

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN INGENIERÍA Y CIENCIAS
AMBIENTALES**



**“CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS
BENÉFICOS PROVENIENTES DE TRES PISOS
ALTITUDINALES DE AZUAY - ECUADOR Y SU INFLUENCIA
EN EL CULTIVO DE FRESA”**

Presentada por:

MANUEL SALVADOR ALVAREZ VERA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN INGENIERÍA Y CIENCIAS
AMBIENTALES**

Lima - Perú

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN INGENIERÍA Y CIENCIAS
AMBIENTALES**

**“CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS
BENÉFICOS PROVENIENTES DE TRES PISOS
ALTITUDINALES DE AZUAY - ECUADOR Y SU INFLUENCIA
EN EL CULTIVO DE FRESA”**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR

Doctoris Philosophiae

Presentada por:

MANUEL SALVADOR ALVAREZ VERA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ph.D. José Calle Maraví
PRESIDENTE

Dr. Víctor Meza Contreras
PATROCINADOR

Dra. Lia Ramos Fernández
MIEMBRO

Dr. Oscar Loli Figueroa
MIEMBRO

Dr. Enrique Pereyra Zelada
MIEMBRO EXTERNO

DEDICATORIA

A toda mi familia

AGRADECIMIENTO

A todos quienes contribuyeron en el desarrollo de esta investigación

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE ANEXOS	xxiv
RESUMEN	xxv
ABSTRACT	xxvi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 MICROORGANISMOS BENÉFICOS	6
2.1.1 Funciones de los microorganismos benéficos	8
a. Producción de reguladores de crecimiento de las plantas	11
b. Fijación de nitrógeno	18
c. Solubilización de fósforo	20
d. Movilización del potasio	21
e. Producción de sideróforos:	22
2.1.2 Microorganismos como biofertilizantes	23
2.1.3 Microorganismos como biopesticidas	24
2.1.4 Bioremediación de suelos con microorganismos benéficos	25
a. Bioremediación de suelos contaminados con metales pesados	25
b. Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos	26
c. Bioremediación de suelos contaminados con pesticidas	27
2.1.5 Microorganismos benéficos y cultivo de fresa	28
2.1.6 Inoculación de microorganismos benéficos	30
2.2 MICROORGANISMOS EFICIENTES EM	31
2.2.1 Tipos de Microorganismos Eficientes	32
a. Bacterias fotosintéticas (<i>Rhodospseudomona</i> spp.)	33
b. Bacterias acidolácticas (<i>Lactobacillus</i> spp.)	34
c. Levaduras (<i>Saccharomyces</i> spp.)	35

2.2.2	Importancia agrícola	36
2.2.3	Efectos de los EM en el rendimiento de los cultivos	37
2.2.4	Efecto antagónico de los Microorganismos Eficientes	38
2.2.5	Microorganismos Eficientes, patógenos y cultivo de fresa	39
2.3	HÁBITATS MICROBIANOS	41
2.4	MEDIOS DE CULTIVO PARA MICROORGANISMOS	43
2.4.1	Medios de cultivo para bacterias fototróficas o fotosintéticas	43
2.4.2	Medios de cultivo para bacterias ácido lácticas	43
2.4.3	Medios de cultivo para levaduras	44
2.4.4	Sistemas miniaturizados API®	45
a.	Inoculación de los sistemas miniaturizados	46
b.	Interpretación de los resultados	46
2.5	AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS	47
2.5.1	Aislamiento de microorganismos benéficos	47
2.5.2	Técnicas de siembra de bacterias y levaduras	48
2.5.3	Cultivo de hongos filamentosos	49
2.6	CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS	50
2.6.1	Caracterización fenotípica	51
a.	Morfología	51
b.	Tinción de Gram	52
c.	Test bioquímico	56
2.6.2	Caracterización molecular	57
a.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	57
2.6.3	Caracterización genómica	59
a.	Ribotipado	59
2.6.4	La electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente (DGGE)	61
2.7	EL CULTIVO DE LA FRESA	62
2.7.1	Características morfológicas	62
2.7.2	Requerimientos de cultivo	63
2.7.3	Plagas y enfermedades	64
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	65
3.1	ZONA DE ESTUDIO	65

3.2	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS VEGETALES	66
3.3	TIPO DE MUESTRAS RECOLECTADAS	67
3.4	PREPARACIÓN DEL CULTIVO MADRE	70
3.5	PRODUCCIÓN DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS (MOBs)	72
3.6	DETERMINACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC.ml⁻¹)	74
3.6.1	Recuento de levaduras UFC.ml ⁻¹	74
3.6.2	Recuento de <i>Bacillus</i> spp. UFC.ml ⁻¹	75
3.6.3	Recuento de <i>Lactobacillus</i> spp. UFC.ml ⁻¹	76
3.6.4	Recuento de actinomicetos UFC.ml ⁻¹	76
3.6.5	Recuento de <i>Pseudomonas</i> spp. UFC.ml ⁻¹	77
3.7	AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS	78
3.8	OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS	79
3.8.1	Observación de levaduras	79
3.8.2	Observación de <i>Bacillus</i> spp.	81
3.8.3	Observación de <i>Lactobacillus</i> spp.	83
3.8.4	Observación de actinomicetos	86
3.8.5	Observación de <i>Pseudomonas</i> spp.	88
3.9	IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	88
3.9.1	Identificación de levaduras	88
3.9.2	Identificación de <i>Bacillus</i> spp.	90
3.9.3	Identificación de <i>Lactobacillus</i> spp.	92
3.9.4	Identificación de actinomicetos	94
3.10	EVALUACIÓN DE ANTAGONISMO DE <i>Bacillus</i> spp. y <i>Lactobacillus</i> spp. ANTE <i>Fusarium</i> sp.	94
3.11	EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES PROTEOLÍTICAS DE <i>Bacillus</i> spp. y <i>Lactobacillus</i> spp.	96
3.12	EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS EN EL CULTIVO DE FRESA	97

3.12.1	Preparación del suelo	98
3.12.2	Análisis de suelo	99
3.12.3	Elaboración de parcelas	100
3.12.4	Instalación del sistema de riego	100
3.12.5	Colocación de acolchado	101
3.12.6	Variedad cultivada	102
3.12.7	Inoculación de microorganismos benéficos	102
3.12.8	Trasplante	103
3.12.9	Riego	104
3.12.10	Fertilización	104
3.12.11	Desarrollo del cultivo	105
3.12.12	Controles culturales	107
3.12.13	Plagas y enfermedades	108
3.12.14	Altura de plantas	109
3.12.15	Diámetro de plantas	109
3.12.16	Número de hojas por planta	110
3.12.17	Longitud de raíces	110
3.12.18	Características físicas, químicas y biológicas del suelo 120 días después del trasplante	111
3.13	ANÁLISIS DE DATOS	112
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	114
4.1	EVALUACIÓN DEL pH EN EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS	114
4.1.1	Determinación del pH en el medio de cultivo madre	114
a.	Evaluación del pH en el medio de cultivo madre de las muestras provenientes del piso altitudinal uno	114
b.	Evaluación del pH en el medio de cultivo madre de las muestras provenientes del piso altitudinal dos	115
c.	Evaluación del pH en el medio de cultivo madre de las muestras provenientes del piso altitudinal tres	116
4.1.2	Registro de pH en la producción de microorganismos benéficos de los diferentes pisos altitudinales.	117

a.	Registro de pH en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de las muestras provenientes del piso altitudinal uno _____	117
b.	Registro de pH en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de las muestras provenientes del piso altitudinal dos _____	118
c.	Registro de pH en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de las muestras provenientes del piso altitudinal tres. _____	119
4.2	UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE MICROORGANISMOS BENÉFICO (UFC.ml⁻¹) POR PISO ALTITUDINAL Y POR ESPECIE VEGETAL _____	122
4.2.1	Unidades formadoras de colonias de levaduras (UFC.ml ⁻¹) _____	122
a.	Unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos del piso altitudinal uno _____	122
b.	Unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos _____	124
c.	Unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos del piso altitudinal tres _____	126
d.	Unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos de tres pisos altitudinales _____	127
e.	Unidades formadoras de colonias de levaduras de acuerdo al piso altitudinal _____	130
4.2.2	Unidades formadoras de colonias de <i>Bacillus</i> spp. (UFC.ml ⁻¹) _____	132
a.	Unidades formadoras de colonias de <i>Bacillus</i> spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal uno _____	132
b.	Unidades formadoras de colonias de <i>Bacillus</i> spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos _____	133
c.	Unidades formadoras de colonias de <i>Bacillus</i> spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal tres _____	135
d.	Unidades formadoras de colonias de <i>Bacillus</i> spp., en los consorcios microbianos de tres pisos altitudinales _____	136
e.	Unidades formadoras de colonias de <i>Bacillus</i> spp., de acuerdo al piso altitudinal _____	139
4.2.3	Unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp. (UFC.ml ⁻¹) _____	140
a.	Unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal uno _____	140

b.	Unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos _____	142
c.	Unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal tres _____	143
d.	Unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp., en los consorcios microbianos de tres pisos altitudinales _____	145
e.	Unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp., en los consorcios microbianos de acuerdo al piso altitudinal _____	148
4.2.4	Unidades formadoras de colonias de actinomicetos (UFC.ml ⁻¹) _____	150
a.	Unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos del piso altitudinal uno _____	150
b.	Unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos _____	151
c.	Unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos del piso altitudinal tres _____	153
d.	Unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos de tres pisos altitudinales _____	154
e.	Unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos de acuerdo al piso altitudinal _____	157
4.3	IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS _____	162
4.3.1	Identificación de levaduras mediante perfil numérico de los sistemas miniaturizados API 20 CAUX V5.0 _____	162
4.3.2	Identificación de <i>Bacillus</i> spp., mediante código de los sistemas miniaturizados API 50 CHB V4.1 _____	164
4.3.3	Identificación de <i>Lactobacillus</i> spp., mediante código de los sistemas miniaturizados API 50 CHL V5.2 _____	167
4.3.4	Identificación de actinomicetos _____	170
4.4	ANTAGONISMO Y CAPACIDAD PROTEOLÍTICA DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS _____	175
4.4.1	Antagonismo de <i>Bacillus</i> spp. ante <i>Fusarium</i> spp. _____	175
4.4.2	Antagonismo de <i>Lactobacillus</i> spp. ante <i>Fusarium</i> spp. _____	179
4.5	CARÁCTERÍSTICAS DEL SUELO _____	182
4.5.1	pH del suelo _____	182

4.5.2	Conductividad eléctrica _____	184
4.5.3	Capacidad de intercambio catiónico _____	186
4.5.4	Materia orgánica _____	187
4.5.5	Nitrógeno _____	190
4.5.6	Fósforo _____	192
4.5.7	Potasio _____	195
4.6	RECuento DE MICROORGANISMOS DEL SUELO _____	197
4.6.1	Recuento de <i>Bacillus</i> sp. (UFC.g ⁻¹) _____	197
4.6.2	Recuento de <i>Lactobacillus</i> sp. (UFC.g ⁻¹) _____	198
4.6.3	Recuento de mohos (UFC.g ⁻¹) _____	199
4.6.4	Enumeración de <i>Pseudomonas</i> sp. (NMP.g ⁻¹) _____	200
4.6.5	Recuento de actinomicetos (UFC.g ⁻¹) _____	201
4.7	ANÁLISIS FITOPATOLÓGICO DEL SUELO _____	205
4.7.1	<i>Rhizopus</i> sp. (UFC.g ⁻¹) _____	206
4.7.2	<i>Aspergillus niger</i> (UFC.g ⁻¹) _____	207
4.7.3	<i>Fusarium oxisporum</i> (UFC.g ⁻¹) _____	208
4.7.4	<i>Fusarium solani</i> (UFC.g ⁻¹) _____	209
4.7.5	<i>Cladosporium</i> sp. (UFC.g ⁻¹) _____	210
4.8	ANÁLISIS NEMATOLÓGICO DEL SUELO _____	214
4.8.1	<i>Aphelenchus</i> (N° de individuos/100 cc de suelo) _____	215
4.8.2	<i>Dorylaimidos</i> (N° de individuos/100 cc de suelo) _____	216
4.8.3	<i>Rhabditidos</i> (N° de individuos/100 cc de suelo) _____	217
4.8.4	<i>Pratylenchus</i> (N° de individuos/100 cc de suelo) _____	218
4.8.5	<i>Meloidogyne</i> (Nivel de nodulación) _____	219
4.9	ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS DE FRESA (<i>Fragaria</i> sp.) _____	224
4.10	DESARROLLO DE LAS PLANTAS DE FRESA (<i>Fragaria</i> sp.) _____	228
4.10.1	Altura de plantas _____	228
a.	Altura de plantas 60 días después del trasplante _____	228
b.	Altura de plantas 90 días después del trasplante _____	230
c.	Altura de plantas 120 días después del trasplante _____	232
4.10.2	Diámetro de plantas _____	233
a.	Diámetro de plantas 60 días después del trasplante _____	233

b.	Diámetro de plantas 90 días después del trasplante _____	235
c.	Diámetro de plantas 120 días después del trasplante _____	236
4.10.3	Número de hojas por planta _____	238
a.	Número de hojas por planta 90 días después del trasplante _____	238
b.	Número de hojas por planta 120 días después del trasplante _____	239
4.10.4	Longitud de raíces _____	241
4.10.5	Relación entre crecimiento de raíces y altura de plantas _____	243
4.10.6	Correlación entre características de crecimiento de plantas de fresa _____	248
V.	CONCLUSIONES _____	257
VI.	RECOMENDACIONES _____	261
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	262
VIII.	ANEXOS _____	292

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Fitohormonas más importantes producidas por microbios _____	13
Cuadro 2: Código de las muestras vegetales de acuerdo al piso altitudinal _____	70
Cuadro 3: Ingredientes y cantidades necesarias para preparar la solución madre de MOBs _____	70
Cuadro 4: Ingredientes y cantidades necesarias para la producción de MOBs _____	72
Cuadro 5: Medios de cultivo para microorganismos benéficos _____	74
Cuadro 6: Código de las pruebas API 20 CAUX para identificación de levaduras _____	89
Cuadro 7: Código de las pruebas API 50 CHB para identificación de <i>Bacillus</i> spp. _____	92
Cuadro 8: Código de las pruebas API 50 CHL para identificación de <i>Lactobacillus</i> _____	94
Cuadro 9: Tratamientos para evaluación de microorganismos benéficos en el cultivo de fresa (<i>Fragaria</i> sp.) _____	97
Cuadro 10: Valores de pH en el medio de cultivo madre de las muestras del piso altitudinal uno _____	114
Cuadro 11: Valores de pH en los medios de cultivo madre de las muestras del piso altitudinal dos _____	115
Cuadro 12: Valores de pH en los medios de cultivo madre de la muestras del piso altitudinal tres _____	116
Cuadro 13: Valores de pH en los medios de cultivo de MOBs de las muestras del piso altitudinal uno _____	117
Cuadro 14: Valores de pH en los medios de cultivo de MOBs de las muestras del piso altitudinal dos _____	118
Cuadro 15: Valores de pH en los medios de cultivo de MOBs de las muestras del piso altitudinal tres _____	120
Cuadro 16: Respuesta de UFC.ml ⁻¹ para levaduras en el piso altitudinal uno _____	123
Cuadro 17: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos del piso altitudinal uno _____	123
Cuadro 18: Respuesta de UFC.ml ⁻¹ para levaduras en el piso altitudinal dos _____	124
Cuadro 19: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos _____	125
Cuadro 20: Respuesta de UFC.ml ⁻¹ para levaduras en el piso altitudinal tres _____	126

Cuadro 21: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos del piso altitudinal tres _____	127
Cuadro 22: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos de tres pisos altitudinales _____	128
Cuadro 23: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de levaduras en consorcios microbianos de tres pisos altitudinales _____	130
Cuadro 24: Respuesta de UFC.ml ⁻¹ para <i>Bacillus</i> spp., en el piso altitudinal uno _____	132
Cuadro 25: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de <i>Bacillus</i> spp., en los consorcio microbianos del piso altitudinal uno _____	132
Cuadro 26: Respuesta de UFC.ml ⁻¹ para <i>Bacillus</i> spp. en el piso altitudinal dos _____	133
Cuadro 27: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de <i>Bacillus</i> spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos _____	134
Cuadro 28: Respuesta de UFC.ml ⁻¹ para <i>Bacillus</i> spp., en el piso altitudinal tres _____	135
Cuadro 29: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de <i>Bacillus</i> spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal tres _____	136
Cuadro 30: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades de formación de colonias de <i>Bacillus</i> spp. en diferentes especies vegetales en tres pisos altitudinales _____	137
Cuadro 31: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de <i>Bacillus</i> spp., en consorcios microbianos de tres pisos altitudinales _____	139
Cuadro 32: Respuesta de UFC.ml ⁻¹ para <i>Lactobacillus</i> spp. en el piso altitudinal uno _____	140
Cuadro 33: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal uno _____	141
Cuadro 34: Respuesta de UFC.ml ⁻¹ para <i>Lactobacillus</i> spp., en el piso altitudinal dos _____	142

Cuadro 35: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos _____	142
Cuadro 36: Respuesta de UFC.ml ⁻¹ para <i>Lactobacillus</i> spp. en el piso altitudinal tres __	144
Cuadro 37: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal tres _____	144
Cuadro 38: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp., en consorcios microbianos de tres pisos altitudinales _____	145
Cuadro 39: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp., en consorcios microbianos de tres pisos altitudinales _____	149
Cuadro 40: Respuesta de UFC.ml ⁻¹ de actinomicetos en el piso altitudinal uno _____	150
Cuadro 41: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos del piso altitudinal uno _____	150
Cuadro 42: Respuesta de UFC.ml ⁻¹ para de actinomicetos en el piso altitudinal dos ____	151
Cuadro 43: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos _____	152
Cuadro 44: Respuesta de UFC.ml ⁻¹ de actinomicetos en el piso altitudinal tres _____	153
Cuadro 45: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los medios de cultivo del piso altitudinal tres _____	153
Cuadro 46: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de actinomicetos en consorcios microbianos de tres pisos altitudinales _____	155
Cuadro 47: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos de acuerdo al piso altitudinal. _____	157
Cuadro 48: Levaduras identificadas mediante perfil numérico de los sistemas miniaturizados API 20 CAUX V50 _____	162

Cuadro 49: <i>Bacillus</i> identificados mediante código de los sistemas miniaturizados API 50 CHB V4.1 _____	165
Cuadro 50: <i>Lactobacillus</i> identificados mediante código de los sistemas miniaturizados API 50 CHB V4.1 _____	168
Cuadro 51: Actinomicetos identificados mediante amplificación 16S-PCR de los lisados de ADN de las cepas en estudio _____	171
Cuadro 52: Niveles de antagonismo de <i>Bacillus</i> spp. de las muestras vegetales del piso altitudinal uno _____	175
Cuadro 53: Niveles de antagonismo de <i>Bacillus</i> spp. de las muestras vegetales del piso altitudinal dos _____	176
Cuadro 54: Niveles de antagonismo de <i>Bacillus</i> spp. de las muestras vegetales del piso altitudinal tres _____	176
Cuadro 55: Niveles de antagonismo de <i>Lactobacillus</i> spp. de las muestras vegetales del piso altitudinal uno _____	179
Cuadro 56: Niveles de antagonismo de <i>Lactobacillus</i> spp. de las muestras vegetales del piso altitudinal dos _____	179
Cuadro 57: Niveles de antagonismo de <i>Lactobacillus</i> spp. de las muestras vegetales del piso altitudinal tres _____	180
Cuadro 58: Comparación entre valores de pH _____	182
Cuadro 59: Comparación entre valores de CE _____	184
Cuadro 60: Comparación entre valores de la CIC meq/100 g _____	186
Cuadro 61: Comparación entre valores de MO _____	187
Cuadro 62: Comparación entre valores de N _____	190
Cuadro 63: Comparación entre valores de fósforo _____	192
Cuadro 64: Comparación entre contenidos de potasio en el suelo _____	195
Cuadro 65: Comparación de recuento de <i>Bacillus</i> sp. (UFC.g ⁻¹) _____	197
Cuadro 66: Comparación de recuento de <i>Lactobacillus</i> sp. (UFC.g ⁻¹) _____	198
Cuadro 67: Comparación de recuento de mohos (UFC.g ⁻¹) _____	199
Cuadro 68: Comparación de enumeración de <i>Pseudomonas</i> sp. (NMP.g ⁻¹) _____	201
Cuadro 69: Comparación de recuento de actinomicetos (UFC.g ⁻¹) _____	202
Cuadro 70: Comparación de recuento de <i>Rhizopus</i> sp. (UFC.g ⁻¹) _____	206
Cuadro 71: Comparación de recuento de <i>Aspergillus niger</i> (UFC.g ⁻¹) _____	207
Cuadro 72: Comparación de recuento de <i>Fusarium oxisporum</i> (UFC.g ⁻¹) _____	208
Cuadro 73: Comparación de recuento de <i>Fusarium solani</i> (UFC.g ⁻¹) _____	209

Cuadro 74: Comparación de recuento de <i>Cladosporium</i> sp. (UFC.g ⁻¹) _____	210
Cuadro 75: Comparación de número de <i>Aphelenchus</i> por 100cc de suelo _____	215
Cuadro 76: Comparación de número de <i>Dorylaimidos</i> por 100cc de suelo _____	216
Cuadro 77: Comparación de número de <i>Rhabditidos</i> por 100cc de suelo _____	217
Cuadro 78: Comparación de número de <i>Pratylenchus</i> por 100cc de suelo _____	218
Cuadro 79: Comparación del nivel de nodulación de <i>Meloidogyne</i> en raíces de plantas de fresa (<i>Fragaria</i> sp.) _____	219
Cuadro 80: Enfermedades identificadas en el cultivo de fresa (<i>Fragaria</i> sp.) _____	226
Cuadro 81: Altura de plantas 60 días después del trasplante _____	228
Cuadro 82: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para altura de plantas 60 días después del trasplante _____	229
Cuadro 83: Altura de plantas 90 días después del trasplante _____	230
Cuadro 84: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para altura de plantas 90 días después del trasplante _____	231
Cuadro 85: Altura de plantas 120 días después del trasplante _____	232
Cuadro 86: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para altura de plantas 120 días después del trasplante _____	232
Cuadro 87: Diámetro de plantas 60 días después del trasplante _____	233
Cuadro 88: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para diámetro de plantas 60 días después del trasplante _____	234
Cuadro 89: Diámetro de plantas 90 días después del trasplante _____	235
Cuadro 90: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para diámetro de plantas 90 días después del trasplante _____	235
Cuadro 91: Diámetro de plantas 120 días después del trasplante _____	236
Cuadro 92: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para diámetro de plantas 120 días después del trasplante _____	237
Cuadro 93: Número de hojas por plantas 90 días después del trasplante _____	238
Cuadro 94: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para número de hojas por plantas 90 días después del trasplante _____	238
Cuadro 95: Número de hojas por plantas 120 días después del trasplante _____	239
Cuadro 96: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para número de hojas por plantas 120 días después del trasplante. _____	240
Cuadro 97: Características de las raíces de plantas de fresas 120 días después del trasplante _____	241

Cuadro 98: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para longitud de raíces 120 días después del trasplante _____	242
Cuadro 99: Comparación entre altura de plantas y longitud de raíces 120 días después del trasplante _____	244
Cuadro 100: Relación entre peso fresco de raíces y peso seco de raíces 120 días después del trasplante _____	245
Cuadro 101: Relación entre peso fresco de hojas y peso seco de hojas 120 días después del trasplante _____	246
Cuadro 102: Relación entre peso seco y longitud de raíces 120 días después del trasplante _____	247
Cuadro 103: Características morfológicas de las plantas de fresa (<i>Fragaria</i> sp.) 120 días después del trasplante _____	249
Cuadro 104: Correlación entre las características morfológicas de las plantas de fresa (<i>Fragaria</i> sp.) 120 días después del trasplante _____	250

