

**Aislamiento e identificación de *Streptomyces spp* presentes de suelos
cafeteros**

Leonardo Ramírez Villa

ASESOR

Liliana Bueno López

Co-asesor

Lina María Londoño Giraldo

**Universidad Libre Seccional Pereira
Facultad de Ciencias de la salud, exactas y naturales
Programa de Microbiología**

2022

Problema y pregunta de investigación

La producción de café es un factor determinante en la economía del país, según análisis del DANE (Departamento administrativo nacional de estadística) los ingresos generados en distinción del sector agropecuario, genera el 29 % de la totalidad; por ende, la priorización de la producción de café es vital como objetivo de desarrollo en el país, desarrollándose alternativas productivas en campos de café confiriéndoles a las plantas resistencia a factores bióticos y abióticos, la aplicación de bioproductos y biorremediación a suelo cafetero (1); La biorremediación toma gran importancia ya que cada vez más se ve la implementación de productos químicos como fertilizantes sintéticos y demás compuestos de origen antrópico expuesto en el sector agrícola generando diferentes problemas tanto de salud pública como deficiencia en la calidad del suelo para tratar los cultivos de café, al igual que la aparición de plagas resistentes por el uso extensivo de estos (2,3).

La actividad de promoción de crecimiento vegetal de algunos microorganismos presentes en la rizosfera del suelo en general, en especial los *Streptomyces* (4), representa en la actualidad una alternativa sostenible para reducir la contaminación establecida por años de exposición a químicos y método para impulsar el sector agrícola en el país al proveer características como estimular la germinación de las semillas, promover el enraizamiento e incrementar el suministro y disponibilidad de nutrientes, mejorar la estructura del suelo y proteger a las plantas frente a estrés bióticos y abióticos.(5). En la actualidad son pocos los estudios reseñados, donde se estudie la presencia de los *Streptomyces* y su papel de promoción de crecimiento vegetal en suelos cafeteros, razón por la cual desde, la Universidad Libre Seccional Pereira, facultad de Ciencias de la Salud, Exactas y Naturales a través del programa de Microbiología, desde el Proyecto de investigación: “Respuesta de indicadores de calidad y manejo sostenible del suelo” se planteó este estudio para dar respuesta a la pregunta de investigación: ¿Es posible identificar y aislar microorganismos del género *Streptomyces* en suelos cafeteros y estudiar su posible actividad de promoción de crecimiento vegetal? Con el fin de optar para el título de microbiólogo este estudio se tituló “Aislamiento de *Streptomyces* spp presentes de suelos cafeteros”

Justificación

Con la creciente economía y habitantes del planeta, aumenta la demanda de materias primas de origen vegetal, esto último exige a los caficultores estar a la par con avances tecnológicos y metodológicos lo que conlleva a un aumento en costos económicos y ambientales(6). Por lo cual hay alternativas que mantienen y mejoran la salud o calidad del suelo, lo que podría llegar a generar efectos positivos en las propiedades organolépticas y de calidad del grano de café. Una de las tantas alternativas productivas que existen se enfocan en la propiedad microbiológica el cual está directamente relacionado con los suelos y sus cultivos, en este caso el café (7).

La familia *Streptomycetaceae* que incluye el importante genero *Streptomyces* se encuentran de manera general en diferentes ecosistemas del planeta, tanto en áreas rocosas como en suelos agrarios, sedimentos marinos, compostaje, entre otros. Están involucrados en procesos de descomposición y mineralización de compuestos orgánicos. Son poco tolerables a la acidez, crecen en temperaturas promedio de 25°-30 °C (8).

Es importante la investigación en identificar microorganismos del género *Streptomyces* en suelos para futuros ensayos microbiológicos y/o biotecnológicos, debido a su importancia ecológica y medioambiental (9) Puesto que diferentes especies del género *Streptomyces* se presentan como promotores de crecimiento vegetal, ya que poseen la capacidad de producir compuestos como auxinas y giberelinas que brindan protección a la planta al solubilizar la pared de hongos o bacterias fitopatógenas (2,10,11). Algunos estudios han entregado resultados positivos en cuanto a la inoculación de plantas con *Streptomyces* en cultivos expuestos a pesticidas reduciendo los efectos tóxicos de estos. También se han observado algunos solubilizadores de fósforo, presentándose como parte de la solución al problema de la poca solubilidad de este elemento en suelos ácidos, derivados de cenizas volcánicas de tal manera que los *Streptomyces* resuelven dicho problema al solubilizarlo por procesos bioquímicos como la producción de ácidos orgánicos, fosfatasa y quelación (8).

La caracterización morfológica y bioquímica de *Streptomyces* spp en diferentes suelos han sido la base de estudio para diversos proyectos de investigación. Sin embargo, si se desea impulsar el potencial biotecnológico de microorganismos promotores de crecimiento vegetal se debe identificar primero los consorcios microbianos de interés, delimitando así el estudio o la población a evaluar, en este caso actinomicetos del género *Streptomyces* y es por eso que, el identificar estos microorganismos en suelos cafeteros se considera de importancia a la hora de reconocer características del entorno que pueden llegar a favorecer la producción de cafés especiales que son tan deseados en el mercado.

Objetivos

Objetivo General

Identificar y aislar microorganismos del género *Streptomyces* presentes en suelos cafeteros mediante aislamiento en medio selectivo.

Objetivos específicos

- Implementar un protocolo para la obtención de aislamientos de *Streptomyces* a partir de muestras de suelo en medio selectivo.
- Evaluar macroscópica y microscópicamente los aislamientos obtenidos de las muestras de suelo.
- Caracterizar mediante pruebas bioquímicas los aislamientos de *Streptomyces* spp.

Marco de referencia

Suelos cafeteros

La producción de café en Colombia se enfoca actualmente en mejorar el valor económico a la cadena productiva, con el fin de garantizar el uso eficiente de los recursos naturales y la sostenibilidad, en ese sentido se ha impulsado la búsqueda de alternativas que mejoren la productividad y permita una buena rentabilidad para la caficultura, ya que hace parte de la economía colombiana, por eso es importante la evaluación de sus suelos teniendo en cuenta sus características fisicoquímicas y biológicas(12). De acuerdo con su material de origen, en su mayoría el 41% son provenientes de cenizas volcánicas. El resto es de origen ígneo 26.6%, sedimentario 19,7% y metamórfico 12,8%. Todas las características que le dan su forma estructural, física, química, biológica y microbiológica cumplen un papel fundamental a la hora de evaluar la calidad del suelo (13,14).

