
**DIVERSIDAD DE BACTERIAS ENDÓFITAS ASOCIADAS
A RAÍCES DEL PASTO COLOSUANA (*Bothriochloa pertusa*)
EN TRES LOCALIDADES DEL DEPARTAMENTO
DE SUCRE, COLOMBIA.**

**Endophytes Diversity of Bacteria Associated with Roots
of Colosuana (*Bothriochloa pertusa*) Pasture in Three Locations
of Sucre Department, Colombia.**

ALEXANDER PEREZ C¹, JOHANNA ROJAS S², M.Sc.;
JUSTO FUENTES C³ ESP.

¹ Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias,
Colombia. Grupo Bioprospección Agropecuaria. Sucre, Colombia.
alexander.perez@unisucra.edu.co

² Universidad de Sucre, Facultad de Educación y Ciencias.
Carrera 28 # 5-267, Sincelejo, Colombia.

³ Universidad de Sucre, Facultad de Ingeniería. Carrera 28# 5-267,
Sincelejo, Colombia.

Presentado 10 de febrero de 2010, aceptado 1 de junio de 2010, correcciones 1 de junio de 2010.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue aislar diversidad de bacterias endófitas cultivables asociadas a raíces del pasto colosuana *Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus en tres localidades del departamento de Sucre, Colombia. La diversidad de bacterias endófitas fue realizada mediante el aislamiento de colonias en medios de cultivos. La densidad poblacional fue estimada por conteo directo de colonias en placa y las características culturales de cada morfotipo fueron obtenidas mediante observación de cada colonia formada. Se determinó la correlación diversidad, densidad poblacional y localidades, utilizando ANOVA y análisis de componentes principales o de correspondencia simple, mediante el programa estadístico R, 2009 (4,5). Fueron muestreadas 20 fincas por localidad; se observó presencia de diversos morfotipos de bacterias endófitas. Se encontró diferencias significativas entre diversidad (morfotipos), densidad poblacional (UFC. raíz⁻¹) y localidades. La diversidad de bacterias endófitas representa apenas una pequeña fracción de la diversidad total existente en la naturaleza, siendo escasas las informaciones que se tienen de la presencia de estos microorganismos en agroecosistemas específicos, razón por lo cual este trabajo se convierte en la primera evidencia de asociación entre bacterias endófitas y raíces del pasto colosuana en Colombia.

Palabras clave: bacteria, endófitas, raíz, pasto.

ABSTRACT

The objective of this study was to isolate endophytes diversity of culturable bacteria associated with grass roots colosuana *Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus in three localities of the department of Sucre, Colombia. Endophytes bacterial diversity was performed by isolation of colonies on media culture. The population density was estimated by direct counting of colonies on plate and cultural characteristics of each morphotype were obtained by observation of each colony made. We determined the correlation diversity, population density and locations, using ANOVA and principal component analysis or simple correspondence, using the statistical program R, 2009 (4.5). 20 farms livestock were sampled by locality, it was observed the presence of various bacterial morphotypes endophytes. We found significant differences between diversity (morphotypes), population density (UFC.raíz⁻¹) and locations. The diversity of bacterial endophytes represents only a small fraction of the total diversity present in nature; being little information we have of the presence of these microorganisms in specific agroecosystems, which is why this work becomes the first evidence of association between bacteria and roots of grass endophytes colosuana in Colombia.