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Función de los hongos micorrícicos absculares (HMA) en la promoción del crecimiento de las plantas (PGP) _____	7
Figura 2: Mecanismos de las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas ____	10
Figura 3: Diagrama esquemático del ciclo celular de la planta y acciones reguladoras de las fitohormonas _____	12
Figura 4: Vías de biosíntesis de auxinas dependientes de triptófano en microorganismos	13
Figura 5: Vías de biosíntesis de auxinas dependientes de triptófano en plantas y microorganismos _____	15
Figura 6: Visión general de las rutas biosintéticas del IAA en bacterias _____	16
Figura 7: Estimulación de la auxina para la ramificación y crecimiento de las raíces ____	17
Figura 8: Contribución microbiana a la nutrición de nitrogenada de las plantas _____	19
Figura 9: Esquema de representación de la solubilización de fósforo del suelo por PGPR	21
Figura 10: Posibles contribuciones microbianas a la nutrición de Fe a la planta _____	22
Figura 11: Microorganismos utilizados para la explotación de biofertilizantes _____	23
Figura 12: Interacción de la planta, exudados de raíz, patógenos, PGPR y otros microbios beneficios en la rizósfera _____	25
Figura 13: Vías de biosíntesis de auxinas dependientes de triptófano en plantas de fresa_	30
Figura 14: Microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados ____	45
Figura 15: Esquema general de pruebas morfológicas e identificación bioquímica por el sistema API 50CHL _____	47
Figura 16: Ilustración de la apariencia de cocos gram positivos y de bacilos gram negativos en diferentes estadios del procedimiento de tinción de Gram _____	52
Figura 17: Diagrama de flujo de la tinción de Gram de características y la morfología de bacterias _____	53
Figura 18: Organigrama de identificación de bacterias Gram positivas de acuerdo a su forma bacilar _____	54
Figura 19: Diagrama para identificación de <i>Bacillus</i> spp. _____	55
Figura 20: Protocolo para la reacción en cadena de la polimerasa _____	59
Figura 21: Protocolo para la separación electroforética de una mezcla de fragmentos de ADN _____	61
Figura 22: Mapa del área de estudio y ubicación de especies vegetales _____	65
Figura 23: Verificación de la altitud del primer piso altitudinal _____	66

Figura 24: Levantamiento de información relacionada con cada una de las plantas y sus usos _____	66
Figura 25: Planta de café (<i>Coffea arabica</i> L.) _____	67
Figura 26: Planta de plátano (<i>Musa paradisiaca</i> L.) _____	67
Figura 27: Planta de girasol (<i>Tithonia diversifolia</i>) _____	67
Figura 28: Planta de ruda (<i>Ruta graveolens</i> L.) _____	68
Figura 29: Planta de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) _____	68
Figura 30: Planta de cedrón (<i>Aloysia triphylla</i>) _____	68
Figura 31: Planta de menta (<i>Mentha piperita</i>) _____	68
Figura 32: Planta de diente de león (<i>Taraxacum officinale</i> Weber.) _____	69
Figura 33: Planta de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) _____	69
Figura 34: Planta de geranio (<i>Pelargonium graveolens</i>) _____	69
Figura 35: Planta de altamisa (<i>Artemisia vulgaris</i>) _____	69
Figura 36: Planta de canayuyo (<i>Sonchus oleraceus</i>) _____	69
Figura 37: Preparación de muestras a) Muestra de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) b) Fragmentación de muestras c) Pesado de muestras _____	71
Figura 38: Bolsas plásticas con hígado, sal y muestra vegetal _____	71
Figura 39: Muestras de tres pisos altitudinales colocadas en bolsas plásticas _____	71
Figura 40: Estado de las muestras 4 días después preparada la solución _____	72
Figura 41: Estado de las muestras 8 días después de preparada la solución _____	72
Figura 42: Muestras y equipos para determinar el pH y conductividad eléctrica _____	72
Figura 43: Determinación de pH y conductividad eléctrica de la solución líquida _____	72
Figura 44: Autoclavado de envases para activación de microorganismos benéficos _____	73
Figura 45: Envases y solución líquida luego del proceso de autoclavado _____	73
Figura 46: Determinación del pH de las muestras después de la activación de microorganismos benéficos _____	73
Figura 47: Estado de las muestras de microorganismos benéficos, ocho días después de la activación _____	73
Figura 48: Desarrollo de colonias de levaduras en la muestra M2P3 _____	75
Figura 49: Desarrollo de colonias de <i>Bacillus</i> spp. en la muestra M1P2 _____	75
Figura 50: Colonias de <i>Latobacillus</i> spp. luego de 48 horas de incubación _____	76
Figura 51: Desarrollo de colonias de actinomicetos en la muestra M3P2 _____	77
Figura 52: Ausencia de <i>Pseudomonas</i> spp. en la muestra M1P3 _____	78
Figura 53: Cultivo puro de levadura de la muestra M3P2 _____	78

Figura 54: Cultivo puro de <i>Lactobacillus</i> spp. de la muestra M2P2 _____	78
Figura 55: Cultivo puro de <i>Bacillus</i> spp. de la muestra M4P3 _____	78
Figura 56: Cultivo puro de actinomicetos de la muestra M5P3 _____	78
Figura 57: Observación microscópica de levaduras en la muestra M1P1 _____	79
Figura 58: Observación microscópica de levaduras en la muestra M2P1 _____	79
Figura 59: Observación microscópica de levaduras en la muestra M3P1 _____	80
Figura 60: Observación microscópica de levaduras en la muestra M1P2 _____	80
Figura 61: Observación microscópica de levaduras en la muestra M2P2 _____	80
Figura 62: Observación microscópica de levaduras en la muestra M3P2 _____	80
Figura 63: Observación microscópica de levaduras en la muestra M4P2 _____	80
Figura 64: Observación microscópica de levaduras en la muestra M1P3 _____	80
Figura 65: Observación microscópica de levaduras en la muestra M2P3 _____	81
Figura 66: Observación microscópica de levaduras en la muestra M3P3 _____	81
Figura 67: Observación microscópica de levaduras en la muestra M4P3 _____	81
Figura 68: Observación microscópica de levaduras en la muestra M5P3 _____	81
Figura 69: Observación microscópica de <i>Bacillus</i> spp. en la muestra M1P1 _____	82
Figura 70: Observación microscópica de <i>Bacillus</i> spp. en la muestra M2P1 _____	82
Figura 71: Observación microscópica de <i>Bacillus</i> spp. en la muestra M3P1 _____	82
Figura 72: Observación microscópica de <i>Bacillus</i> spp. en la muestra M1P2 _____	82
Figura 73: Observación microscópica de <i>Bacillus</i> spp. en la muestra M2P2 _____	82
Figura 74: Observación microscópica de <i>Bacillus</i> spp. en la muestra M3P2 _____	82
Figura 75: Observación microscópica de <i>Bacillus</i> spp. en la muestra M4P2 _____	83
Figura 76: Observación microscópica de <i>Bacillus</i> spp. en la muestra M1P3 _____	83
Figura 77: Observación microscópica de <i>Bacillus</i> spp. en la muestra M2P3 _____	83
Figura 78: Observación microscópica de <i>Bacillus</i> spp. en la muestra M3P3 _____	83
Figura 79: Observación microscópica de <i>Bacillus</i> spp. en la muestra M4P3 _____	83
Figura 80: Observación microscópica de <i>Bacillus</i> spp. en la muestra M5P3 _____	83
Figura 81: Observación microscópica de <i>Lactobacillus</i> spp. en la muestra M1P1 _____	84
Figura 82: Observación microscópica de <i>Lactobacillus</i> spp. en la muestra M2P1 _____	84
Figura 83: Observación microscópica de <i>Lactobacillus</i> spp. en la muestra M3P1 _____	84
Figura 84: Observación microscópica de <i>Lactobacillus</i> spp. en la muestra M1P2 _____	84
Figura 85: Observación microscópica de <i>Lactobacillus</i> spp. en la muestra M2P2 _____	85
Figura 86: Observación microscópica de <i>Lactobacillus</i> spp. en la muestra M3P2 _____	85
Figura 87: Observación microscópica de <i>Lactobacillus</i> spp. en la muestra M4P2 _____	85

Figura 88: Observación microscópica de <i>Lactobacillus</i> spp. en la muestra M1P3	85
Figura 89: Observación microscópica de <i>Lactobacillus</i> spp. en la muestra M2P3	85
Figura 90: Observación microscópica de <i>Lctobacillus</i> spp. en la muestra M3P3	85
Figura 91: Observación microscópica de <i>Lactobacillus</i> spp. en la muestra M4P3	86
Figura 92: Observación microscópica de <i>Lactobacillus</i> spp. en la muestra M5P3	86
Figura 93: Observación microscópica de actinomicetos en la muestra M1P1	86
Figura 94: Observación microscópica de actinomicetos en la muestra M2P1	86
Figura 95: Observación microscópica de actinomicetos en la muestra M3P2	87
Figura 96: Observación microscópica de actinomicetos en la muestra M4P2	87
Figura 97: Observación microscópica de actinomicetos en la muestra M4P3	87
Figura 98: Observación microscópica de actinomicetos en la muestra M5P3A1	87
Figura 99: Observación microscópica de actinomicetos en la muestra M5P3A2	87
Figura 100: Observación microscópica de actinomicetos en la muestra M5P3A3	87
Figura 101: Observación de turbidez en diferentes cúpulas de API 20 C AUX	88
Figura 102: Hoja de registro de turbidez de API 20 C AUX	89
Figura 103: Diferentes tonalidades de color en los microtubos de API 50 CHB (24 horas)	91
Figura 104: Hoja de registro de códigos API 50 CHB para identificación de <i>Bacillus</i> spp.	91
Figura 105: Diferentes tonalidades de color en las cúpulas de API 50 CHL (48 horas)	93
Figura 106: Hoja de registro de código de API 50 CHL para <i>Lactobacillus</i> spp.	93
Figura 107: Ausencia de antagonismo de <i>Bacillus</i> spp. de la muestra M1P1B1 ante <i>Fusarium</i> sp.	95
Figura 108: Bajo nivel de antagonismo de <i>Lactobacillus</i> spp. de la muestra M3P2L1 ante <i>Fusarium</i> sp.	95
Figura 109: Nivel medio de antagonismo de <i>Bacillus</i> spp. de la muestra M4P2B1 ante <i>Fusarium</i> sp.	96
Figura 110: Alto nivel de antagonismo de <i>Lactobacillus</i> spp. de la muestra M3P2L3 ante <i>Fusarium</i> sp.	96
Figura 111: Halo pequeño en <i>Bacillus</i> de la muestra M3P1B1	97
Figura 112: Halo grande en <i>Lactobacillus</i> de la muestra M4P3L1	97
Figura 113: Distribución de las unidades experimentales y dimensiones del campo experimental	98
Figura 114: Preparación de suelo con arado de discos	99

Figura 115: Mullido de suelo con rastra_____	99
Figura 116: Excavación del suelo para recolección de muestra_____	99
Figura 117: Formas de parcelas para cultivo de fresa (<i>Fragaria</i> sp.)_____	100
Figura 118: Dos laterales de riego por cada parcela_____	101
Figura 119: Parcelas con acolchado blanco e identificación de tratamientos _____	101
Figura 120: Secuencia de preparación de micrororganismos benéficos a) Determinación de volúmenes b) Solución de agua con MOBs c) Aplicación de la solución en cada sitio _____	103
Figura 121: Plantas sumergidas en solución de microorganismos benéficos y solución de microorganismos benéficos del piso altitudinal uno, al 2,5% _____	103
Figura 122: Plantas de fresa correctamente trasplantas _____	103
Figura 123: Instrumento utilizado para determinar la humedad del suelo _____	104
Figura 124: Riego localizado en cada planta _____	104
Figura 125: Vermicompost incorporado al suelo antes del trasplante _____	105
Figura 126: Brotación de hojas y flores 15 días después del trasplante _____	105
Figura 127: Estolones emitidos por las plantas de fresa_____	105
Figura 128: Estado de desarrollo de las plantas de fresa 20 días después de la plantación _____	106
Figura 129: Estado de desarrollo de las plantas de fresa 90 días después de la plantación _____	106
Figura 130: Estado de desarrollo de las plantas de fresa 100 días después de la plantación _____	107
Figura 131: Estado de desarrollo de las plantas de fresa 120 días después de la plantación. _____	107
Figura 132: Estado de desarrollo del tratamiento T5, 120 días después de la plantación. _____	107
Figura 133: Planta de fresa afectada por ácaros (<i>Tetranychus</i> sp.) _____	108
Figura 134: Planta de fresa en el tratamiento T4 afectada por <i>Macrophomina</i> sp. _____	109
Figura 135: Planta de fresa en el tratamiento T4 afectada por <i>Fusarium solani</i> _____	109
Figura 136: Registro de altura de plantas _____	109
Figura 137: Registro del diámetro de plantas_____	110
Figura 138: Estado de desarrollo de las hojas de plantas de fresa del tratamiento T1, 90 días después del trasplante _____	110
Figura 139: Proceso de extracción de raíces de plantas de fresa (<i>Fragaria</i> sp.) _____	111
Figura 140: Zona radicular donde se recolectó las muestras del suelo _____	111

Figura 141: Muestras de suelos de los ocho tratamientos _____	111
Figura 142: Ilustración de análisis estadístico y determinación de niveles de significancia _____	112
Figura 143: Ilustración de solapamiento entre medias de los tratamientos _____	112
Figura 144: Variación de pH en los medios de cultivo madre de las muestras del piso altitudinal uno _____	115
Figura 145: Variación de pH en los medios de cultivo madre de las muestras del piso altitudinal dos _____	116
Figura 146: Variación de pH en los medios de cultivo madre de las muestras del piso altitudinal tres _____	117
Figura 147: Variación de pH en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de las muestras del piso altitudinal uno _____	118
Figura 148: Variación de pH en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de las muestras del piso altitudinal dos _____	119
Figura 149: Variación de pH en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de las muestras del piso altitudinal tres _____	120
Figura 150: Comparación de UFC de levaduras en los medios de cultivo de microorganismos benéficos del piso altitudinal uno _____	124
Figura 151: Comparación de UFC de levaduras en los medios de cultivo de microorganismos benéficos del piso altitudinal dos _____	125
Figura 152: Comparación de UFC de levaduras en los medios de cultivo de microorganismos benéficos del piso altitudinal tres _____	127
Figura 153: Comparación de UFC de levaduras en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de tres pisos altitudinales _____	128
Figura 154: Comparación de UFC de levaduras en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de acuerdo al piso altitudinal _____	131
Figura 155: Comparación de UFC de <i>Bacillus</i> spp., en los medios de cultivo de microorganismos benéficos del piso altitudinal uno _____	133
Figura 156: Comparación de UFC de <i>Bacillus</i> spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos _____	134
Figura 157: Comparación de UFC de <i>Bacillus</i> spp. en los consorcios microbianos del piso altitudinal tres _____	136
Figura 158: Comparación de UFC de <i>Bacillus</i> spp. en consorcios microbianos de tres pisos altitudinales _____	137

Figura 159: Comparación de UFC de <i>Bacillus</i> spp., en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de acuerdo al piso altitudinal _____	139
Figura 160: Comparación de unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp., en los medios de cultivo de microorganismos benéficos del piso altitudinal uno ____	141
Figura 161: Comparación de unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp., en los medios de cultivo de microorganismos benéficos piso altitudinal dos _	143
Figura 162: Comparación de unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp., en los medios de cultivo de microorganismos benéficos del piso altitudinal tres ____	145
Figura 163: Comparación de unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp., en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de tres pisos altitudinales _	146
Figura 164: Comparación de unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp., en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de acuerdo al piso altitudinal _____	149
Figura 165: Comparación de UFC de actinomicetos en los medios de cultivo del piso altitudinal uno _____	151
Figura 166: Comparación de UFC de actinomicetos en los en los medios de cultivo de microorganismos benéficos del piso altitudinal dos _____	152
Figura 167: Comparación de UFC de actinomicetos en los medios de cultivo del piso altitudinal tres_____	154
Figura 168: Comparación de UFC de actinomicetos en los medios de cultivo de tres pisos altitudinales _____	155
Figura 169: Comparación de UFC de actinomicetos en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de acuerdo al piso altitudinal _____	157
Figura 170: Potencial de especies vegetales para unidades formadoras de colonias de levaduras, <i>Bacillus</i> spp., y actinomicetos _____	158
Figura 171: Potencial de especies vegetales para unidades formadoras de colonias de <i>Lactobacillus</i> spp. _____	159
Figura 172: Comparación entre valores de pH de los diferentes tratamientos _____	183
Figura 173: Comparación entre valores de CE de los diferentes tratamientos _____	185
Figura 174: Comparación entre valores de la CIC de los diferentes tratamientos _____	186
Figura 175: Comparación entre valores de MO de los diferentes tratamientos _____	188
Figura 176: Comparación entre valores de N de los diferentes tratamientos _____	191
Figura 177: Comparación entre valores de fósforo en los diferentes tratamientos _____	193
Figura 178: Comparación entre los valores de Potasio de los diferentes tratamiento ____	196

Figura 179: Comparación de recuento de <i>Bacillus</i> sp. (UFC.g ⁻¹) de suelos, entre el día cero y 120 días después del trasplante de fresa (<i>Fragaria</i> sp.) _____	198
Figura 180: Comparación de recuento de <i>Lactobacillus</i> sp. (UFC.g ⁻¹) de suelos, entre el día cero y 120 días después del trasplante de fresa (<i>Fragaria</i> sp.) _____	199
Figura 181: Comparación de recuento de mohos (UFC.g ⁻¹) de suelos entre el día cero y 120 días después del trasplante de fresa (<i>Fragaria</i> sp.) _____	200
Figura 182: Comparación de enumeración de <i>Pseudomonas</i> sp. (NMP.g ⁻¹) de suelos, entre el día cero y 120 días después del trasplante de fresa <i>Fragaria</i> sp. _____	201
Figura 183: Comparación de recuento de actinomicetos (UFC.g ⁻¹) de suelos entre el día cero y 120 días después del trasplante de fresa (<i>Fragaria</i> sp.) _____	202
Figura 184: Comparación de recuento de <i>Rhizopus</i> sp. (UFC.g ⁻¹) _____	207
Figura 185: Comparación de recuento de <i>Aspergillus niger</i> (UFC.g ⁻¹) _____	208
Figura 186: Comparación de recuento de <i>Fusarium oxisporum</i> (UFC.g ⁻¹) _____	209
Figura 187: Comparación de recuento de <i>Fusarium solani</i> (UFC.g ⁻¹) _____	210
Figura 188: Comparación de recuento de <i>Cladosporium</i> sp. (UFC.g ⁻¹) _____	211
Figura 189: Comparación de número de <i>Aphelenchus</i> por 100cc de suelo _____	216
Figura 190: Comparación de número de <i>Dorylaimidos</i> por 100cc de suelo _____	217
Figura 191: Comparación de número de <i>Rhabditidos</i> por 100cc de suelo _____	218
Figura 192: Comparación de número de <i>Pratylenchus</i> por 100cc de suelo _____	219
Figura 193: Comparación de nivel de nodulación de <i>Meloidogyne</i> sp. en raíces de plantas de fresa (<i>Fragaria</i>) _____	220
Figura 194: Plantas de fresa (<i>Fragaria</i> sp) enfermas en los diferentes tratamientos ____	225
Figura 195: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para altura de plantas 60 días después del trasplante _____	230
Figura 196: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para altura de plantas 90 días después del trasplante _____	231
Figura 197: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para altura de plantas 120 días después del trasplante _____	233
Figura 198: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para diámetro de plantas 60 días después del trasplante _____	234
Figura 199: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para diámetro de plantas 90 días después del trasplante _____	236
Figura 200: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para diámetro de plantas 120 días después del trasplante _____	237

Figura 201: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para número de hojas por planta 90 días después del trasplante _____	239
Figura 202: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para número de hojas por planta 120 días después del trasplante _____	240
Figura 203: Diferencias en longitud de raíces de plantas de fresa entre los tratamientos T1, T7 y T8, 120 días después del trasplante _____	242
Figura 204: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para longitud de raíces 120 días después del trasplante _____	243
Figura 205: Longitud de raíces de plantas de fresa 120 días después del trasplante _____	243
Figura 206: Relación entre altura de plantas y longitud de raíces 120 días después del trasplante _____	245
Figura 207: Relación entre peso seco y peso fresco de raíces 120 días después del trasplante _____	246
Figura 208: Relación entre peso fresco y peso seco de hojas 120 días después del trasplante _____	247
Figura 209: Relación entre peso seco y longitud de raíces 120 días después del trasplante _____	248
Figura 210: Correlación entre altura de plantas y diámetro de plantas 120 días después del trasplante _____	251
Figura 211: Correlación entre altura de plantas y longitud de raíces 120 días después del trasplante _____	251
Figura 212: Correlación entre peso fresco de hojas y peso seco de hojas 120 días después del trasplante _____	252
Figura 213: Correlación entre peso fresco de raíces y peso seco de raíces 120 días después del trasplante _____	252

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Valores registrados de unidades formadoras de colonias de levaduras en las especies vegetales de tres pisos altitudinales _____	292
ANEXO 2: Valores registrados de unidades formadoras de colonias de Bacillus en las especies vegetales de tres pisos altitudinales _____	293
ANEXO 3: Valores registrados de unidades formadoras de colonias de Lactobacillus en las especies vegetales de tres pisos altitudinales _____	294
ANEXO 4: Valores registrados de unidades formadoras de colonias de actinomicetos en las especies vegetales de tres pisos altitudinales _____	295
ANEXO 5: Resultados del análisis de suelos: caracterización _____	296
ANEXO 6: Resultados del análisis fitopatológico del suelo antes de establecer el cultivo _____	298
ANEXO 7: Resultados del análisis nematológico del suelo antes de establecer el cultivo	299
ANEXO 8: Resultados del análisis microbiológico del suelo antes de establecer el cultivo _____	300
ANEXO 9: Resultados de la caracterización del agua utilizada para regar las plantas de fresa. _____	301
ANEXO 10: Resultados análisis microbiológico de agua para riego de fresas. _____	302
ANEXO 11: Resultados de análisis de vermicompost _____	303
ANEXO 12: Resultados del análisis fitopatológico de una muestra de planta de fresa, tratamiento T1 _____	304
ANEXO 13: Resultados del análisis fitopatológico de una muestra de planta de fresa, tratamiento T4 _____	305
ANEXO 14: Resultados del análisis fitopatológico de una muestra de planta de fresa, tratamiento T4 _____	306
ANEXO 15: Resultados del análisis fitopatológico de muestras de plantas de fresa de los tratamientos T7 y T8. _____	307
ANEXO 16: Resultados de la caracterización del suelo 120 días después de establecido el cultivo _____	308
ANEXO 17: Resultados del análisis fitopatológico del suelo de 8 tratamientos 120 días después de establecido el cultivo. _____	310
ANEXO 18: Resultados del análisis nematológico del suelo de 8 tratamientos 120 días después de establecido el cultivo. _____	312

ANEXO 19: Resultados del análisis microbiológico del suelo 120 días después de establecido el cultivo _____	314
ANEXO 20: Resultados del análisis de los medios API 20 AUX V5.0 para levaduras__	322
ANEXO 21: Resultados del análisis de los medios API 50 CHB V4.1 para <i>Bacillus</i> ____	332
ANEXO 22: Resultados del análisis de los medios API 50 CHL V5.2 para <i>Lactobacillus</i> _____	337
ANEXO 23: Resultados de la identificación de actinomicetos _____	342

RESUMEN

Se evaluó el efecto de microorganismos benéficos en el desarrollo del cultivo de fresa (*Fragaria* sp.). La investigación se realizó en dos fases de campo y una de laboratorio; la primera etapa de campo se ejecutó en Azuay – Ecuador, se recolectaron muestras de plantas ubicadas en tres pisos altitudinales con características climatológicas diferentes, las dos fases siguientes se cumplieron en la Universidad Nacional Agraria La Molina, en Lima – Perú. En la fase de laboratorio se obtuvieron microorganismos benéficos de cada muestra vegetal, se determinaron las unidades formadoras de colonias de levaduras, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., y actinomicetos, no se confirmó la presencia de *Pseudomonas* spp. Con sistemas miniaturizados API se identificaron *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*; mediante la amplificación 16S-PCR de los lisados de ADN de las cepas en estudio se identificaron *Streptomyces sanglieri*, *Streptomyces lushanensis*, *Streptomyces griseorubens*, *Streptomyces thermocarboxydus* y *Streptomyces bungoensis*. En la segunda etapa de campo se seleccionó un consorcio microbiano por cada piso altitudinal, se inoculó en el suelo y se plantó fresa. Se comprobó que de acuerdo a la procedencia los microorganismos presentan diferentes efectos en el suelo y en el desarrollo de las plantas de fresa, el consorcio microbiano obtenido de la planta de café (*Coffea arabica* L.) e inoculado al 2,5% de concentración beneficia el crecimiento radicular así como también incrementan la longitud y diámetro de las plantas, mientras que el consorcio obtenido de la planta de menta (*Mentha piperita*) e inoculado al 2,5% de concentración incrementa el número de hojas. Se concluye que en cada piso altitudinal existen microorganismos benéficos de interés ambiental, que su presencia está ligada a las propiedades fitoquímicas de las especies vegetales y su inoculación provoca cambios en la rizósfera, por lo tanto, benefician el desarrollo vegetativo.

Palabras claves: Microorganismos; vegetales; plantas; suelo; consorcios microbianos.