Las propiedades de los suelos cafeteros pueden variar según la zona en la que estén los cultivos de café, pues el suelo es determinado según el tipo de roca en la cual se originó, las características de la zona como la altitud, la humedad, clima y la composición entre el limo, arcilla y arena, materia orgánica (15). Se toma como referencia la “Taxonomía de suelos y sus consideraciones para la zona cafetera de Colombia” de Lince & Sadeghian, 2021 (16) Mencionan que los suelos cafeteros del departamento de Caldas cuentan con suelos de tipo espodosol, andisol, entisol y oxisol. El tipo de suelo cafetero el cual se tomaron las muestras de suelo es de tipo andisol, contiene una concentración de materia orgánica (MO) < 43,1% (Se debe tener en cuenta que, en la zona cafetera, el contenido de MO de los suelos cafeteros no supera el 30%), este tipo de suelo cuenta con una alta retención de fósforo, gran capacidad de almacenamiento de agua, alta capacidad de intercambio catiónico, densidad aparente $\leq 0,90 \text{ g cm}^3$, suelo con presencia de arcillas alófanicas, propias de las cenizas volcánicas(16). Con respecto a las características microbiológicas, actualmente no hay una descripción o estudio que caracterice a los microorganismos de suelos cafeteros, sin embargo, se toma de forma general la caracterización de los microorganismos presentes en los suelos, en un gramo de suelo se puede estimar que hay 10^4 especies distintas de microorganismos (17). Los géneros bacterianos más importantes agrícolamente son los siguientes: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Lactobacillus*, *nitrosomonas*, *Clostridium*, *Rhizobium* (13)

Microorganismos del suelo

Los microorganismos juegan un papel fundamental en la salud del suelo, entre estos se encuentran bacterias y hongos principalmente, en segunda instancia se encuentran los protozoarios y virus que pueden ejercer control sobre los principales. Las bacterias y hongos intervienen directamente con la descomposición de los residuos vegetales y los ciclos biogeoquímicos (14) y se consideran junto con los actinomicetos como los responsables de la mineralización directa o indirecta que permite la asimilación de los nutrientes por parte de las plantas, en un gramo de tierra fértil se encuentra entre 100 millones a 1 billón de bacterias (18).

Microorganismos promotores de crecimiento vegetal (MPCV)

Son microorganismos que interactúan directamente con las raíces de la planta, pues se encuentran en la rizosfera, nicho de estrecha relación microorganismo-planta generando una simbiosis la cual se ve beneficiada la planta, bacteria y hongo. (19). En el microbioma de la rizosfera, estos microorganismos pueden aumentar la productividad de las plantas y su crecimiento. Estos microorganismos pueden ayudar a suprimir la actividad antagónica de los fitopatógenos, funcionando como biocontroladores. Otra característica clave es el desarrollo de mecanismos que tienen que ver con su metabolismo, solubilizando nutrientes haciéndolos disponibles y suministrándolos a la vez a las plantas, productores de fitohormonas como el ácido giberélico, auxinas y ácido salicílico, además de fijar nitrógeno cumpliendo la función biogeoquímica. Importante son todas las características mencionadas, ya que mejoran el desarrollo radicular, incrementando a su vez la actividad enzimática de las plantas y propician además que otros microorganismos actúen beneficiosamente sobre la planta (20).

Finalmente, los microorganismos promotores de crecimiento vegetal son de gran importancia, pues pueden cumplir el papel como bioprotectores pues suprimen enfermedades de las plantas, biofertilizantes aumentando la capacidad de las plantas para adquirir nutrientes y bioestimulantes con su producción de fitohormonas (20). Siendo útiles como alternativa productiva para el reemplazo de fertilizantes y pesticidas químicos, considerándose amigables con el medio ambiente beneficiándose la planta, el suelo y la economía del agricultor.

Grupo actinomicetos

El grupo de actinomicetos, son las más numerosas encontrándose estos por gramo en una concentración de 10^6 y 10^7 (21) por gramos de suelo los cuales son ubicuos ampliamente distribuidos en los ecosistemas.

Los actinomicetos se describen microscópicamente como bacterias Gram positivas, filamentosas, parcialmente ácido resistentes, heterótrofas aerobias y unas pocas son anaerobias. Antes eran confundidos por los hongos por la similitud del crecimiento macroscópico, formación de filamentos llamados hifas con

ramificaciones a lo que se le da el nombre de micelio. Muchos de estos son productoras de esporas y micelio aéreo (21).

La mayoría de los actinomicetos son mesófilos, y la temperatura de crecimiento registra entre 25 °C a 30 °C, a temperaturas inferiores a 5 °C su crecimiento es nulo, a temperaturas altas solo pocas especies termofílicas son capaces de resistir como lo son las *Thermonospora sp.* y *Thermoactinomyces sp.* y *Streptomyces sp.* a temperaturas de más de 55 °C (22).

Son productoras de un metabolito secundario específicamente un compuesto orgánico volátil llamado geosmina, la culpable del típico olor a “tierra mojada”. Los actinomicetos actualmente son el foco de las investigaciones agroecológicas, farmacéuticas y alimentarias por su capacidad de producción de sustancias con actividad biológica, una de las más importantes es la degradación de pesticidas y la producción de nuevos antibióticos (23).

Streptomyces spp.

Forman parte de la familia de los actinomicetos, género que suele ser el predominante con el 70 al 90% de las colonias, seguido de *Norcardia* 10 a 30% y el tercero *Micromonospora* con un 1 al 15% (23).

Su micelio tiene un diámetro de 0,5-2 micrómetros, vegetativo ampliamente ramificado, con un micelio aéreo que forma cadenas entre 3 y esporas. Gram positivos, que forman colonias secas, adheridas al agar con bordes irregulares, la mayoría de veces están pigmentadas (22). Se consideran de suma importancia biotecnológica debido a su producción de metabolitos secundarios, como los antibióticos en la medicina humana y veterinaria.

Streptomyces hacen parte de los promotores de crecimiento vegetal beneficiosos para el crecimiento vegetal mejorando la calidad suelo-planta, debido a la producción de fitohormonas como la giberelina que ayuda a la germinación de las semillas, promueven el enraizamiento, hacen disponible y suministran los nutrientes del suelo, mejoran la calidad del suelo y protegen a la planta de peligros bióticos y abióticos. En los estudios de Condori-Pacsi et al., 2019 (2) establecen que por mucho tiempo este género *Streptomyces* fueron bacterias de vida libre, sin embargo tienen interacciones complejas con las plantas siendo beneficiosas como promotoras de crecimiento vegetal.

METODOLOGÍA

Muestras de suelo: Las muestras de suelos fueron tomadas en la finca cafetera "Casa Quantic", Caldas ubicada a los 1.370 msnm con coordenadas 4°57'40.7"N 75°42'05.3"W, se encuentra 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. Principal razón por la cual se seleccionó el lugar, adicionalmente el manejo orgánico sostenible y la implementación de lineamiento estratégicos de gestión ambiental rural en el sistema ambiental del lugar es clave. (24)

Se realizó un muestreo compuesto aleatorio a una profundidad no mayor de 25 cm, luego se empaquetan en bolsas herméticas nuevas de 1 kg. Se tuvo en cuenta las recomendaciones de la "Guía toma de muestras por Instituto geográfico Agustín Codazzi" (25).

Las muestras fueron tomadas por el productor y para esto tuvo en cuenta realizar un muestreo aleatorio, con submuestras de todo el lote que fue definido por el uso de materiales orgánicos para el manejo de este. Una vez recolectadas todas las submuestras se realizó un cuarteo para reducir cantidad de muestra y llevar al laboratorio máximo un kilogramo de muestra de suelo fresco. Esta muestra fue almacenada en nevera a 4°C y se procedió a su análisis inmediato.

Para la preparación de la muestra, se tamizó el suelo para retirar restos de piedras, raíces y macroorganismos, luego se hicieron diluciones seriadas desde 10^{-1} a 10^{-4} en tubos de ensayo de 10 ml con el fin de reducir la carga microbiana, el solvente vendría siendo la peptona con 9 ml y 1g de suelo.

