



UNIVERSIDAD LIBRE®

**MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL (MPCV)
EN SUELOS DE AGOECOSISTEMAS CAFETEROS**

LINA VANESSA ZAMORA NOVITEÑO
Estudiante programa de Microbiología

LILIANA BUENO LOPEZ
Docente Programa de microbiología

UNIVERSIDAD LIBRE PEREIRA

FACULTAD

MICROBIOLOGÍA

PEREIRA

MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO VEGETAL (MPCV) EN SUELOS DE AGOECOSISTEMAS CAFETEROS

Noviteño Lina

Resumen

En la agricultura de café se ven involucrados muchos microorganismos (MOS) desde el suelo tales como *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, estos ayudan al desarrollo de su semilla, tallo, flor y hojas, lo cual permiten el crecimiento y fortalecimiento de los árboles de cafeto proporcionado por los nutrientes del suelo, de igual manera existen microorganismos que controlan la aparición enfermedades a través de la inhibición de microorganismos patógenos. En el presente documento se evaluaron MPCV de suelos cafeteros con manejo orgánico, enfatizando en solubilizadores de fósforo y potasio y se estudió la posible relación del manejo del suelo con la presencia de estos microorganismos, el método utilizado consistió en realizar medios de cultivos que nos pudieran dar una evidencia del crecimiento de distintas bacterias como por ejemplos las que se mencionaron anteriormente, por lo cual fueron realizados medios de PDA con el fin de observar crecimiento de colonias relacionadas a Mohos y Levaduras, Agar nutritivo como indicador de heterótrofos, Pikoskaya por último Agar SMR1 siendo estos últimos dos los más importantes con respecto a el trabajo que se está realizando. Dando como resultados satisfactorios puesto se logró evidenciar crecimiento de bacterias beneficiosas para estos suelos y se alcanzó a identificar bacterias que corresponden al desarrollo de estos arbustos relacionados al suelo de café.

Palabras clave: Microorganismos promotores de crecimiento vegetal, café, compost,

Abstract

In coffee agriculture, many microorganisms (SOM) are involved, coffee trees provide nutrients from the soil, in the same way there are microorganisms that control the appearance of diseases through the inhibition of pathogenic microorganisms. In the present document, MPCV of coffee growing soils with organic management were evaluated, emphasizing in phosphorus and potassium solubilizers and the possible relationship of soil management with the presence of these microorganisms was studied, the method used consisted of making culture media that can give evidence of the growth of different bacteria such as those mentioned above, for which PDA media were made in order to observe growth of colonies related to Molds and Yeasts, Nutritive Agar as an indicator of heterotrophs, Pikoskaya finally Agar SMR1 being these last two the most important with respect to the work that is being carried out. Giving as satisfactory results, it was possible to show the growth of beneficial bacteria for these soils and it was found to identify bacteria that correspond to the development of these bushes related to the coffee soil.

Key words

Plant growth promoting microorganisms, coffee, compost.

INTRODUCCIÓN

El café es originario de Etiopía y existen muchas teorías sobre cómo se empezó a consumir considerando una de las más conocidas, la que tiene que ver con un pastor de cabras etíope a quien le llamó la atención el cambio de ánimo que tenían las cabras después de consumir una semilla madura (roja) de café ¹. También con seguridad era sabido en aquella época que los personajes cautivos o privados de su libertad, llevados desde Sudán, Yemen por último a Arabia, en lo cual a travesando el gran puerto conocido en aquella época como moca, el cual en la actualidad es un sinónimo con el café. En lo cual no queda alguna incertidumbre que el café se cultivaba en el Yemen ya en el siglo

XV y es posible desde épocas anteriores también el nombre café proviene del árabe Cauá, el cual llegó a nosotros por el vocablo turco cave, lo que le dió su nombre según el significado de cada país y en el caso de Colombia Café². El cultivo de café se extiende por Asia y América en los siglos XVII Y XVIII, y a mediados del siglo XIX Brasil entra como el mayor productor mundial del grano de café³.

El café también cuenta con aportes en la salud, ayudando a combatir enfermedades como el VIH y el virus de la hepatitis C (VHC). Un estudio realizado sobre el efecto protector del consumo de café sobre todas las causas de mortalidad de pacientes franceses coinfectados por VIH-VHC, determinó que tomar tres tazas del café al día reduciría el riesgo de fallecer en personas coinfectadas por las anteriores enfermedades mencionadas⁴.

Hace parte del género Coffe⁵ de la familia de las Rubiácea tiene más de 500 géneros y cuenta con aproximadamente 6.000 especies entre árboles y arbustos. En Colombia se introdujo a comienzos del siglo XIX entrando a través de la región del Orinoco, tiempo después llegó a Santander para llegar finalmente a la zona conocida como zona cafetera central. Subsiguientemente se distribuyó al norte para expandirse al sur de Colombia y luego se expandió hacia el sur del país. Pero solo hasta 1925 se pudo construir los primeros cultivos en haciendas de Colombia⁶.

El café Arábica también llamado Arábigos, es el más apreciado por su contenido de cafeína bajo que está contiene concentraciones de (0.9% y 1.5%). El cultivo de este es más fino por lo tanto se trata con mucho más cuidado. De acuerdo con las diferentes descripciones de la planta de café su fruto es redondo, suave, levemente agrio, de color café achocolatado, contiene una corteza lisa y un intenso olor por el cual se caracteriza. Actualmente aún se cuenta con más de Existen más de 1.000 diversidades de café arábico, en Colombia. Algunas de ellas son variedad Caturra, Colombia, Borbón, Típica, Maragoripe entre otras⁷.

En los cultivos de café se ven involucrados muchos microorganismos (MOS) desde el suelo, su semilla, tallo, flor y hojas, lo cual permiten el crecimiento y fortalecimiento de los árboles de café proporcionado por los nutrientes del suelo, de igual manera existen microorganismos que controlan la aparición de enfermedades a través de la inhibición de microorganismos patógenos. Existen muchas bacterias pertenecientes al suelo tales como *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* entre otras, por lo que gran parte de la productividad de las plantas se debe al suelo razón por la cual es importante tener en cuenta la fertilidad de este, identificar microorganismos que puedan estar aportando al funcionamiento del agroecosistema, para saber que nutrientes le aporta a la planta y como poder maximizar su producción por medio de compuestos orgánicos que se pueden tener en cuenta⁸.

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (MPCV) son indispensables ya que ayudan a recuperar la estructura del suelo que ha sido sometido a agroquímicos, fertilizantes. En los suelos se encuentran grandes cantidades de MOS los cuales son muy pequeños miden entre (0,1 a 1 micra). Estos pueden ser anaerobios, facultativos o aerobias. Además, estos microorganismos pueden soportar variaciones de cambios climáticos, adaptación de terrenos⁹.

Se reconocen como géneros importantes de microorganismos que cumplen funciones de promotores de crecimiento vegetal, a *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Clostridium*, *Thiobacillus*, *Lactobacillus*, y *Rhizobium*, también diversidad de hongos y actinomicetos¹⁰.

De estos géneros se resaltan *Bacillus*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* como solubilizadores de fósforo y potasio, nutrientes que, a pesar de estar presentes en el suelo, no son fácilmente asimilables para las plantas por su poca solubilidad en suelos ácidos derivados de cenizas volcánicas, como es el caso de

los suelos cafetos. Aquellos MPCV tienen la habilidad de facilitar la solubilidad de nutrientes, por medio de la producción de los conocidos ácidos orgánicos tales como : (málico, cítrico y cetoglutárico) y algunas enzimas tales como:(fosfatasa ácida y alcalina) ¹¹.

En el presente documento se evaluaron MPCV de suelos cafeteros con manejo orgánico, enfatizando en solubilizadores de fósforo y potasio y se estudió la posible relación del manejo del suelo con la presencia de estos microorganismos.

METODOLOGÍA

Para la investigación y desarrollo del tema se llevó a cabo primero una revisión bibliográfica acompañada por un análisis bibliométrico y posteriormente se procedió a realizar un trabajo práctico con muestras de suelo tomadas de una finca cafetera.

PARTE 1: Estudio bibliométrico y Revisión bibliográfica

La bibliometría permite estudiar las actividades científicas, esta se deriva de la cienciometría la cual evalúa la producción científica enfocándose en el estudio de publicaciones científicas ¹². Para esto se aplican las matemáticas y estadística ya que se realizan cuantificaciones científicas para buscar y dar lugar a los más populares por país, por región, por autor, por temas de interés, entre otros criterios de búsqueda

La bibliometría puede también denominarse bibliografía estadística la cual está apoyada en el querer verificar los balances de las publicaciones a través de un recuento de análisis estadísticos de acuerdo con las publicaciones que ya existen, es un método que cuantifica diferentes contenidos tales como el perteneciente a contenido de libros, estudios cuantitativos de componentes físicos ya publicados, también de áreas bibliográficas o de sustitutos¹³.

Para realizar estudios bibliométricos es necesario la generación de bases de datos en formatos de archivos que sean compatibles con las diferentes herramientas existentes de análisis como el software estadístico R, VOWEL u otras plataformas. También es importante determinar criterios de Exclusión de acuerdo con los intereses del investigador¹⁴.