Key words: Bacteria, endophytes, roots, pasture.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias están indisolublemente asociadas a las plantas como patogénicas, epífitas, endófitas, simbióticas y antagónicas. Muchas forman asociaciones íntimas con las plantas y forman grupos diversos filogenéticamente representados por especies pertenecientes a los principales taxones. Las bacterias asociadas a las plantas típicamente intercambian señales con su hospedero y poseen diversos mecanismos para adaptación y colonización (Preston *et al.*, 1998). Aspectos importantes de la diversidad de bacterias en el ecosistema incluyen los diferentes procesos que estos realizan, la complejidad de la interacción y el número de niveles tróficos que los componen. En los últimos años, ha despertado intereses cada vez mayor aspectos relacionados con la composición, estructura y función de comunidades de bacterias en diferentes ambientes (Ward, 2006). Las primeras evidencias de asociación entre microorganismos endófitos y plantas, se originaron de observaciones en tejidos y hojas fosilizadas, lo que soporta la inferencia de que la asociación planta-endófito pudo haber ocurrido junto con la aparición de las primeras plantas en la tierra (Hua wei *et al.*, 2006). Como resultado de esa larga asociación es posible que algunos de estos microorganismos endófitos hayan adquirido un sistema genético para transferir información desde la planta hospedera hasta ellos, o viceversa, garantizando su adaptación a diferentes ambientes y a la planta hospedera (Tsavkelova *et al.*, 2007). Las bacterias endófitas son reconocidas como aquellos organismos que residen en tejidos de las plantas, principalmente espacios intercelulares, raramente en espacios intracelulares y dentro de tejidos vasculares sin causar síntomas de enfermedad en la planta (Bacon y White, 2000). Las discusiones sobre el origen de las bacterias endófitas y la forma de penetración, además de los mecanismos de colonización, consideran la hipótesis de que se originaron desde semillas, de la rizosfera, de microflora, de filoplano

o de material utilizado para la propagación vegetativa (Reinhold-huker y Hurek, 1998). La penetración en la planta puede ocurrir por estomas, heridas, áreas de emergencia de raíces laterales, siendo que estas bacterias pueden producir enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular de los vegetales (Macculley, 2002).

La densidad poblacional de bacterias endófitas es altamente variable, depende de la especie de bacteria y el genotipo de la planta hospedera, además del estado de desarrollo del planta, la densidad del inóculo y las condiciones ambientales (Pillay y Norwalk, 1997). Estudios moleculares recientes sobre diversidad de bacterias endófitas han revelado una alta riqueza de filotipos, que promueven el crecimiento de las planta, suprimen fitopatógenos, ayudan a remover contaminantes, solubilizan fosfato y contribuyen a la asimilación biológica de nitrógeno (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). Las bacterias endófitas son consideradas como modelo de estudio de expresión génica en su nicho natural o hábitat dentro de las plantas (Maron *et al.*, 2006). Sin embargo, cuestiones básicas sobre la diversidad microbiana existente en plantas comerciales, así como la estructura de esas comunidades y la funcionalidad en diferentes especies vegetales, localizadas en diversos ambientes geográficamente definidos, deben ser objeto de investigaciones modernas en lo referente a la presencia de bacterias endófitas, diversidad y su relación con la productividad en agroecosistemas específicos. La ganadería es una actividad muy significativa dentro del sector agropecuario y agroindustrial del país. Comprende 491.334 predios, conformados por la pequeña, mediana y grande ganadería (Fedegan, 2009). En el Departamento de Sucre la ganadería de doble propósito representa un 84,9% de su territorio (Dane, 2000). Una de las limitantes en la productividad animal es la escasez o falta total de forraje durante la época seca debido a la estacionalidad de las lluvias. Esta escasez se incrementa por los diferentes grados de compactación, problemas erosivos, bajos niveles de fertilidad, la falta de abonamientos y el pastoreo extensivo, generando la degradación de las praderas (Aguilera, 2005).

Las pasturas del Caribe colombiano están constituidas por gramíneas de alto potencial productivo como guinea (*Panicum máximum*), angletón (*Dichanthium aristatum*), puntero (*Hyparrhenia rufa*) y pará (*Brachiaria mutica*), algunas especies naturalizadas como Colosuana o kikuyina (*Bothriochloa pertusa*). Esta última ha colonizado en forma rápida y progresiva la región, invadiendo las especies cultivadas de tal forma que en la actualidad cubre extensas áreas de las zonas de vidas de bosques secos tropical (bs-T) y bosque muy seco tropical (bms-T) en los departamentos de Córdoba, Sucre, Bolívar y Magdalena. El pasto colosuana, alcanza un total de 274.005 hectáreas, distribuidas en 19 municipios del departamento de Sucre (Aguilera, 2005; Universidad de Sucre, 1998). El objetivo del presente trabajo fue aislar la diversidad de bacterias endófitas cultivables asociadas a raíces del pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus) en tres localidades del departamento de Sucre.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTREO

El muestreo fue realizado en fincas ganaderas previamente identificadas, sembradas con el pasto colosuana en los municipios de Corozal, Sampedo y Tolú pertenecientes al departamento de Sucre. En cada finca, se realizó un muestreo, representativo, tomando

entre 15 a 20 submuestras al azar a una profundidad de 0-20 cm, recolectando al tiempo suelo y raíces. Las submuestras se homogenizaron para conformar una muestra por finca con un peso aproximado de 2.000 g, las cuales se depositaron en bolsas plásticas rotuladas con el número de la finca, corregimiento, área sembrada con el pasto y fecha de recolección. A cada muestra colectada se le hizo aislamiento y cuantificación de comunidades de bacterias endófitas asociadas en las raíces del pasto colosuana.

AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS ENDÓFITAS

Las muestras de suelos fueron tamizadas para separar suelos (piedras, cascajos) y raíces. Una vez tamizadas se procedió a los análisis microbiológicos de comunidades endófitas en las raíces. Diez raíces por muestras, fueron individualmente colocadas en 10 frascos erlenmeyer de 50 mL para la desinfección superficial por lavado en agua destilada y detergente neutro, por un minuto, seguida de cuatro enjuagues en agua destilada esterilizada. Las raíces lavadas fueron transferidas a nuevos frascos conteniendo agua esterilizada, para el aislamiento de comunidades de bacterias endófitas.

Para el aislamiento de bacterias endófitas, cada raíz fue sometida a proceso de esterilización superficial (Sakiyama *et al.*, 2001). El proceso consistió de: dos lavados de la raíz en agua destilada esterilizada, seguida de agitación por 15 min en solución tampón de fosfato de potasio 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0; inmersión por 1 min en alcohol 70%; agitación por 5 min en solución de hipoclorito de sodio 5% y Tween 80%; nuevamente inmersión por 1 min en alcohol 70% seguida de agitación por 15 min en solución tampón fosfato de potasio 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0 y, finalmente, el lavado por cuatro veces en agua destilada esterilizada. El proceso fue repetido por dos veces. Para confirmar la esterilización de la superficie de las raíces, alícuota del último lavado fue esparcida en placa conteniendo medio de cultivo agar nutritivo e incubada a 28 °C por 72 horas. Seguidamente, las raíces fueron transferidas para tubo conteniendo caldo nutritivo e incubado a 28 °C por 72 horas, para la certificación de la no presencia de microorganismos en la superficie de las raíces a ser utilizadas para el aislamiento de bacterias endófitas cultivables.

La densidad de bacterias por raíces, en UFC. g. de raíces⁻¹, fue estimada por conteo directo de colonias en placas. Durante el conteo fueron observadas y seleccionadas las colonias que se distinguían en cuanto a forma, aspecto de la superficie, color y tamaño. Los morfotipos seleccionados fueron purificados y mantenidos en agar nutritivo para su posterior análisis e identificación.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para correlacionar densidad poblacional de bacterias endófitas y localidades se utilizó ANOVA y el análisis de componentes principales o de correspondencia simple, mediante el programa estadístico R, 2009 (4,5)(R-development).

RESULTADOS

Un total de 20 fincas ganaderas por municipio fueron muestreadas. La densidad poblacional para bacterias endófitas aisladas de raíces del pasto colosuana osciló entre 3,1 a 6,2 x 10⁵ UFC.raíz⁻¹, 4,2 a 6,7 x 10⁵ UFC.raíz⁻¹ y 3,2 a 5,0 x 10⁵ UFC.raíz⁻¹ para el municipio de Corozal, Sampués y Tolú, respectivamente. En la figura 1 se puede observar la diversidad de bacterias endófitas aislada con diferentes aspectos morfológicos.