Inoculación y siembra en medio selectivo

Se tomaron 100 µl de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , y se sembraron en medio de cultivo Ashby mediante una siembra masiva. La siembra se realizó por triplicado.

Agar Ashby: Medio de cultivo selectivo para identificar microorganismos que fijen nitrógeno atmosférico, puesto que los componentes de este medio carece de nitrógeno (26). Este medio fue elaborado considerando las siguientes componentes dextrosa 20 g, fosfato de hidrogeno dipotásico 0.2 g, Sulfato de magnesio 0.2 g, Cloruro de sodio 0.2 g, Sulfato de potasio 0.1 g, CaCO_3 o carbonato de calcio 5 g, Agar 15 g para 1 L. Se incubó durante 14 días a 28 °C.

Condiciones de crecimiento

Para el crecimiento de *Streptomyces* spp, todos los aislamientos se incubaron a 28 °C durante un periodo de 14 días (27). Esta condición aplicó para todos los experimentos realizados en el trabajo investigativo.

Caracterización macroscópica preliminar

Las colonias presentes en el medio Ashby fueron seleccionadas como *Streptomyces* a través de una evaluación visual macroscópica, teniendo en cuenta

las siguientes características tales como: color de la colonia y características de micelio como la textura, el borde, forma y superficie; las características para tener en cuenta son colonias polvorosas, rugosas, cerosas con bordes irregulares y los colores blancos, grises, café y negros(21)

Siembra en medio enriquecido

Una vez seleccionadas las colonias de interés del medio Ashby se procedió a aislarlas en el medio GYM (*Glucose, Yeast extract and Malt extract*), medio de cultivo usado para facilitar la esporulación y el crecimiento variado de los microorganismos del suelo, lo que lo convierte en un medio enriquecido. (glucosa 4 g, extracto de levadura 4 g, extracto de malta 10 g, CaCO₃ 2 g, Agar 12 g para 1 L) (28). Para evitar contaminaciones fúngicas se adicionó la nistatina 50 µL/mL (29).

Las colonias presuntivas de *Streptomyces* spp se repicaron en el medio GYM para su caracterización morfológica y siembra en microcultivos de Ridell.

Identificación de *Streptomyces* spp por microcultivo de Ridell

Se usó la técnica de microcultivos según de Ridell (30) modificando el medio de cultivo a GYM, sembrando las colonias aisladas de los posibles *Streptomyces* spp anteriormente inoculadas en medio GYM en cajas de Petri.

Caracterización microscópica de *Streptomyces* spp

Se realizó una tinción Gram a los crecimientos bacterianos del microcultivo de Ridell para identificarlos microscópicamente en el objetivo de 100x, se observaron la presencia de esporas y arreglo de estructuras de esporulación similares a las reportadas por Perez et al, 2015 (31) además de tener en cuenta que son cocos Gram positivos, con arreglo de estrepto (21).

Caracterización bioquímica de los aislamientos de *Streptomyces*

Para este apartado se tuvieron en cuenta las siguientes pruebas bioquímicas: Catalasa: peróxido de hidrogeno 30%, Oxidasa: Reactivo de kovacs para estas dos primeras pruebas se usó el método directo, el cual trató sobre la adición del reactivo directamente a las colonias del medio de cultivo, en este caso fue del medio Ashby en el que se realizó la prueba catalasa y oxidasa

Citratos: Citratos Simmons, fijación nitrógeno atmosférico: Ashby glucosa agar (dextrosa 20 g, fosfato de hidrogeno dipotásico 0,2 g, sulfato de magnesio 0,2 g, cloruro de sodio 0,2 g, sulfato de potasio 0,1 g, carbonato de calcio 5 g, agar 15 g para 1 L) (26). Solubilizadores de fosforo: Medio SRM1 para solubilizadores de fósforo (Extracto de levadura 0,5 g, glucosa 10 g, Agar bacteriológico 36 g, sulfato de amonio 0,5 g, fosfato de calcio 5 g, azul de bromotimol 0,1 g, cloruro de potasio 0,2 g, sulfato de magnesio 0,3 g, sulfato de hierro 0,0004 g, cloruro de sodio 0,2 g para 1 L) (32–35).

Estas pruebas bioquímicas se justifican, en primer lugar, desde el punto de la actividad biológica de las *Streptomyces* con el fin de garantizar su relación interventora con el ciclaje de nutrientes en suelos cafeteros. Segundo no son todas las pruebas bioquímicas,

en las recomendaciones se menciona lo que se debe hacer en los próximos ensayos en la continuación de este trabajo.

Nomenclatura y conservación de los aislados de *Streptomyces*

Para la nomenclatura de los aislamientos se les asignó un código por descripción macroscópica, este código denota de donde proviene las cepas, siendo SC_ULP: Suelos cafeteros, Universidad Libre de Pereira, RICMSS (Respuesta de Indicadores de Calidad y Manejo Sostenible del Suelo) son las siglas del proyecto de investigación de donde surgió este estudio y la última letra hace parte de las colonias. Como se evidencia en la tabla 1.

Para la conservación de *Streptomyces* se tomó las recomendaciones de Shepherd, et al., 2010. (36) Se usó 2 conservaciones, una con la biomasa recogida directamente de los repiques del medio GYM en tubos Falcon de 15 ml, usándose 10 ml de una solución con glicerol al 20% y la segunda conservación se utilizó medio GYM en caldo para el crecimiento de los *Streptomyces*, con los mismos componentes, pero sin el agar-agar. Se usaron tubos eppendorf de 1,5 ml, vertiendo 500 µl de la siembra posterior a tratarlo en el vortex para homogenizar el contenido dentro de los tubos de ensayo; se tomó 500 µl de una solución de glicerol al 30% y se vertió en el tubo eppendorf, quedando en una concentración de 15%. Ambas conservaciones se guardaron a una temperatura de -17° C. Todas las conservaciones se hicieron al día 14, contando desde el primer día de la inoculación

En la figura 1 se presenta un diagrama, el cual resume la metodología de este estudio.