Los indicadores de trabajos bibliométricos más que importantes son fundamentales ya que ayudan a calcular con más facilidad el trabajo científico realizado ya sea trabajo de investigación, tesis, propuestas o en encontrar información sobre algún tema de la manera más sencilla posible, esta plataforma puede generar un mayor impacto y hacer el trabajo de búsqueda más asequible. En otras palabras los indicadores cuantitativos de la actividad científica, en la cual contiene una cantidad de publicaciones en lo cual permite imaginar el estado real de la ciencia, e indicadores de impacto que se establecen una cantidad de citas las cuales se logra la obtención los trabajos realizados, en lo cual caracterizan la importancia del documento de acuerdo al reconocimiento otorgado por otros investigadores; es decir estos indicadores valoran el impacto de autores, revistas o trabajos realizados, ya sea de investigación o de otro índole¹⁵. También, se calculan de referencias de acuerdo con el número de publicaciones, discriminados por tipo de documentos, países de origen, método o encuadre metodológico subyacente y técnicas o estrategias usadas.

En este documento se consultaron diferentes bases de datos para realizar la revisión bibliográfica como: PubMed, Scopus, ScienDirect, Scielo, Springer, redalyc.org, NCBÍ. De la misma manera se realizó una búsqueda en la web a través de Google académico.

Con el fin de realizar un acercamiento a la bibliometría se usó la información resultante de la base de datos Scopus usando como código de búsqueda (Coffe AND soil AND microorganism) AND (EXCLUYE (DOCTYPE, "cp") OR EXCLUYE (DOCTYPE, "cr) OR EXCLUYE (DOCTYPE, "sh")), los resultados obtenidos con ese código de búsqueda fueron descargado en un archivo .csv y para posteriormente proceder a realizar el análisis bibliométrico con el software estadístico R studio, apoyado por las librerías bibliometrix y biblioshiny. Este análisis generó una diversidad de representaciones gráficas a través de las cuales se espera lograr conocer la tendencia de las investigaciones vinculadas con el código de búsqueda utilizado. De estos resultados se seleccionarán las figuras que se consideren pueden acompañar de manera más idónea la revisión bibliográfica sistémica realizada.

PARTE 2: Determinación de microorganismos en suelos cafeteros.

Descripción del lugar de muestreo

Teniendo en cuenta la clasificación de vida según Holdridge, la zona de estudio se ubica a los 1.370 msnm en un bosque sub andino, húmedo premontano bajo. Con un alto porcentaje de materia orgánica por la formación de suelos de origen volcánico relacionados con el complejo volcánico del parque nacional Natural los nevados. En la primera parcela se encuentran cultivos de café especial de origen arábigo, especialmente de café geisha. Este lote solo se usa para este tipo de cultivos. En la parcela número 2 se encuentra cultivos de café en variedades de castillo-naranja y Borbón amarillo. Además, se encuentran especies de algo potencial de sombrío, como lo es la guayaba dulce, sapote (*Pouteria sapota*) y leguminosas como frijol. En la tercera parcela que resulta ser la más amplia del sistema finca, se tiene un manejo de cultivos mixtos entre las variedades castillo-naranja, Borbón amarillo y plátano. A este último se le aplican los métodos de conservación de frutos a través del embolsado. Cabe resaltar que en esta zona no existen especies de sombrío o que aporten a la cobertura del Sotobosque (Figura1).

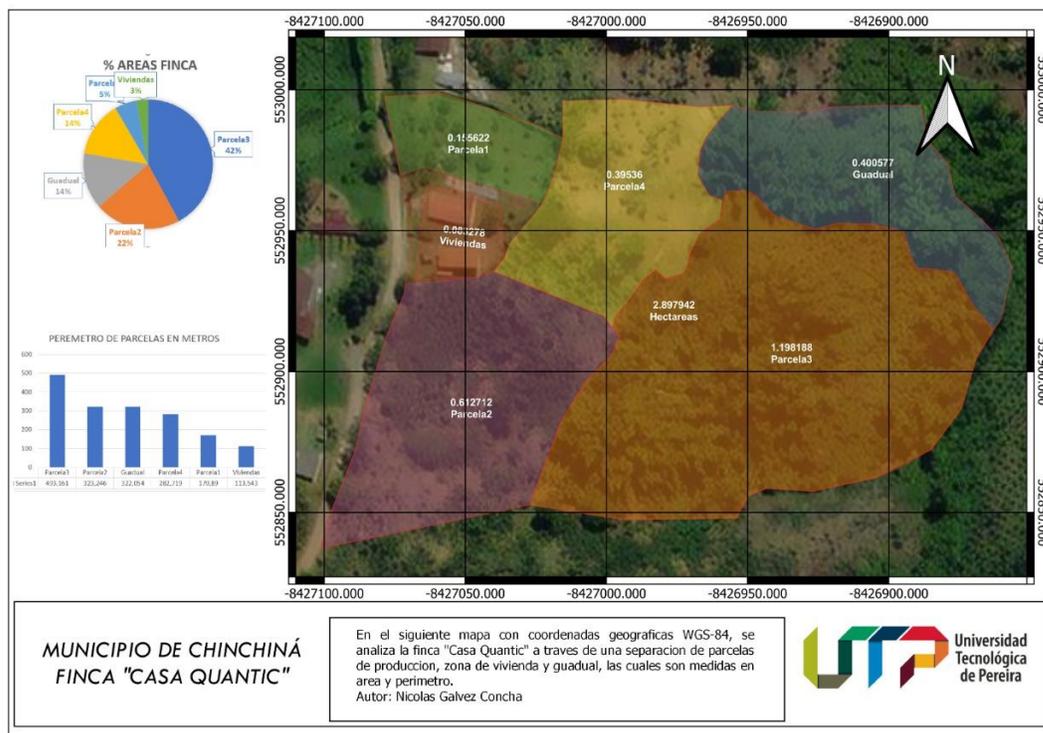


Imagen 1: Ubicación y descripción geográfica de la finca cafetera "Casa Quantic".

Descripción de las muestra

Para el trabajo realizado se consideraron dos lotes sembrados en café: producción (abono con aceite de nim y cascara de café) y crecimiento (micorrizas y base de cal). Por lo tanto, en el presente artículo se encuentra en los resultados marcadas como Producción (P) y Crecimiento (C).

Preparación de la muestra y medios de cultivo a utilizar

De cada una de las muestras se pesó 10g y se llevaron a un Erlenmeyer con 90ml de agua peptona donde se mezcló por 25sg (segundos), para tomar con una pipeta 1ml de esta preparación y pasar como preferencia a 9 tubos de ensayo realizando diluciones seriadas hasta 10^{-9} , para ser llevadas a las caja Petri con cada medio de los cuales se estarán especificando más adelante para que sirve cada uno de ellos y que es posible encontrar en cada uno.

Se realizaron medios de cultivos como lo fueron. Agar papa dextrosa (PDA), Agar Nutritivo, Agar Pikovskaya modificado, Agar SRM1 y se tomaron los volúmenes correspondientes para cada uno de ellos. A continuación, se describen los usos y preparaciones de cada medio de cultivo.

Agar de dextrosa y papa (PDA)

El extracto de papa contiene almidones y dextrosa son una parte fundamental para el crecimiento de hongos y levaduras, este contiene un pH (3,5) el cual es bajo por lo que este evita el crecimiento de las bacterias, este es muy utilizado para aislamiento de hongos y levaduras en productos lácteos, alimentos y bebidas en general ¹⁶. Para la preparación de este medio se usó 9.75g en 250ml.

Agar nutritivo

Este Agar usado normalmente en los laboratorios ya que cuenta con la capacidad de crecimiento de casi cualquier bacteria que se encuentre en la matriz que se esté tratando, este medio puede permanecer solido a temperaturas relativamente altas, el crecimiento bacteriano que ocurre en este medio seda en superficie y se pueden apreciar bien las colonias de crecimiento e incluso aun siendo muy pequeñas. Para la preparación de este medio se usaron 5g en 250ml ¹⁷.

Pikovskaya

El agar Pikovskayas es recomendado para el crecimiento de microorganismos del suelo solubilizadores de fosfato y solubilizadores de Potasio, el cual se usó para este último, al igual este medio se usó estandarizado por el laboratorio de la Universidad Libre Seccional Pereira (**tabla1**). En este medio crecen con facilidad crecimiento de algunos microorganismos como *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa* ¹⁸.

Tabla 1: Agar Pikovskaya Modificado para solubilizadores de potasio.

Componentes	Cantidad
Glucosa	10
Nitrato de potasio	5
Cloruro de Potasio	0.2
Sulfato de Amonio	0.5
Sulfato de Maganesio	0.1
Sulfato de Manganeso	0.1

Purpura de bormocresol	0.125
Agar Agar	15
Ajustar pH a 7	-
Agua destilada	1000ml

SRM¹ ROGOSA Y SHARPE para Solubilizadores de fósforo

Este medio está diseñado para la evaluación de microorganismos solubilizadores de fosfato o fósforo orgánico e inorgánico ¹⁹, observando la ficha técnica nos dice que es apto para detectar *Lactobacilos* por enriquecimiento selectivo, Sirve para alimentos bebidas alcohólicas y productos lácteos. Los microorganismos de suelos contienen compuestos orgánicos e inorgánicos los cuales favorecen la nutrición de las plantas se encuentran microorganismos tales como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Clostridium*, *Thiobacillus*, *Lactobacillus*, y *Rhizobium* ²⁰. Haciendo el énfasis en *Lactobacillus* el cual es uno de los promotores de fosforo y se encuentra en suelos. Este medio cuenta con una preparación especial al igual que el Pikovskaya puesto está compuesto de distintos reactivos y se usaron las medidas ya descritas por el laboratorio en este caso de la Universidad Libre de Colombia, el medio esta descrito para preparar 250ml (**tabla 2**).

Tabla 2: Reactivos utilizados para la preparación del Medio SRM1 para solubilizadores de fósforo.