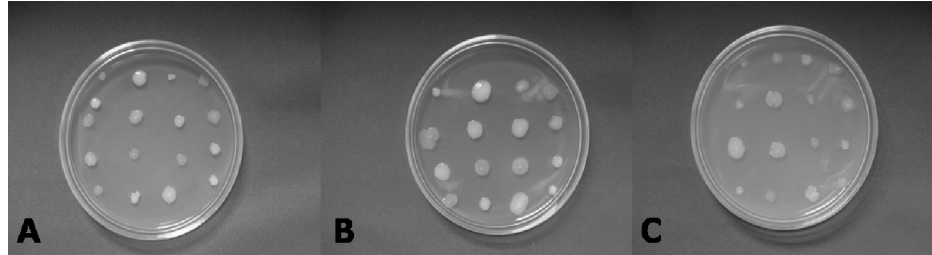


Figura 1. Aspectos morfológicos de comunidades de bacterias endófitas asociadas a raíces de pasto colosuana. A- municipio de Corozal, B- municipio de Sampués y C-municipio de Tolú.

La densidad de bacterias fue estimada en UFC. g. de raíces⁻¹, por conteo directo de colonias en placas. Fueron encontrados 4 morfotipos conformados por colonias de diferentes color y tamaño. Morfotipo 1: cb-colonias de color blanco; morfotipo 2: czan-colonias de color zanahorias; morfotipo 3: camar-colonias de color amarillo y morfotipo 4: Cbeig-colonias de color beige.

El análisis de ANOVA para densidad poblacional, señala diferencias significativas entre UFC total g. de raíces⁻¹ y localidades ($p\text{-value} = 1,49 \times 10^{-6}$). Fue encontrada diferencias significativas para los morfotipos 1, 3 y 4 ($p\text{-value} = 2,2 \times 10^{-16}$) y para el morfotipo 2 ($p\text{-value} = 9,3 \times 10^{-16}$) con relación a las localidades. El boxplot para UFC total g. de raíces⁻¹ por localidades, muestra que la mayor densidad poblacional de bacterias endófitas aislada se encuentran en el municipio de Sampués, sin embargo se observa que el municipio de Corozal mostró un mayor rango de dispersión con relación a las otras localidades (Fig. 2).

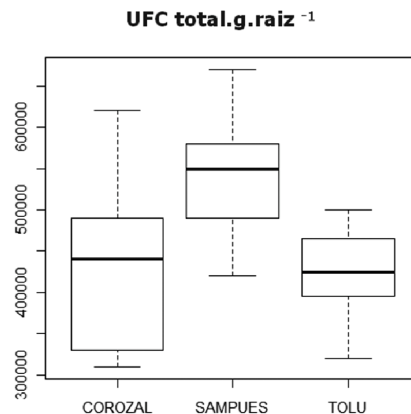


Figura 2. Boxplot de la densidad poblacional total en UFC g. de raíces⁻¹ de bacterias endófitas aisladas del pasto colosuana en tres localidades del departamento de Sucre.

La figura 3 muestra la distribución de UFC g. de raíces⁻¹ de cada morfotipo aislado por localidad. En esta figura se observa una mayor densidad poblacional del morfotipo 3 (camar) en el municipio de Corozal y una menor densidad en Sampués. El morfotipo 1 (cb) presenta una mayor densidad en el municipio de Sampués y menor en Tolú, contrariamente se observa que el morfotipo 4 (cbeig) presenta una mayor densidad en

Tolú y una menor densidad para Corozal. La mayor densidad poblacional del morfotipo 2 (czan) fue encontrada en el municipio de Sampedes, seguido por Corozal quien además mostró un mayor rango de dispersión.

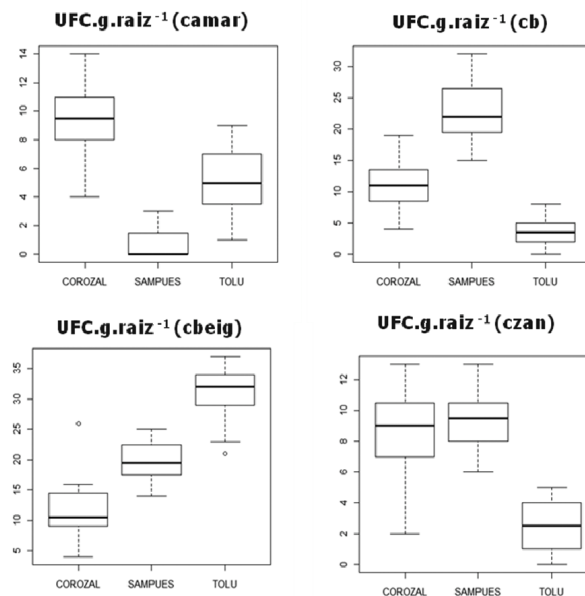


Figura 3. Boxplot mostrando distribución de densidad poblacional de morfotipos en UFC g. de raíces de bacterias endófitas aisladas de raíces de pasto colosuana en tres localidades del departamento de Sucre.