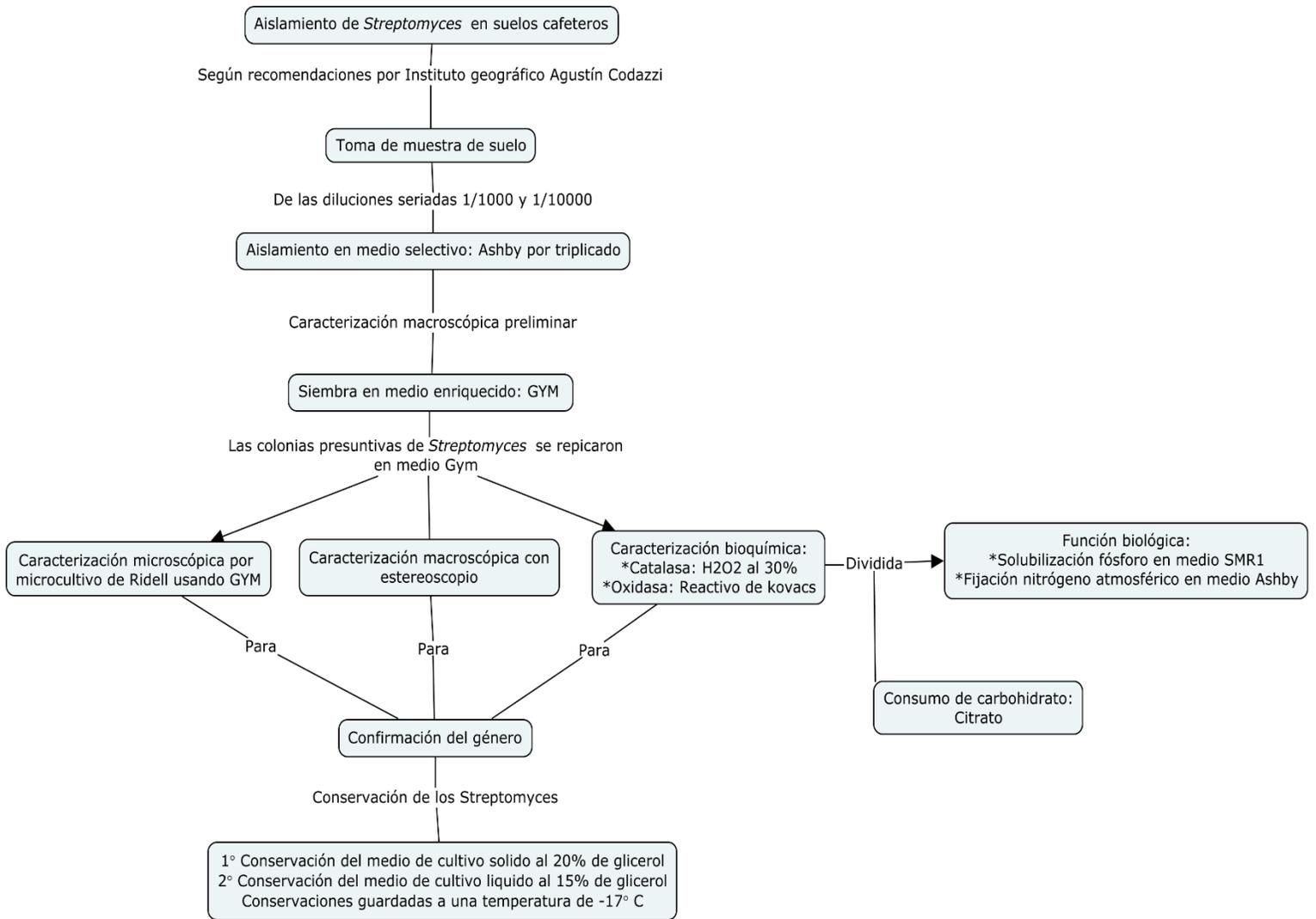


Figura 1. Diagrama metodológico. Fuente: Propia

RESULTADOS

Selección de bacterias *Streptomyces* spp en medio Ashby y GYM

Luego de la siembra masiva por triplicado de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} de la muestra de suelo cafeteras, se obtuvo un crecimiento completo a los 14 días como lo indicó Khandan N, Gottravalli J, 2015 (27), como se evidencia en la figura 2.



Figura 2. Crecimiento en medio Ashby para la selección de presuntas *Streptomyces* spp. Fuente: Propia

En la figura 2, se puede observar el crecimiento presuntivo que se presentó de colonias de *Streptomyces* spp, reconocidas por sus características morfológicas como el crecimiento adherido al agar, colonia de color blanco o gris, rugoso y seca, diferenciándose de las demás colonias, en comparación con otros medios de cultivo con el medio Ashby es posible evidenciar bien las colonias de los microorganismos gracias a que no es un medio enriquecido; las UFC que crezcan allí no proliferaran tanto como si estuvieran en un medio de cultivo basal.

Todo el aislamiento fue posible gracias al uso del medio Ashby, puesto que contiene pocos nutrientes para que proliferen microorganismos contaminantes, su composición es fiel al argumento antes dado ya que solo contiene dextrosa como carbohidrato, mientras que el medio enriquecido GYM contiene glucosa, extracto de levadura y extracto de malta que ayuda a que crezcan diversos microorganismos. Esto también lo constata el estudio de Duque & López, 2019 (37). Además de destacar su uso como medio selectivo para los microorganismos que crecen allí, pues fijan el nitrógeno atmosférico.

Siembra en medio enriquecido

Siguiendo el orden de la metodología del aislamiento de este género de bacterias Gram positivas, se aislaron las colonias presuntivas de *Streptomyces* spp en medio GYM para su enriquecimiento y esporulación, como se ve en la figura 3.



Figura 3. Crecimiento de algunas colonias presuntivas de *Streptomyces spp.* fuente: Propia

Al hacer el aislamiento de las colonias presuntivas como se evidencia en la figura 3, se percató el buen crecimiento que tiene el género *Streptomyces* en el medio GYM, observando las características morfológicas reportadas por la literatura que menciona un crecimiento polvoroso y seco. De las cajas de Petri como se evidencia en la figura 3, hubo una característica muy notable, el fuerte olor a “tierra húmeda”, debido al compuesto orgánico volátil (VOC) llamada geosmina, compuesto producido por *Streptomyces spp.* (38,39). Las colonias que se observan en la figura 3, se distinguieron por presentar fuerte olor a la geosmina, especialmente la colonia ubicada a la izquierda. Esta característica organoléptica se toma como referente puesto que es propio de los actinomicetos, *Streptomyces spp.* (40).

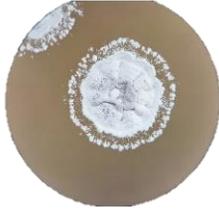
Se descartaron las colonias que no mostraron las características morfológicas buscadas, según criterios ya reportados y los demás aislamientos presuntivos de *Streptomyces* se les hizo tinción Gram, omitiendo el paso de la safranina o fucsina para evidenciar solo microorganismos Gram positivos (41), los cuales fueron objeto de estudio, ya que los *Streptomyces* se caracterizan por ser grampositivos. Debido a los resultados obtenidos en este apartado, se compara con otros estudios que examinan la parte microscópica como es el caso de López & Lemus, 2019 (42). Los cuales encontraron la misma morfología siendo Gram-positivos en arreglo de estreptococos con hifas

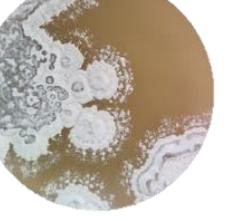
Luego del repique se seleccionaron las colonias de características similares y se agruparon de acuerdo con estas; posteriormente se les asignaron códigos como se reseña en la tabla 1

Los crecimientos obtenidos (tabla 1) de los repiques es similar en diferentes estudios en los cuales usan el mismo medio enriquecido GYM para facilitar el crecimiento óptimo de *Streptomyces spp.*, respaldado por el estudio de López & Lemus, 2019 (42), y Duque & López, 2019 (37). Lo fundamental de este medio, además del buen crecimiento de los actinomicetos, es la buena diferenciación macroscópica teniendo colonias, secas, filamentosas, cerosas, rugosas con bordes irregulares como lo confirman (21,42). Paralelamente, fue posible visualizar cambios del pigmento en el medio GYM debido a la relación micelio-sustrato como se refieren diferentes autores. (42–44). Puesto que en el ciclo de vida de los *Streptomyces* las esporas se convierten en hifas vegetativas formando un micelio, el cual se propaga por el medio de cultivo difundiéndose en el

mismo, alterando la coloración, además de tener en cuenta que, dependiendo de la especie, los *Streptomyces* tienen la capacidad de producir pigmentos melanoides.(43)