Componentes	Cantidad en (gr)
Extracto de levadura	0,125
Glucosa	2,5
Agar Bacteriológico	9
Sulfato de Amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	0,125
Fosfato de Calcio (Ca ₃ P ₀₄)	1,25
Azul de Bromotimol	0,025
KCL	0,05
MgSO ₄	0,075
FeSO ₄	0,0004
NaCl	0,05
Agua destilada	250ml

Agua peptona

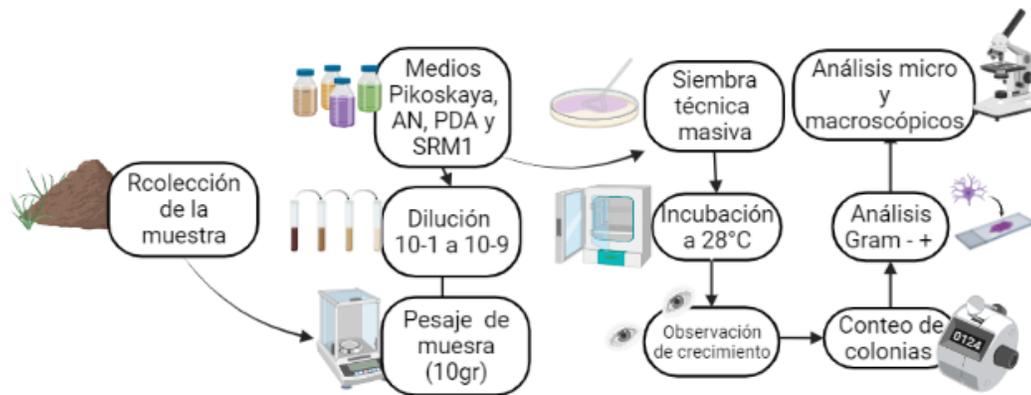
Se usó como diluyente, también se usa para el enriquecimiento no selectivo de microorganismos en muestras de comida y medioambientales, normalmente se pesa 25,5g para 1l de solución, para la preparación de este medio se tomó un peso de 6.65 gr para preparar 261 ml de Agua peptona, los cuales 81 mililitros fueron usados para 9 tubos de ensayo cada uno a un volumen de 9ml y 180 ml de los cuales 90ml fueron para la muestra 1 y los otros 90ml para la muestra 2, este último paso se realizó antes de hacer la respectivas diluciones. Esterilice en autoclave a 121°C por 15 minutos ²¹.

Cada uno de los medios anteriormente mencionados se esterilizado en autoclave a 121°C por 15 min.

Conteo de colonias

Este consistió en hacer diluciones seriadas 1:10 y extender 0.1 ml lo cual equivale a 100ul, en los medios de cultivo realizados de cada dilución en una placa; las placas se incubaron a 28°C por 6 días

en el cual ya se evidenciaba un notable crecimiento de colonias a las cuales se les realizó el recuento, para cada una de las muestras en diferentes medios de cultivo (**figura 2**).



Created in BioRender.com bio

Figura 2: Resumen del análisis de microorganismos del suelo y MPCV.

RESULTADOS

PARTE 1: Bibliometría y revisión bibliográfica

A continuación, será posible evidenciar los resultados obtenidos del análisis bibliométrico realizado obteniendo 104 artículos con las palabras clave “Coffee soil microorganism”. Para esta ocasión se usaron las figuras “country collaboration map”, el cual nos permitió apreciar los países (**figura 3**) que más publicaciones presentan en el área entre los que se encuentra Brasil y Colombia y “WordCloud” (**figura 4**) generadas a través de R. en el cual evidencia el interés de investigadores en temáticas relacionadas con MPCV en suelos cafeteros, resaltando palabras clave como *Pseudomonas*, actividad microbiana, control biológico, micorrizas, solubilizadores de fósforo, degradadores de celulosa entre otros, estas figuras representan una información clara y precisa en el caso de country collaboration map permite apreciar con claridad los países donde se realizó investigaciones frente al tema de microorganismo que se encuentran en suelos cafeteros entre los cuales se evidencia una notable investigación realizada por investigadores para su interés entre los países de Etiopía el cual se encuentra ubicado en África lo cual es muy relacionado y nombrado en artículos en investigaciones puesto el origen de café proviene de aquel lugar, el segundo país más mencionado en publicaciones y en investigaciones es Suecia el cual está ubicado en el área europea, dentro de los países que son señalados, se encuentra Colombia ubicada en América del Sur haciendo referencia a la realización de investigaciones asociadas con el tema de interés, al igual que Brasil.

La nube de palabras WordCloud, expresa las palabras que más son utilizadas como palabras clave o en búsquedas de este tipo de temas entre las cuales se encuentran las más pronunciadas que se

biológicas y químicas del suelo pueden involucrarse y afectar las raíces. Las bacterias en la rizosfera pueden ser simbióticas o no simbióticas, lo que está determinado por si su modo de acción es directamente beneficioso para la planta o no ²².

La rizosfera tiene tres componentes diferentes: la rizosfera (suelo), el rizoplano y la raíz. La rizosfera se considera la parte del suelo regulada por las raíces donde se da liberación de sustratos y afectando la actividad microbiana. El rizoplano es la superficie de la raíz unida con mucha fuerza a átomos o partículas del suelo y la raíz está colonizada por microorganismos ²². Las bacterias en la rizosfera pueden presentarse en cantidades de 10 a hasta 1000 veces mayor que en la tierra a granel, pero menor que en un medio de laboratorio. Para conservar los efectos beneficiosos en el entorno de la raíz, las bacterias se generan asociaciones microbianas rizosféricas que compiten por los nutrientes secretados por la raíz. Las interacciones entre la planta y la rizosfera son esenciales para obtener agua y nutrientes del suelo y las interacciones son beneficiosas para las plantas y los microorganismos del suelo ²².

El estudio de la diversidad microbiana ha estado avanzando por lo que el conocimiento de los compuestos orgánicos que se liberan a través de las raíces de las plantas llamadas *rizo deposiciones*, de acuerdo con su naturaleza y liberación han logrado clasificar de diferentes maneras:

- Exudados radicales: sustancias orgánicas con bajo peso molecular.
- Secreciones: alto peso molecular y liberadas de forma activa al medio con gasto de ATP
- Lisados: sustancias expulsadas por células posterior a su lisis.
- Gases: dióxido de carbono, ácido cianhídrico y etileno.
- Mucílagos: forman una capa alrededor de la raíz (cofia) la cual está formada por polisacáridos y gracias a la gran cantidad de agua acumulada es posible generar mucigeles²³.

Los exudados radicales son muy diversos encontrando azúcares sencillos, polisacáridos, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, esteroides, factores de crecimiento, enzimas, flavonoides, vitaminas, etc. ²³.

Una de las principales funciones de los exudados es proteger contra patógenos, con respaldo de algunos compuestos, como fitoalexinas. Algunos compuestos exudados por las plantas modifican el suelo rizosférico con sustancias fitoactivas (los denominados aleloquímicos) que impiden la germinación y proliferación de las semillas de otras plantas lo cual crea una protección a la planta o plántula de café siendo no invadida por otras semillas.

La modificación del suelo rizosférico debido a la presencia de micigeles facilita la retención de agua, y las relaciones simbióticas; se tiene reportes de compuestos en los exudados que provocan reacciones (quimiotaxis) reacciones de acercamiento en algunas bacterias, resaltando que el tipo de exudación es responsable del tipo de microorganismos que habitan en la rizosfera ^{23,24}.

Entre los MOS importantes usados como biofertilizantes, se encuentran las bacterias tales como los *Azotobacter*, *rhizobios* y *Azospirillum*, siendo estos hongos que a través de ellos se forman micorrizas arbusculares (HMA) y rizo-bacterias como *chroococcum* y *Bacillus*. Algunos investigadores encuentran como favorable la aplicación de *Azotobacter*, *Pseudomonas* y bacterias solubilizadores de fósforo o también llamada (Fosforina), ya que a través de estos estudios han encontrado que el café mejora crecimiento y desarrollo de la planta hasta del 33% tanto en suelos ferralítico rojo lixiviado típico montaña ²⁵, como suelos con baja fertilidad.

Los HMA y las bacterias promotores del crecimiento de plantas practican efectos nutricionales benéficos, producción y crecimiento de las semillas o granos de café. Se han presentados estudios anteriores donde se logró concluir que la presencia de nitrato inhibe la liberación de auxinas, por otro lado lo que ocasiona es un incremento de la producción de giberelinas^{25,26}.

Entre los MPCV o bacterias más frecuentes en la rizosfera de *Coffea* spp. se encuentran géneros como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Azotobacter*²⁷. Estos géneros intervienen en mecanismos de acción donde estos microorganismos pueden ocasionar el crecimiento frutífero de las plantas, estimulando la producción de auxinas citoquininas, ácido indol acético, que también se incorporan la solubilización de potasio, fosfato, fijación de nitrógeno atmosférico y la síntesis de compuestos que limitan el desarrollo de microorganismos fitopatógenos²⁶.

MICROORGANISMOS DEL SUELO

Las *Pseudomonas*, tienen dos características significativas como son su habilidad para establecerse con gran rapidez en la rizosfera y su capacidad competitiva frente a la flora nativa. Otros microorganismos aportan a mecanismos como síntesis de antibióticos y la producción de enzimas que degradan la pared celular de fitopatógenos. También produce fitohormonas como Auxinas que favorecen la división celular y dominancia apical e iniciación de la raíz. Además giberelinas, auxinas y citoquininas con acción positiva en los cultivos, siempre que se empleen de manera adecuada. Las anteriormente mencionadas estimulan la semillas para su germinación, el número de pelos radicales, el crecimiento inicial y también influye en la longitud de las raíces, por lo cual acelera la fructificación y floración de la planta¹¹ *Azospirillum* favorece el incremento la densidad, desarrollo radical y tamaño de los pelos radicales e influye en una mayor absorción de agua y nutrientes²⁸.