ABSTRACT

The effect of beneficial microorganisms on the development of the strawberry crop (*Fragaria* sp.) was evaluated. The investigation was carried out in two phases of field and one of laboratory; the first field stage was executed in Azuay - Ecuador, samples of plants located in three altitudinal floors with different climatological characteristics were collected, the following two phases were fulfilled at the National Agrarian University La Molina, in Lima - Peru. In the laboratory phase beneficial microorganisms of each plant sample were obtained, the colony forming units of yeasts, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., and actinomycetes were determined, *Pseudomonas* spp., was not confirmed. With miniaturized API systems *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, they were identified; through of the 16S-PCR amplification of the DNA lysates of the strains under study, *Streptomyces sanglieri*, *Streptomyces lushanensis*, *Streptomyces griseorubens*, *Streptomyces thermocarboxydus* and *Streptomyces bungoensis* were identified. In the second field stage, a microbial consortium was selected for each altitudinal floor, inoculated in the soil and strawberry was planted. It was verified that according to the origin the microorganisms present different effects in the soil and in the development of strawberry plants, the microbial consortium obtained from the coffee plant (*Coffea arabica* L.) and inoculated at 2.5% concentration. it benefits the root growth as well as increasing the length and diameter of the plants, while the consortium obtained from the mint plant (*Mentha piperita*) and inoculated at 2.5% concentration increases the number of leaves. It is concluded that there are beneficial microorganisms of environmental interest in each altitudinal floor, that their presence is linked to the phytochemical properties of the plant species and their inoculation causes changes in the rhizosphere, therefore, they benefit the vegetative development.

Keywords: Microorganisms; vegetables; plants; floor; microbial consortia.

I. INTRODUCCIÓN

Cada día somos más habitantes en el planeta Tierra <<la población mundial aumentará en un 50% entre el año 2001 y el año 2050, pasando de 6.100 millones de personas a 9.300 millones>> (Acuña *et al.*, 2003); lo cual demandará mayor producción de alimentos que garantice la subsistencia de las familias. El suelo agrícola es el medio de donde las plantas, toman los elementos nutritivos requeridos para el desarrollo y producción, no es inerte, está lleno de vida <<la superficie del suelo y los huecos de sus distintos horizontes sirven para alojar organismos vivientes que se han adaptado a tales condiciones, ya sean animales o plantas>> (Porta *et al.*, 2003), la carga microbiana cumple funciones transcendentales en la rizósfera <<en el suelo, los microorganismos desarrollan una amplia gama de acciones que inciden en el desarrollo y nutrición vegetal>> (Acuña *et al.*, 2006).

Las prácticas agrícolas inadecuadas, los cultivos intensivos, así como el uso indiscriminado de agroquímicos, entre otros factores, provocan el desgaste de esta delicada estructura, lo cual conlleva a un descenso en la reserva de nutrientes, que se refleja en una baja producción agrícola, por consiguiente, se ha convertido en una seria restricción para los productores <<la erosión es un proceso que tiene lugar en forma espontánea en la naturaleza si bien su intensidad varía de unos escenarios a otros. La intervención del hombre hace que la intensidad del proceso pueda verse fuertemente incrementada>> (Porta *et al.*, 2003).

Otra de las grandes limitantes en la producción agrícola, es la presencia de agentes patógenos que atacan a las plantas en las diferentes etapas de desarrollo, ocasionan severas enfermedades, como resultado, causan deterioro de los tejidos vegetales e inclusive pueden dañar completamente los cultivos establecidos; en consecuencia, pérdidas económicas, <<las enfermedades de las plantas son importantes para el hombre debido a que perjudican a las plantas y sus productos. Para los millones de personas que habitan la Tierra y cuya existencia depende de los productos vegetales, las enfermedades de las plantas pueden marcar la diferencia entre una vida normal y una acosada por el hambre, o incluso conducir a la muerte por inanición>> (Agrios, 2009), por esta razón se usan pesticidas para contrarrestar la afección de fito patógenos, sin embargo, el manejo de estos requiere de una serie de medidas a tener en cuenta, antes, durante y después de su aplicación; de lo contrario

puede causar afecciones a la salud de los agricultores. El ser humano es susceptible en diversos grados al efecto tóxico de los plaguicidas, el uso excesivo en la agricultura y el mal manejo de estos, ocasiona una elevada contaminación por residuos de plaguicidas en los alimentos; estas sustancias se han convertido en un gran problema para la salud pública (Karam *et al.*, 2004). Cada producto químico presenta un periodo de seguridad, es decir un espacio de tiempo desde su aplicación hasta la cosecha, durante el cual no se debe recolectar la producción y peor consumir; no obstante, esta regla no siempre se cumple. Es probable que muchos frutos y vegetales lleguen hasta el consumidor con residuos de pesticidas, por lo tanto, pueden afectar la salud de las personas, sobre todo de los más vulnerables como niños, ancianos y mujeres embarazadas.

Es motivo de preocupación de técnicos e investigadores, la búsqueda constante de alternativas naturales, así como también amigables con el ambiente, para recuperar el suelo y su capacidad de producción, para ofrecer opciones sostenibles, al alcance de todos.

Ante lo cual, la inoculación de microorganismos benéficos, emerge como una opción cierta en la agricultura orgánica, para recuperar la fertilidad del suelo, en base a la introducción de un grupo de microorganismos que contribuyen a la absorción de nutrientes, por consiguiente, al crecimiento de las plantas <<la capacidad productiva de los suelos está directamente asociada con su contenido de materia orgánica que es la principal reserva del carbono orgánico y principal fuente de nutrientes para las plantas>> (Pedraza *et al.*, 2010). Los microorganismos benéficos lo constituyen <<un amplio grupo de microorganismos desconocidos o mal definidos que interactúan favorablemente en suelos y con plantas para representar efectos benéficos cuales son muchas veces difíciles de predecir>> (Higa y Parr, 1994), juegan un papel importante en los sistemas agrícolas, particularmente los microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPM) (Trabelsi y Mhamdi, 2013), las cuales pueden beneficiarse de la función microbiana; trabajar con estos pequeños aliados invisibles es un vínculo importante para la red de vida (Wilkinson, 2009), <<en el suelo, los microorganismos desarrollan una amplia gama de acciones que inciden en el desarrollo y nutrición vegetal>> (Acuña *et al.*, 2006).

Los mecanismos que regulan la interacción de la planta con los microbios beneficiosos y los que subyacen el efecto de estas interacciones, son compartidos por grupos taxonómicamente diferentes (Pineda *et al.*, 2013), entre los principales se encuentran << bacterias naturales, hongos y otros microbios que juegan un papel crucial en la productividad y salud de las

plantas>> (Wilkinson, 2009). En todo el mundo, algunos de los microorganismos benéficos utilizados en la agricultura, incluyen *Rizobium*, Micorrizas, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, especies de *Streptomyces* y muchos más (Vadakattu, 2012). Microorganismos de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* y *Penicilium* tienen la capacidad de solubilizar el fósforo orgánico en el suelo, producen ácido fosfórico, fórmico, acético, propiónico, láctico, glicólico, fumárico y succínico; beneficiando en las plantas, la absorción de nutrientes (Tan *et al.*, 2009). La importancia de bacterias como *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Azospirillum*, radica en la producción de hormonas benéficas para el crecimiento vegetal, tales como el ácido indol acético (IAA), las giberelinas, las citoquininas y etileno; estas hormonas contribuyen a superar la latencia y el enanismo en las plantas (Tan *et al.*, 2009).

La fresa (*Fragaria* sp.), es un cultivo comercial importante, debido a la precocidad de su cosecha, la cual puede prolongarse por un periodo de dos años aproximadamente con óptimos rendimientos <<la cosecha se inicia a los 75 – 90 días de establecida la plantación, dependiendo de la variedad seleccionada y la condición climática prevaleciente>> (Esquivel, 2005). En condiciones favorables, las diferentes partes de las plantas, son altamente susceptibles al ataque de patógenos, los cuales provocan descensos en el rendimiento y finalmente la muerte. En vista que el fruto de la fresa se cosecha cada dos o tres días, la aplicación de productos químicos para el control fitosanitario, es una medida altamente riesgosa, puesto que el periodo de seguridad de muchos pesticidas, superan este límite.

La provincia del Azuay está ubicada al sur del Ecuador, cuenta una variedad climatológica, desde cálido en la parte costanera, hasta el clima frío en los páramos más elevados; por la diversidad climática, se destaca la riqueza en flora y fauna que posee esta provincia. No se conoce estudios relacionados con la identificación de microorganismos benéficos en la filósfera de especies vegetales de esta región, así como de su aplicación en la agricultura. La teoría ecológica, indica que para cada organismo existe al menos un nicho, el principal, que es aquel en el que crece mejor; el mismo organismo puede habitar otros nichos, pero en ellos no tendrá tanto éxito como en el principal (Madigan *et al.*, 2004). Es difícil cuantificar todos los microorganismos benéficos, aunque miles de especies se han identificado, se estima que el número desconocido es inmenso, casi cada vez que los microbiólogos examinan una muestra de suelo, descubren más microbios (Wilkinson, 2009).

Es sustancial conocer, la diversidad microbiana con potencial benéfico, presente en las especies vegetales. Dependiendo de la ubicación geográfica, las plantas podrían ser el hábitat de diferentes e importantes microorganismos beneficiosos, que viven y se desarrollan en cada zona, adaptados a los factores ambientales imperantes en el lugar. <<Es necesario cuantificar las células de un hábitat microbiano o conocer qué clase de organismos están presentes y en qué número para conocer su incidencia en el medio, esta información proporciona detalles de la dinámica de un ecosistema y de los organismos significativos desde el punto de vista ecológico>> (Madigan *et al.*, 2004).

Existe la preocupación permanente, por investigar la incidencia de los microorganismos benéficos en la morfología y rendimiento del cultivo de fresa. Estudios previos sugieren que la inoculación de raíces con *Bacillus* M3 solo o en combinación con *Bacillus* OSU-142 o *Pseudomonas* BA-8, tiene el potencial de aumentar el rendimiento, el crecimiento y el contenido nutricional de la planta de fresa en condiciones de crecimiento orgánico (Esitken *et al.*, 2010). De acuerdo a Pirlak y Köse (2009), las aplicaciones de bacterias no tienen un efecto importante sobre el pH y peso promedio de los frutos; el resultado del estudio sugiere que *Pseudomonas* BA-8, *Bacillus* OSU-142 y *Bacillus* M-3 tienen potencial para aumentar el rendimiento en planta de fresa. En la investigación ejecutada por Vestberg *et al.* (2004), *Bacillus subtilis* fue el microorganismo promotor del crecimiento más prometedor, tanto en la promoción del crecimiento como en el control de la enfermedad; los microorganismos *T. harzianum*, *G. catenulatum* y *B. subtilis*, así como la mezcla *T. harzianum* + *G. catenulatum* fueron los mejores tratamientos.

Sin embargo, en nuestro medio, investigaciones relacionadas a la inoculación de consorcios microbianos en cultivo de fresa (*Fragaria* sp.), son escasas, por esta razón apremia conocer con certeza, el rol de los microorganismos benéficos en este cultivo de interés comercial. Los microorganismos de importancia agrícola, representan una estrategia ecológica clave en la utilización integrada de prácticas, tales como manejo de nutrientes, plagas y enfermedades; por consiguiente, reducir el uso de productos químicos en la agricultura, así como también mejorar el rendimiento de los cultivos (Bhattacharyya *et al.*, 2016).

El objetivo general de la investigación fue caracterizar e identificar a nivel de laboratorio los microorganismos benéficos presentes en consorcios microbianos procedentes de especies vegetales de tres pisos altitudinales de Azuay – Ecuador y evaluar la incidencia de su inoculación en el suelo, sobre el desarrollo del cultivo de fresa (*Fragaria* sp.).

Los objetivos específicos fueron:

- Determinar mediante análisis de laboratorio, las unidades formadoras de colonias de microorganismos benéficos en los consorcios microbianos procedentes de especies vegetales de tres pisos altitudinales de Azuay – Ecuador, con la finalidad de conocer el potencial microbiano beneficioso de cada planta en estudio.
- Identificar a través de técnicas de laboratorio, los principales microorganismos benéficos presentes en los cultivos microbianos provenientes de especies vegetales de tres pisos altitudinales de Azuay – Ecuador, con el propósito de reconocer las especies beneficiosas más relevantes.
- Determinar mediante análisis de laboratorio el efecto de la inoculación de consorcios microbianos benéficos derivados de especies vegetales de tres pisos altitudinales de Azuay – Ecuador, en las características químicas y biológicas del suelo de la rizósfera de las plantas de fresa para establecer la influencia microbiana en el cultivo.
- Evaluar a nivel de campo la incidencia de tres consorcios microbianos benéficos obtenidos de especies vegetales provenientes de tres pisos altitudinales de Azuay – Ecuador, en el cultivo de fresa, para verificar el efecto en el desarrollo de las plantas cultivadas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Los microorganismos desempeñan un papel importante en los sistemas agrícolas, particularmente los promotores del crecimiento de las plantas (PGPM) (Trabelsi y Mhamdi, 2013), las cuales pueden beneficiarse de la función de estos seres microscópicos; trabajar con estos pequeños aliados invisibles, es un vínculo importante para la red de vida (Wilkinson, 2009). Agentes de control biológico (BCA), como *Trichoderma* y *Pseudomonas* spp., pueden controlar la enfermedad (efecto primario), pero recientemente han demostrado la estimulación del crecimiento de la planta (efecto secundario) en ausencia de un patógeno; gracias a sus multifacéticos efectos, el potencial aumento del uso de estos microorganismos beneficiosos, puede ayudar a reducir los problemas asociados con el uso de productos químicos sintéticos en la agricultura (Avis *et al.*, 2008).

2.1 MICROORGANISMOS BENÉFICOS

Cada vez es más frecuente hablar, de los microorganismos, sus beneficios, así como la relación con las diferentes formas de vida, a la par de su rol fundamental en el ambiente. El uso de microorganismos en los diferentes campos, está en constante desarrollo. Día a día aumenta la relevancia de los microorganismos benéficos, de acuerdo a Higa y Parr (1994) lo constituyen <<*un amplio grupo de microorganismos desconocidos o mal definidos que interaccionan favorablemente en suelos y con plantas para representar efectos benéficos cuales son muchas veces difíciles de predecir*>>.

Es difícil cuantificar todas las especies de microorganismos benéficos, aunque miles han sido identificadas, se estima que el número desconocido es inmenso; casi cada vez que los microbiólogos examinan una muestra de suelo, descubren nuevas (Wilkinson, 2009).

Los mecanismos que regulan la interacción de la planta con la población microbiana, son compartidos por grupos taxonómicamente diferentes de microorganismos benéficos (Pineda *et al.*, 2013), entre los principales grupos, se encuentran <<*bacterias naturales, hongos y otros microbios que juegan un papel crucial en la productividad y salud de las plantas*>>

(Wilkinson, 2009), en todo el mundo, algunos de los utilizados en la agricultura, incluyen *Rizobium*, *Micorrizas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, especies de *Streptomyces* y muchos más (Vadakattu, 2012); microorganismos de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* y *Penicilium*, en el suelo tienen la capacidad de solubilizar el fósforo orgánico, produciendo ácido fosfatasa, ácido fórmico, acético, propiónico, láctico, glicólico, fumárico además de succínico; por lo cual benefician la absorción de nutrientes por las plantas (Tan *et al.*, 2009).

En las plantas, se sabe que los hongos micorrízicos arbusculares mejoran el estado nutricional, así como el crecimiento; protegen contra patógenos radiculares, además ofrecen resistencia a la sequía y salinidad (Patil *et al.*, 2013). El esquema de la función de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la promoción del crecimiento de las plantas, de acuerdo a Malfanova (2013), se presenta en la figura 1.

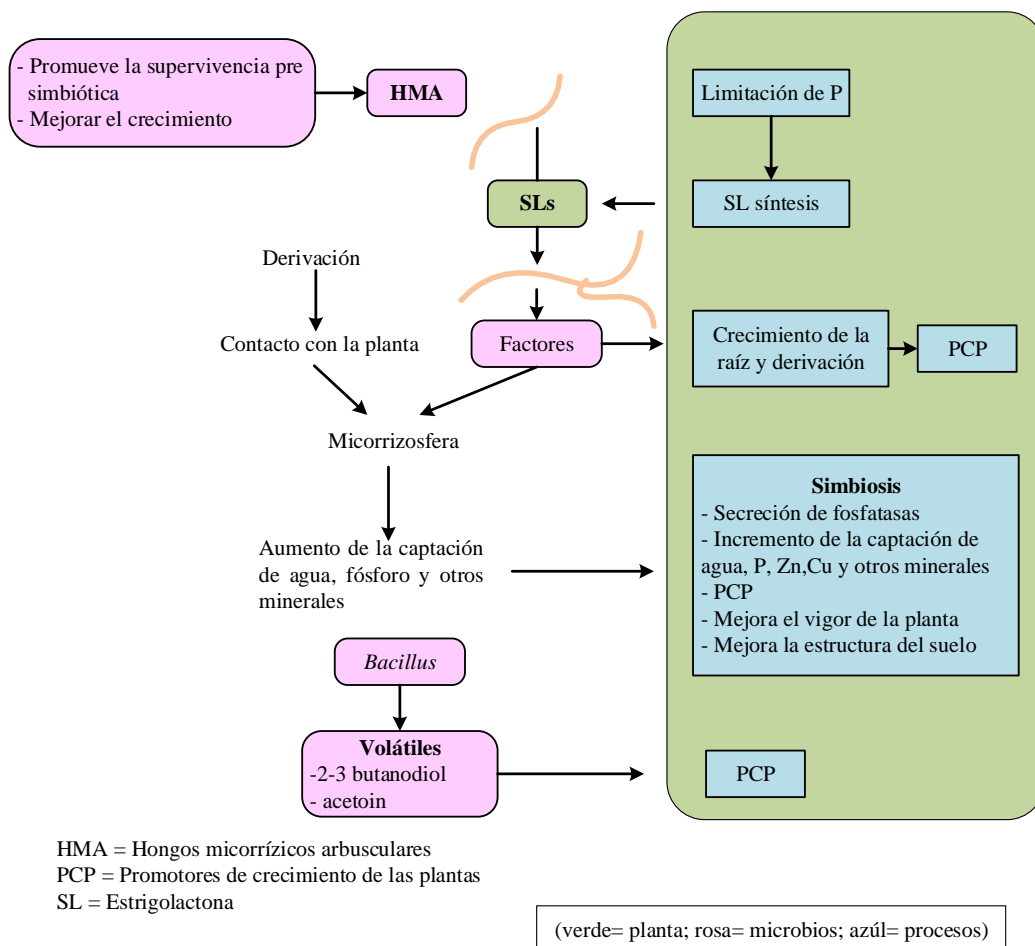


Figura 1: Función de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la promoción del crecimiento de las plantas (PGP)

FUENTE: Malfanova (2013)

Las especies de *Trichoderma* pertenecen a una clase de hongos libres, que son beneficiosos para las plantas; además existen especies bacterianas como *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*., *P. aeaureofasciens* y *P. chloraphis*, que pueden actuar en beneficio de las plantas (Ortíz *et al.*, 2009). A lo largo de los años han sido objeto de una extensa investigación bacterias benéficas promotoras de crecimiento que pertenecen a los géneros *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Dexia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* y *Zoogloea* (Babalola, 2010). La importancia de bacterias como *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Azospirillum*, radica en la producción de hormonas tales como el ácido indol acético (IAA), las giberelinas, las citoquininas y el etileno; estas hormonas favorecen el crecimiento vegetal, contribuyen a superar la latencia y el enanismo en las plantas (Tan *et al.*, 2009). En el estudio de microorganismos de montaña (MM) en la producción de acelga en la meseta de Popayán en Colombia, se verificó su efectividad en el desarrollo y rendimiento de la producción, con dos aplicaciones semanales de microorganismos capturados en el sistema café y potrero, además se confirmó que los microorganismos influyen en algunas propiedades del suelo como incremento de la materia orgánica, variación del pH, contenido de nitrógeno y potasio (Campo *et al.*, 2014). Se demostró que al evaluar el efecto de siete consorcios de hongos micorrízicos aislados de fincas cafetaleras en el crecimiento de plantas de café (*Coffea arabica* L.) var. Garnica, en condiciones de invernadero y de campo, los consorcios incrementaron la altura en un 91 por ciento con respecto al testigo absoluto y al testigo fertilizado con fósforo (Trejo *et al.*, 2011).

2.1.1 Funciones de los microorganismos benéficos

Los microorganismos son actores importantes en un sistema de producción, ya que pueden ayudar en el desarrollo de sistemas agrícolas sostenibles. Las interacciones microbianas beneficiosas para las plantas, pueden ser divididas en tres categorías: (i) aquellos microorganismos que se asocian con las plantas y son responsable de su nutrición; (ii) existe un grupo que estimulan el crecimiento indirecto, impidiendo el crecimiento de patógenos (biocontrol); (iii) finalmente, los responsables de la promoción directa del crecimiento, por ejemplo, por producción de fitohormonas (Nihorimbere *et al.*, 2011). Las influencias beneficiosas de los microorganismos sobre el crecimiento de las plantas, incluyen la fijación de nitrógeno, la adquisición de los principales nutrientes, la promoción del crecimiento de las ramas, así como de raíces, el control o la supresión de enfermedades y la mejora de la

estructura del suelo (Vadakattu, 2012). Los beneficios de crecimiento de las plantas pueden atribuirse a los siguientes mecanismos: (i) microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPMs) que actúan como biofertilizantes (tales como bacterias fijadoras de nitrógeno y bacterias solubilizantes de fosfato) que ayudan a la absorción de nutrientes de las plantas, al proporcionar nitrógeno fijo u otros nutrientes, (ii) fito estimuladores (microbios como *Azospirillum*) promueven el crecimiento de las plantas, generalmente mediante hormonas, (iii) agentes de control biológico (tales como *Trichoderma*, *Pseudomonas* y *Bacillus*) protegen a las plantas contra organismos fitopatógenos (Trabelsi y Mhamdi, 2013).

Es evidente, que los microorganismos benéficos desempeñan un rol fundamental en la nutrición, así como en la sanidad de la planta; por lo tanto, en el rendimiento del cultivo, así mismo en la calidad de la cosecha; existen microorganismos que cumplen funciones específicas en los suelos, por lo que es importante cuidar, además es necesario reactivar la flora microbiana (Pineda *et al.*, 2013). Los microorganismos de importancia agrícola, representan una estrategia ecológica clave para la administración integrada de prácticas, que incluyen manejo de nutrientes, enfermedades y plagas; en consecuencia, reducir el uso de productos químicos en la agricultura, así como también para mejorar el rendimiento de los cultivos (Bhattacharyya *et al.*, 2016).

Las simbiosis de los microorganismos beneficiosos con las plantas, dan lugar a importantes cambios en la fisiología de estas, suelen estar relacionados con el crecimiento y desarrollo, pero también tienen un impacto importante en la capacidad para hacer frente al estrés (Pineda *et al.*, 2013); por ejemplo (endófitas, hongos micorrízicos y rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas) son en su mayoría mutualistas, pueden considerarse como mutualismos nutricionales y/o defensivos dependiendo de si la planta recibe nutrientes o protección contra los atacantes, a cambio de ofrecer refugio o comida a su pareja (Pineda *et al.*, 2013). <<Los hongos micorrízicos y las bacterias fijadoras de nitrógeno son llamados "microsymbiontes" porque forman una relación simbiótica (mutuamente beneficiosa) con las plantas>> (Wilkinson, 2009).

Las principales funciones de los microorganismos benéficos son: la fijación de nitrógeno atmosférico, descomposición de desechos orgánicos y residuos, supresión de patógenos de desarrollo del suelo, reciclaje e incremento de la disponibilidad de nutrientes para las plantas, degradación de tóxicos incluyendo pesticidas, producción de antibióticos y otros

componentes bioactivos, producción de moléculas orgánicas simples para el consumo de las plantas, formación de complejos de metales pesados para toma limitada por las plantas, solubilización de fuentes de nutrientes insolubles, producción de polisacáridos para mejorar la agregación del suelo (Higa y Parr, 1994).

Los microorganismos desempeñan un papel importante en una serie de transformaciones químicas de los suelos; por lo tanto, influyen en la disponibilidad de macro y micronutrientes. El uso de microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPM), además de la protección convencional, ayuda a aumentar los rendimientos (Meena *et al.*, 2016). Las rizobacterias pueden promover el desarrollo de las plantas a través de una amplia variedad de mecanismos, los cuales se pueden agrupar según su modo de acción en: (i) la síntesis de sustancias que pueden ser asimiladas directamente; (ii) la movilización de nutrientes; (iii) la inducción de la resistencia al estrés; y (iv) la prevención de las enfermedades (Figura 2) (García-Fraile *et al.*, 2015).