Tabla 1. Características macroscópicas vinculadas a los aislamientos de *Streptomyces*

Código asignado	Identificación macroscópica	Descripción	Repique GYM
SC_ULP_RICMSS_A		<p>Colonia gris oscura, adherida al agar, borde irregular, polvoroso y seco</p>	
SC_ULP_RICMSS_B		<p>Colonia café, adherida al agar, borde irregular y rugoso, seco</p>	
SC_ULP_RICMSS_C		<p>Colonia blanca, borde irregular con halo fragmentado y rugoso, seco y polvoroso</p>	
SC_ULP_RICMSS_D		<p>Colonia blanca, adherida al agar, borde irregular con halo septado distinguido, rugoso, seco y polvoroso</p>	

SC_ULP_RICMSS_E		Colonia blanca, adherida al agar, borde con halo irregular, rugoso, seco y polvoroso sin pigmentación en el centro	
SC_ULP_RICMSS_F		Colonia blanca adherida al agar, borde con halo irregular, rugoso, seco y polvoroso	
SC_ULP_RICMSS_G		Colonia blanca, adherida al agar, borde irregular expandido, seco y polvoroso con un centro rugoso	
SC_ULP_RICMSS_H		Colonia blanca, borde con halo irregular, rugoso, seco y polvoroso	

En la observación macroscópica con el estereoscopio se pudo observar la estructura micelar de la bacteria *Streptomyces spp.* Teniendo en común algunos el color gris o blanco como se ve en la tabla 2, siendo diferente del negro y el café. La distinción macroscópica se hizo teniendo en cuenta, si algunos tenían halos septados uniformes o no, si era rugoso, polvoroso o seco, y si su crecimiento era más o menos uniforme

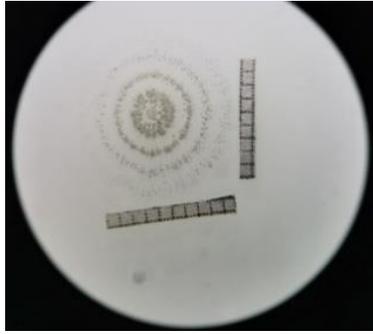


Figura 4. Tamaño promedio de las colonias. Observación estereoscópica de SC_ULP_RICMSS_E con tira de longitud de 10 milímetros, fuente: Propia

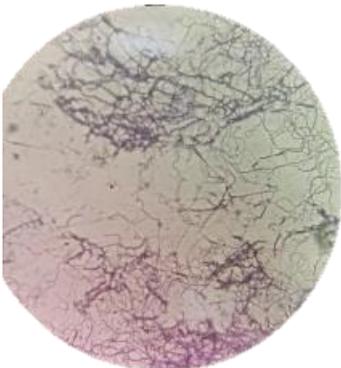
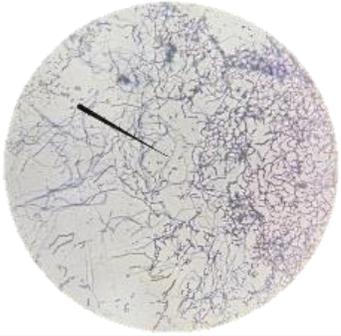
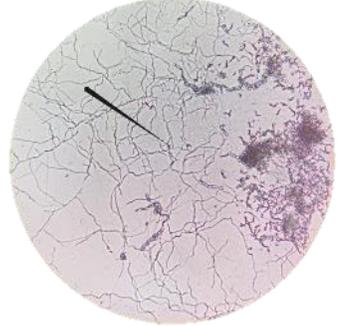
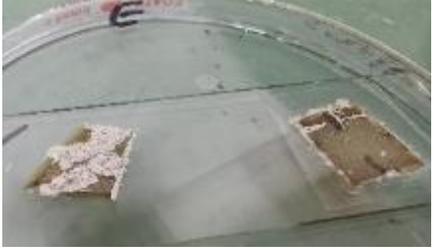
Si se observa en la figura 3, la colonia tiene la misma forma que en el estudio de Salazar & Ordoñez, 2013 (21), estas son colonias polvorosas, cerosas con bordes irregulares. Cabe destacar, que en el anterior estudio citado no se usó medio GYM, usaron Agar avena y Ashby.

El trabajo hecho por Tresner, Davies & Backus, 1961. (45) resulta relevante, para referenciar en esta ocasión, ya que emplean la técnica de microscopía electrónica con cultivos aislados de *Streptomyces* en medio de cultivo YMA (Yeast-malt agar: 10 g extracto de malta, 4 g de extracto de levadura, 4 g de glucosa y 20 g de agar-agar para un litro de medio), siendo de relevancia en este estudio, pues el único componente que le falta al medio YMA es el carbonato de calcio diferenciándolo del medio GYM. Así que se tomó como referente el crecimiento de sus *Streptomyces*, siendo para las colonias blancas las siguientes especies: *S. alboniger*, *S. albus*, *S. nitrificans*, *S. rimosus*, *S. ruber*, y para las colonias café y gris oscuro: *S. achromogenes*, *S. ambofaciens*, *S. antibioticus*, *S. argenteolus*, *S. aureofaciens*, *S. aureus*, *S. alboflavus*, *S. albus*, *S. arabicus*, *S. albogriseolus*, *S. bikiniensis*, *S. caeruleus*, *S. catenulae*, *S. calvus*, *S. diastaticus*, *S. felleus*, *S. fimicarius*, *S. flavovirens*, *S. flavus*, *S. flaveolus*, *S. fradiae*, *S. filipinensis*, *S. gelaticus*, *S. griseolus*, *S. griseoplanus*, *S. griseoluteus*, *S. griseoruber*, *S. gilvosporeus*, *S. griseoflavus*, *S. halstedii*, *S. hygrosopicus*, *S. mirabilis*, *S. naganishii*, *S. narbonensis*, *S. nitrosporeus*, *S. noursei*, *S. olivaceus*, *S. olivochromogenes*, *S. parvulus*, *S. phaeochromogenes*, *S. purpeofuscus*, *S. pseudogriseolus*, *S. rubrocyanodiastaticus* var, *piger*, *S. olivaceus*, *S. tanashiensis*, *S. venezuelae*, *S. verticillatus* y *S. violaceoniger*, *S. violaceoruber*, *S. viridis*.

Los colores del micelio aéreo de los *Streptomyces* cambian según su especie (43), los obtenidos en este estudio fueron de color gris oscuro, café y blanco. Así que se puede considerar en primera instancia que de los 8 aislamientos obtenidos podrían ser cualquiera de las anteriores especies mencionadas, sin embargo, luego se podría constatar con la prueba molecular 16S

Identificación de *Streptomyces* spp por microcultivo de Ridell

En este apartado se tomó como referencia los estudios de Duque & López, 2019 y Salazar & Ordoñez, 2013 (21,37), ya que le hacen una distinción microscópica a sus presuntos *Streptomyces* spp.

Tabla 2. Identificación macroscópica, microscópica de algunas muestras y la observación de las hifas aéreas mediante la técnica de microcultivo de Ridell		
Código	Observación microscópica con objetivo 100X	Observación macroscópica
SC_ULP_RICMSS_B		
SC_ULP_RICMSS_D		
SC_ULP_RICMSS_E		

Se constató el trabajo hecho por López & Lemus, 2019 (42), ya que hicieron tinción de sus cultivos, se logró verificar la caracterización microscópica en este proyecto, ya que se evidencia la similitud. Compartiendo lo Gram positivos, ramificados y en forma de cadena como se puede verificar en la tabla 2.