Las bacterias amonificadoras descomponen sustancias orgánicas nitrogenadas y poder ser transformadas en sales amoniacales o en amonio. También se encuentran bacterias nitrificadoras que oxidan el amoníaco hasta llevarlo a nitrato y fijadoras de nitrógeno, que suplen las necesidades de nitrógeno, fijando el que se encuentra en la y que es aprovechado también por las plantas asociadas.

Las Bacterias celulolíticas cumplen función de degradación de la celulosa, presentándose en buena cantidad en residuos vegetales; las bacterias pectinolíticas degradan la pectina y sus derivados. En cuanto uno de los géneros más conocidos es *Arthrobacter*, este microorganismo mencionado anteriormente, se puede utilizar como agente biotecnológico para promover el crecimiento de los cultivos de café, aportando al aumento de la biomasa vegetal, transformando compuestos que fortalecen las plántulas del café, de tal manera que se pueden obtener orgánicamente para no realizar mayor daño a las plántulas. Porque si se excede el uso de MOS puede perder sus beneficios y por lo contrario realiza un daño a la planta por el cual se ve afectado su consumo.

Rizobacterias

Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), en particular las que pertenecen al género *Azospirillum*, contribuyen al éxito de las simbiosis²⁹ Las plantas siempre han tenido una relación simbiótica con los microbios del suelo (bacterias y hongos) durante su crecimiento y desarrollo. Los microorganismos simbióticos del suelo de vida libre que habitan la rizosfera de muchas especies vegetales y tienen diversos efectos beneficiosos sobre la planta hospedante²².

Una manera de definir si una bacteria actúa de manera benéfica es evaluando su efecto sobre el crecimiento de las plantas. Las bacterias que pueden promover el crecimiento de las plantas son denominadas BPCV³⁰, el término incluye en este grupo aquellas que son de vida libre también denominadas RPCV o por sus siglas en inglés PGPR, haciendo referencia a rizobacterias, es decir, aquellas bacterias encontradas específicamente en la rizosfera, forman relaciones simbióticas con plantas como *Rhizobia* spp y algunos endófitos bacterianos capaces de colonizar los tejidos internos de las plantas³⁰.

MICORRIZAS

Hongos micorrízicos arbusculares (hongos AMF o AM), estos son clave para el desarrollo de las plantas y los nutrientes minerales que están en el suelo los cuales la planta puede absorber, son considerados fertilizantes naturales por lo cual aporta una mejor viabilidad al crecimiento de las plantas, recomienda la aplicación de este hongo inoculado a plantas ³¹ a lo cual se puede decir que es muy efectiva puesto se aprecian en arbusculares frutales o de hortalizas, AMF son capaces transportar el fósforo del suelo hacia las partes superiores de plantas ubicadas en tierras con déficit de este nutriente. Los AMF como biofertilizantes, podría tener un fin hacia una agricultura sostenible, es cada vez más necesario, ya que el manejo adecuado de estos hongos simbióticos podría latentemente disminuir el uso de agroquímicos. La principal estrategia adoptada para lograr este objetivo es la inoculación de propágulos de AMF (inóculo) en un suelo objetivo. Desafortunadamente, los HMA son simbioses obligados y no pueden cultivarse en cultivos puros, lejos de sus plantas hospedantes. Esta característica restrictiva hace que la producción a gran escala de inóculos de AMF sea muy desafiante y compleja. Hay tres tipos principales de inóculos de AMF. Primero, el suelo de la zona de la raíz de una planta que alberga AMF se puede utilizar como inóculo, ya que normalmente contiene fragmentos de raíces colonizadas, esporas de AMF e hifas. Sin embargo, a menos que haya información precisa sobre la abundancia, diversidad, y la infectividad están disponibles, los inóculos del suelo pueden no ser confiables y conllevan el posible riesgo de transferir semillas de malezas y patógenos ³².

ACTINOMICETOS

Los actinomicetos, hacen parte de un importante grupo de organismos procarióticos, que habitan en suelos de zonas cafeteras como en suelos de material orgánico como es el compostado ³³. En general, estos degradan o destruyen sustancias complejas, como lignocelulosa, quitina y peptidoglicanos, con lo cual contribuyen a la mineralización de compuestos mencionados del compostaje y suelo, como se menciona el género *Streptomyces*, ha sido descrito como fundador de la rizosfera, contando con la capacidad de ejercer biocontrol, sobre hongos fitopatógenos, promover la nodulación y ayudar a los bacteriodes de *Rhizobium*, a la asimilación del hierro, en leguminosas, en la fijación de nitrógeno, lo cual ayuda, indirectamente, a estimular el crecimiento vegetal de las plántulas de café otorgando un cultivo arbusto más sano, agradable y por lo tanto al aprovechamiento del grano de café. De acuerdo con los estudios realizados por ³³ nos dice que en una investigación, sobre poblaciones microbianas en el proceso de compostaje, de residuos orgánicos sólidos municipales, encontraron del grupo de actinomicetos, bacterias Gram-positivas, como: *Streptomyces*, *Actinomyces*, el género *Streptomyces*, fue el más frecuentemente encontrado, el anterior es una investigación realizada en compost para suelos cafeteros.

MECANISMO DE ACCIÓN

Los mecanismos de acción de las PGPR son variados y pueden ser clasificados de manera general, en extracelulares (ePGPR) o intracelulares (iPGPR); los primeros ocurren en el exterior de la rizosfera, en los espacios entre células del córtex de la raíz, y los segundos suceden al interior de la rizosfera. ³⁴ También pueden presentarse como directos e indirectos, siendo los directos los que se dan fuera de la planta y en ambos casos se afecta el metabolismo a través de la expresión genética ³⁰.

Mecanismos de acción directos

Fijación de Nitrógeno

El nitrógeno limita el impulso de crecimiento de plantas, de acuerdo con esto es posible decir que la fijación de nitrógeno biológica tiene una gran importancia ambiental ya que esta se encuentra

relacionada a la agricultura. Existen géneros de bacterias tales como *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*, estas son integrantes de la microbiota perteneciente al suelo la cual es autóctona, estas se logran observar en la raíz de la planta en forma de abultamiento en la raíz de algunas plantas, esta conserva una relación simbiótica la cual se lleva entre planta y bacteria logrando un total beneficio mutuo ³⁵.

La nitrogenasa bacteriana se nutre del poder reductor generado en el metabolismo, si bien requiere de energía suministrada por la molécula de ATP para el correcto funcionamiento ³⁶. El nitrógeno reducido se incorpora a los aminoácidos para dirigirse a las proteínas. Dos aminoácidos influyentes en el proceso son la glutamina y el glutamato, reconocidos por sus funciones en las reacciones bioquímicas como transportadores de nitrógeno ³⁷.

Solubilización de Fosfato

Después del nitrógeno, es el fósforo el mayor nutriente limitante en las plantas. Los fertilizantes con fosfatos contribuyen al desarrollo de las raíces, la floración y la fructificación ³⁸. Las plantas absorben el fósforo de dos formas iónicas solubles, la monobásica (H_2PO_4^-) y la di-básica (HPO_4^{2-}) ³⁹. Sin embargo las bacterias PGPR pueden solubilizar el fosfato dejándolo a disposición de la planta y con ventaja frente a todas aquellas que carecen de ayuda biológica capaz de solubilizar este elemento ⁴⁰.

Solubilización de Potasio

El potasio en el suelo puede liberarse a través de la erosión, lo que con lleva a una oxidación parcial de glucosa a ácidos orgánicos, mejorando la disolución a través de la conocida formación de complejos que reaccionan en la solución. Los productos relacionados a esta reacción incrementan una afinidad química de la reacción general de disolución de feldespato.

Una vez termina este proceso es liberado el potasio que puede ser asimilado por la planta ⁴¹. Los microorganismos más comunes capaces de solubilizar el potasio son *Bacillus*, *Pseudomonas (fluorescens)* y *Clostridium*, y algunos hongos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Mucor*. Al igual que los solubilizadores de fosforo, el potasio contribuye al crecimiento de las raíces, floración y nutrición de las plantas ³⁷.

Principales metodologías de identificación de MPCV

Se debe tener en cuenta al momento de tomar la muestra de suelo la profundidad, el tipo de textura, la accesibilidad que se tenga al punto donde se tomara la muestra, cantidad (máx. 1000 g). Los instrumentos para utilizar deben ser fáciles de limpiar de la misma manera estos deben estar totalmente estériles al momento de empezar a tomar las muestras, teniendo en cuenta que, si estos están contaminados o si el suelo al cual se tomara la muestra es totalmente orgánico, estos no deben tener ningún tipo de sustancias químicas. Para realizar la toma de la muestra también es muy importante tener en cuenta la documentación del lugar de muestreo como la ubicación del sitio, coordenadas, técnica utilizada, código para la muestra, humedad, textura y características organolépticas, entre otras ⁴³. Las muestras deberán ser conservadas a una temperatura de 4°C.

También se toma en cuenta las muestras superficiales compuestas la cual es muy utilizada para la evaluación de riesgos para la flora, fauna y la salud humana. En estos casos se recomienda un muestreo donde se tome submuestras (10 – 25 unidades) en un área y una capa determinada y unir las submuestras individuales en una muestra compuesta. La *tabla 2* muestra la profundidad a la cual se debe tomar las muestras según su suelo ⁴⁴.

