada	Opaca	crema	Seca	0.2-0.4	Huancavelica
40	Irregular	Digitiforme	Acuminada	Opaca	crema	Seca	0.2	Huancavelica
41	Irregular	Ondulado	Acuminada	Opaca	crema	Seca	0.2-0.4	Huancavelica
42	Irregular	Digitiforme	Acuminada	Opaca	crema	Seca	0.2-0.4	Huancavelica
43	Irregular	Ondulado	Acuminada	Opaca	Crema	Seca	0.4	Huancavelica

Tabla 3. Caracterización bioquímicas de 43 cepas de *Bacillus* spp.

Cepas	Voges Proskauer	Red. Nitrate	Gas	Acidez	Lecitina	Almidón	7% NaCl	Anaerobiosis	50°C	Especie
1	+	+	-	+	-	+	+	-	+	
2	+	+	-	+	-	+	+	+	+	<i>B.licheniformis</i>
3	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
4	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
5	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
6	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
7	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
8	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
9	+	+	-	v	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i> *
10	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
11	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
12	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
13	+	+	-	+	-	+	+	+	+	<i>B.licheniformis</i>
14	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
15	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
16	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
17	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
18	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
19	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
20	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
21	V	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i> *
22	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
23	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
24	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
25	+	+	-	+	-	+	+	+	+	<i>B.licheniformis</i>
26	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
27	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
28	+	+	-	+	-	+	+	-	-	<i>B. subtilis</i> *
29	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
30	V	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i> *
31	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
32	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
33	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
34	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
35	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
36	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
37	+	+	-	+	-	+	+	-	-	<i>B. subtilis</i> *
38	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
39	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
40	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
41	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
42	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
43	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
<i>B.cereus</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	<i>B. cereus</i>
<i>B.subtilis</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>B. subtilis</i>
<i>Bpumilus</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	+	<i>B.pumilus</i>

¹ Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología Marino Tabusso, Dpto. de Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina. Av. La Universidad s/n La Molina. pamelacalvovelez@yahoo.com.

² Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología Marino Tabusso, Dpto. de Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina. Av. La Universidad s/n La Molina. Email. dzuniga@lamolina.edu.pe, web: www.lamolina.edu.pe/lmt.