Debido a que no se puede evidenciar bien la estructura microscópica en la tabla 2, Expone Duque & López, 2019 (37), que no fue posible obtener un resultado óptimo comparando su evidencia fotográfica con el trabajo de Salazar & Ordoñez, 2013 (21), pero esto es debido a que es un estreptococo que aparentemente no se puede visualizar bien su estructura microscópica, debido al aumento del microscopio o tipo. Sin embargo, se puede constatar que, las características microscópicas evidenciadas son correctas y propias del género *Streptomyces* debido a que se realizó tinción directamente del microcultivo de Ridell.

Actividad biológica y prueba bioquímica de los aislamientos de *Streptomyces*

Los resultados de todos los aislamientos analizados fueron positivo para catalasa, sin embargo, para la oxidasa con el método directo en el cual se le adiciona una gota del reactivo de Kovacs directamente a la colonia del medio de cultivo Ashby fue negativo. En el caso del consumo de citrato como fuente de carbono, las cepas SC_ULP_RICMSS_B y SC_ULP_RICMSS_C fueron positivas. Para la fijación de nitrógeno en el medio Ashby, todas las cepas fueron capaces de crecer en el medio de cultivo, por lo tanto son consideradas bacterias fijadoras de nitrógeno de crecimiento libre. Para el medio SRM1 dirigido a evaluar el crecimiento de solubilizadores de fosforo, todos los aislamientos analizados solubilizaron el fosforo, con excepción del aislamiento SC_ULP_RICMSS_B. En la tabla 3, se evidencia los resultados expuestos anteriormente.

Tabla 3. Pruebas bioquímicas y actividad biológica de los presuntivos *Streptomyces* aislados

CODIGO	Nitrógeno Ashby	Fosforo SMR1	Citrato	Catalasa	Oxidasa
SC_ULP_RICMSS_A	+	+	-	+	-
SC_ULP_RICMSS_B	+	-	+	+	-
SC_ULP_RICMSS_C	+	+	+	+	-
SC_ULP_RICMSS_D	+	+	-	+	-
SC_ULP_RICMSS_E	+	+	-	+	-
SC_ULP_RICMSS_F	+	+	-	+	-
SC_ULP_RICMSS_G	+	+	-	+	-
SC_ULP_RICMSS_H	+	+	-	+	-

+ = positivo, - = negativo

Con respecto a la prueba oxidasa, se hizo directamente en el medio selectivo Ashby, contraproducente ya que este medio tiene gran cantidad de glucosa lo que demuestra una actividad inhibitora de la oxidasa, por lo cual se puede fundamentar un resultado falso negativo(46). Para la confirmación del género *Streptomyces* se tuvo en cuenta la literatura, puesto que para *Streptomyces* siempre fijaran nitrógeno, solubilizaran fosforo y son positivos para catalasa (8,21,37,44). Teniendo en cuenta lo anterior se constata el género además de tener como referente el estudio de Salazar & Ordoñez, 2013 (21) y

las pruebas bioquímicas de referencia que tiene Bergey, 2005 y Dworkin, 2006. (47,48) para *Streptomyces*, teniendo en cuenta que a los autores mencionados anteriormente tuvieron los mismos resultados a excepción de las funciones biológicas que no mencionan.

Respecto a las funciones biológicas, se comprueba que estos microorganismos tienen actividad de promoción de crecimiento vegetal aislados de suelos cafeteros, puesto que pudieron crecer en el medio Ashby y SMR1. Según Beltrán-Pineda, et al. 2022, estos microorganismos que tienen esta capacidad de fijar nitrógeno y solubilizar fósforo, tienen gran potencial biotecnológico medioambiental, ya que son utilizados como alternativas productivas, siendo base para la fabricación de biofertilizantes. Los aislados de *Streptomyces* promueven esta circulación de nutrientes requeridos por las plantas, evitando a su vez el uso de fertilizantes químicos(49). Específicamente la fijación del nitrógeno atmosférico permite administrarle a la planta este nutriente, ya que es esencial para la formación de proteínas como por ejemplo la clorofila.



Figura 5. Crecimiento de *Streptomyces* en medio Ashby. Fuente: Propia

En cuanto al fósforo, este es fundamental para la formación de ácidos nucleicos; como el ácido desoxirribonucleico y ácido ribonucleico, formación de la molécula adenosín trifosfato, siendo un nutriente vital ya que ayuda a la planta con el crecimiento de sus raíces, en el proceso de la fotosíntesis y transferencias de energía (49) Estos microorganismos solubilizadores de fósforo suministran el fósforo mediante la producción de ácidos orgánicos solubilizando minerales como la roca fosfórica, hidroxiapatita, fosfato tricálcico y fosfato dicálcico, quelación, reacciones de intercambio o por la asimilación directa. (50)

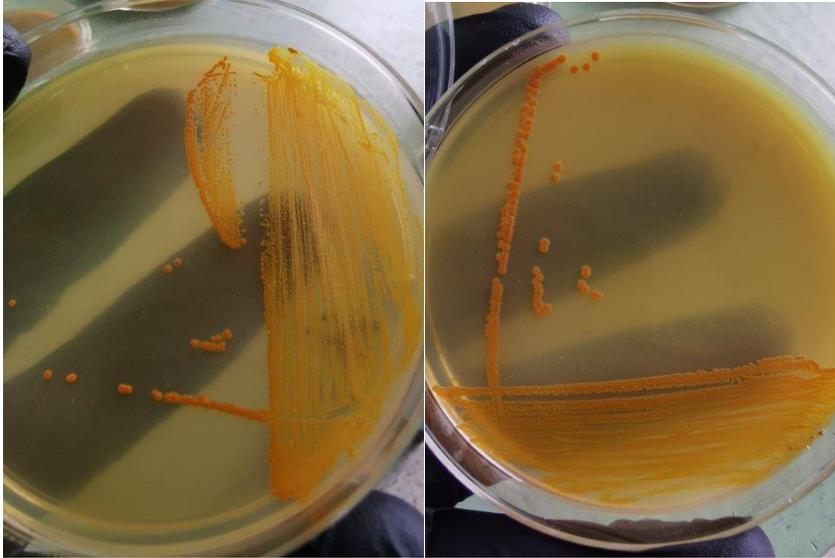


Figura 6. Crecimiento de *Streptomyces* en medio SMR1. Fuente: Propia

Conclusiones

Dada las características obtenidas macro y microscópicamente, se puede confirmar que todos los aislamientos obtenidos pertenecen al género *Streptomyces* spp. Además de haberse logrado la identificación mediante el medio de cultivo GYM para la obtención de *Streptomyces*.

Se logró evidenciar las características propias de los *Streptomyces* gracias a su observación microscópica y macroscópica, y su microcultivo por el método de Ridell evidenciando las hifas aéreas propias de dicho género. Así, de forma tradicional se puede identificar estas bacterias aisladas del suelo más sus características teniendo como referente cuales especies podrían ser cada cepa aislada. Todo lo anterior pertinente respecto a los objetivos propuestos.