Tabla 2. Profundidad del muestreo según el uso del suelo

SUELO	PROFUNDIDAD DE MUESTREO (CAPAS)
Suelo agrícola	0 – 30 cm (1) 30 -60 cm
Suelo Residencial/Parques	0 – 10 cm (2) 10 – 30 cm (3)
Suelo Comercial/Industrial/ Extractivo	0 – 10 cm

De acuerdo con el trabajo de Loredo⁴⁵, para el aislamiento de microorganismos se toman 10 g de la muestra de suelo en matraces con 90 ml de diluyente (solución salina 0.8%). De esa forma se consiguió la dilución 10-1, posteriormente los matraces fueron agitados vigorosamente en el Vortex. Luego, se tomó 1 mL de la dilución 10-1 y se añadió en tubos con 9 mL de diluyente, logrando una dilución de 10-2 la cual fue agitada. Finalmente, se repitió el último paso hasta obtener la dilución de acuerdo con la muestra y el macroorganismo a estudiar (**Tabla 3**). De manera complementaria se determina la húmeda ya que este llega a afectar el movimiento de las bacterias hacia la raíz, por ejemplo, el *Azospirillum* se mueve mejor hacia la raíz cuando el suelo está a 16% de humedad, en cambio cuando está en 10% de la misma este se mueve más lento ⁴⁵.

Tabla 3. Medios de cultivo y condiciones para el análisis de las poblaciones microbianas de la rizosfera del cultivo de café ⁴⁵.

Análisis	Diluciones	Medios de Cultivo	Temperatura y periodo de Incubación
Actinomicetos	-2,-3 y -4	Agar Almidón Caseína	28°C por 6 días
Aerobios Mesófilos	-4,-5 y -6	Agar plate Count	28°C por 48 horas
<i>Bacillus</i> con tratamiento térmico (80°C)	-3,-4 y -5	Agar TGE	28°C por 48 horas
Bacterias fijadoras de nitrógeno	-2,-3,-4,-5,-6 y -7	Caldo mineral son nitrógeno	28°C por 14 días
Mohos y Levaduras	-2,-3 y -4	OGY	22°C por 48 días
<i>Pseudomonas</i>	-2,-3,-4,-5,-6 y -7	Caldo Aparagina	28°C por 10 días

En otros estudios se ha enfatizado en la búsqueda de *Pseudomonas* por medio de caldo de cultivo como agar nutritivo, también se realizan pruebas bioquímicas conocidas como producción pioverdina, oxidasa, catalasa, urea, nitrato, citrato, arginina descarboxilasa y glucosa OF (La cual es usada para la determinación del metabolismo oxidativo-fermentativo de bacterias Gram negativas) ⁴⁶. De igual manera se han encontrado comúnmente *Bacillus ssp* ⁴⁵.

Los Actinomicetos también han sido identificados haciendo uso de coloración de Gram y posteriormente realizando observaciones de características macroscópicas, donde las colonias se aprecian secas, pulverulentas o desintegradas y con su olor característicos (olor a suelo por producción de geosminas) estas son purificadas, para después identificar sus hifas en forma de espiral y esporas ⁴⁷.

El medio PDA es muy utilizado en los laboratorios de identificación de microorganismos del suelo como lo son los hongos y levaduras ya que estos crecen fácilmente liberan esporas de las cuales se

pude tomar una alícuota en la cual se puede realizar una identificación morfológica e identificar que microorganismo es, teniendo en cuenta que este tipo de microorganismos comúnmente son encontrados en suelos ^{48, 49}.

Extracción ADN microbiano

Una vez obtenidas las muestras, haber preparado los medios, haber realizado la siembra y esperar los 8 días aproximadamente, se pasa a identificar la morfología de los posibles microorganismo que hayan crecido en los medios de cultivo ⁵⁰. La confirmación morfológica de las bacterias, se realiza la conocida tinción de Gram y para hongos se utiliza coloración con azul de lactofenol, para luego realizar identificación morfológica bajo el microscopio. Una vez que se confirman las morfologías de los MOS ⁵¹, se toma una alícuota y de esa manera se inocula en 200ml de caldo nutritivo, posteriormente se inocula a temperatura ambiente a 30°C durante 8 días, se transfieren 10mL de cultivo en caldo nutritivo a 12 tubos de Eppendorf, se centrifugó a 360rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se escogió el pellet (biomasa), con el propósito de disolverlo en 200mL de solución salina para obtener el inoculante final para cada tratamiento⁵².

La PCR en tiempo real (PCR-TR) muestra su utilidad al momento de identificar las secuencias de genes de los microorganismos ya que este método permite evaluar la carga fúngica y su respuesta al procedimiento. Por esta razón se debe lograr una correcta ampliación por PCR, por lo tanto, se debe asegurar una extracción y purificación correcta del ADN el cual proporcione unos resultados confiables y rápidos para su utilización en el diagnóstico y la caracterización ⁵³. Esta técnica consiste en identificar productos que se amplifican por medio de la PCR, con la molécula fluorescente, permitiendo cuantificar numerosas moléculas amplificadas dependiendo de la intensidad de la señal durante la electroforesis ⁵⁴. La electroforesis es usada en laboratorios para realizar la debida separación de ADN, el ARN, proteínas o moléculas dependiendo así de su tamaño y carga eléctrica que esta pueda tener. utilizando una corriente eléctrica para la movilización de moléculas y que se dé la separación de estas a través de un gel ⁵⁵.

El análisis bioinformático es una estrategia la cual va dirigida al diseño de sistemas eficientes de almacenamiento, donde se adquieren nuevos modelos donde se compara y analiza las distintas clases de datos biológicos, de una manera rápida y confiable, los resultados de este son analizados desde un punto de vista estadístico ⁵⁶.

Los pasos generales para la extracción de ADN del suelo se enumeran a continuación.

1. Recolectar la muestra en el área de muestreo
2. Realizar aislamiento de MOS
3. Realizar identificación de colonias en rizobacterias y hongos
4. Morfología celular microscópica de rizobacterias y hongos
5. Extracción de ADN por método BBU
6. Amplificación del gen por medio de PCR y electroforesis
7. Secuencia de los productos de la PCR
8. Análisis bioinformático y filogenia ^{57, 58}.

Se espera poder identificar distintos microorganismos beneficiosos de suelos cafeteros tales como los fijadores de Nitrógeno, Fosfatos, *Bacillus spp*, Actinomicetos, Mohos y Levaduras, identificar que se encuentre en la rizosfera que sea promotores de crecimiento de estas para llevar a cabo un mejor aprovechamiento del fruto, realizando comparaciones para determinar la carga microbiana a través de las pruebas anteriormente mencionadas y analizar suelos como, suelos natural, compost y suelos sin adición de microorganismo.

PARTE 2: Análisis de resultados microorganismos en suelos cafeteros.

Se observa en la **figura 5** a continuación el crecimiento que se dio en la muestra la cual se denominó producción y Crecimiento.

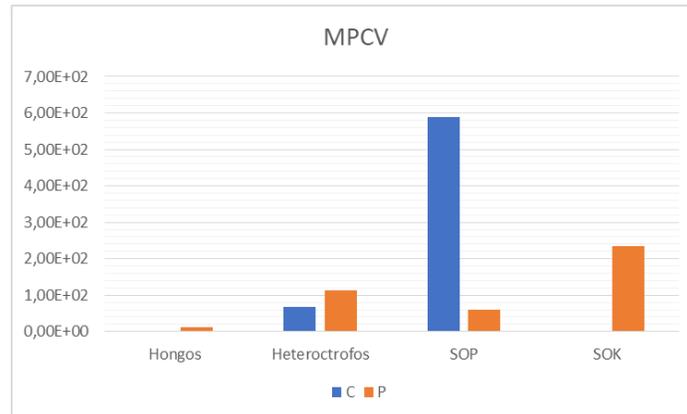


Figura 5: índice de crecimiento de bacterias, heterótrofos, solubilizadores de fósforo (SOP) y solubilizadores de potasio (SOK) de las muestras de suelo de crecimiento (C) y producción (P).

En la **figura 5** es una comparación entre las muestras C y P, donde en primera instancia se puede observar una diferencia en el crecimiento de hongos y levadura donde se observa que el mayor crecimiento ocurrió en P, heterótrofos mayor crecimiento en P, pero con poca diferencia de crecimiento en C, en solubilizadores de fósforo fue notoria el crecimiento de bacterias solubilizadores de fósforo en C que en P, y en solubilizadores de potasio se dio el mayor crecimiento de bacterias solubilizadores de potasio de la muestra P.

Mohos y levaduras

Como referencia cajas Petri con agar PDA, donde se encontró que la dilución 10^{-5} de la muestra denominada Producción y Crecimiento permitió observar diferencias macroscópicas de crecimiento (**figura 6**).

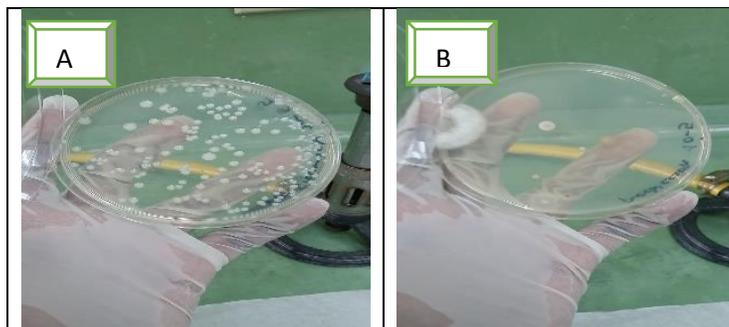


Figura 6: Crecimiento de UFC, en medio PDA dilución 10^{-5} .