En la Figura 4 se observa la matriz de dispersión de densidad poblacional total e individual de morfotipos de bacterias endófitas aisladas de raíces del pasto colosuana en los municipios de Tolú, Sampedes y Corozal.

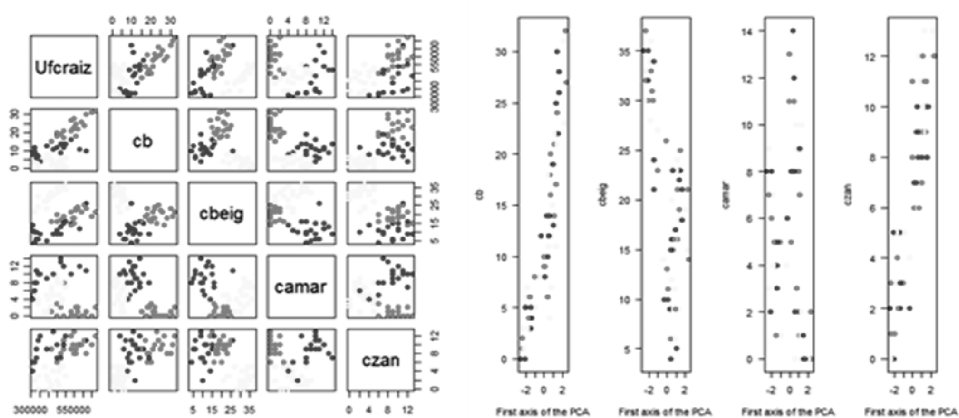


Figura 4. Matriz de dispersión de morfotipos de bacterias endófitas aisladas de raíces de pasto colosuana en tres localidades del departamento de Sucre.

Al relacionar morfotipos con localidades mediante análisis de componentes principales, la primera componente muestra una mayor densidad poblacional del morfotipo 2 (czan) aislados en algunas fincas ganaderas del municipio de Corozal con relación a los morfotipos 1 (cb), 3 (camar) y 4 (cbeig). La segunda componente relaciona una mayor densidad poblacional del morfotipo 4 en el municipio de Tolú, morfotipo 1 en Sampués y morfotipo 3 en Corozal (Fig. 5).

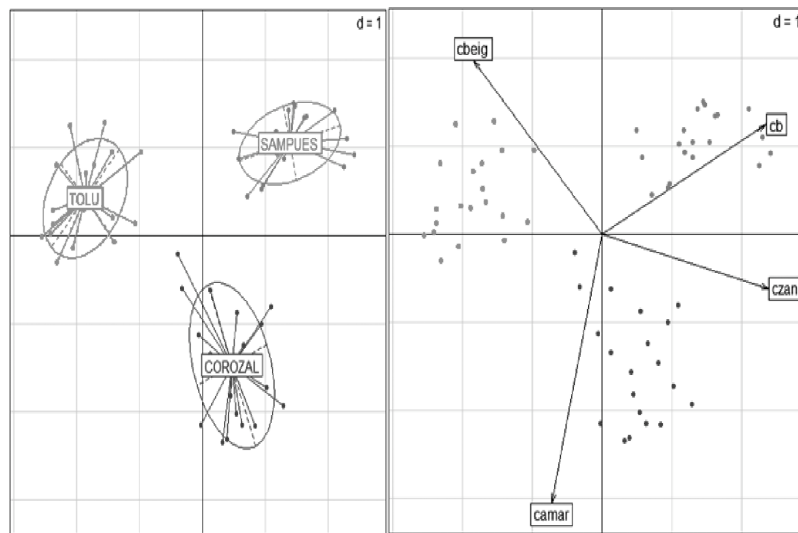


Figura 5. Análisis de componentes principales de la densidad poblacional de morfotipos de bacterias endófitas (UFC g. de raíces⁻¹) aisladas de raíces del pasto colosuana en tres localidades del departamento de Sucre.