Fue posible aislar *Streptomyces* spp de suelos cafeteros y evaluar su actividad de promoción de crecimiento vegetal con respecto a fijación de nitrógeno y solubilización de fósforo.

Se conservaron las diferentes 8 cepas para su posterior análisis en próximas investigaciones, la temprana dar continuidad con la identificación molecular

Recomendaciones

Streptomyces son un grupo de bacterias de gran interés, puesto que son un grupo que representa gran importancia biotecnológica los cuales han sido explotados y explorados en buena parte, sin embargo, esto no quiere decir que no haya más que hacer con ellos. Puesto que las investigaciones se pueden direccionar a un campo en el cual no se haya vinculado el estudio de los *Streptomyces* o que en su defecto sea inexplorado. En el contexto socioeconómico es importante destacar el conocimiento de los caficultores sobre la microbiota de su suelo y evidenciar su relación con la productividad y calidad de sus productos, sirviendo como insumo e idea para generar alternativas productivas permitiendo una buena rentabilidad reduciendo el uso de agroquímicos y a su vez el impacto ambiental (12)

Por lo tanto, con el aislamiento de los *Streptomyces* del suelo cafetero, es relevante el hecho de que se pueda continuar la investigación sobre estos evidenciando por ejemplo su actividad promotora de crecimiento vegetal sobre plantas de café, o su competencia con microorganismos patógenos del suelo cafetero. Además de esto, queda como un insumo para la Universidad Libre para la docencia e investigaciones futuras; una por ejemplo puede ser la identificación molecular mediante la técnica molecular 16S.

Como última recomendación según los resultados es seguir con la caracterización bioquímicamente de las cepas de las presuntas de *Streptomyces*, según estudios en los que generalmente se les evalúa el consumo de carbohidratos, la reducción de nitratos a nitritos, producción de indol, pruebas de fermentación, entre otros. Y terminar con la actividad biológica usando un medio para solubilizadores de potasio para evidenciar su acción de ciclaje de nutrientes y así caracterizarlos completamente respecto a su función biológica (32,33,35) y volver a repetir la prueba oxidasa.

Además, es importante confirmar género con la herramienta molecular 16s y repetir la prueba oxidasa.

Agradecimientos

Este trabajo hace parte del proyecto “RESPUESTA DE INDICADORES DE CALIDAD Y MANEJO SOSTENIBLE DEL SUELO ANTE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE AGRICULTURA ECOLÓGICA EN CAFETALES BAJO DIFERENTES CONTEXTOS AMBIENTALES EN COLOMBIA”, financiado por Universidad Libre seccional Pereira. Facultad de ciencias de la salud exactas y naturales, programa de Microbiología. Convocatoria nacional 1.

REFERENCIAS

1. Villanueva-Mejía DF. Estudio sobre Bioeconomía. Anexo 1 Análisis Sector Agrícola y Pecuario. Estud sobre la Bioeconomía como fuente nuevas Ind basadas en el Cap Nat Colomb [Internet]. 2018;1–49. Available from: https://dnp.gov.co/Crecimiento-Verde/Documents/ejes-tematicos/Bioeconomia/Informe 2/ANEXO 1_Análisis sector agrícola.pdf
2. Condori-Pacsi SJ, Fernández-Guzman PR, Valderrama-Valencia, María R. Aislamiento y caracterización de *Streptomyces* spp rizosféricos promotores del crecimiento vegetal. IDESEA (Chile) [Internet]. 2019;37:109–16. Available from: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/idesia/v37n2/0718-3429-idesia-37-02-00109.pdf>
3. Bermejo AC, Castro JC, Hilacondo WC, Quispe JL. Rhizospheric actinomycetes from organic crops of native potato (*Solanum tuberosum*): Isolation, phenotypic characterization, molecular identification, and impact on biocontrol of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Sci Agropecu.* 2020;11(2):223–31.
4. Posada AM, Mejía DP, Polanco-Echeverry D, Cardona JA. (Pgpr): Una Revisión Sistemática 1990-2019 Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Pgpr): a Systematic Review 1990-2019. *RIAA Rev Investig Agrar y Ambient.* 2021;12(2):161–78.
5. Moore JAM, Abraham PE, Michener JK, Muchero W, Cregger MA. Ecosystem consequences of introducing plant growth promoting rhizobacteria to managed systems and potential legacy effects. *New Phytol* [Internet]. 2022 Jan 31; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35098533>
6. Arcila P. J, Farfan V. FF, Moreno B. AM, Salazar G. LF, Hincapie G. E. Sistemas de producción de café en Colombia. 2007 [cited 2022 Feb 8];275–94. Available from: <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/720>
7. Rosas Arellano J, Escamilla Prado E, Ruiz Rosado O. Relación de los nutrimentos del suelo con las características físicas y sensoriales del café orgánico. *Terra Latinoam* [Internet]. 2008 [cited 2022 Feb 8];26(4):375–84. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792008000400010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
8. Luo MC, Deal KR, Akhunov ED. Genome comparisons reveal a dominant mechanism of chromosome number reduction in grasses and accelerated genome evolution in Triticeae. *Theor Appl Genet.* 2010;7(2):1–7.
9. de Lima Procópio RE, da Silva IR, Martins MK, de Azevedo JL, de Araújo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian J Infect Dis.* 2012 Sep 1;16(5):466–71.
10. Millán K, Monreal C, Díaz J, Soria J, Jarquín R. Aporte de Microorganismos Benéficos por la Incorporación al Suelo de Residuos Deshidratados de Col (*Brassica oleracea* var *capitata*) y su Efecto en el pH. *Rev Mex Fitopatol* [Internet]. 2013;31(1):29–44. Available from: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v31n1/v31n1a4.pdf>
11. Tanya Morocho M, Leiva-Mora M. Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Cent Agrícola.* 2019;46(2):93–103.
12. Bueno Lopez L. Servicios ecosistémicos de los suelos y su relación con la calidad