(A) Denominada Crecimiento se evidencia una cantidad alta de crecimiento de colonias, a comparación de la muestra (B) denominada producción donde se evidencia un bajo crecimiento de colonias, en lo cual la muestra A tiene mayor número de concentración de microorganismos en la dilución de 10^{-5} a comparación de producción.

Heterótrofos

Se tomó como referencia cajas de Petri las (figura 7) cuales contienen agar Nutritivo, donde se evidenció la comparación de las diluciones 10^{-7} de las muestras, y sus comparaciones macroscópicas del crecimiento de ambas muestras ver figura 7.

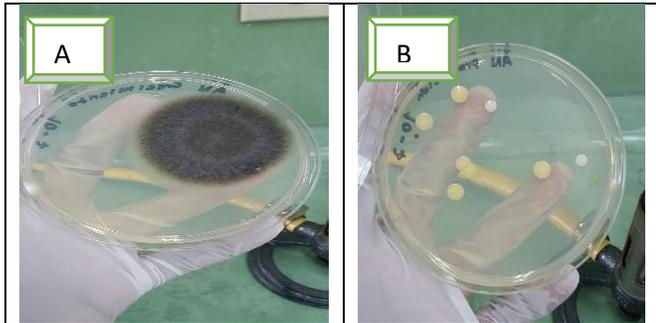
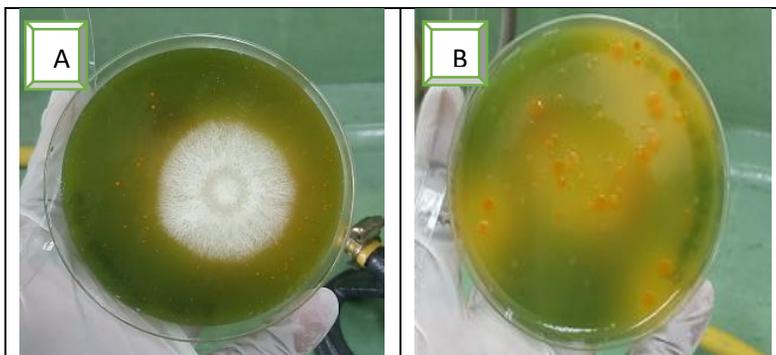


Figura 7: Crecimiento de UFC, en agar nutritivo diluciones 10^{-7} .

(A) Crecimiento y Producción (B), en la parte (A) el crecimiento de un hongo que de acuerdo con ⁵⁹ su colonia es redonda con un intenso color café oscuro, casi negro y con un borde tipo plomo o abanó, su textura tipo lana. Alrededor tenía lo que parecían ser anillos café oscuro, café, café oscuro y café claro, con rayas en todo su interior. Lo observado en la figura 7, permite concluir que posiblemente este hongo sea un *Alternaria sp.* (B) además se aprecia crecimiento de distintas bacterias de las cuales, las amarillas correspondieron a cocos Gram positivo, no se obtiene foto solo la anotación.

Solubilizadores de Fosfato

Se logró observar un notable crecimiento de colonias (figura 8) la cual incluye un hongo grande en el medio de cultivo solubilizadores de fosforo, de este hongo se pudo apreciar el halo amarillento que causa en el medio el cual nos indica un cambio de color a causa de solubilización de fosforo de este microorganismo del cual es posible corresponda a un *Streptomyces*, al igual en el mismo cuadro parte (B) se observó un crecimiento de bacterias solubilizadoras de Fosfato en la cual también se alcanza a observa el halo que ellas producen al contacto con este medio y su morfología, coco Gram negativa.



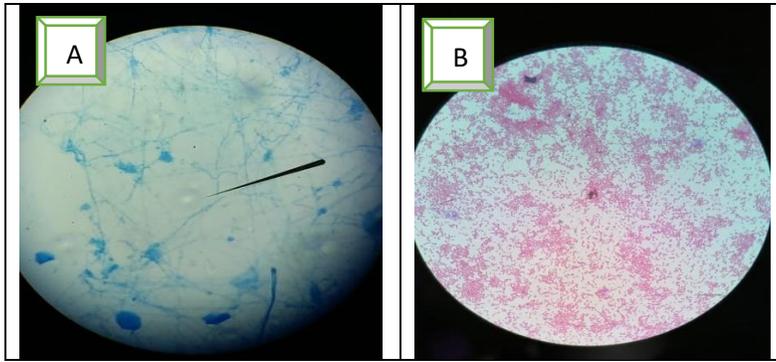


Figura 8: Crecimiento de UFC en agar SMR1. Suelo Producción diluciones 10^{-5} . Características macroscópicas y microscópicas de los aislamientos obtenidos.

(A) Macroscópicamente se identificó lo que posiblemente puede ser un *Streptomyces*, microscópicamente su morfología se observó lo que parecía ser micelios filamentosos a la vista delgados y contiene conidios muy delgados. (B) macroscópicamente se observó colonias, con pequeños halos amarillos lo cual indica que están solubilizando fósforo, microscópicamente se tomó una colonia para observar morfología a partir de tinción de Gram donde se determina que estas colonias corresponden a cocos Gram Negativo.

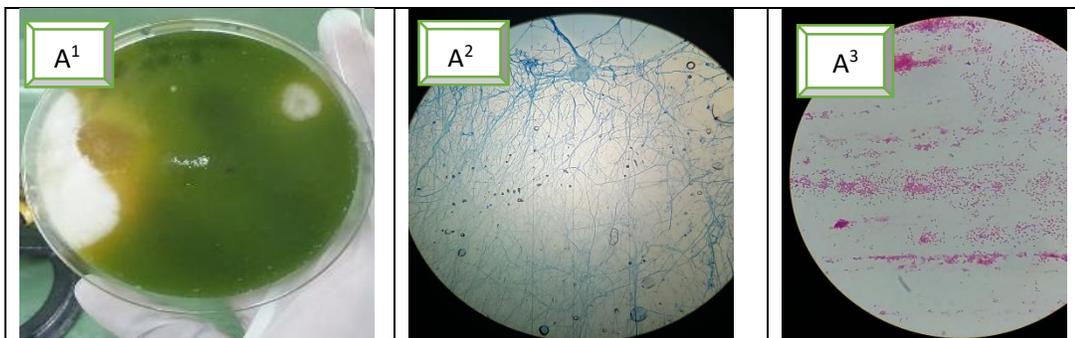
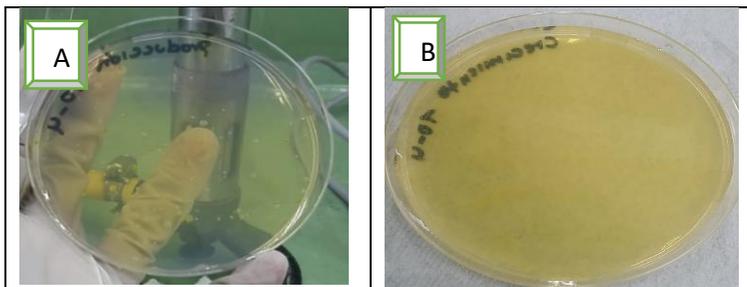


Figura 9: Crecimiento de UFC en agar MSR1 Muestra Crecimiento 10^{-5} .

En este medio se logró apreciar (figura 9) del crecimiento de lo que puede ser *Streptomyces*, sus filamentos delgados, se asemejan mucho a la morfología de este microorganismo, se realiza tinción de Gram para las bacterias encontradas en este medio la cual correspondió a coco Gram negativos. De acuerdo con otros estudios.

Medio Picovskaya



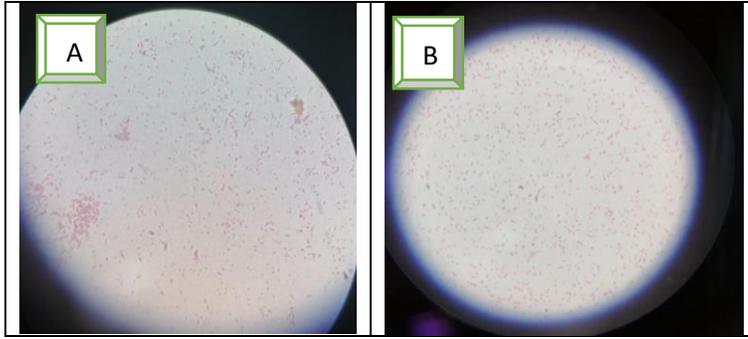


Figura 10: Crecimiento de UFC en agar Pikovskaya dilución 10^{-4} . Muestra crecimiento y producción.

Ambos medios de cultivo son Pikovskaya, con una dilución de 10^{-4} , se observó (figura 10) que A pertenece a producción donde se nota el cambio de color ya que alrededor aún se alcanzó a ver el color morado, color original del medio de cultivo, se logró una observación que contiene colonias solubilizadores de K, su morfología corresponde con cocos Gram negativos. En las figuras (B) se pudo observar que en la muestra C hubo un crecimiento total de las colonias en lo cual se hizo imposible el conteo de colonia por lo tanto se determinó que fue incontables, al identificar su morfología se encontraron cocobacilos Gram negativos. Como se pudo evidenciar un mayor crecimiento en la muestra B la cual corresponde a C y de la que en la muestra A correspondiente a P.