DISCUSIÓN

La densidad poblacional de bacterias endófitas es menor que las patogénicas. Evolutivamente, los endófitos aparecen como microorganismos intermediarios entre bacterias saprofitas y patogénicas de plantas. Los valores de densidad poblacional de bacterias endófitas nativas en tejido de la mayoría de las especies vegetales sitúense en torno de 10^3 a 10^6 UFC.g⁻¹ de tejido fresco (Hallmann *et al.*, 1997). Las mayores densidades poblacionales bacterias endófitas nativas o introducidas, son normalmente observadas en la raíz y en la parte inferior del tallo, presentándose decrecimiento del tallo hasta la hoja (Lamb *et al.*, 1996). Las variaciones estacionales y geográficas, el tipo de tejido vegetal (Mocali *et al.*, 2003), especie y cultivares de hospedero y la interacción con otros microorganismos benéficos (Araujo *et al.*, 2002), también pueden influenciar el patrón de colonización de las bacterias endófitas.

Las bacterias endófitas han sido aisladas de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas comerciales, en especies de árboles forestales (Cankar *et al.*, 2005), frutales (Vega *et al.*, 2005; Lacava *et al.*, 2006), plantas herbáceas como caña de azúcar (Olivares *et al.*, 1996) soya (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004) y orquídeas (Tsavkelova *et al.*, 2007).

Son escasos los estudios que se tienen sobre la presencia de bacterias endófitas asociadas a diferentes tejidos de pastos. Fue aislada e identificada *Azoarcus* BH72 como una bacteria endófitas de raíces del pasto *Leptochloa fusca* L. Kunth, en Pakistán, con capacidad de fijar nitrógeno biológicamente (Hurek y Reinhold-Hurek, 2003). Fue evidenciada la presencia de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en rizoma y tallo de las especies de pasto *Ammophila arenaria* y *Elymus mollis* desde Oregón. Evidencias similares de estas bacterias fijadoras de nitrógeno fueron también identificadas en *Uniola paniculata* y *Ammophila brevigulata*. Estos hallazgos demuestran probablemente que estas y otras pasturas de climas templados se asocian con bacterias diazotróficas como una alternativa para la nutrición con nitrógeno (Dalton, 2004).

Estudios moleculares recientes sobre diversidad de bacterias endófitas han revelado una alta riqueza de filotipos, que promueven el crecimiento de la planta, suprimen fitopatógenos, ayudan a remover contaminantes, solubilizan fosfato y contribuyen a la asimilación biológica de nitrógeno.

No existe evidencias sobre la diversidad, ni la funcionalidad de bacterias endófitas asociadas a tejidos del pasto colosuana en condiciones climáticas, edáficas y de manejo de este pasto en agroecosistemas a nivel mundial, de Colombia y costa Caribe. Una estrategia para evaluar la diversidad microbiana (indicador biológico) asociados a los agroecosistemas es el análisis a través de herramientas de bioestadística (análisis multivariados) que permita la conversión e interpretación de un conjunto de variables (localidades) con una alta correspondencia entre ciertos indicadores (diversidad y densidad poblacional) y un componente, resultando en un alto peso absoluto del indicador en un componente determinado (localidad). Por esta razón se hace necesario desarrollar investigaciones básicas y aplicadas para el conocimiento de este recurso biológico y su posible papel en la sostenibilidad y producción de esta especie de pasto.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Sucre, Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

- AGUILERA MM. La Economía del Departamento de Sucre: Ganadería y Sector Público. Documento de trabajo sobre economía regional. Sincelejo: Banco Ganadero; 2005.
- ARAUJO WL, MARCON J, MACCHERONI WJR, VAN ELSAS JD, VAN VUURDE JWL, et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(10):4906-4914.
- BACON CW, WHITE JF. Microbial Endophytes. New York: Marcel Dekker Inc.; 2000.
- CANKAR K, KRAIGHER H, RAVNIKAR M, RUPNIK M. Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *FEMS Microbiol Lett.* 2005;244(2):341-345.
- DALTON DA, KRAMER S, AZIOS N, FUSARO S, CAHILL E, et al. Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus mollis*) from Oregon. *FEMS Microbiol Ecol.* 2004;49(3):469-479.