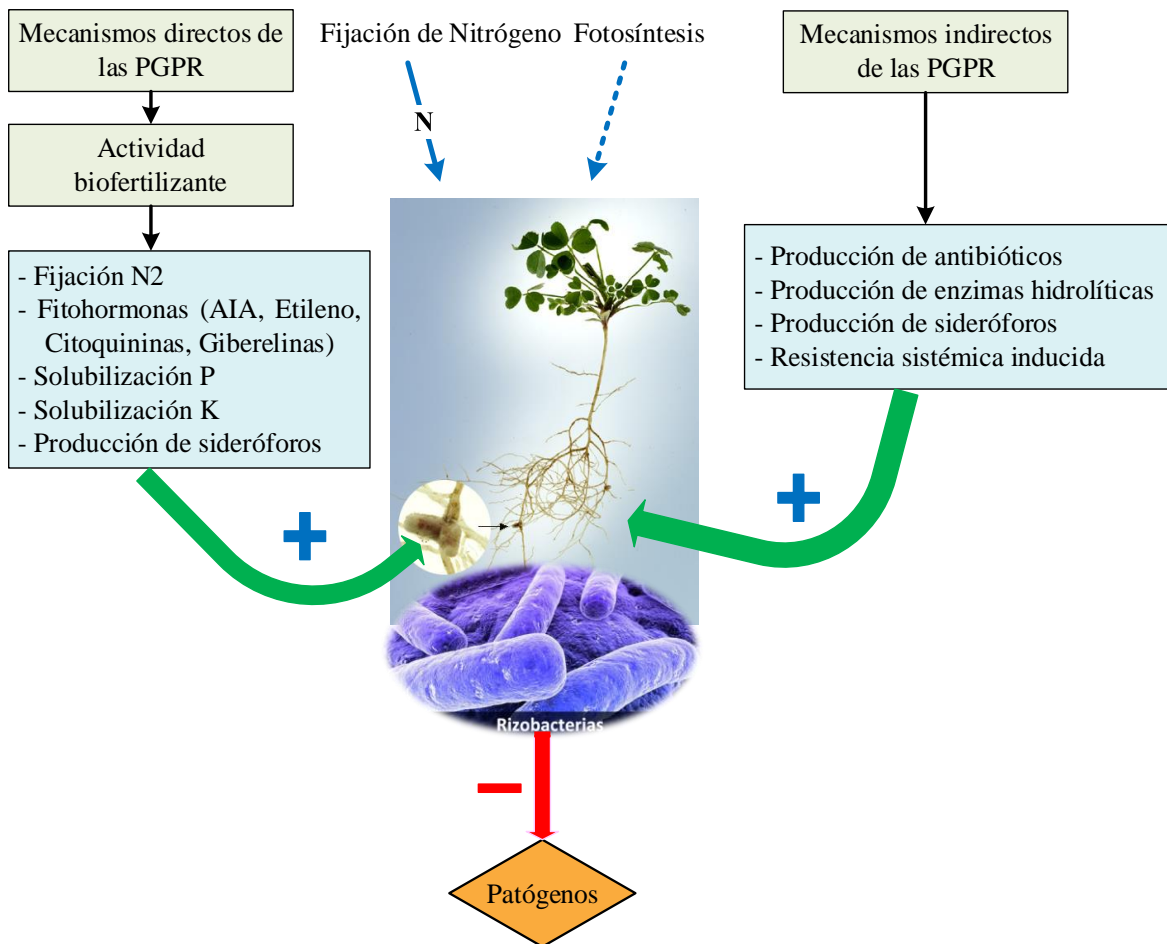


Figura 2: Mecanismos de las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas

a. Producción de reguladores de crecimiento de las plantas

Los reguladores de crecimiento, son sustancias sintéticas similares a las hormonas vegetales naturales, pueden promover el crecimiento de las plantas, razón por la que son importantes en la agricultura; los microorganismos que habitan la rizósfera de los vegetales en crecimiento, pueden sintetizar y liberar auxinas como metabolitos secundarios (Bhattacharyya *et al.*, 2016).

Las rizobacterias producen fitohormonas tales como auxinas, citoquininas, giberelinas y el etileno, que pueden afectar la proliferación celular en la arquitectura de la raíz, debido a la sobreproducción de raíces laterales, así como de pelos radiculares, con un consiguiente aumento de la absorción de nutrientes y agua (Gupta *et al.*, 2015); en las raíces más del 80 por ciento son capaces de producir auxinas, sus efectos sobre el crecimiento de las plantas son notables, afectan principalmente al sistema radicular, aumentan su tamaño a más de su peso, número de ramificación y superficie en contacto con el suelo, de tal manera que mejoran la nutrición además de la capacidad de crecimiento de las plantas (Jha y Saraf, 2015).

Las principales clases de fitohormonas son las citoquininas (CK), auxinas, giberelinas, etileno, ácido abscísico y jasmonatos. Generalmente, CKs, auxinas y giberelinas juegan papeles reguladores positivos, mientras que el etileno, el ácido abscísico y los jasmonatos desempeñan papeles inhibidores en la regulación del ciclo celular (figura 3) (Wong *et al.*, 2016).

Entre los reguladores del crecimiento, el ácido indol acético (IAA) es la auxina natural más común que se encuentra en las plantas, su efecto es positivo sobre el crecimiento de las raíces; la biosíntesis implica formación de indol -3- ácido pirúvico además de indol -3- aldehído acético, es el mecanismo más común en bacterias como *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Citoquininas y giberelinas pueden producir las rizobacterias *Azotobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Paenibacillus polymyxa* (Gupta *et al.*, 2015).

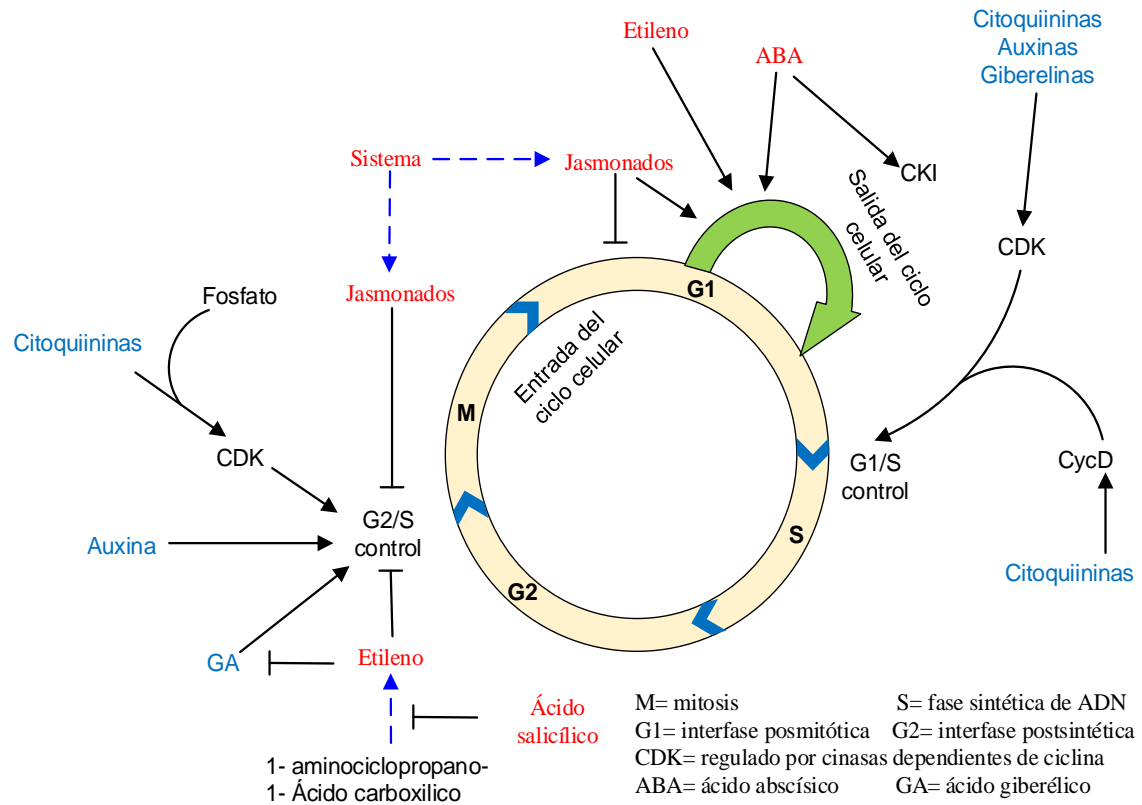


Figura 3: Diagrama esquemático del ciclo celular de la planta y acciones reguladoras de las fitohormonas

FUENTE: Wong *et al.* (2016)

El ciclo celular tiene cuatro fases distintas: G1 (interfase posmitótica), S (fase sintética del ADN), G2 (interfase postsintética) y M (mitosis); y fases de subdivisión de la mitosis, citocinesis y fase G1 (G0); todos los cuales se rigen por una serie de puntos de control, principalmente entre G1 y S (punto de control G1/S) y entre G2 y M (punto de control G2/M). El ciclo celular vegetal es predominantemente regulado por fitohormonas, mientras que otros factores ejercen grados variables de controles bajo condiciones ambientales (abióticas) y bióticas diferentes en las que toda la planta es expuesta (Wong *et al.*, 2015). Generalmente, las auxinas, las citoquininas y las giberelinas, desempeñan papeles estimulantes; mientras que el ácido abscísico (ABA), etileno y jasmonatos inhiben la progresión del ciclo celular; systemin, una hormona peptídica vegetal, regula el ciclo celular promoviendo la biosíntesis de jasmonatos; mientras que el ácido salicílico regula la progresión del ciclo celular inhibiendo la biosíntesis del etileno (Wong *et al.*, 2016). De acuerdo a Spaepen (2015) las más importantes fitohormonas producidas por los microbios son: auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico además del etileno; la estructura y efectos en las plantas se presenta en el cuadro 1.

Cuadro 1: Fitohormonas más importantes producidas por microbios

Clase	Estructura	Efecto en la planta
Auxina		Elongación y división celular Dominancia apical
Citoquininas		Inhibición del alargamiento de las raíces Estimulación de la división celular Expansión de la hoja por aumento de células Retraso de la senescencia
Giberelinas		Germinación de semillas Elongación de tallos Inducción floral y crecimiento de frutos
Ácido abscísico		Cierre estomático Inhibición del crecimiento de brotes Ácido abscísico Dormancia de brotes Abióticos y bióticos
Etileno	$H_2C=CH_2$	Estrés y hormona madurez Senescencia y abscisión Estrés abiótico y biótico

FUENTE: Spaepen (2015)

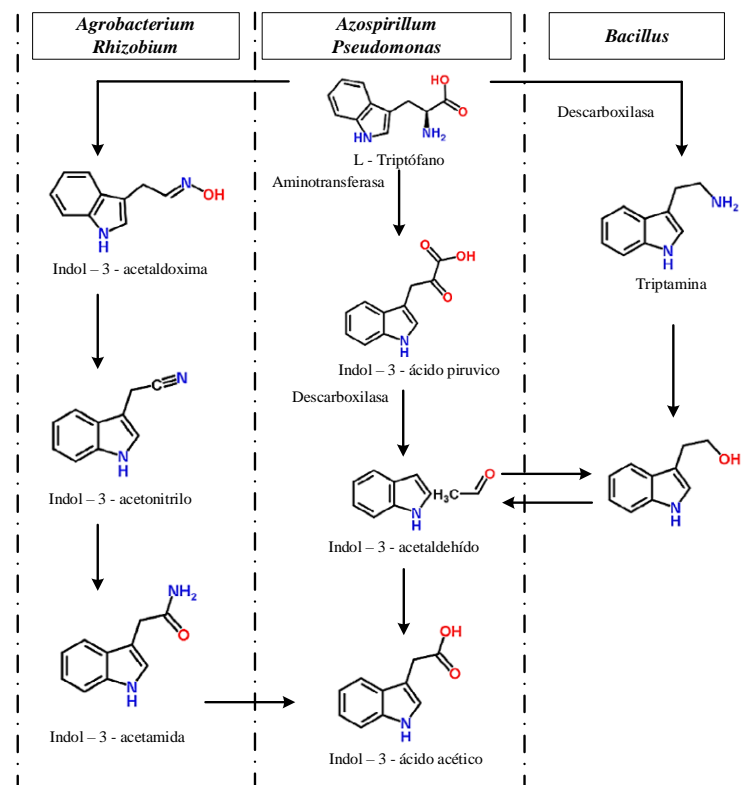


Figura 4: Vías de biosíntesis de auxinas dependientes de triptófano en microorganismos

FUENTE: Goswami *et al.* (2016)

Por más de 100 años la auxina ha sido estudiada; su biosíntesis, el transporte y las vías de señalización todavía no están claras (Wani *et al.*, 2016). La biosíntesis microbiana así como el mecanismo fundamental de la acción de las auxinas en la planta, han sido objeto de intensa investigación; diversas PGPRs poseen rutas diferentes para la síntesis de IAA, se conocen tres vías dependientes de L-triptófano que se secreta en exudados de raíz como un precursor para la producción de IAA, figura 4 (Goswami *et al.*, 2016).

Las rizobacterias con capacidad para promover el crecimiento de las plantas, se pueden clasificar en rizobacterias promotoras del crecimiento extracelulares (ePGPR) que pueden existir en la rizósfera, en el rizoplano o en los espacios entre las células de la corteza de la raíz, incluye los géneros bacterianos tales como *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Pseudomonas* y *Serratia*; y rizobacterias promotoras del crecimiento intracelular (iPGPR) que se localizan generalmente en el interior de las estructuras nodulares especializadas de las células de las raíces, pertenecen a la familia de *Rhizobiaceae*, incluye *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium*, endófitas y especies de *Frankia*, las cuales pueden fijar simbióticamente nitrógeno atmosférico con las plantas superiores (Gupta *et al.*, 2015).

Las PGPR son las herramientas potenciales para la agricultura, y tendencia para el futuro. Algunas de estas bacterias pertenecen a los géneros *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* y *Zoogloea*. Las vías de biosíntesis de auxinas dependientes de triptófano en plantas y microorganismos, se ilustran en la figura 5 (Jha y Saraf, 2015).

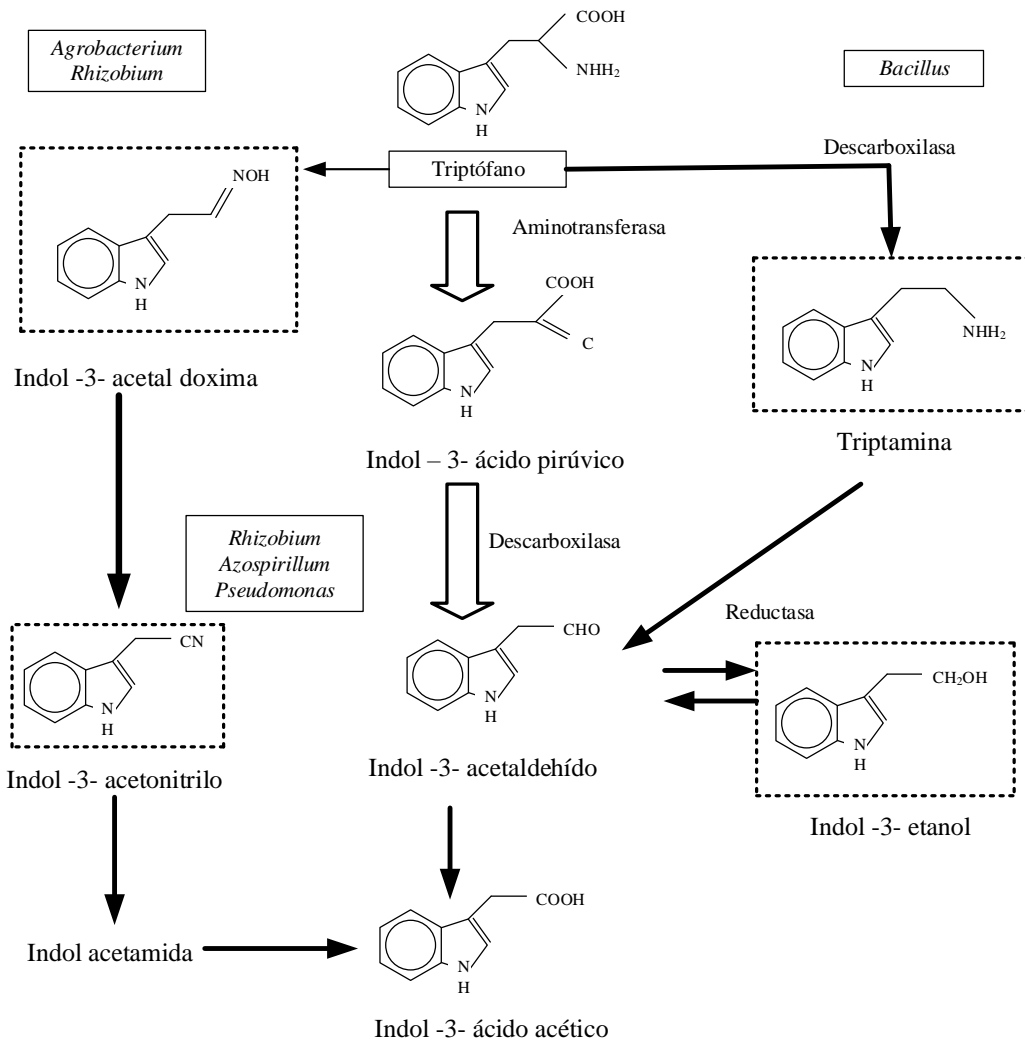
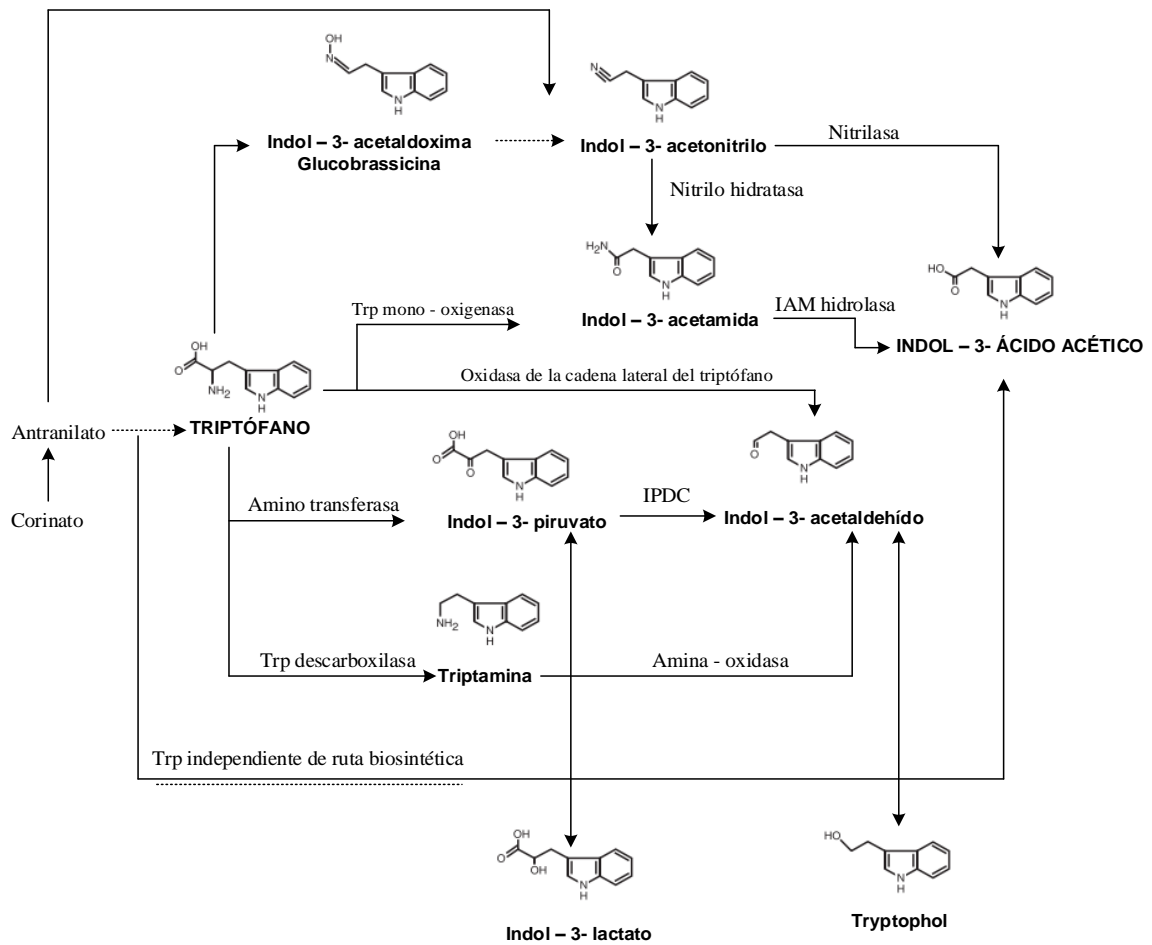


Figura 5: Vías de biosíntesis de auxinas dependientes de triptófano en plantas y microorganismos

FUENTE: Jha y Saraf (2015)

- **El ácido indol -3- acético (IAA):** La auxina, ácido indol -3- acético (IAA), es una importante fitohormona producida por varias cepas de PGPR, es de dominio, que las rizobacterias productoras de IAA aumentan el crecimiento de las plantas, tanto con respuestas rápidas (por ejemplo, aumento de la elongación celular), como las de largo plazo (por ejemplo, la división celular y la diferenciación) (Goswami *et al.*, 2016). La producción de IAA ha sido reportada para bacterias, se supone incluso que más del 80% de las bacterias aisladas de la rizósfera son capaces de sintetizar IAA; el principal precursor de la síntesis de IAA es triptófano, las diferentes rutas para sintetizar el IAA, se presenta en la figura 6 (Spaepen y Vanderleyden, 2011).

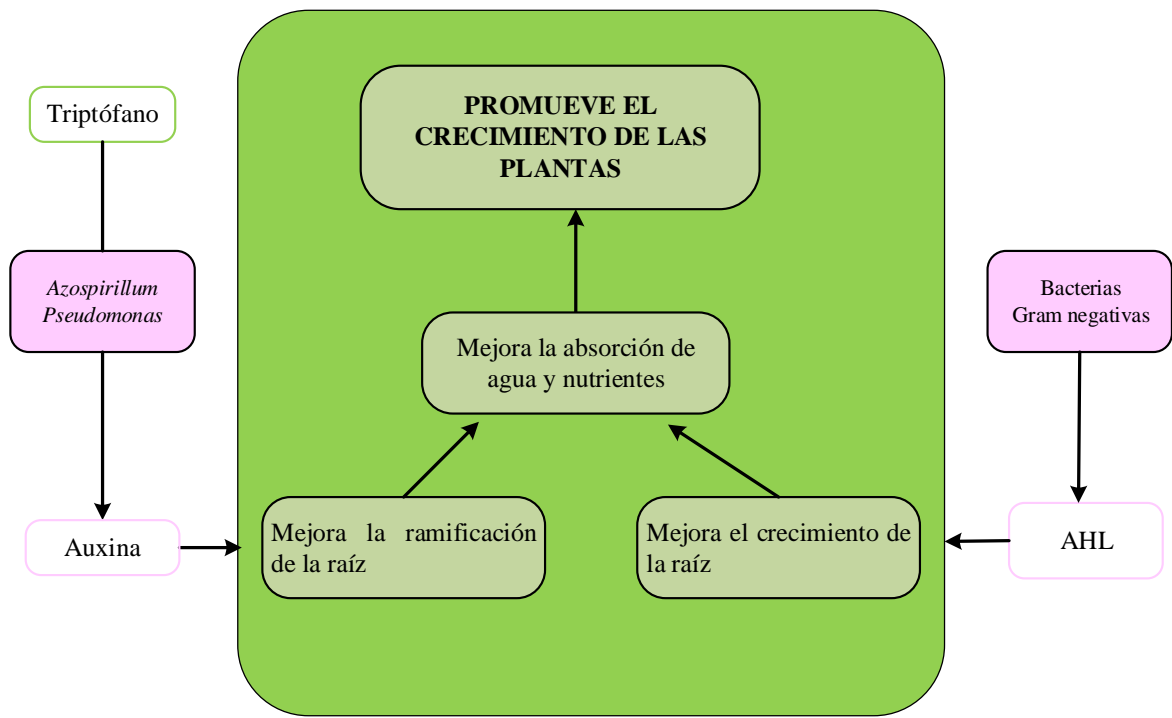


(IAAld= indol - 3 - acetaldehído; IAM= indol - 3 - acetamida; PIDC=indol - 3 - piruvato descarboxilasa; Trp= triptófano).