De los medios de cultivos mencionados anteriormente se debe tener en cuenta que todas las imágenes con la evidencia de crecimiento no están plasmadas en este trabajo que se realizó, solo se tuvieron algunas en cuenta las cuales contaban con una mejor ilustración de lo que se quería dar a conocer, se llevó a cabo una comparación con otros estudios realizados donde encontraron una alta cantidad de *Pseudomonas* la cual obtuvieron del suelo rizosfericas puesto estaba relacionada con su características fenotípicas, aun así su aislamiento se debió gracias a que se dio la formación de un color el cual era amarillo verdoso en el agar que estos utilizaron el cual fue agar King B y la obtención de bacilos Gram negativos. Sus colores pertenecen a sideróforos los cuales contienen bajo peso molecular, el cual actúa como un agentes quelantes de Fe, los cuales son importantes para la nutrición vegetal ²⁴ también realizaron aislamiento de *Azotobacter* cuyas colonias fueron seleccionadas por presentar un crecimiento gelatinoso y abundante, con aspecto de color amarillento y café y a la observación para identificación morfológica se detectó presencia de células Gram negativas con formación de quistes ⁶⁰.

El crecimiento gelatinoso de *Azotobacter* está asociado con su producción de exopolisacáridos (EPS), como el alginato el cual participa en el enquistamiento de las células como mecanismo de protección y de polihidroxibutirato (PHB) que es el principal material que constituye la reserva de carbono y energía de estas células bacterianas y está relacionado con la fijación biológica de nitrógeno, debido a que protege a la enzima nitrogenasa contra la alta concentración de oxígeno ⁶⁰ estos contaron con otros microorganismo beneficiosos que aportan nutrientes a plantas, a diferencia del trabajo realizado de este citado fue que estos trabajaron con plantas de arroz, en lo cual reportaron otras especies encontradas tales como *P. putida*, *Pseudomonas veronii*, *P. mandelii* y *P. montelii* como endófitas del arroz ⁶¹ y el de este trabajo es asociado a microorganismo encontrados en suelos de café.

De acuerdo con los resultado que se obtuvieron muchas bacterias Gram negativas en las distintas semanas de análisis y observaciones para las dos muestras de suelos analizada en cuanto a su solubilización de potasio (K) y fosforo (P) se crea la posibilidad que correspondan a *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.* y *Bacillus sp.* En lo cual con los estudios y resultados realizados por ⁶² Estos encontraron que *Bacillus* y *Pseudomonas*, fueron las bacterias solubilizadoras de fosforo más abundantes en la rizosfera de plantas de café que crecían en bosques naturales.

Conclusión

Se logró identificar una cantidad de bacterias, correspondientes a los medios tratados como PDA, Agar Nutritivo, Picovskaya y Agar Smr1, donde se pudo evidenciar crecimiento de un Gram número de bacterias, en su mayoría Gram negativas, al igual se pudo realizar recuento de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF), se realizó por conteo de las colonias que tuvieron la capacidad de formaron halo de solubilización en el medio SMR1, PVK modificado, las colonias se determinaron como; las unidades formadoras de colonia/g suelo (UFC/g de suelo). Este análisis se realizó con el fin de determinar la solubilización de fosfatos, potasio, crecimiento de hongos y levaduras y heterótrofos lo cual se logró, identificando que el suelo a tratar tiene un gran potencial para brindar un crecimiento óptimo y estable de los arbusto de café puesto tiene excelentes concentraciones de microorganismos beneficiosos para nutrir las parcelas que contienen las características de este suelo. Teniendo en cuenta la comparación de las dos muestras C y P, se puede decir que ambos suelos cuentan una comunidad microbiana favorable puesto se puede ver reflejado en la gráfica de índice de crecimiento de estas bacterias, pero aun así quien muestra un mejor acompañamiento de estas bacteria beneficiosa es la muestra denominada como P.

Bibliografía

1. Organización Internacional del Café. *Organización Internacional Del Café*. http://www.ico.org/ES/coffee_storyc.asp
2. InfoAgro. EL CULTIVO DEL CAFÉ. Published online 2020. <https://infoagro.com/herbaceos/industriales/cafe.htm>
3. CAFETEROS FN DE. 01. Historia del café.pdf. In: *MANUAL DEL CAFETERO COLOMBIANO*. EDITORIAL. ; 1958:19. [https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/831/1/01.Historia del café.pdf](https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/831/1/01.Historia%20del%20café.pdf)
4. Carrieri MP, Protopopescu C, Marcellin F, et al. Protective effect of coffee consumption on all-cause mortality of French HIV-HCV co-infected patients. *J Hepatol*. 2017;67(6):1157-1167. doi:10.1016/j.jhep.2017.08.005
5. Figueroa E, Pérez F, Godínez L. *La Producción y El Consumo Del Café*. Lara-Ramo., (IGLESIAS-SUAREZ FB, SOTO-LUNA, Vladimir M, ESCAMILLA-BOUCHAN, Imelda M, eds.); 2012. www.ecorfan.org/spain
6. Bancolombia G. Guia completa: Como cultivar cafe. Published online 2018. <https://www.grupobancolombia.com/wps/portal/negocios/actualizate/sostenibilidad/guia-cultivo-cafe-colombia#:~:text=De acuerdo con el agrónomo,sobre el nivel del mar>
7. Echeverri D, Buitrago L, Montes F, Mejía I, González M del P. Café para cardiólogos. *Rev Colomb Cardiol*. 2005;11(8):357-365. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcca/v11n8/v11n8a1.pdf>
8. Ferrera R, Alarcón A. The Microbial Activity in the Agroecosystem. *Cienc Ergo Sum*. 2001;8(2):175-183. doi:104/10402108.pdf
9. Salamone IG De, Baca BE, Azcón R. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revisión*. 2010;11:155-164.
10. Mario DH. Los microorganismos del suelo en la nutrición vegetal. ORIUS BIOTECH. Published 2019. [https://www.oriusbiotech.com/escrito?nom=Los_microorganismos_del_suelo_en_la_nutrición_vegetal.#:~:text=LAS BACTERIAS DEL SUELO,o pH neutro \(neutrófilas\)](https://www.oriusbiotech.com/escrito?nom=Los_microorganismos_del_suelo_en_la_nutrición_vegetal.#:~:text=LAS BACTERIAS DEL SUELO,o pH neutro (neutrófilas))

11. Olga A, Hernández Y, García OA. Utilización de algunos microorganismos del suelo en cultivos de interés para la ganadería. *Rev Cuba Cienc Agrícola*. 2001;35(2):85-97. doi:193018220001
12. Romaní Franco, Huamaní Charles G-AG. Estudios Bibliométricos Como Línea De Investigación En Las Ciencias Biomédicas: Una Aproximación Para El Pregrado. *Cienc e Investig Médica Estud Latinoam*. 2011;16(1):52-62. doi:71723602008
13. López ES, Quintero SJC, Fernández H, et al. La bibliometría: una herramienta eficaz para evaluar la actividad científica postgraduada. *Scielo*. 2009;7(4):59-62. <http://scielo.sld.cu/pdf/ms/v7n4/v7n4a745.pdf>
14. Angarita Becerra L. Estudio bibliométrico sobre uso de métodos y técnicas cualitativas en investigación publicada en bases de datos de uso común entre el 2011-2013. *Rev Iberoam Psicol Cienc y Tecnol*. 2014;7(2):67-76. https://www.ucc.edu.co/bogota/sede/Documents/angarita_2014_investigacion_cualitativa.pdf
15. Escorcía TA. El análisis bibliométrico como herramienta para el seguimiento de publicaciones científicas, tesis y trabajos de grado [tesis]. Pontificia Universidad Javeriana. *Director. Published online* 2008. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8212/tesis209.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
16. Malpartida-zevallos J. Nota técnica: Evaluación de medios de cultivo en la producción de conidias y crecimiento diametral de cuatro cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch. :145-147. <https://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/entomologia/v45/pdf/a25v45.pdf>
17. Chemical M. *Ficha de Datos de Seguridad AGAR NUTRITIVO*.; 2013.
18. Agar I, Calcium D. Pikovskaya ' s Agar TM 543 Composition Instructions for Use. Published 2014. https://hoachattitan.vn/images/2020/tm_543_pikovskayas-agar_1.pdf
19. Karnataka LIN. Phosphate solubilizers from the rhizosphere of. *CHILEANJAR*. 2012;72(September). *Aspergillus, Bacillus, phosphate solubilising microbes, 16s rDNA analysis*.
20. Control Q. *Pikovskayas Agar*. <https://himedialabs.com/TD/M520.pdf>
21. Bpw FT. *Agua Peptonada Tamponada ISO Medios de Cultivo*. <https://multimedia.3m.com/mws/media/15337950/agua-peptonada-tamponada-iso-medios-de-cultivo.pdf>
22. Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol Res*. 2018;206(July 2017):131-140. doi:10.1016/j.micres.2017.08.016
23. Instituci PL. La rizosfera: un "criptoecosistema" vital. Aspectos básicos y aplicados. *Conama, Congr Nac Del Medio Ambient*. Published online 2012:1-17. <http://www.conama2012.conama.org/conama10/download/files/conama11/CT2010/1896700116.pdf>
24. Aguado-Santacruz GA, Moreno-Gómez B, Jiménez-Francisco B, García-Moya E, Preciado-Ortiz RE. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: Una síntesis. *Rev Fitotec Mex*. 2012;35(1):9-21. doi:10.35196/rfm.2012.1.9
25. Anaya A, Lourdes M De, Gálvez J, et al. Biofertilización De Café Orgánico En Etapa De Vivero. *Rev Mex Ciencias Agrícolas*. 2011;2:3. doi:263119714009
26. Angulo VC, Sanfuentes EA, Rodríguez F, Sossa KE. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Rev Argentina Micrología*. 2014;46(4):338-347. doi:10.1016/S0325-7541(14)70093-8
27. Arjun Dev Jnawali 1, Roshan Babu Ojha 2, Marahatta1 S. Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability – a review. *medcrave*. 2015;2(6):250-253. doi:10.15406/apar.2015.02.00069