-
- DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas. Encuesta Nacional Agropecuaria, Costa Atlántica. Costa Atlántica; 2000.
- FEDEGAN. Federación nacional de ganaderos sector lácteo colombiano: una propuesta para reconstruir al sector. FEDEGAN. 2009;1:2-34.
- HALLMANN J, QUADT-HALLMANN A, MAHAFFEE WF, KLOPPER JW. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol.* 1997;43(10):895-914.
- HUREK T, REINHOLD-HUREK B. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J Biotechnol.* 2003;106(2-3):169-178.
- HUA WEI Z, YOUNG CHS, REN XT. Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod Rep.* 2006;23:753-771.
- KUKLINSKY-SOBRAL J, ARAUJO WL, MENDES R, GERALDI IO, PIZZIRANI-KLEINER AA, *et al.* Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol.* 2004;6(12):1244-1251.
- LACAVA TP, DINI AF, ARAUJO W, AZEVEDO J. Caracterização da comunidade de bactérias endofíticas de cítricos por isolamento, PCR específica e DGGE. *Pesq Agropec Bras.* 2006;41(4):637-542.
- LAMB TG, TONKYN DW, KLUEPFEL DA. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from rhizosphere to aerial plant tissue. *Can J Microbiol.* 1996;42(11):1112-1120.
- MACCULLEY ME. Niches for bacterium endophytes in crop plants: A plant Biologists view. *Aust J Plant Physiol.* 2002;28(9):983-990.
- MARON P, RANJARD L, MOUGEL C, LEMANCEAU P. Metaproteomics: A new Approach for Studying Functional Microbial Ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 2006;53(3):486-493.
- MOCALI S, BERTELLI E, DI CELLO F, MENGONI A, SFALANGA A, *et al.* Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. *Res Microbiol.* 2003;54(2):105-114.
- OLIVARES FL, BALDANI VLD, REIS VM, BALDANI JI, DOBEREINER J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biol. Fertil. Soils.* 1996;21(3):197-200.
- PILLAY VK, NORWARK J. Inoculum, density, temperature, and genotype effect on in vitro growth promotion and epiphyte and endophyte colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.), seedling inoculated with a *Pseudomonas* bacterium. *Can J Microbiol.* 1997;43:354-361.
- PRESTON G, HAUBOLD B, RAINEY P. Bacterial genomics and adaptation to life plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbioses. *Curr Opin Microbiol.* 1998;1(5):589-597.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM R: A Language and Environment for Statistical computing, R Foundation for Statistical Computing [Programa de ordenador]. Versión 2.11.1. Disponible en línea: <http://www.R-project.org>; 2009.
- REINHOLD-HUKER B, HUREK T. Interactions of Grameneous plant with *Azoarcus* spp., and other diazotrophic, identification, localization and perspective to study their function. *C Rev plant Sci.* 1998;17:29-54.
- ROSENBLUETH M, MARTINEZ-ROMERO E. Bacterial endophytes and their interaction with host. *MPMI.* 2006;19(8):827-837.

SAKIYAMA CH, PAULA EM, PEREIRA PC, BORGES AC, SILVA DO. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. *Letter Appl Microbiol.* 2001;33(2):117-121.

TSAVKELOVA EA, CHERDYNTSEVA TA, BOTINA SG, NETRUSOV AI. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol Res.* 2007;162(1):69-76.

UNIVERSIDAD DE SUCRE. Situación actual del sector ganadero en el departamento de Sucre. Sincelejo: Universidad de Sucre; 1998.

VEGA F, PAVA RM, POSADA F, BUYER J. Endophytic bacteria in coffee arabica L. *J Basic Microbiol.* 2005;45(5):371-380.

WARD DA. A Macrobiological perspective on microbial species. *Microbe.* 2006;1(6):269-278.