Figura 6: Visión general de las rutas biosintéticas del IAA en bacterias

FUENTE: Spaepen y Vanderleyden (2011)

Las bacterias que producen ácido indol acético, pueden presentar incidencia en los contenidos de auxina vegetal que incurren en el crecimiento, superficie, así como longitud de raíces, lo cual se refleja en mejor absorción de agua y nutrientes por la planta figura 7 (Malfanova, 2013).



**** AHL son moléculas secretadas por muchas bacterias Gram-negativas

(verde= planta; rosa= microbios; azul=procesos)

Figura 7: Estimulación de la auxina para la ramificación y crecimiento de las raíces

FUENTE: Malfanova (2013)

- **Citocininas:** Las citocininas juegan papeles influyentes, son considerados reguladores maestros durante el crecimiento y desarrollo de las plantas (Wani *et al.*, 2016), promueven y mantienen la división celular de las plantas en cultivos, están implicadas en diversos procesos de diferenciación, formación de brotes, crecimiento de raíces primarias y formación de callos (Jha y Saraf, 2015).

Las citoquininas representan otra clase de fitohormonas producidas por microorganismos, las respuestas de las plantas a las aplicaciones exógenas, dan lugar a una mayor división celular, a un mayor desarrollo de las raíces, a una formación de cabello de raíz mejorada, a una inhibición del alargamiento de las raíces, a la iniciación de brotes o a ciertas otras respuestas fisiológicas; procesos de desarrollo tales como la formación de la vasculatura embrionaria, la señalización nutricional, la expansión foliar, la ramificación, la producción de clorofila, el crecimiento de las raíces, la promoción de la germinación de las semillas y el retraso de la senescencia también están fuertemente influenciados por las citoquininas (Goswami *et al.*, 2016). Entre las bacterias rizosféricas que pueden producir citoquininas se encuentran *Agrobacterium*,

Arthrobacter, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum rubrum*, *Serratia* y *Xanthomonas* (Malfanova, 2013).

- **Giberelinas:** Hay poca información sobre microorganismos que producen giberelinas, aunque se sabe que las bacterias existentes en los nódulos de las leguminosas que fijan el nitrógeno (rizobios) son capaces de producir giberelinas, auxinas y citoquininas, en concentraciones muy bajas (Jha y Saraf, 2015). Las giberelinas son un gran grupo de fitohormonas que constituyen hasta 136 moléculas estructuradas diferente (Bhattacharyya *et al.*, 2016), son un grupo grande de células tetracíclicas diterpenoides ácidos carboxílicos, pero sólo algunos de ellos funcionan como hormonas de crecimiento en plantas superiores, siendo predominantes las formas GA1 y GA4 (Wani *et al.*, 2016).
- Las giberelinas tienen influencia en muchos procesos de desarrollo en plantas superiores, incluyendo la germinación de las semillas, la elongación del tallo, la floración y el establecimiento de frutos (Bhattacharyya *et al.*, 2016). La producción de giberelinas por bacilos es rara, con solo dos cepas documentadas que son capaces de producir giberelinas, son *B. pumilus* y *B. licheniformis*; estas hormonas pueden ser trasladadas de las raíces a las partes aéreas de la planta, donde los efectos son notables y más aún cuando las bacterias también producen auxinas que estimulan el sistema radicular al aumentar el suministro de nutrientes, para facilitar el crecimiento en la parte aérea (Goswami *et al.*, 2016). En la rizósfera de la planta, bacterias tales como *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Xanthomonas*, producen giberelinas (Malfanova, 2013).

b. Fijación de nitrógeno

Especies de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR), incrementan el crecimiento de legumbres, desarrollo de raíces y fijación de nitrógeno (Nandal y Hooda, 2013). Las cepas bacterianas que poseen el rasgo de fijación de nitrógeno se clasifican en dos categorías. (i) La primera categoría incluye las bacterias simbióticas asociadas a raíces – leguminosas, que poseen la especificidad e infectan las raíces para producir nódulos (cepas de *Rhizobium*), (ii) otro grupo de bacterias son las llamadas fijadoras de nitrógeno de vida libres, que no poseen especificidad para plantas,

ejemplos de estas bacterias incluyen *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Bacillus*, y *Paenibacillus* (Goswami *et al.*, 2016).

La contribución de los microorganismos a la nutrición nitrogenada de las plantas se ilustra en la figura 8 (Malfanova, 2013).

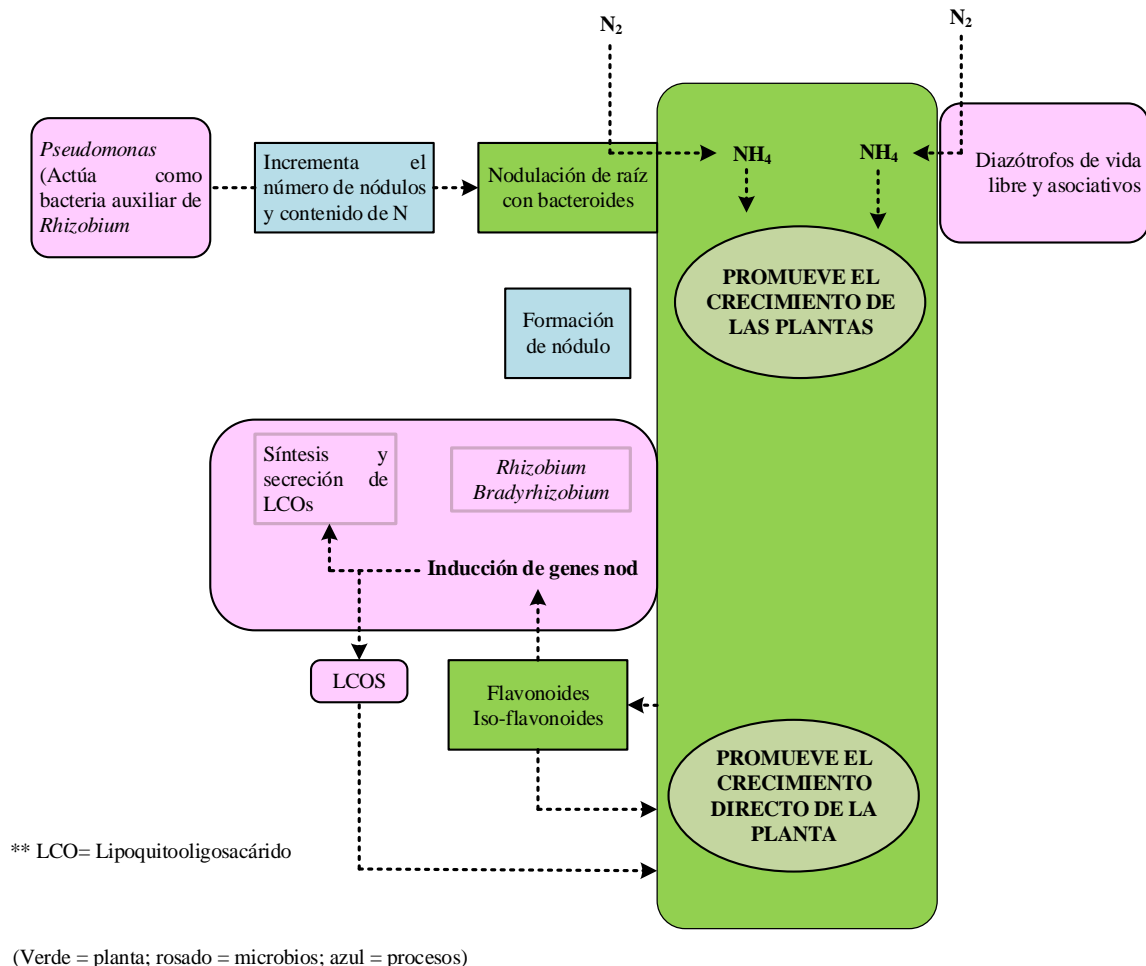


Figura 8: Contribución microbiana a la nutrición de nitrogenada de las plantas

FUENTE: Malfanova (2013)

Las bacterias fijan el nitrógeno atmosférico por medio de la enzima nitrogenasa, dos componentes de metaloenzima compuesta de (a) dinitrogenasa reductasa, un dímero de dos subunidades idénticas que contiene los sitios para enlace de magnesio ATP e hidrólisis, y suministra la reducción de la potencia de la dinitrogenasa, y (b) la dinitrogenasa componente que contiene un cofactor metálico. El proceso de nodulación (a) interacción de rihadhesina rhizobial con lectinas del huésped y la fijación del rizobio con las células de la raíz; (b) la excreción de factores de nod por rhizobia causa el enrollamiento del pelo de la raíz; (c) Rhizobia penetra en el cabello de la raíz y forma

un hilo de infección a través de los cuales penetran las células corticales y forman los nódulos (Nandal y Hooda, 2013).

c. Solubilización de fósforo

En el suelo, las rizobacterias presentes que promueven el crecimiento de las plantas, utilizan diferentes estrategias para aprovechar las formas no disponibles de fósforo y a su vez también ayudan a hacer el fósforo disponible para que las plantas absorban; los principales mecanismos de solubilización de los fosfatos empleados por las rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas, incluyen: (i) liberación de complejos o compuestos disolventes minerales, ejemplo, aniones de ácidos orgánicos, protones de iones hidroxilo, CO₂, (ii) liberación de enzimas extracelulares (mineralización bioquímica de fosfatos) y (iii) la liberación de fosfato durante la degradación del sustrato (mineralización biológica de fosfatos) (Gupta *et al.*, 2015).

Los microorganismos desempeñan un papel esencial en la nutrición del fósforo, aumentando su disponibilidad a las plantas, a través de la liberación de fosfatos orgánicos e inorgánicos del suelo, por solubilización y mineralización del fósforo (Bhattacharyya *et al.*, 2016). Los hongos micorrízicos arbusculares (AM) están en todos los suelos, estos pueden aumentar el crecimiento y la reproducción vegetal, potenciando la absorción de nutrientes en el suelo, especialmente los inmóviles como el fósforo (Dasgan *et al.*, 2012).

Los microorganismos beneficiosos en los biofertilizantes podrían movilizar la disponibilidad de nutrientes en el suelo, por su actividad biológica (Xiang *et al.*, 2012). Entre las comunidades de bacterias, cepas ecto rizosféricas de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* y *Enterobacter* son registradas como cepas efectivas solubilizantes de fosfato; especies como *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus sircalmous*, y *Pseudomonas striata*, son potentes solubilizadores de fosfato (Bhattacharyya *et al.*, 2016). Han atraído la atención de los agricultores, PGPR solubilizantes de fosfatos, que incluyen los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium* *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* y *Serratia* (Gupta *et al.*, 2015). El esquema representativo de la solubilización de fósforo del suelo, por las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) (Goswami *et al.*, 2016) se presenta en la figura 9.

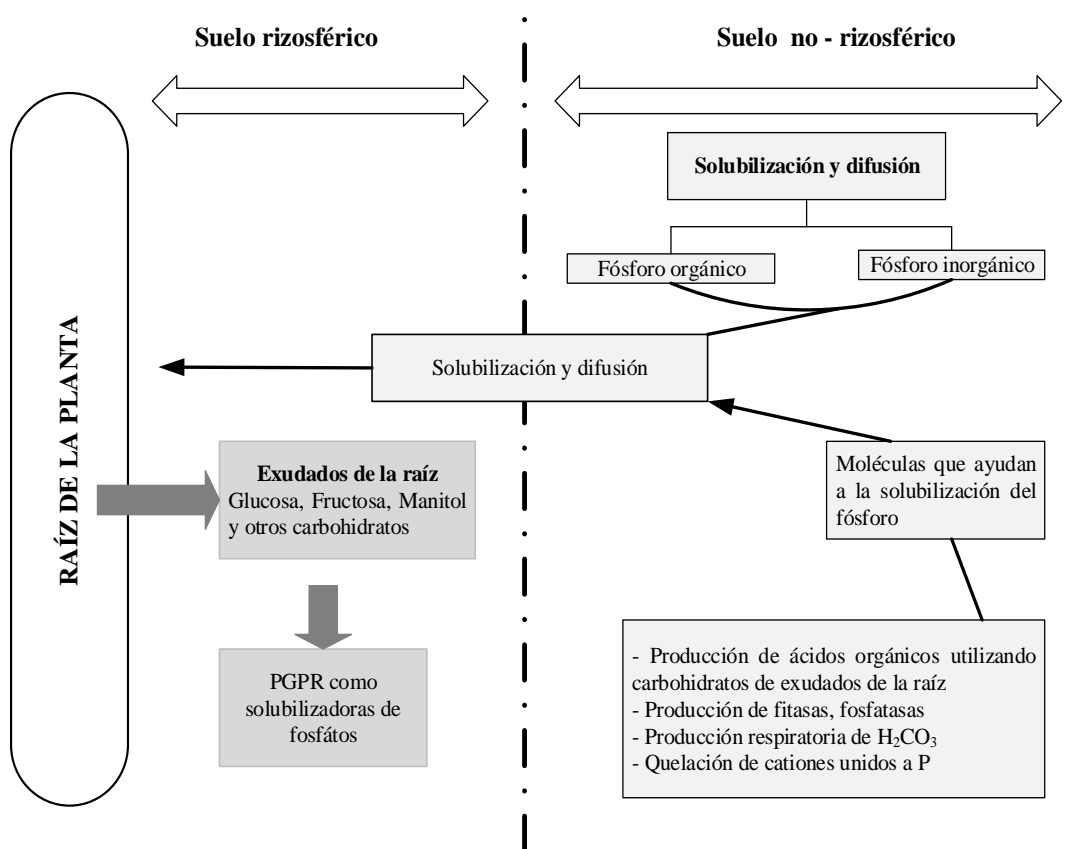


Figura 9: Esquema de representación de la solubilización de fósforo del suelo por PGPR

FUENTE: Goswami *et al.* (2016)

d. Movilización del potasio

En la rizósfera de diferentes cultivos, ciertas bacterias y hongos tienen la capacidad de movilizar potasio, mediante la producción de ácidos orgánicos-inorgánicos o mediante la producción de polisacáridos (Sindhu *et al.*, 2016). Las rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas son capaces de solubilizar la roca de potasio a través de la producción y secreción de ácidos orgánicos; se ha reportado de rizobacterias solubilizantes de potasio tales como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Bacillus edaphicus*, *Bacillus mucilaginosus*, *Burkholderia*, *Paenibacillus* sp. y *Pseudomonas*, que liberan potasio a forma accesible a partir de potasio mineral en los suelos (Gupta *et al.*, 2015).

Los microorganismos solubilizantes de potasio (KSMs), habitan en la rizósfera; para el crecimiento y rendimiento de las plantas, solubilizan el potasio insoluble (K) a formas solubles de K, se lleva a cabo por un gran número de bacterias saprófitas (*Bacillus mucilaginosus*, *B. edaphicus*, *B. circulans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*,

Paenibacillus spp.) y cepas de hongos (*Aspergillus* spp. y *Aspergillus terreus*) (Meena *et al.*, 2016). Microorganismos tales como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Arthrobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus mucilaginosus*, *Bacillus edaphicus*, *Frateuria* sp., *Klebsiella* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., son conocidos por su papel potencial en la movilización de fuentes insolubles de K en el suelo (Bhattacharyya *et al.*, 2016).

e. Producción de sideróforos:

Las bacterias que crecen bajo concentraciones bajas de Fe^{3+} también producen una variedad de sideróforos, que unen este ion con alta afinidad, figura 10 (Malfanova, 2013). En el crecimiento de las plantas, los beneficios directos de los sideróforos bacterianos se ha demostrado mediante el uso de ferrosidóforos radiomarcados como única fuente de hierro; un gran número rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas que incluyen *Aeromonas*, *Azadirachta*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* y *Streptomyces* sp., se involucran en este proceso (Gupta *et al.*, 2015).

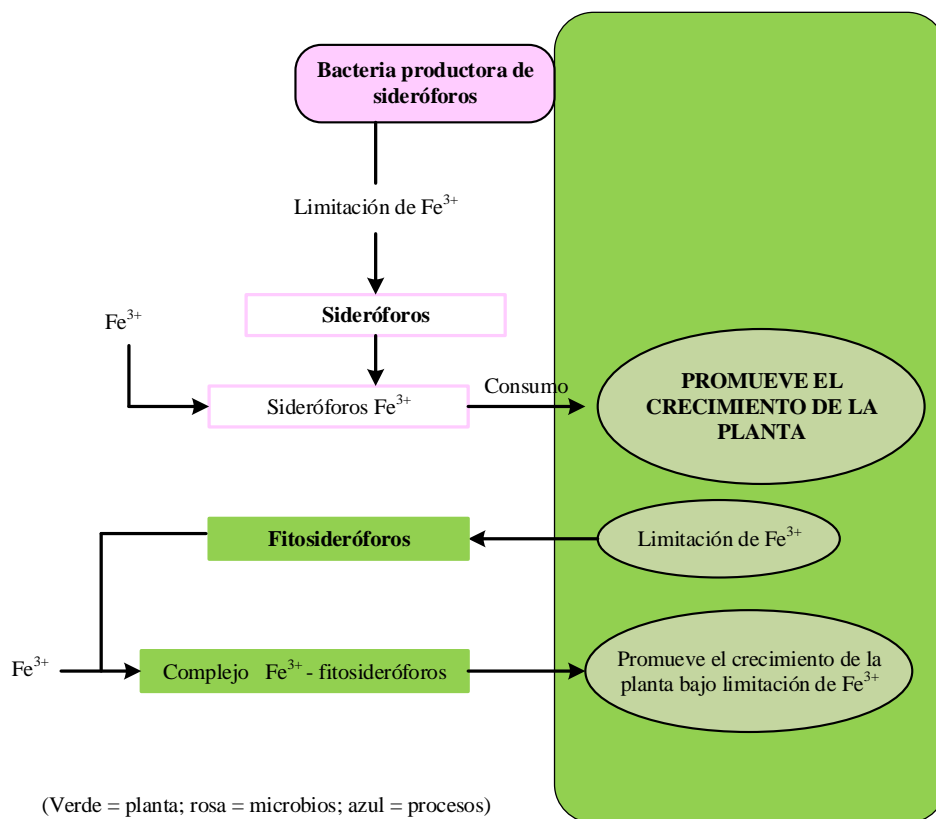


Figura 10: Posibles contribuciones microbianas a la nutrición de Fe a la planta

FUENTE: Malfanova (2013)

2.1.2 Microorganismos como biofertilizantes

Los fertilizantes de nueva generación llamados "biofertilizantes" o "fertilizantes microbianos" (Dasgan *et al.*, 2012), son sustancias que contienen microorganismos, que cuando se aplican sobre la semilla o superficie del suelo, colonizan la rizósfera y promueven el crecimiento a través de una mayor disponibilidad de nutrientes (Bhattacharyya *et al.*, 2016). Las principales fuentes de biofertilizantes, son microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfato y las micorrizas; para este propósito se incluyen *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, bacterias fotosintéticas, bacterias fijadoras de nitrógeno, hongos de *Trichoderma* y levaduras (Bhattacharjee y Dey, 2014). *Acetobacter*, *Allorhizobium*, *Aspergillus*, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, etc., han establecido su eficacia como potentes promotores del crecimiento de las plantas (Bhattacharyya *et al.*, 2016); un efecto claro de la micro biota benéfica del suelo es el aumento en el crecimiento radicular, así como la alteración de la arquitectura de las raíces (Pineda *et al.*, 2013). Los principales microorganismos que forman parte de los biofertilizantes, se esquematizan en la figura 11 (Xiang *et al.*, 2012).

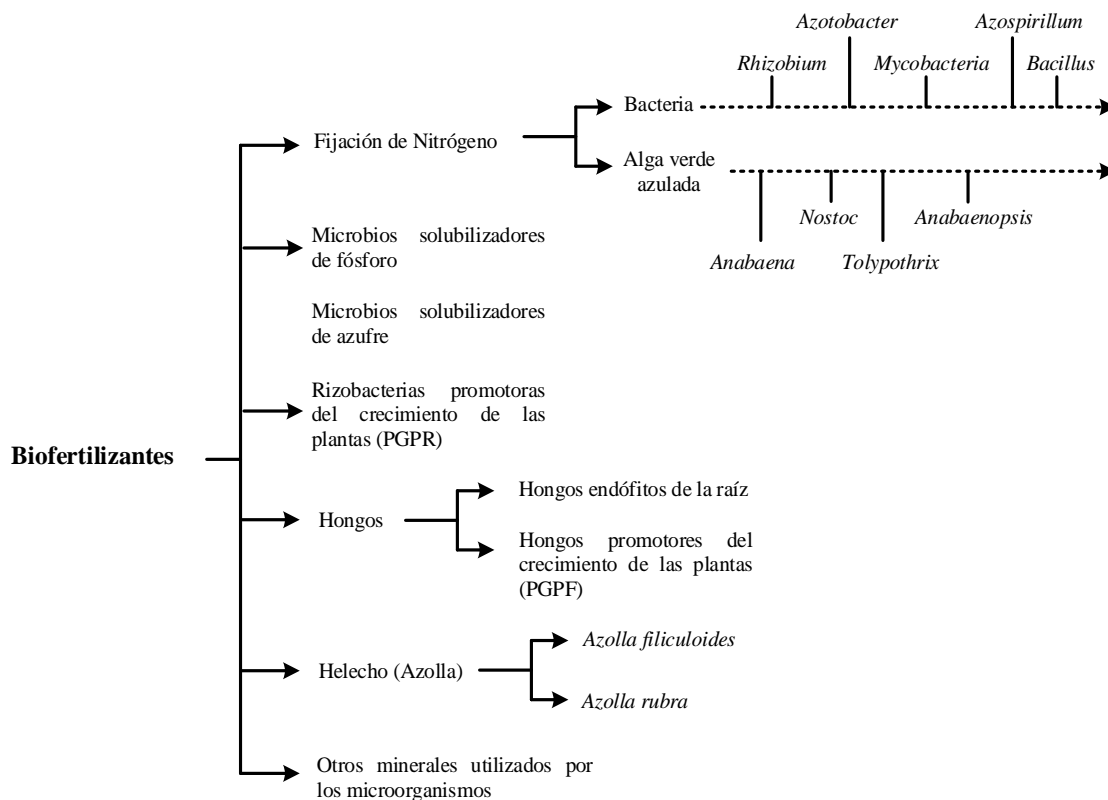


Figura 11: Microorganismos utilizados para la explotación de biofertilizantes

FUENTE: Xiang *et al.* (2012)

2.1.3 Microorganismos como biopesticidas

En las rizobacterias promotoras del crecimiento, la producción de antibióticos se considera uno de los mecanismos de biocontrol más potentes contra los fitopatógenos (Gupta *et al.*, 2015).

Los biopesticidas en los últimos años están reemplazando a los productos químicos plaguicidas, para superar el efecto perjudicial de estos sobre el organismo no objetivo (Kachhawa, 2017); los biopesticidas microbianos son microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas controlando los fitopatógenos a través de una amplia variedad de mecanismos, tales como producción de antibióticos, sideróforos, HCN, producción de enzimas hidrolíticas, que inducen a la resistencia sistémica (Gupta *et al.*, 2015). Además de suprimir localmente patógenos a través de la competencia o a través de la producción de antibióticos y sideróforos, los microbios beneficiosos del suelo pueden mejorar la resistencia de las plantas contra una amplia gama de patógenos y herbívoros en tejidos de plantas sistémicas (Pineda *et al.*, 2013). *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y actinomicetos antagonistas son conocidos como potentes productores de antibióticos de diversos modos de acción (Bhattacharyya *et al.*, 2016), los antibióticos identificados incluyen compuestos tales como anfisina, 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), oomicina A, fenazina, piroluteorina, pirrolnitrina, tensina, tropolona y lipopéptidos cíclicos producido por *Pseudomonas* y oligomicina A, kanosamina, zwittermicina A, y xantobaccina producida por *Bacillus*, *Streptomyces*, y *Stenotrophomonas* sp. (Gupta *et al.*, 2015).

Entre los diversos bio productos *Bacillus thuringiensis* (Bt), *Trichoderma viride*, *Metarhizium* spp., *Beauveria bassiana*, se utilizan popularmente en la protección de las plantas (Kachhawa, 2017). En los agentes para biocontrol se destacan: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Gliocladium* spp., *Trichoderma* spp., *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii*, *Verticillium chlamydosporium*, *Streptomyces griseoviridi*, *Streptomyces lydicus*, *Ampelomyces quisqualis*, *Candida oleophila*, *Fusarium oxysporum* (no patógeno), *Burkholderia*, *Agrobacterium Radiobacter* cepa 84, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pythium oligandrum*, *Erwinia amylovora* (horquilla proteína), *Phlebia gigantean*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium islanidicum* (para el cacahuete), *Alcaligenes* spp., *Chaetomium globosum*, *Aspergillus niger* - cepa AN27, hongos VAM, *Myrothecium verrucaria*, *Photobacterium luminescences akhurstii* cepa K-1, *Serratia marcescens* GPS 5 entre otros (Singh, 2014).