28. Cuevas YP y F. Revisión bibliográfica POTENCIALIDADES DE Azospirillum COMO INOCULANTE. *redalyc.org*. Published online 2002. <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193218120004.pdf>
29. Puente ML, Zawoznik M, de Sabando ML, et al. Improvement of soybean grain nutritional quality under foliar inoculation with Azospirillum brasilense strain Az39. *Symbiosis*. 2019;77(1):41-47. doi:10.1007/s13199-018-0568-x
30. De Sevilla U, Benjumea Muñoz D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones. Published online 2017. [https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/65140/BENJUMEA MU%DIOZ, DANIEL.pdf;jsessionid=128B858A5A46F6A74FB6EC5A99E66B0C?sequence=1&isAlloved=y](https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/65140/BENJUMEA_MU%20DIOZ,%20DANIEL.pdf;jsessionid=128B858A5A46F6A74FB6EC5A99E66B0C?sequence=1&isAlloved=y)
31. Hernández-Acosta E, Trejo-Aguilar D, Rivera-Fernández A, Ferrera-Cerrato R. Arbuscular mycorrhiza as a biofertilizer in production of coffee. *Terra Latinoam*. 2020;38(3):613-628. doi:10.28940/terra.v38i3.659
32. Berruti A, Lumini E, Balestrini R, Bianciotto V. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: Let's benefit from past successes. *Front Microbiol*. 2016;6(JAN):1-13. doi:10.3389/fmicb.2015.01559
33. Escobar Escobar N, Mora Delgado J, Romero Jola N. Identificación De Poblaciones Microbianas En Compost De Residuos Orgánicos De Fincas Cafeteras De Cundinamarca. *Boletín Científico Cent Museos Mus Hist Nat*. 2012;16(1):75-88. <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v16n1/v16n1a06.pdf>
34. Zandi P, Basu SK. Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as BioFertilizers in Stabilizing Agricultural Ecosystems. © *Springer*. 2016;3:71-87. doi:10.1007/978-3-319-26803-3_3
35. López Pérez JP, Boronat Gil R. Aspectos básicos de la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de bacterias. Estudio en el laboratorio de educación secundaria. *Rev eureka sobre enseñanza y Divulg las ciencias*. 2016;13(1):203-209. doi:10.25267/rev_eureka_ensen_divulg_cienc.2016.v13.i1.15
36. Fernández-Pascual, M., María, N. MR de F. Fijación biológica del nitrógeno: factores limitantes. In: *Ciencia y Medio Ambiente - Segundas Jornadas Científicas Sobre Medio Ambiente Del CCMA-CSIC*. ; 2002:195-202. [https://digital.csic.es/bitstream/10261/128283/1/Fijación Biológica391%28MC F Pascual%29.pdf](https://digital.csic.es/bitstream/10261/128283/1/Fijación%20Biológica391%28MC%20F%20Pascual%29.pdf)
37. Nelson D, Lehninger ACM. Lehninger : principios de bioquímica. *J Shoulder Elb Surg*. 2014;6(6):1328 páginas.
38. Rojo Jiménez E, Pérez-Urria Carril E. Café I (G. Coffea). *REDUCA Biol*. 2014;7(2):113-132. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/27835/1/1757-2066-1-PB.pdf>
39. Dutta S, Podile AR. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): The bugs to debug the root zone. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36(3):232-244. doi:10.3109/10408411003766806
40. Oteino N, Lally RD, Kiwanuka S, et al. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic Pseudomonas isolates. *Front Microbiol*. 2015;6(JUL):1-9. doi:10.3389/fmicb.2015.00745
41. Evelyn vascos C. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO. Published online 2013.
42. Restrepo-correa SP, Pineda-meneses EC, Ríos-osorio LA. Mecanismos de acción de hongos y bacterias empleados como biofertilizantes en suelos agrícolas: una revisión sistemática. 2017;18(2):335-351. <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v18n2/0122-8706-ccta-18-02-00335.pdf>
43. Mendoza R, Espinoza A. Guía Técnica para muestreo de suelos. *Univ Nac Agrar*. Published online 2017:1-56. <https://core.ac.uk/download/pdf/151729876.pdf%0Ahttp://repositorio.una.edu.ni/3613/1/P33>

- M539.pdf
44. MINAM. O. MINISTERIO DEL AMBIENTE. Guía para el muestreo de suelos. *Minam*. Published online 2014:72. <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2018/07/GUIA-PARA-EL-MUESTREO-DE-SUELO.pdf>
 45. Loredó OC, López RL, Espinosa VD. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. *Plant Growth-Promoting Bacteria in Association with Gramineous Species: A Review. TERRA Latinoam*. 2004;22(2):225-239. doi:57322211
 46. Abierto T. Medio OF con Glucosa. Published online 1959:3. https://www.insumolab.cl/descargas/area_clinica/tubos/12x100/ficha_tecnica/17.pdf
 47. Suckling DM, Baker G, Salehi L, et al. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL EN CULTIVOS DE UCHUVA (*Physalis peruviana* L.) CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA FRENTE A *Fusarium* sp. *J Agric Food Chem*. 2009;54(1). <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-016-3076-8><http://dx.doi.org/10.1080/02772248.2015.1031668><http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.073><http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.027><http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.022>
 48. Uso R. Agar Papa Dextrosa. https://www.insumolab.cl/descargas/industria/placas_90mm/ficha_tecnica/02.pdf
 49. Min T. Agar Dextrosa y Patata EP / USP / BAM El Agar Dextrosa y Patata está recomendado por APHA y FDA para cultivar levaduras y mohos . También se puede usar en la identificación de hongos y Test microbiológico. Published online 2019:7-8. file:///C:/Users/Lina/Downloads/1022_es_2.pdf
 50. Enrique J, Rodríguez-vázquez R, Enrique J, Luis R. Bacterias y hongos hidrocarbonoclastas de rizósfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo. *Terra Latinoam*. 2003;21(4):493-502. <https://www.redalyc.org/pdf/573/57321405.pdf>
 51. Amils R. Protoplast. In: *Encyclopedia of Astrobiology*. ; 2011:1377-1377. doi:10.1007/978-3-642-11274-4_1302
 52. González F. H, Fuentes M. N. Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Rev Ciencias Agrícolas*. 2017;34(1):17. doi:10.22267/rcia.173401.60
 53. Monroy-Vaca EX, Fernández-Andreu CM, Díaz-Rodríguez R, Martínez-Machín G, Illnait-Zaragozí MÍT, Perurena-Lancha M. Evaluación de cuatro métodos de extracción del ADN de *histoplasma capsulatum* y su uso en reacciones de PCR. *Vaccimonitor*. 2014;23(2):49-56. <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v23n2/vac03214.pdf>
 54. Azofeifa J, Sancho-Fernández V. Estimación de dosis génica mediante PCR-múltiple y electroforesis capilar fluorescente en posibles portadoras de delecciones en el gen de la distrofina, Costa Rica 1998- 2000. *Acta Pediátrica Costarric*. 2001;15(2):64-77. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00902001000200005
 55. Ruiz Moleón V, Garrote Santana H, Díaz Alonso C, Fernández Martínez L, Amor Vigil AM. Electroforesis capilar para el análisis de marcadores oncohematológicos en el Instituto de Hematología e Inmunología. *Rev Cuba hematol inmunol hemoter*. 2017;33(3):114-116. http://scielo.sld.cu/pdf/hih/v33n3/hih_a15.pdf
 56. Barreto Hernández E. Bioinformática: una oportunidad y un desafío Bioinformatics presents both an opportunity and a challenge. *Rev Colomb Biotecnol*. 2008;X(1):132-138. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2731617>
 57. *Biodiversidad de Microorganismos Promotores Del Crecimiento Vegetal En La Rizosfera Del Árbol Sagrado En Chinampas de Xochimilco*.; 2018. https://www.biodiversidad.gob.mx/media/1/ciencia-ciudadana/biocodigos/pdf/07_Rizosfera_Salix_Xochimilco.pdf
 58. de Vizcarrondo M, Gutiérrez de Gamboa S. Identificación microbiana. *Identificación Microbiana*. http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_12_ide

- ntificación.pdf. Published 2002.
59. Municipaly C, Fernando P, Gregorio LM, et al. Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K ' iphak ' iphani , Comunidad Choquenaira-Viacha Filamentous soil fungi communities on K ' iphak ' iphani agroecosistemas , Resumen Introducción El suelo es un ambiente complejo que ofrece un. Published online 2017:2-25. http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v8n1/v8n1_a02.pdf
 60. Rhizobacteria COF. Aislamiento y caracterización de rizobacterias asociadas a cultivos de arroz (. Published online 2017:373-391. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n4/1405-3195-agro-51-04-00373-en.pdf>
 61. de Souza R, Meyer J, Schoenfeld R, da Costa PB, Passaglia LMP. Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with rice cropped in iron-stressed soils. *Ann Microbiol.* 2015;65(2):951-964. doi:10.1007/s13213-014-0939-3
 62. Eleonora M, Pineda B. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal Phosphate solubilization as a microbial strategy for promoting plant growth. *CORPOICA.* Published online 2014. <https://www.redalyc.org/pdf/4499/449944863010.pdf>