- del café en el Distrito de Manejo Integrado “Cuchilla de San Juan”, Belén de Umbría, Risaralda. Universidad Tecnológica de Pereira; 2022.
13. Domingo S, Sadeghian S, Salamanca A, Cardona DA, Hincapié E. Indicadores de la calidad del suelo en algunos agroecosistemas de la zona cafetera Colombiana. XII Congr Ecuatoriano la Cienc del Suelo. 2010;
 14. Bautista Cruz A, Etchevers Barra J, del Castillo RF, Gutiérrez C. La calidad del suelo y sus indicadores: . Ecosistemas [Internet]. 2004 Sep 1;13(2 SE-). Available from: <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/572>
 15. García-Astillero A. Tipos de suelos y sus principales características [Internet]. Ecología verde. 2019. p. 1. Available from: https://www.ecologiaverde.com/tipos-de-suelos-y-sus-principales-caracteristicas-1645.html#anchor_1
 16. Lince-Salazar L, Sadeghian S. Taxonomía de suelos. Consideraciones para la zona cafetera de Colombia. Boletín Técnico Cenicafé. 2021;45:1–31.
 17. Torsvik V, Øvreås L, Thingstad TF. Prokaryotic Diversity--Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors. Science (80-) [Internet]. 2002 May 10;296(5570):1064–6. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1071698>
 18. Hoorman JJ. Role of soil bacteria: Update and revision. MCC; 2016.
 19. Angulo VC, Sanfuentes EA, Rodríguez F, Sossa KE. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de Eucalyptus nitens. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2014 Oct;46(4):338–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0325754114700938>
 20. González H, Fuentes N. Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. Rev Cienc Agr 34(1)17 - 31 [Internet]. 2015; Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-01352017000100002#:~:text=Los microorganismos promotores de crecimiento,M%2C y Azospirillum.
 21. Salazar AM, Ordoñez CA. Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira; 2013.
 22. Franco Granada M. Evaluación de caracteres PGRP en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas [Internet]. Granada; 2008. Available from: <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/2110/17716093.pdf?sequence=1>
 23. Rincon-Enriquez G, Quiñones Aguilar EE, Evangelista-Martínez Z. Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. Rev Elem. 2016 Jan 1;23:59–64.
 24. Galvez C N. Propuesta de una estrategia de Gestión Ambiental enfocada hacia la sustentabilidad del desarrollo rural de la organización Quantic Artesanal en la Vereda “El Guacamayo”; Chinchiná Caldas [Internet]. Universidad Tecnológica de Pereira; 2022. Available from: <https://repositorio.utp.edu.co/items/74f4390a-c124-476c-88e7-b4fd6ea8e00c>
 25. IGAC (Institución geográfico Agustín Codazzi). Guía de muestreo [Internet]. Available from: <https://www.igac.gov.co/sites/igac.gov.co/files/guiademuestreo.pdf>
 26. Himedialabs. Ashby’s Glucose Agar [Internet]. 2020. p. 2. Available from: <https://himedialabs.com/TD/M713.pdf>
 27. Khandan N, Gottravalli J. Isolation, Identification and Assessment of the Antimicrobial Activity of Streptomyces flavogriseus, Strain ACTK2, From a Soil

- Sample From Kodagu, Karnataka State in India. Jundishapur J Microbiol [Internet]. 2015 Feb 10;8(2). Available from: <https://brief.land/jjm/articles/56376.html>
28. DSMZ the LI. GYM Streptomyces medium [Internet]. 2007. p. 1. Available from: https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium65.pdf
 29. Williams ST, Davies FL. Use of Antibiotics for Selective Isolation and Enumeration of Actinomycetes in Soil. J Gen Microbiol [Internet]. 1965 Feb 1;38(2):251–61. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-38-2-251>
 30. Riddell RW. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. Mycologia [Internet]. 1950 Mar;42(2):265. Available from: <https://www.jstor.org/stable/3755439?origin=crossref>
 31. Perez DA, García NY, Gallegos G, Ruiz MF, Berlanga DI, Rios C. Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagonicos a *Fusarium equiseti*. Rev Mex Ciencias Agrícolas [Internet]. 2015;6:1629–38. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263142146016>
 32. Reddy NG, Ramakrishn DPN, Raja Gopal SV. A Morphological, Physiological and Biochemical Studies of Marine Streptomyces rochei (MTCC 10109) Showing Antagonistic Activity Against Selective Human Pathogenic Microorganisms. Asian J Biol Sci [Internet]. 2010 Dec 15;4(1):1–14. Available from: <https://www.scialert.net/abstract/?doi=ajbs.2011.1.14>
 33. Islam MS, Aktar MB, Rahman MM, Main Uddin KM. Isolation and characterization of Streptomyces spp collected from Bangladeshi soils on the basis of morphological and biochemical studies. IntJCurrMicrobiolAppSci [Internet]. 2014 [cited 2022 Feb 3];3(11):734–42. Available from: <http://www.ijcmas.com>
 34. Rao WVBS, Sinha M. Phosphate dissolving microorganisms in the soil and rhizosphere. Indian J Agric Sci. 1963;33:272–8.
 35. Lowe KL, Espinoza LE, Davelos Baines AL. Biochemical, nutrient and inhibitory characteristics of streptomyces cultured from a hypersaline estuary, The Laguna Madre (Texas). Online J Biol Sci [Internet]. 2013 [cited 2022 Feb 3];13(1):18–27. Available from: <http://www.thescipub.com/ojbs.toc>
 36. Shepherd MD, Kharel MK, Bosserman MA, Rohr J. Laboratory Maintenance of Streptomyces Species. Curr Protoc Microbiol [Internet]. 2010 Aug;18(1). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780471729259.mc10e01s18>
 37. Duque JE, López R. Evaluación preliminar para aislamiento e identificación bioquímica de Streptomyces sp. 2019;
 38. Schöller CEG, Gürtler H, Pedersen R, Molin S, Wilkins K. Volatile Metabolites from Actinomycetes. J Agric Food Chem [Internet]. 2002 Apr 1;50(9):2615–21. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0116754>
 39. Sharma M, Dangi P, Choudhary M. Actinomycetes: source, identification, and their applications. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2014;3(2):801–32.
 40. Insam H, Seewald MSA. Volatile organic compounds (VOCs) in soils. Biol Fertil Soils [Internet]. 2010 Mar 13;46(3):199–213. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00374-010-0442-3>
 41. Sanchez L. Estudio microscópico de microorganismos. Univ Autónoma del

- Estado Morelos [Internet]. 2017;40. Available from:
https://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/70467/secme-29089_1.pdf?sequence=1
42. López R, Lemus JA. Multiplicación de *Streptomyces* sp. con propósitos de biocompostaje de subproductos de caña de azúcar. 2019;
 43. Ayála F, Marcela D. Determinación de la actividad quitinolítica de cepas nativas de actinomicetos y su efecto antagónico sobre microorganismos fitopatógenos [Internet]. Pontificia Universidad Javeriana; 2009. Available from:
<http://hdl.handle.net/10554/8218>
 44. Krieg NR, Padgett PJ. Phenotypic and Physiological Characterization Methods. In 2011. p. 15–60. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123877307000036>
 45. Tresner HD, Davies MC, Backus EJ. Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. *J Bacteriol* [Internet]. 1961 Jan;81(1):70–80. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.81.1.70-80.1961>
 46. Aryal S. Oxidase Test- Principle, Uses, Procedure, Types, Result Interpretation, Examples and Limitations [Internet]. 2018. p. 1. Available from:
<https://microbiologyinfo.com/oxidase-test-principle-uses-procedure-types-result-interpretation-examples-and-limitations/#:~:text=The oxidase test is used to determine if,are many method variations to the oxidase test.>
 47. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, Boone DR, Vos P De, et al. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*. Springer. [Internet]. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, Boone DR, De Vos P, et al., editors. Boston, MA: Springer US; 2005. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/0-387-28022-7>
 48. Bernardet J-F, Bowman J. The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. *Proteobacteria Delta Epsil Subclasses Deep Rooted Bact*. 2006;7:481–532.
 49. Beltrán-Pineda ME, Bernal-Figueroa AA. Biofertilizantes: alternativa biotecnológica para los agroecosistemas. *Rev Mutis* [Internet]. 2022 Jan;12(1). Available from:
<https://revistas.utadeo.edu.co/index.php/mutis/article/view/Biofertilizantes-alternativa-biotecnologica-para-agroecosistemas>
 50. Tamayo Rivera P. Caracterización de los principales grupos de microorganismos en un suelo volcánico de la zona Andina del Ecuador [Internet]. Universidad central de Ecuador; 2021. Available from:
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/25162/1/UCE-FAG-CIA-TAMAYO PAULO.pdf>