La interacción de las especies vegetales, los exudados de raíz, los patógenos, las PGPR y otros microbios beneficios en la rizósfera, se ilustra en la figura 12 (Goswami *et al.*, 2016).

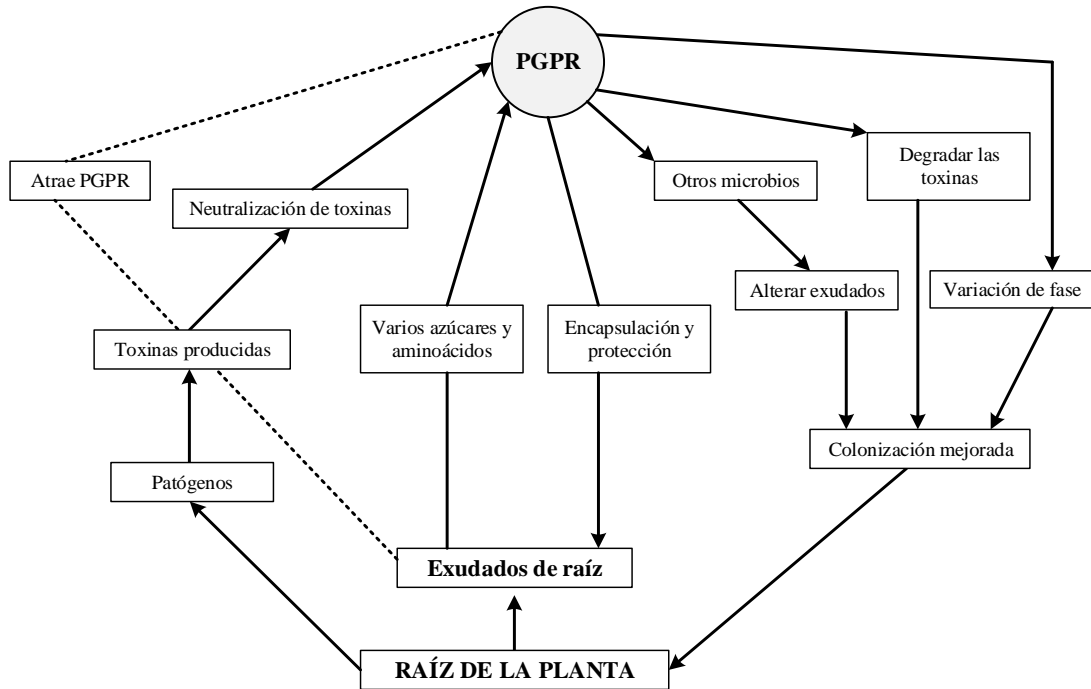


Figura 12: Interacción de la planta, exudados de raíz, patógenos, PGPR y otros microbios beneficios en la rizósfera

FUENTE: Goswami *et al.* (2016)

2.1.4 Bioremediación de suelos con microorganismos benéficos

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos benéficos para limpiar ambientes contaminados; es empleada para atacar o sustraer agentes contaminantes específicos del suelo, se realiza por medio de degradación o transformación de diferentes compuestos nocivos en otros de menor toxicidad o materia orgánica en descomposición. A través de investigaciones realizadas con la secuenciación de genes 16S-RNA, se encontró consorcios bacterianos degradadores de hidrocarburos, demostrando la presencia de: *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilis*, *Acinetobacter junii*, y *Pseudomonas sp.* (Benavides *et al.*, 2006).

a. Bioremediación de suelos contaminados con metales pesados

Las técnicas para la remediación de suelos se basan en métodos fisicoquímicos y biológicos; estas últimas llamadas biorremediación, ya que aprovecha el potencial metabólico de organismos vivos (bacterias y hongos) para la descontaminación. Los

microbios se han empleado porque muestran un alto nivel de biosorción de metales pesados, especialmente en la biosorción y la precipitación de cadmio; por lo tanto, el aumento microbiano del suelo utilizando microorganismos vivos para la inmovilización de reactivos es una buena alternativa. Una cepa bacteriana *Pseudomonas putida* aislada del suelo contaminado presentó tanto alta tolerancia y gran capacidad de absorción de metales pesados (Fu *et al.*, 2008); los hongos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Rhizopus* han sido estudiados ampliamente como potenciales agentes microbianos para la extracción de metales pesados a partir de soluciones acuosas (Dixit *et al.*, 2015).

b. Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

Tanto *in situ* como *ex situ*, los procesos del tratamiento que implica el uso de microorganismos para descomponer los contaminantes ambientales orgánicos peligrosos para evitar las desventajas económicas y técnicas, son viables. Las cepas de *Bacillus subtilis* DM-04 y *Pseudomonas aeruginosa* M y NM, aislados de una muestra de suelo contaminada con petróleo en el nordeste de la India (campo petrolero ONGC) crecieron en un gran número de compuestos de hidrocarburos como fuente de carbono y energía, que demuestra que estas cepas podría ser degradadores eficientes de hidrocarburos (Das y Mukherjee, 2007). Uno de los géneros bacterianos más explotados en bio procesos no convencionales es *Rhodococcus*, un grupo único consistente en microorganismos que presentan una gran diversidad metabólica, capaz de transformar, biodegradar y utilizar como única fuente de carbono compuestos hidrófobos; la *Pseudomonas fluorescens* es degradadora de naftaleno y fenantreno, ventaja que tiene frente a las otras *Pseudomonas*, que solo metabolizan naftaleno y asfaltenos (Benavides *et al.*, 2006).

El proceso de biodegradación de hidrocarburos se lleva a cabo por diversos microorganismos presentes en el suelo, pero hay relativamente pocos microorganismos que utilizan hidrocarburos como única fuente de carbono y energía en comparación con el número general de bacterias; *Bacillus* sp., *Acinetobacter*, *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas putida* son utilizadas (Łebkowska *et al.*, 2011).

La reducción de la concentración de HAPs se vincula a la comunidad bacteriana, que se caracteriza por una alta diversidad y la persistencia de un consorcio bacteriano representado por cepas bacterianas Gram-negativas durante todo el proceso de

tratamiento biológico. En particular géneros de *Pseudomonas* y *Enterobacter* tienen una fuerte capacidad de degradar HAPs (Sun *et al.*, 2012).

c. **Bioremediación de suelos contaminados con pesticidas**

Estudios a nivel mundial han determinado que los microorganismos son los principales responsables de la degradación de compuestos plaguicidas. Esto se debe al uso extenso de estos compuestos en suelos agrícolas, lo cual ha inducido mecanismos de adaptación genética en los microorganismos, que ha conllevado a la síntesis de enzimas que oxidan, hidrolizan e hidroxilan los plaguicidas, permitiendo su utilización como única fuente de carbono, nitrógeno, azufre o fósforo, facilitando la eliminación de la toxicidad del compuesto por actividad cometabólica o mineralización completa (Castellanos y Rache, 2013).

Se estudió la biodegradación de permetrina y cipermetrina a concentraciones de 50 y 100 mg/l, con cepas de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina*, *Chromobacterium violaceum* y *Burkholderia cepacia*, en reactores por lotes. Las cepas de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas mendocina* fueron las que presentaron una mayor capacidad de biodegradación de los plaguicidas, a partir de los 5 días esta es del 65 por ciento para ambos plaguicidas y después de los 15 días se mantiene prácticamente constante, siendo de hasta el 95 por ciento para permetrina a 50 y 100 mg/l y para cipermetrina del 90 por ciento a 50 mg/l y 89 por ciento a 100 mg/l medido mediante espectrofotometría UV/Vis, estos resultados indican que estas bacterias pueden ser usadas en procesos de biorremediación de estos plaguicidas (Mendoza *et al.*, 2011). Se han reportado diversos hongos degradadores de plaguicidas N-metilcarbamatos como *Mucor ramanianus*, *Aspergillus niger*, *Gliocladium* sp., levaduras como *Pichia anomala* cepa HQ-C-01, capaces de degradar carbofuran como única fuente de carbono y/o de nitrógeno (Castellanos y Rache, 2013).

La biodegradación de pesticidas utilizando microorganismos nativos para su extracción del medio ambiente, es bastante atractivo. Se han realizado investigaciones para determinar la eficacia de las comunidades de bacterias del suelo para la biodegradación de clorpirifos y TCP (3,5,6-tricloro-2-piridinol), los resultados indican la alta afinidad de las comunidades bacterianas del suelo para la degradación de clorpirifos y TCP. El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA ha confirmado la relación genética de los aislados con *Pseudomonas*, *Agrobacterium* y con *Bacillus*; su potencial de degradación

para clorpirifos y TCP se ha encontrado en este orden: *Pseudomonas*> *Agrobacterium*> *Bacillus* (Maya *et al.*, 2011).

2.1.5 Microorganismos benéficos y cultivo de fresa

Existe la preocupación permanente por investigar la incidencia de los microorganismos benéficos en la morfología y rendimiento del cultivo de fresa. En estudios previos, en general los resultados sugieren que la inoculación de raíces con *Bacillus* M3 solo o en combinación con *Bacillus* OSU-142 o *Pseudomonas* BA-8 tiene el potencial de aumentar el rendimiento, el crecimiento y el contenido nutricional de la planta de fresa en condiciones de crecimiento orgánico (Esitken *et al.*, 2010).

Se determinó que las aplicaciones de bacterias no tienen un efecto importante sobre el peso promedio de los frutos y pH, el resultado de este estudio sugiere que *Pseudomonas* BA-8, *Bacillus* OSU-142 y *Bacillus* M-3 tienen potencial para aumentar el rendimiento en planta de fresa (Pirlak y Köse, 2009). *Bacillus subtilis* fue el microorganismo promotor del crecimiento más prometedor, tanto en la promoción del crecimiento como en el control de la enfermedad, los microorganismos *T. harzianum*, *G. catenulatum* y *B. subtilis*, así como la mezcla *T. harzianum* + *G. catenulatum* fueron los mejores tratamientos en un estudio realizado (Vestberg *et al.*, 2004).

En otras investigaciones las plantas fueron tratadas con tres diferentes fertilizantes, es decir, el inóculo líquido de la bacteria diazotrófica *Klebsiella planticola* (PGPR1), el inóculo líquido combinado de *Azotobacter*, *Derris* y *Bacillus* genera (PGPR2) y el fertilizante Multi Kmg. La aplicación de PGPR1 dió el mayor número total de microorganismos, amonificadores, actinomicetos y oligonitrófilos. Los fertilizantes no afectaron el número de hongos y azotobacterios. En términos de potencial generativo, los fertilizantes tuvieron un efecto significativo en el rendimiento por planta. El mayor rendimiento (0,52 kg por planta) se registró en plantas tratadas con PGPR1. El análisis de propiedades morfométricas y químicas reveló una influencia significativa de los fertilizantes sobre las propiedades químicas de los frutos de Senga Sengana (Pesakovic *et al.*, 2013).

Se destaca los efectos de la inoculación de plantas de fresa con *Rhizobium* sp., cepa PEPV16, perteneciente al grupo filogenético de *R. leguminosarum*, y cuya capacidad de promoción del crecimiento de las plantas ha sido reportada previamente para lechuga (*Lactuca sativa*) y zanahorias (*Daucus carota*). Los resultados demostraron que el PEPV16 promueve el

crecimiento de fresas a través de aumentos significativos en el número de estolones, flores y frutos, en comparación con los controles no inoculados, además los frutos de las plantas inoculadas tenían concentraciones más altas de Fe, Zn, Mn y Mo, así como también mayores concentraciones de ácidos orgánicos, como cítrico y málico, y menores cantidades de ácido ascórbico (Flores *et al.*, 2016).

Es importante tener presente que *Azospirillum brasilense* es una bacteria promotora del crecimiento de las plantas (PGPB), capaz de mejorar el desarrollo y rendimiento de cultivos importantes incluyendo fresa (*Fragaria ananassa*, Duch.) (Guerrero-Molina *et al.*, 2011).

En condiciones de invernadero se reveló la capacidad de las cepas *Bacillus* y *Sphingopyxis*, para promover el crecimiento vegetal, mejorar el número de raíces, la longitud y peso seco, así como también el número de hojas, longitud del pecíolo y peso de la parte aérea. Siete *Bacillus* spp., promovieron el desarrollo de raíces y una cepa de *Sphingopyxis* sp., promovió el desarrollo de brotes de plantas de fresa. La promoción del crecimiento de la planta se correlacionó con la producción de ácido indol acético y la solubilización de fosfato (Dias *et al.*, 2009). La fertilización con biopreparaciones intensificó el crecimiento del sistema radicular de las plantas de fresa (Derkowska *et al.*, 2015).

Durante tres años se estudió el efecto de tres cepas de bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPB), solas o en combinación (*Pseudomonas* BA-8, *Bacillus* OSU-142 y *Bacillus* M-3) sobre el cultivo de fresa. Los datos mostraron que PGPB aumentan significativamente el rendimiento de la fruta, crecimiento de la planta y contenido de P y Zn de las hojas. En general, los resultados de este estudio sugieren que la inoculación de *Bacillus* M-3 a las raíces, solo o en combinación con la pulverización de *Bacillus* OSU-142 o *Pseudomonas* BA-8 tienen el potencial de aumentar el rendimiento, el crecimiento y el contenido nutricional de la planta de fresa en condiciones de crecimiento orgánico (Esitken *et al.*, 2010).

Las vías de biosíntesis de auxinas dependientes de triptófano en plantas de fresa se presentan en la figura 13.

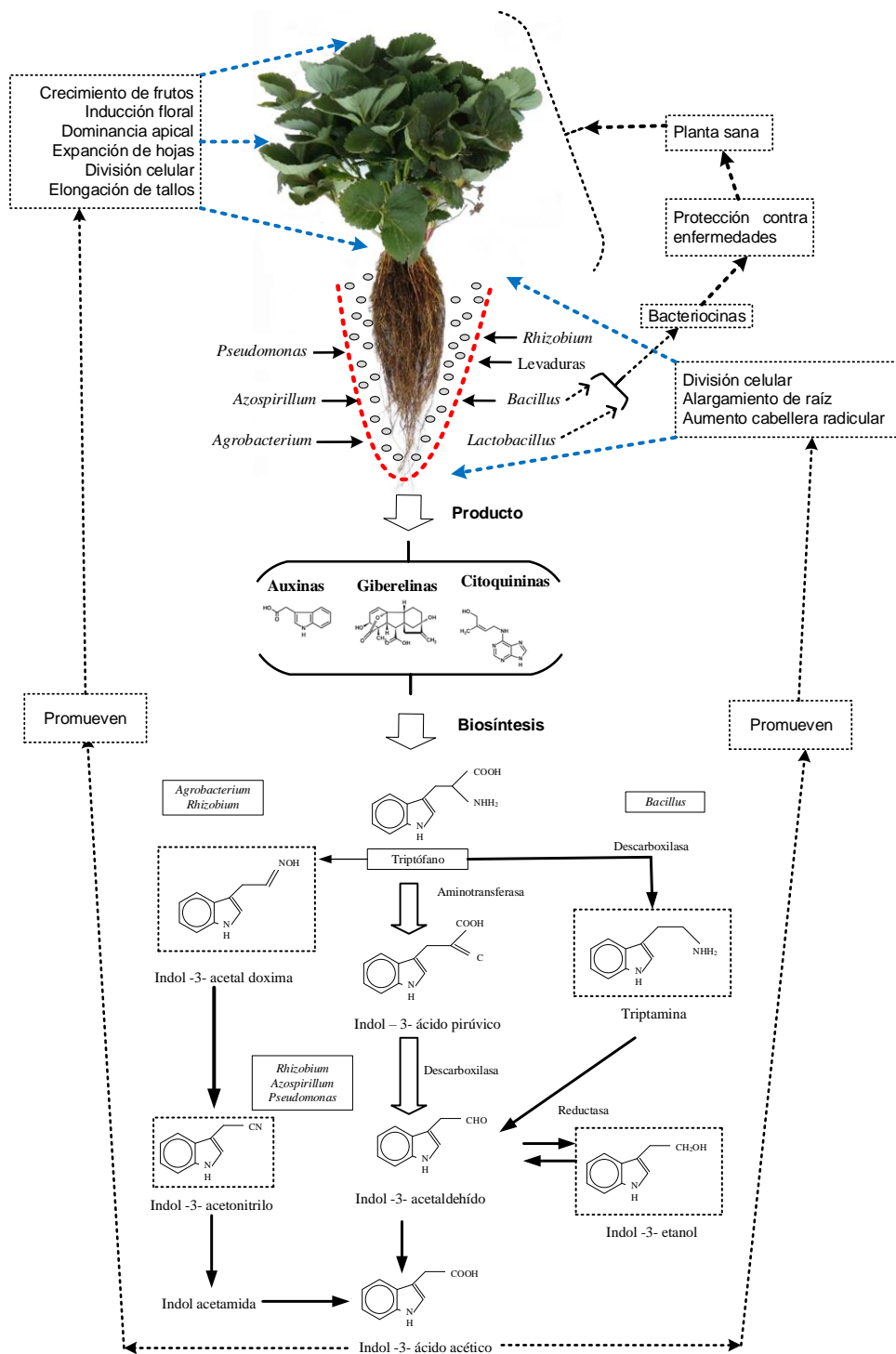


Figura 13: Vías de biosíntesis de auxinas dependientes de triptófano en plantas de fresa

2.1.6 Inoculación de microorganismos benéficos

La inoculación de microorganismos benéficos en los suelos se realiza con la finalidad de reactivar la flora microbiana, para lo cual necesitamos conocer a los microorganismos y <<las relaciones e interacciones ecológicas con otros microorganismos, incluyendo su

habilidad para coexistir en cultivos mixtos y después en sus aplicaciones al suelo>> (Higa y Parr, 1994). La inoculación de microorganismos consiste en el suministro de altas densidades de microbios viables y de una rápida colonización en la rizósfera huésped (Trabelsi y Mhamdi, 2013). <<*El uso de cultivos mixtos de microorganismos benéficos como inoculantes del suelo está basado en los principios de los ecosistemas naturales los que son sostenidos por sus constituyentes*>> (Higa y Parr, 1994). Los microorganismos beneficiosos pueden ser introducidos "inoculando" los sistemas radiculares de las plantas para formar una asociación efectiva (Wilkinson, 2009). Para tener éxito en la inoculación de microorganismos benéficos en el suelo <<*es necesario conocer el crecimiento individual y características de sobrevivencia de cada microorganismo benéfico en particular, incluyendo sus requerimientos nutricionales y medioambientales*>> (Higa y Parr, 1994). La inoculación de microorganismos induciría al menos una perturbación transitoria del equilibrio de las comunidades microbianas del suelo (Trabelsi y Mhamdi, 2013). <<*Muchos creen que, cuando los microorganismos benéficos son cultivados e inoculados en los suelos, su número es relativamente pequeño comparado con sus habitantes nativos, y ellos pueden ser rápidamente suprimidos por la microflora establecida en él*>> (Higa y Parr, 1994), por lo que es importante estudiar la correlación poblacional entre los microorganismos antes de la inoculación y luego de realizada esta.

2.2 MICROORGANISMOS EFICIENTES EM

El concepto de los Microorganismos Eficaces (EM) fue desarrollado por el Profesor Teruo Higa, de la Universidad de Ryukyus, Okinawa, Japón, consiste en una mezcla de microorganismos que habitan naturalmente en el suelo del que se puede aislar y aplicarse como inoculante para aumentar la diversidad microbiana de los suelos y las plantas (Higa y Parr, 1994).

Los Microorganismos Efectivos conocidos por su sigla en inglés EM (Effective Microorganisms), son una mezcla de tres grupos de microorganismos completamente naturales que se encuentran comúnmente en los suelos y en los alimentos, contienen: bacterias fototróficas o fotosintéticas, bacterias ácido lácticas y levaduras; habitantes comunes de los suelos y de las raíces de las plantas (BID, 2009).

Los "Microorganismos Eficaces" o EM hace referencia a <<*cultivos mixtos específicos de microorganismos benéficos que están siendo usados efectivamente como inoculante microbiano*>> (Higa y Parr, 1994). Renuka y Parameswari (2012) indica que la tecnología

de Microorganismos Eficaces (EM) se basa en las especies que contienen los consorcios que son una mezcla de cinco géneros de organismos, a saber, actinomicetos, hongos, bacterias fotosintéticas, levaduras y bacterias de ácido láctico, aisladas del respectivo entorno. Arias (2010) enfatiza que son una cultura mixta de microorganismos benéficos (fundamentalmente bacterias fotosintéticas productoras de ácido láctico, levaduras, actinomicetos y hongos fermentadores) que pueden aplicarse como inoculante para incrementar la diversidad microbiana de los suelos; en estudios realizados por Alfonso *et al.* (2005) los resultados demostraron que los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces*, forman parte de la comunidad microbiana de la rizósfera del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y que *Azospirillum* es el género dominante provocando un rendimiento agrícola superior a un 11% con respecto a las plantas testigo.

Singh *et al.* (2011) afirma que los Microorganismos Eficientes (EM) contienen especies seleccionadas, incluyendo poblaciones predominantes de bacterias ácido lácticas además de levaduras y un número más pequeño de bacterias fotosintéticas. En estas poblaciones microbianas pueden constar de especies seleccionadas de microorganismos incluyendo rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, fijadoras de nitrógeno, supresoras de enfermedades de plantas, de cianobacterias, hongos, actinomicetos degradantes y otros microbios útiles; de acuerdo a Higa y Parr (1994) todos los microorganismos eficientes son compatibles mutuamente unos con otros y capaces de coexistir en un cultivo líquido; Yamada y Xu (2001) indican que el abono orgánico inoculado y fermentado con Microorganismos Eficientes contiene grandes poblaciones de *Lactobacillus* spp., actinomicetos, bacterias fotosintética y levaduras, además altas concentraciones de compuestos intermedios tales como ácidos orgánicos y aminoácidos; en nuestro medio una de las principales limitantes es el desconocimiento de las especies de microorganismos presentes en los suelos y las interacciones microbianas en la rizósfera de los cultivos.

2.2.1 Tipos de Microorganismos Eficientes

De acuerdo a Packialakshmi y Yasotha (2014) entre los principales microorganismos en cultivo EM predominan las bacterias fotosintéticas (*Rhodopseudomonas palustris* y *Rhodobacter sphaeroides*), lactobacilos (*L. plantarum*, *L. casei* y *Streptococcus lactis*), levadura (*Saccharomyces* spp.) y actinomicetos (*Streptomyces* spp); Higa y Parr (1994) afirman que la cultura EM <<contiene especies seleccionadas de microorganismos incluyendo poblaciones predominantes de bacterias del ácido láctico y levaduras, y un

pequeño número de bacterias fotosintéticas, actinomicetos y otros tipos de organismos>> todos estos microorganismos presentan mutua compatibilidad entre ellos y coexisten en el cultivo líquido. Al respecto Renuka y Parameswari (2012), indica que EM se compone de una amplia variedad de microorganismos eficaces, beneficiosos y no patógenos que conviven juntos, esencialmente se trata de una combinación de especies aerobias y anaerobias, se encuentran comúnmente en todos los ecosistemas; de acuerdo a los autores EM contiene alrededor de 80 especies de microorganismos que son capaces de purificar y revivir la naturaleza, las principales especies son normalmente el *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* y *Streptococcus lactis* (bacterias del ácido láctico), *Rhodopseudomonas palustris* y *Rhodobacter sphaeroides*, (bacterias fotosintéticas), *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* (levaduras), *Streptomyces albus* y *S. griseus* (actinomicetos), además *Aspergillus oryzae*, *Penicillium* sp., y *Mucor hiemalis* (hongos de fermentación).

a. Bacterias fotosintéticas (*Rhodopseudomona* spp.)

Son consideradas el eje central de la actividad de EM, pues dan sostén a otros microorganismos, por ejemplo, las poblaciones de micorrizas de la raíz, se incrementan por la disponibilidad de aminoácidos que segregan las bacterias fotosintéticas, las micorrizas, mejoran la solubilidad de los fosfatos, supliendo de esta forma el fósforo a las plantas, también coexisten con *Azotobacter* y *Rhizobium*, que fijan nitrógeno atmosférico (BID, 2009). Las sustancias sintetizadas comprenden aminoácidos, ácidos nucleicos, sustancias bioactivas y azúcares, promoviendo el crecimiento y desarrollo de las plantas, <<*los metabolitos son absorbidos directamente por ellas, y actúan como sustrato para incrementar la población de otros Microorganismos Eficaces*>> (Arias, 2010).

La diversidad de la familia Rhodospirillaceae se refleja en su morfología, la estructura de su membrana interna, la composición de sus carotenoides y la bacterioclorofila a o b como únicos pigmentos fotosintéticos. La coloración de sus cultivos es típica, adquiriendo tonalidades que van desde el verde, verde - amarillo, café - amarillo, café, café - rojizo, rojo o violeta – púrpura, y su morfología celular puede ser de bacilos, cocos o espirales, relativamente pequeños, con movilidad mediante flagelos polares o peritricos y en ocasiones con vacuolas con gas (Pacheco *et al.*, 2006).

b. Bacterias acidolácticas (*Lactobacillus* spp.)

Originan ácido láctico a partir de azúcares y otros carbohidratos, producidos por las bacterias fotosintéticas y levaduras. El ácido láctico, es un compuesto que controla microorganismos nocivos y mejora la descomposición de la materia orgánica. Arias (2010) enfatiza que <<el ácido láctico es un fuerte esterilizador, suprime microorganismos patógenos e incrementa la rápida descomposición de materia orgánica>>. Los *Lactobacillus* promueven la fermentación y desdoblamiento de lignina y celulosa, permitiendo una más rápida descomposición de los materiales vegetales; también, tienen la habilidad de suprimir microorganismos causantes de enfermedades, como los hongos del género *Fusarium* que debilitan las plantas, exponiéndolas al ataque de otras enfermedades y plagas (BID, 2009).

De acuerdo a Kandler (1992) el género *Lactobacillus* son bacterias con forma de varillas rectas o curvas, de 0,6 - 0,9 x 1,5-6 µm de tamaño, que se presentan aisladas, por parejas o en cadenas cortas. Inmóviles y aflagelados, gram positivas, anaerobios o anaerobios facultativos, homofermentativos, metabolizan los carbohidratos dando como producto final ácido láctico. El intervalo de temperatura y de pH óptimo de crecimiento se sitúa entre 35 - 38 °C y 5,5 - 5,8 respectivamente. Los *Lactobacillus* tienen unas necesidades nutritivas complejas para su crecimiento: carbohidratos, nucleótidos, aminoácidos y vitaminas

Collado (2004) expresa que las bacterias acidolácticas son bacilos largos con morfología cocobacilar y corineforme, que es frecuente la formación de cadenas y son gram positivos, inmóviles, aunque existen unas pocas especies móviles por flagelos peritricos. No son esporulados, son sacarolíticos obligados, su característica principal es la de fermentar azúcares con producción de ácido láctico, pudiendo ser homofermentadores u heterofermentadores y crecen entre 2 °C y 53 °C, aunque su temperatura óptima es de 30 °C – 40 °C. Son acidúricos, creciendo óptimamente a pH comprendidos entre 5.5 - 6.2; García, (2012) complementa que su metabolismo es estrictamente fermentativo y al menos la mitad de los productos carbonosos finales es lactato que normalmente no es fermentado. Otros productos adicionales pueden ser acetato, etanol, CO₂, formato o succinato. No se producen ácidos volátiles con más de dos átomos de carbono. No suelen reducir los nitratos y, si lo hacen, es sólo cuando el pH final está en torno a 6,0. No licúan la gelatina y la caseína no la digieren, aunque la

mayoría de las cepas producen pequeñas cantidades de nitrógeno soluble. Tampoco producen indol ni H₂S, son catalasa y citocromo negativas, sin embargo, algunas cepas descomponen el peróxido por medio de una pseudocatalasa, la reacción de la bencidina es negativa. Es rara la producción de pigmentos.

c. Levaduras (*Saccharomyces* spp.)

Sintetizan tanto sustancias antimicrobiales, como compuestos útiles para el crecimiento de las plantas, partiendo de aminoácidos y azúcares (secretados por las bacterias fotosintéticas), así como de materia orgánica. Los elementos producidos por las levaduras (hormonas y enzimas), promueven la división activa de células, siendo también, sustratos útiles para las bacterias acidolácticas y los actinomicetos (BID, 2009). Las sustancias bioactivas como las hormonas y las enzimas producidas por levaduras promueven la actividad celular y la división de la raíz. <<*Las levaduras constituyen el grupo de microorganismos más íntimamente relacionados con el progreso y el bienestar de la humanidad. Algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* y en concreto, *Saccharomyces cerevisiae*, conocida como levadura de cerveza o levadura del pan debido a su empleo como fermento, se han utilizado a lo largo de la historia*>> (Arias, 2012).

Las levaduras son los eucariotas más simples que existen y tienen una gran diversidad respecto su tamaño, forma y color. Las células están formadas por unas envueltas celulares y un citoplasma con diversos orgánulos característicos de las células eucariotas como son un núcleo rodeado de membrana, retículo endoplasmático liso y rugoso, aparato de Golgi, mitocondrias y vacuolas, entre otros. En *S. cerevisiae*, estas capas constituyen el 15 % del volumen total de la célula, cuyo papel principal es proporcionar una barrera con el exterior y controlar la permeabilidad.

Las levaduras se reproducen predominantemente de forma asexual por gemación (solo el género *Schizosaccharomyces* se reproduce por fisión binaria) (Tomás *et al.*, 2010). La levadura *S. cerevisiae* es un hongo unicelular perteneciente a la clase de los hemiascomicetos, dentro del género *Saccharomyces*, la especie *cerevisiae* posee un ciclo de vida que incluye una fase sexual, alterna dos fases, una haploide y otra diploide. Las células haploides presentan dos posibilidades en su ciclo biológico: un ciclo de reproducción vegetativo, por el que la célula se divide para dar dos células iguales, y un ciclo sexual, en el que dos células de tipo sexual opuesto se fusionan para dar lugar a

una célula diploide que entra de nuevo en un ciclo de división vegetativo. Durante el ciclo de vida vegetativo, la levadura se divide por gemación. La célula hija inicia su crecimiento formando una yema en la célula madre hasta que alcanza un tamaño similar a ésta, teniendo lugar en este momento la citoquinesis, septación y separación de las dos células. En cuanto al ciclo sexual, en *S. cerevisiae* existen dos tipos celulares sexualmente opuestos, a y α , determinados por un par de alelos heterocigotos: MAT a y MAT α . Tanto las células haploides a como las α expresan de forma constitutiva una feromona del mismo nombre. Las células diploides pueden reproducirse vegetativamente por gemación si el medio en el que se encuentran tiene los nutrientes apropiados para ello o pueden esporular en condiciones ambientales de limitación de nutrientes, como pueden ser la falta de nitrógeno y la ausencia de una fuente de carbono fermentable en el medio (Arias, 2012).

2.2.2 Importancia agrícola

El uso cada vez más frecuente de agroquímicos sumado a las prácticas agrícolas intensivas, así como a los mono cultivos han llevado a la degradación de los suelos, por lo tanto, a la reducción del espacio donde se produce los alimentos para los seres vivos; lo cual es motivo de absoluta preocupación, que conlleva a buscar alternativas para la recuperación del suelo agrícola, así como para evitar su pérdida y deterioro. La agricultura orgánica se está convirtiendo en una herramienta importante para recuperar la calidad de los suelos degradados e incrementar la producción agrícola, por lo tanto, el uso de agentes biológicos como biofertilizantes o bioplaguicidas es una parte integral de la agricultura orgánica, especialmente en el cultivo de hortalizas (Srivastava *et al.*, 2007).

El uso de Microorganismos Eficientes en la producción agrícola, es motivo de investigación y estudio debido a la gran importancia que han despertado estos, por los beneficios que pueden aportar a las condiciones del suelo y por consiguiente al rendimiento de los cultivos, <<las investigaciones han mostrado que la inoculación de la comunidad microbiana eficiente para el ecosistema del suelo mejora la calidad del suelo, la salud del suelo, crecimiento, rendimiento y calidad de los cultivos>> (Singh *et al.*, 2011). De acuerdo a Arias (2010), el uso de Microorganismos Eficientes EM en el sector agrícola, permite su recuperación, por lo tanto la aplicación de esta tecnología actualmente está beneficiando a los agricultores; las poblaciones microbianas son fundamentales para los procesos que impulsan la estabilidad y la productividad de los agroecosistemas (Singh *et al.*, 2011), ya

que la interacción entre los microbios solos o en mezclas y las plantas podría mejorar la productividad de la mayoría de los sistemas de cultivo de manera significativa; en estudios realizados se evidencia el efecto antagónico sobre especies perjudiciales, por ejemplo el organismo *Bacillus megaterium* actúa contra el patógeno *E. coli* (Packialakshmi y Yasothea, 2014), por lo tanto resulta importante en la agricultura actual el uso de biofertilizantes, que son microorganismos que mejoran la disponibilidad de nutrientes, contribuyendo a la nutrición de la planta ya sea por facilitar la absorción de nutrientes o aumentando la disponibilidad de estos en la zona radicular (Pereg y McMillan, 2015). La rizósfera es uno de los principales sitios donde se presentan microorganismos, específicamente funcionales, como fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos, promotores del crecimiento vegetal, biocontroladores y especies patogénicas, normalmente, compiten por espacio y por nutrientes. Estas interrelaciones entre microorganismos inciden en la interacción suelo – planta – microorganismos - ambiente y repercuten de forma directa, en el crecimiento y en el desarrollo de las especies vegetales. De acuerdo a Cano (2011) los microorganismos rizosféricos, como los hongos formadores de micorrizas arbusculares (AMF), hongos del género *Trichoderma* y bacterias del género *Pseudomonas*, son usualmente catalogados como agentes de control biológico (BCA) y microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM).

2.2.3 Efectos de los EM en el rendimiento de los cultivos

A nivel mundial se han realizado investigaciones para evaluar el efecto de los EM en el desarrollo vegetativo y producción de diferentes cultivos. En un estudio ejecutado en cultivo de fresa se aplicó tres preparados con EM, se concluyó que no tiene ningún efecto significativo sobre los cambios en los valores de pH pero provocan el crecimiento de la planta y mejoran la fructificación y calidad de la fruta (Zydlik y Zydlik, 2013), en investigaciones realizadas en el cultivo de col, los resultados mostraron un aumento del área foliar, esto sugirió que EM mejora la calidad así como el rendimiento de la planta (Chantal *et al.*, 2010), en experimentos efectuados en cultivo de maíz, los resultados mostraron que mejoran el rendimiento y sus componentes de manera significativa (Dehghani *et al.*, 2013), en cultivo de flores cambia el contenido de nutrientes disponibles en el sustrato, además de un efecto positivo en el número de brotes formados así como en el diámetro de las flores en caso de rosas y el número de inflorescencias formadas en caso de gerberas (Górski y Kleiber, 2010).

Con respecto a la cantidad y frecuencia de aplicación en el cultivo de palmera datilera se ha concluido que es preferible añadir EM en 90 ml/palma/año en combinación con sulfato de potasio en 1,5 kg/palma/año dividido en tres dosis iguales, aplicadas tres veces al año para mejorar el contenido foliar de clorofila, porcentaje de cuaja, porcentaje de fruta retenida y el rendimiento de la planta (Salama *et al.*, 2014), en el cultivo de tabaco tratado con microorganismos eficaces (EM) los resultados mostraron un aumento significativo de la altura de la planta y circunferencia del tallo, también mejoró el contenido de clorofila de las hojas (Chantal *et al.*, 2013), <<ha sido ampliamente demostrado que los microorganismos del suelo interactúan con las raíces de las plantas y constituyentes del suelo en la interfase raíz-suelo>> (Pedraza *et al.*, 2010).

2.2.4 Efecto antagónico de los Microorganismos Eficientes

Dentro del consorcio microbiano eficiente, se destacan los microorganismos *Bacillus* spp., y *Lactobacillus* spp., con capacidades antagónicas ante diferentes patógenos causantes de enfermedades en los cultivos.

Los *Bacillus* presentan antagonismos ante patógenos <<a través de la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas, polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos>> (Corrales *et al.*, 2012), además por la facilidad de digerir la quitina, y la producción de antibióticos como: bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina, entre otros (Bernal *et al.*, 2002). El grupo de bacterias ácido lácticas <<está compuesto de un número de géneros incluyendo *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*>> (Parra, 2010) que se caracterizan por la producción de metabolitos bioactivos que actúan contra un amplio espectro de microorganismos patógenos como bacterias y hongos (Shrestha *et al.*, 2014), no obstante en estudios realizados por Megali *et al.* (2014), se demuestra que con respecto a los mecanismos de resistencia en cultivos de tomate, comparado a los fertilizantes químicos los microorganismos beneficiosos aumentan el crecimiento de la planta y producción de fruta por 35 y 61 por ciento, respectivamente y contrariamente a lo esperado, plantas inoculadas con microorganismos beneficiosos permiten mayor supervivencia de larvas de insectos con un promedio de 41 por ciento más que en las plantas no fertilizadas (Megali *et al.*, 2014).

De acuerdo a varias investigaciones desarrolladas se evidencia que los cultivos adicionados Microorganismos Eficientes ofrecen mayor resistencia a los patógenos, en cultivo de

pimiento los resultados indican que los tratamientos donde se aplicó EM + *Trichoderma* tuvieron una menor incidencia de los patógenos *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium* sp., 5 y 6 por ciento respectivamente; en el tratamiento a base de abono químico, la incidencia de los patógenos fue igual al testigo, llegando a ser mayor al 20 por ciento (Flores *et al.*, 2012).

Hamed *et al.* (2011), indica que en pruebas in vitro las bacterias del ácido láctico (LAB), aisladas a partir de leche y yogur aumentan significativamente el efecto protector contra *F. oxysporum*, especialmente cuando LAB se aplica a semillas, el número de raíces aumenta en 216, 311, y 358 por ciento, se ha demostrado por primera vez la capacidad de LAB para actuar como bacterias promotoras del crecimiento de la planta al igual que agente de bio control contra algunos hongos fitopatógenos menores.

2.2.5 Microorganismos Eficientes, patógenos y cultivo de fresa

La fresa es un cultivo de interés comercial por el rendimiento que ofrece esta pequeña planta, es una de las frutas más preferidas por niños y adultos, además contienen importantes nutrientes. Sin embargo, las explotaciones agrícolas se ven perjudicadas debido principalmente a la presencia de un sin número de patógenos que afectan el rendimiento del cultivo y finalmente provoca la muerte de las plantas; es así que se ha convertido en una limitante importante para los productores ya que no basta los controles sanitarios con productos químicos, que además amenazan la calidad de la fruta y la salud de las personas. Ante esta situación se han desarrollado investigaciones para evaluar la incidencia de Microorganismos Eficientes en el rendimiento del cultivo de fresa y el efecto sobre patógenos.

Estudios llevados a cabo en la fresa “Senga Sengana” bajo condiciones de invernadero, tratados con inóculo líquido de bacterias *Klebsiella diazotróficas*, inóculo líquido combinado de *Azotobacter*, *Bacillus*, *Dexia* y fertilizante, tuvieron un efecto significativo en el rendimiento por planta; el análisis de morfometría y propiedades químicas revela una influencia significativa de los fertilizantes en las propiedades químicas de las frutas “Senga Sengana” (Pešaković *et al.*, 2013).

En la evaluación de Microorganismos Eficientes en el crecimiento vegetativo de tres variedades de fresa: Honeoye, Elsanta y Selva; cuatro tratamientos fueron probados: Control (no tratado), inóculo EM - agropecuaria, la fertilización NPK estándar, y EM - Agricultura inóculo aplicado juntos con el NPK, los resultados indicaron que el inóculo EM-microbiana

fue el más eficaz para estimular el crecimiento de brotes y raíces en el cultivar Honeoye, mientras que Selva mostró un aumento de la biomasa de raíces como resultado de la aplicación de EM. Las plantas del cultivar “Elsanta” no mostró un efecto positivo como una respuesta de aplicación EM. Las mediciones también revelaron que la fertilización NPK aplicada a las plantas de fresa junto con EM - agricultura puede tener efecto positivo sobre el crecimiento de la planta de fresa (Glinicki *et al.*, 2011), en la evaluación del efecto de los bio fertilizantes en el crecimiento de la raíz de la fresa y parámetros morfológicos se constata un efecto positivo en comparación con las plantas fertilizadas únicamente con NPK (Sas *et al.*, 2011).

Con respecto a las propiedades antagonistas de los Microorganismos Eficientes, entre 186 cepas bacterianas, 36 fueron encontrados eficaz para inhibir el desarrollo de *Botrytis cinerea* Pers, bajo condiciones in vitro y trece de ellas tienen una mayor zona de inhibición; se ha demostrado que bacterias antagonistas inhiben el desarrollo *B. cinerea* en fresas (Donmez *et al.*, 2011).

El uso de organismos bio controladores es una alternativa para el control de *Botrytis cinérea*, ya que permite disminuir los residuos de pesticidas en el ambiente, se evaluaron dos cultivares comerciales de fresa (Camino Real y Ventana), con aplicación de *Trichoderma harzianum* y *T. lignorum*, Iprodione en dosis comercial y un tratamiento testigo. La incidencia de la enfermedad en el tratamiento testigo fue del 60 por ciento, mientras que para los tratamientos con *T. harzianum* y *T. lignorum* solo alcanzó un 33 por ciento, lo que indica un control mayor de los antagonistas en comparación con el químico sobre la enfermedad, además la masa fresca de frutos mostró diferencias significativas cuando se aplicó *T. lignorum*, ya que este tratamiento obtuvo los frutos más grandes y con mayor tonalidad roja. La aplicación de *Trichoderma* sp., presentó frutos con mayor firmeza en las dos variedades, lo que indica que estos frutos soportan mejor la manipulación pos cosecha y el almacenamiento (Merchán *et al.*, 2014). Tortora *et al.* (2012) cita que la bacteria *Azospirillum brasilense* reduce la antracnosis y promueve el crecimiento de las plantas, *A. brasilense* participan activamente en la inducción de protección sistémica en plantas de fresa en contra de la enfermedad antracnosis causada por *C. acutatum*.

Cepas bacterianas de la rizosfera presentan efecto antagonista contra *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* y *P. cactorum*. Tres bacterias de diferentes géneros *Raoultella terrigena*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Pseudomonas fluorescens* evidencian mayor efecto inhibitorio

sobre el crecimiento del micelio de ambas *Phytophthoras* spp. Bajo condiciones de invernadero las tres bacterias fueron significativamente eficaces en la reducción del núcleo rojo y pudrición de la corona, exhibió un nivel similar de control como el fungicida químico Aliette de hasta a 59 por ciento. En campo con condiciones artificiales, las tres rizobacterias mostraron un control de hasta un 45 por ciento en contra de ambas enfermedades y sólo *B. amyloliquefaciens* fue eficaz contra estela roja (Anandhakumar y Zeller, 2007).

2.3 HÁBITATS MICROBIANOS

Cualquier hábitat adecuado para el crecimiento de organismos superiores puede también soportar el crecimiento de microorganismos, en tales hábitats alcanzan grandes números y pueden ser beneficiosos para las plantas o animales, o ser patógenos de sus respectivos hospedadores. Los hábitats naturales de los microorganismos son extremadamente diversos, la temperatura es uno de los factores más importantes que afectan al crecimiento y a la supervivencia de los microorganismos, el conocimiento de los efectos ambientales nos permite explicar la distribución de los microorganismos en la naturaleza y hace posible métodos que controlen o potencien las actividades microbianas, existe todo un espectro continuo entre los microorganismos, desde aquellos que tienen su temperatura óptima a muy bajas temperaturas hasta los que tienen a temperatura alta, se puede distinguir cuatro grupo de microorganismos con relación a su temperatura óptima: psicrófilos, con temperatura óptimas bajas; mesófilos con temperaturas óptimas moderadas; termófilos con altas temperaturas óptimas; e hipertermófilos con temperaturas óptimas muy elevadas (Madigan *et al.*, 2004). Dado el pequeño tamaño de los microorganismos, su hábitat también lo es y para designarlo se utiliza el término microambiente, describe las condiciones o lugar donde vive un microorganismo (Porta *et al.*, 2003). La mayor parte de los microorganismos pueden crecer en un rango térmico situado en torno a los 40 °C, algunos crecen a más de 90 °C y otros a -10 °C. En su mayoría los microorganismos son metabólicamente intolerantes a un pH bajo, la temperatura y humedad del suelo es fundamental para su desarrollo (Coyne, 2000), las poblaciones microbianas raramente viven aisladas, por lo general se relacionan con otras poblaciones en conjuntos llamados comunidades microbianas. En una comunidad microbiana, la diversidad y abundancia de microorganismos está controlada por los recursos (alimentos) y por las condiciones (temperatura, humedad, concentración de oxígeno, etc.) que existen en el medio (Gálvez, 2001).

Las plantas proporcionan a las comunidades microbianas hábitats específicos, que se puede clasificar ampliamente como la rizosfera, la filosfera y la endosfera. La estructura de el microbioma de la planta está determinada por factores bióticos y abióticos, pero sigue las reglas ecológicas (Berg *et al.*, 2016). Cada planta en un entorno natural o agrícola está colonizada por una diversidad de microbios, tanto en su superficie exterior como en sus superficies internas (Porras-Alfaro y Bayman, 2011), albergan distintas comunidades microbianas dentro y fuera de sus tejidos designados como microbiota vegetal (Schlaeppli y Bulgarelli, 2015).

Las partes aéreas de las plantas vivas, incluidas las hojas, los tallos, los brotes, las flores y las frutas, proporcionan un hábitat para los microorganismos denominados filosfera (Whipps *et al.*, 2008), están colonizadas por una variedad de bacterias, levaduras y hongos (Lindow y Brandl, 2003). Se considera que las bacterias son los habitantes microbianos dominantes de la filosfera, aunque las arqueas, los hongos filamentosos y las levaduras también pueden ser importantes (Whipps *et al.*, 2008).

En general, se cree que las poblaciones de bacterias aeróbicas cultivables en las hojas están dominadas por unos pocos géneros. La disponibilidad de nutrientes que contienen carbono en las hojas es un determinante principal de la colonización epífita. Múltiples factores químicos y físicos limitan el crecimiento bacteriano y la supervivencia en la filosfera. La filosfera es científica y económicamente un hábitat importante para estudiar la ecología microbiana (Lindow y Brandl, 2003).

Aunque los endófitos se han estudiado extensamente con anterioridad, la interacción entre los diferentes endófitos y sus hospedadores es aún poco conocida. Los mecanismos que subyacen a estas interacciones, las fuerzas impulsoras que determinan ensamblajes de comunidades microbianas específicas encontradas en diferentes órganos de plantas, la influencia que tienen una variedad de factores (por ejemplo, ambientales, genéticos, fenológicos, etc.) en la formación de microbiomas endofíticos o cómo explotar / aprovechar los beneficios que estos consorcios microbianos internos brindan a sus anfitriones son solo algunos de los asuntos interesantes que se están estudiando actualmente (Compant *et al.*, 2016).

La diversidad filogenética de los microbiomas de las plantas está cada vez mejor caracterizada, y su diversidad funcional es cada vez más accesible (Finkel *et al.*, 2017). La interacción planta-microbios es clave para el crecimiento y desarrollo de las plantas, así

como para la salud del suelo. Una comprensión del microbioma y sus atributos beneficiosos podrían tener múltiples beneficios para la agricultura sostenible. Recientemente, se da un gran énfasis a la decodificación de la diversidad microbiana asociada con plantas de diversos hábitats. La diversidad microbiana es considerada importante para mantener la sostenibilidad de sistemas de producción agrícola (Yadav *et al.*, 2017).

2.4 MEDIOS DE CULTIVO PARA MICROORGANISMOS

Un medio de cultivo es una solución acuosa bien como tal o, bien incorporada a un coloide en estado de gel, en las que están presentes todas las sustancias necesarias para el crecimiento de unos determinados microorganismos. De acuerdo a Rojas (2011), las propiedades fundamentales que deben presentar los medios de cultivo para el desarrollo ideal de microorganismos son: humedad, fertilidad, pH y transparencia. El medio de cultivo y las condiciones de incubación deben ser selectivos para el organismo que se desea aislar y contra selectivo para los organismos no deseados.

2.4.1 Medios de cultivo para bacterias fototróficas o fotosintéticas

Estas bacterias son de nutrición muy diversa y pueden utilizar como fuente de carbono sustancias diversas. La mayoría pueden crecer también fotoautotroficamente con ($\text{CO}_2 + \text{H}_2$) o ($\text{CO}_2 +$ bajos niveles de H_2S). El enriquecimiento y aislamiento de las bacterias rojas no del azufre son fáciles, utilizando un medio de sales minerales suplementado con un ácido orgánico como fuente de carbono. Tales tipos de medios, inoculados con lodo, agua de un lago o de una alcantarilla, se incuban anaeróbicamente con luz e invariablemente favorecen el crecimiento de bacterias rojas no del azufre. Los medios de enriquecimiento pueden hacerse aún más selectivos omitiendo fuentes de nitrógeno de tipo orgánico (como por ejemplo la peptona), prácticamente todas las bacterias rojas no del azufre pueden fijar N_2 y crecer en estas condiciones más que otros posibles competidores (Madigan *et al.*, 2004). Al respecto Pacheco *et al.* (2006) acota que requieren de una o más vitaminas para su crecimiento y generalmente son la tiamina, biotina, niacina y ácido p-benzóico^{1, 2, 8}.

2.4.2 Medios de cultivo para bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas requieren medios nutricionales complejos, con aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables. El medio de cultivo más empleado es el medio MRS descrito por Man, Rogosa y Sharpe en 1960, este medio contiene además magnesio, manganeso acetato y polisorbato

80 (Tween 80), que facilitan de gran forma el crecimiento de los bacilos lácticos, incluso de las especies más exigentes, como *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermenti* (Collado, 2004).

El Agar M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas. El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias gram negativas. Para la caracterización fenotípica de cepas se realizan pruebas de producción de gas, a partir de glucosa al 2 por ciento en medio de cultivo líquido Man, Rogosa y Sharp (MRS, Merck, Alemania) a 37 °C durante 24 - 48 horas, sin agitación (Sánchez y Tromps, 2014).

2.4.3 Medios de cultivo para levaduras

Los medios generales para crecer hongos contienen peptona, una fuente de energía, como hidratos de carbono y agar. Las levaduras crecen a temperatura ambiente, una presión de oxígeno de 1 atmósfera y a un pH ligeramente ácido, lo cual puede ayudar a que no crezcan bacterias en este medio tan rico. Algunos medios comunes y generalistas para crecer levaduras tienen un pH ácido como los medios agar sabouraud o agar patata dextrosa. Los medios comunes con antibióticos son OGA (Oxitetraciclina glucosa agar) o CGA (Cloranfenicol glucosa agar) usados para el recuento de colonias (Cárdenes, 2000).

Los medios de cultivo utilizados para levaduras son similares aquellos utilizados para el crecimiento de hongos filamentosos, con pH bajo (4,5 - 5,5) para inhibir las bacterias, entre los cuales se encuentran los agares y caldos de extracto de malta o de extracto de levaduras (Cortes, 2004).

Para el desarrollo ideal de levaduras el medio más popular y utilizado es el agar glucosa - peptona descrito por vez primera por Sabouraud en 1894 y conocido como el agar Sabouraud. Este medio tiene un pH inferior a 6, no permitiendo el crecimiento de algunas bacterias. Para el aislamiento de levaduras, el crecimiento bacteriano en agar Sabouraud se puede suprimir añadiendo antibióticos antibacterianos al medio: cloranfenicol, penicilina y estreptomicina son los más comunes. El agar de Sabouraud (AS) es el medio más usado para

el aislamiento de otras levaduras, medio general que soporta el crecimiento de la mayoría de los hongos patogénicos. No es un medio diferencial y las colonias de varias levaduras patógenas que crecen en este agar no pueden ser fácilmente distinguibles entre sí (Cárdenes, 2000).

2.4.4 Sistemas miniaturizados API®

Los sistemas miniaturizados API® son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Estos sistemas consisten en un dispositivo de plástico con varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados o diferentes sustratos de enzimas de acuerdo al tipo de prueba que se requiere montar. Entre algunas de las pruebas bioquímicas que pueden realizarse con estos sistemas están las pruebas de fermentación de carbohidratos, la determinación de la producción de H₂S, la determinación de la hidrólisis de la gelatina, entre otras.

En el mercado existe una variedad de galerías para ser utilizadas en la identificación de diferentes tipos de microorganismos, por ello, aunque todos estos sistemas tienen el mismo fundamento, difieren en el número y tipo de pruebas que permiten realizar, ya que su selección está directamente relacionada con la actividad metabólica del género al que pertenece el microorganismo a identificar.

De acuerdo al tipo de prueba realizada los microtubos se tornan de diferentes tonalidades (BIOMERIEUX, 2015) (figura 14).



Figura 14: Microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados

FUENTE: BIOMERIEUX (2015)

API 20 C AUX es utilizado para la identificación de levaduras, contiene 20 microtubos diferentes en su interior; API 50 CHB V4.1 es utilizado para la identificación de *Bacillus* se utilizó, consta de 50 microtubos en cada galería y API® 50 – CHL es utilizado para la identificación de *Lactobacillus*, es una galería conformada por 50 microtubos.

a. Inoculación de los sistemas miniaturizados

Cada microtubo del sistema debe inocularse con una suspensión en solución salina al 0,85 por ciento de un cultivo puro del microorganismo a ser identificado. En algunos casos estos microtubos deben llenarse completamente con la suspensión, mientras que en otros se requiere del añadido de parafina líquida estéril, que proporciona las condiciones anaeróbicas necesarias. Todas las instrucciones para la preparación de la suspensión, así como para la inoculación de cada uno de los microtubos, y las condiciones de incubación se pueden encontrar claramente especificadas en los instructivos de uso señalados por el fabricante para cada tipo de galería.

b. Interpretación de los resultados

La presencia de enzimas y/o de productos metabólicos generados durante el periodo de incubación reaccionan con los sustratos contenidos en los microtubos y desarrollan en los mismos una coloración que puede aparecer en forma espontánea o con el agregado de algún reactivo para su revelado. La interpretación de los resultados se basa en la observación de las coloraciones desarrolladas, ésta se lleva a cabo mediante la comparación del color obtenido en cada microtubo con el que muestra la carta de colores. De acuerdo a esa interpretación se puede establecer un resultado positivo (+) o negativo (-).

Los resultados obtenidos en cada microtubo se colocan en la hoja de resultados que suministra el fabricante. Los datos así obtenidos pueden transformarse en un código de 7 dígitos denominado “perfil numérico” que resulta de la suma de los valores correspondientes a las pruebas positivas asignados previamente en la planilla. En algunos sistemas miniaturizados se recomienda la realización de pruebas bioquímicas opcionales, que permiten obtener dos dígitos adicionales. El código obtenido se corresponderá a un determinado género o especie de acuerdo a la información contenida en las bases de datos suministradas por el fabricante y que pueden encontrarse disponibles en forma impresa y/o electrónica (BIOMÉRIEUX, 2015). El esquema general de pruebas morfológicas e identificación bioquímica por el sistema API 50CHL (BIOMERIEUX, 2002), se presenta en la figura 15.

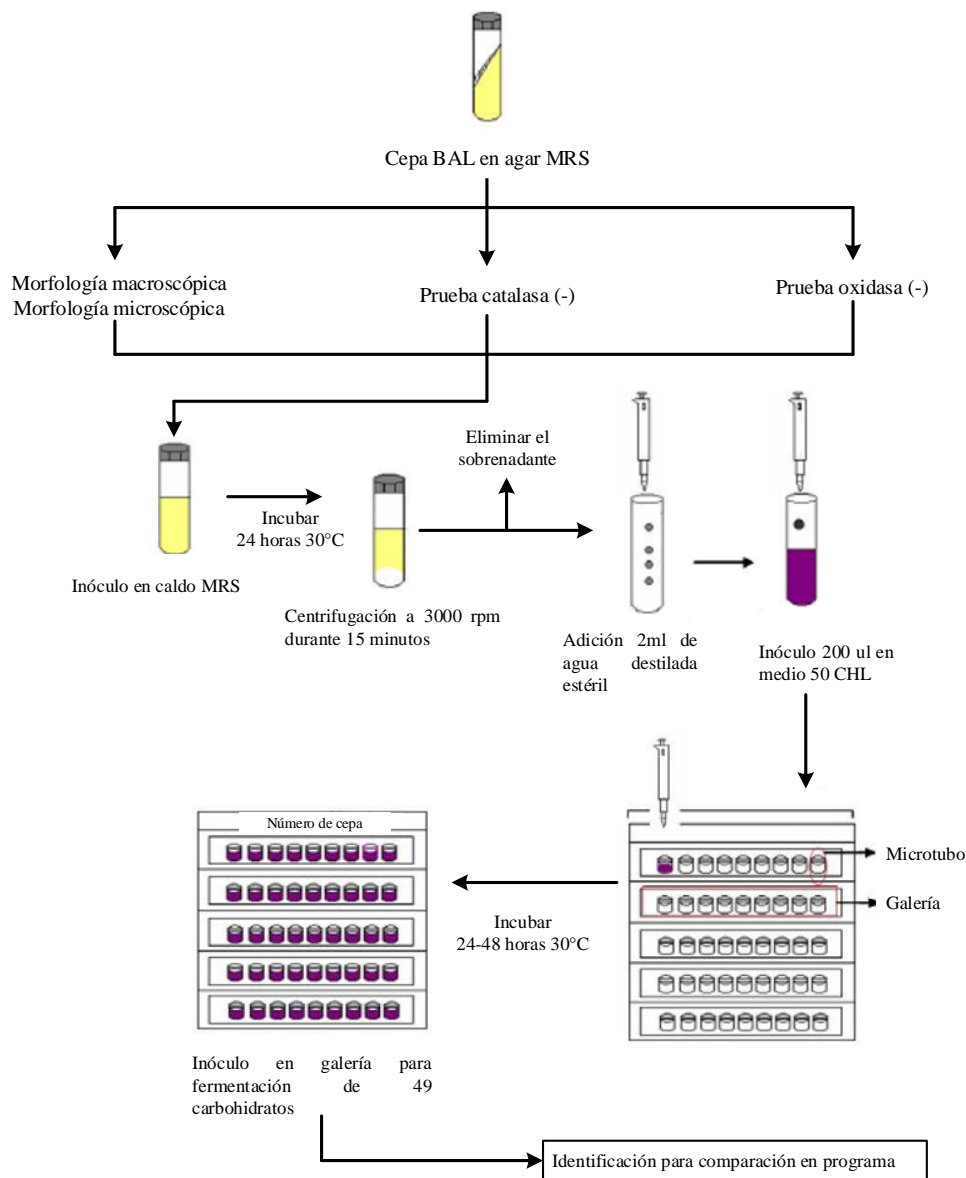


Figura 15: Esquema general de pruebas morfológicas e identificación bioquímica por el sistema API 50CHL

FUENTE: BIOMERIEUX (2002)

2.5 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS

2.5.1 Aislamiento de microorganismos benéficos

Los cultivos axénicos o puros se pueden obtener de muchas maneras a partir de un enriquecimiento, los métodos empleados más frecuentemente son la siembra por estría en superficie (en placas de petri) la siembra en profundidad (agar shake) y la dilución en líquido. Para aquellos microorganismos que crecen bien en medio de cultivo sólido (con agar) el método de elección es la siembra por estría.

Siembra en profundidad y día más probable (NMP): este método consiste en la dilución de un cultivo mixto en tubos de agar fundido; cuando el agar solidifica, las colonias se desarrollan embebidas en el tubo de agar en vez de en la superficie como ocurre en la siembra por estrías en placa. Es posible obtener cultivos axénicos mediante diluciones sucesivas de una suspensión de células en tubos de agar fundido. A partir de una colonia crecida en el tubo de mayor dilución utilizada como inóculo, se puede volver hacer otro banco de diluciones de tal manera que se acabe obteniendo un cultivo axénico.

Un procedimiento similar sin usar agar es la dilución seriada de un inóculo en un medio líquido hasta que el tubo o tubos finales de la serie no muestren crecimiento. Utilizando diluciones seriadas de diez en diez, por ejemplo, el último tubo que muestre crecimiento tiene que haberse originado a partir de 10 células o menos. Si se repite varias veces este proceso se obtiene cultivos axénicos, esta técnica se conoce como la técnica del número más probable (NMP) (Madigan *et al.*, 2004).

2.5.2 Técnicas de siembra de bacterias y levaduras

De acuerdo a Aquiahuatl *et al.* (2012) existen diferentes técnicas de siembra: por suspensión de la muestra en medios líquidos; extensión de diluciones de un cultivo en superficie de medios en caja de Petri; por estría en caja de Petri y tubos con medios solidificados en forma inclinada; por piquete o picadura en tubos con medios sólidos o semisólidos. Con la aplicación de cada técnica se obtiene información de importancia para el estudio básico o aplicado de los microorganismos de interés. El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos, mediante la técnica de estría cruzada para producir colonias aisladas en cultivos sólidos y así, obtener un cultivo puro. Cuando la técnica por estría se aplica para aislar un microorganismo de interés a partir de mezclas donde se encuentra en pequeñas cantidades, generalmente se obtendrán las bacterias dominantes. En este caso, se utilizan medios selectivos o de enriquecimiento, los que contienen nutrientes especiales, antibióticos, altas concentraciones de sales y/o condiciones de pH, luz o temperatura que incrementarán la población del microorganismo de interés y se facilitará su aislamiento. Si se agregan a los medios de cultivo otros componentes como: sangre, colorantes, indicadores, es posible distinguir entre especies bacterianas por la forma en que metabolizan los sustratos y que se manifiesta por cambios en la apariencia del pH del medio de cultivo. Estos medios se conocen como medios diferenciales y son de gran utilidad para la caracterización e identificación de especies bacterianas.

a) Técnica de estría cruzada

- Dividir cada una de las placas Petri por la parte de atrás en cuatro cuadrantes. Esterilizar el asa con calor en el mechero.
- Dejar enfriar el asa y tomar la muestra de una colonia.
- Inocular la muestra haciendo 4 o 5 estrías simples muy juntas de lado a lado sobre el primer cuadrante de la placa, cerrar la placa. Flamear el asa de inoculación y hacer girar la placa Petri un cuarto de vuelta.
- Abrir nuevamente la placa y con el asa de siembra esterilizada y fría, tocar la superficie de las estrías recién hechas en un punto alejado del inicio. Hacer un segundo grupo de estrías como en el caso anterior. Realizar el mismo procedimiento en el tercer cuadrante y en el último cuadrante, sin flamear el asa de siembra hará una estría más abierta (simple).
- Las placas con la base hacia arriba se incuban a 35 °C durante 24 - 48 horas.

b) Siembra en tubos y condiciones de incubación

- Después de la incubación de los cultivos, seleccionar, de las placas Petri con agar nutritivo, la colonia más aislada de cada cepa.
- Transferir con el asa, previamente esterilizada y fría, una pequeña muestra de la colonia a un tubo.
- Transferir de la misma forma una muestra de la misma colonia inoculando por estría los tubos inclinados con agar nutritivo y agar papa dextrosa.
- Incubar los tubos a 35 °C durante 24 - 48 horas. Observar la aparición de colonias y reportar la forma de crecimiento de los microorganismos.

2.5.3 Cultivo de hongos filamentosos

Aquihuatl *et al.* (2012) indica que los hongos filamentosos (mohos) tienen una estructura vegetativa característica denominada hifa. El conjunto de hifas ramificadas constituye el micelio. Las hifas de algunos hongos presentan tabiques transversales o septos, aunque en el caso de los hongos que pertenecen al grupo Zygomycota, las hifas no presentan estos septos y se conocen como hifas cenocíticas. El principal mecanismo de reproducción de los hongos es asexual por fragmentación de hifas vegetativas o por la producción de esporas en conidióforos y esporangióforos, formados en hifas aéreas, llamadas reproductivas.

a) Siembra de hongos filamentosos

- Para sembrar los hongos filamentosos, se separa una parte de micelio de los hongos con asa de siembra, previamente esterilizada en la flama del mechero.
- Se coloca el micelio en el centro de una placa de Petri con medio por inoculación por piquete.
- Se incuban las placas de Petri en forma invertida, envueltas en papel o en una bolsa de plástico, a 28-30 °C durante 3-5 días.

b) Descripción macroscópica

Observar las siguientes características de los hongos filamentosos:

- Forma, tamaño y tipo de colonia
- Aspecto del micelio: algodonoso, aterciopelado, velloso, aéreo o pegado al medio
- Color del micelio y color de las esporas
- Cambios en el medio de cultivo

c) Descripción microscópica en montaje con cinta adhesiva

- Colocar una gota de azul de lactofenol en el centro de un portaobjetos limpio.
- Cortar una tira de 4-5 cm de cinta adhesiva transparente; con pinzas de disección doblar la cinta en “U” con el adhesivo hacia afuera.
- Abrir la placa Petri cerca del mechero y presionar suavemente la cinta adhesiva sobre la periferia de la colonia.
- Colocar suavemente la cinta con la muestra sobre la gota de azul de lactofenol, evitando la formación de burbujas para no alterar las estructuras. La cinta funciona como cubreobjetos, no es necesario colocar uno.
- Dejar reposar durante 3-5 minutos y hacer observaciones en el microscopio con los objetivos de 10X y 40X. Localizar y observar hifas, estructuras especializadas como esporangióforos, esporangios, conidióforos, conidias y rizoides; determinar si las hifas presentan divisiones (septos).

2.6 CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS

Es posible conocer las características metabólicas de los microorganismos por su inoculación en medios de cultivo con diversos sustratos que puedan ser utilizados como fuentes de

energía, carbono, donadores de electrones, así como de otros nutrientes esenciales necesarios para su crecimiento.

Existen numerosas pruebas bioquímicas con medios de cultivo adicionados de indicadores de pH para detectar la producción de ácido o álcali, con inhibidores selectivos como bilis, cianuro o con colorantes, sulfuros, etc. que facilitan la determinación de diferentes actividades metabólicas. Las actividades que se evalúan con mayor frecuencia son: capacidad para fermentar carbohidratos (glucosa, lactosa, sacarosa), para catabolizar aminoácidos y urea, la producción de enzimas hidrolíticas específicas de tipo endo o exo como oxidasas, reductasas, amilasas, lipasas, etcétera (Aquiahuatl *et al.*, 2012).

2.6.1 Caracterización fenotípica

a. Morfología

Cuando los microorganismos crecen sobre medios de cultivo exhiben diferencias en la apariencia macroscópica de su crecimiento, estas diferencias llamadas características culturales, son la base para la separación de ellas en grupos taxonómicos. Las características culturales de los microorganismos conocidos, están consignadas en Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, son determinadas por el cultivo de los microorganismos en Agar Nutritivo inclinado y en placas de Petri, en caldo Nutritivo y en Gel Nutriente. La morfología colonial, es una característica indispensable a tener en cuenta en el aislamiento primario de una bacteria y, en la cual se debe considerar el borde y la elevación de la misma. Adicionalmente, es importante apreciar la consistencia y la textura de la masa celular, pues también son características distintivas. La consistencia va desde la colonia seca que, tocada con un asa se desplaza en la superficie del medio, hasta las colonias viscosas que se pegan al asa y se separan de la colonia formando un hilo (generalmente son bacterias con cápsulas gruesas). Así como, también la pigmentación de la colonia, las películas continuas de crecimiento (bacterias móviles), colonias lisas (generalmente virulentas), o colonias rugosas (generalmente avirulentas) (Rojas, 2011). La presencia de estructuras de reproducción sexual, es el principal criterio de clasificación que permite ubicar a los hongos en tres divisiones o phyla: *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*. Otros criterios importantes para la clasificación de los hongos son las características de las hifas y las estructuras de producción de esporas asexuales (Aquiahuatl *et al.*, 2012).

b. Tinción de Gram

Esta técnica permite separar a las bacterias en dos grandes grupos: gram positivas y gram negativas, basados en si retienen o no, el colorante primario (cristal violeta) luego del proceso de decoloración. Los organismos que retienen el cristal violeta luego de la adición del agente decolorante, el alcohol, aparecen como azul oscuro o violeta, y se designan como gram positivos; aquellos que pierden el cristal violeta y se tiñen con el colorante secundario, la safranina, aparecen como rojos y se designan como gram negativos. Un examen minucioso de un extendido bacteriano teñido diferencialmente, provee una información muy importante sobre la caracterización morfológica e identificación de la muestra. El procedimiento puede resumirse de la siguiente manera: una vez que la preparación ha sido fijada a la lámina portaobjeto, se añade el colorante cristal violeta, el cual se deja en contacto por un minuto y las células se tiñen de color violeta, posteriormente se lava el exceso de colorante con agua destilada, luego se añade la solución de lugol, que actúa como mordiente, y se deja en contacto por un 1 minuto. El yodo se combina con el cristal violeta y forma un compuesto que precipita en el interior de la célula; este complejo puede extraerse fácilmente con alcohol etílico de las gram negativas, pero no se remueve fácilmente de las gram positivas. Una vez realizada la decoloración se añade el colorante de contraste, la safranina, la cual se deja en contacto por 30 segundos; el exceso de colorante se elimina con agua destilada. Las láminas así preparadas se secan a temperatura ambiente o con la ayuda de toallas absorbentes (Tortora, 2007); este procedimiento se esquematiza en la figura 16.

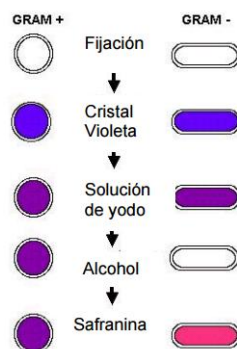


Figura 16: Ilustración de la apariencia de cocos gram positivos y de bacilos gram negativos en diferentes estadios del procedimiento de tinción de Gram

El diagrama de flujo para identificación de bacterias gram positivas, mediante tinción de Gram y la morfología celular (Bergey *et al.*, 2005) se presenta en la figura 17.

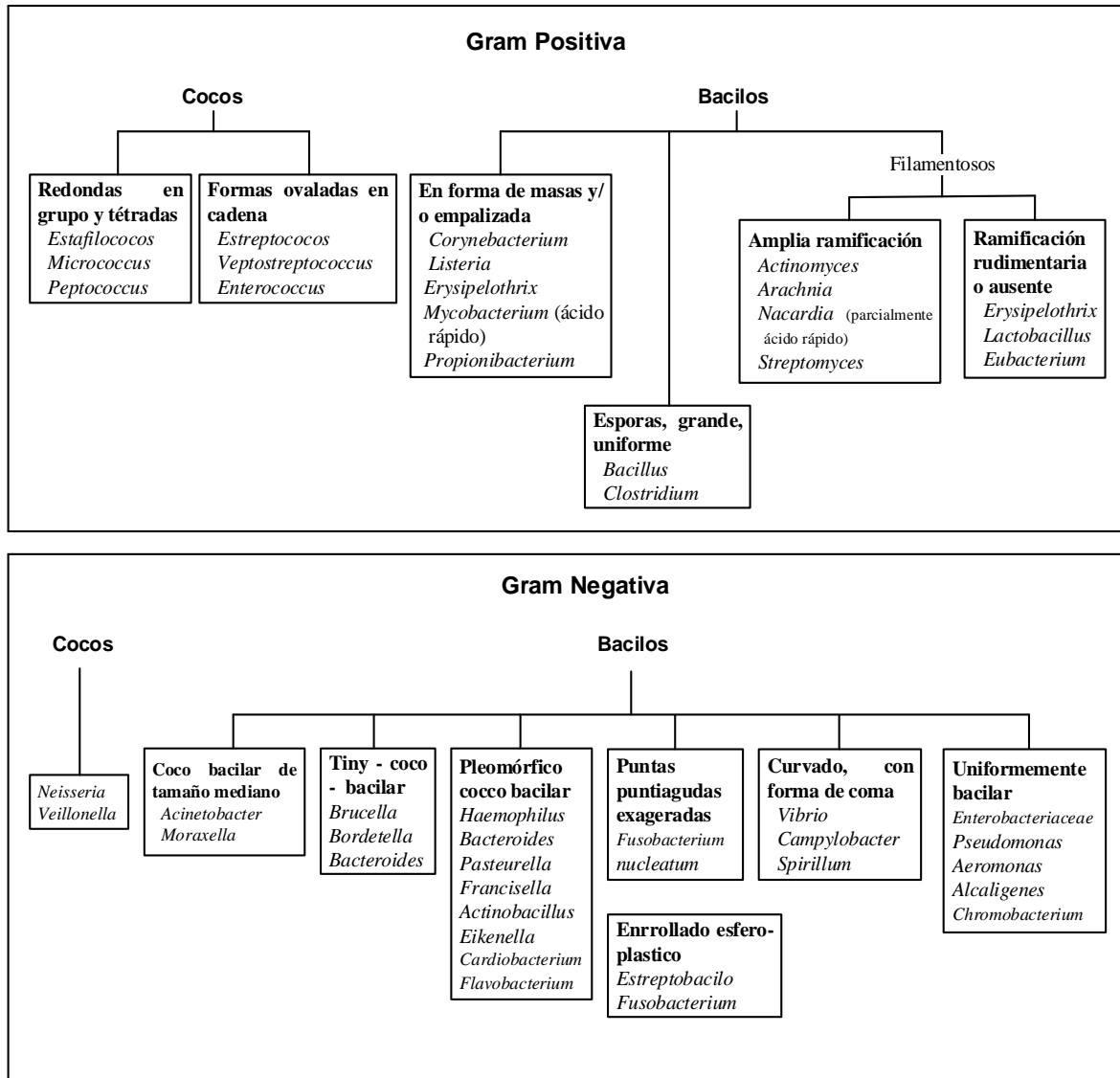


Figura 17: Diagrama de flujo de la tinción de Gram de características y la morfología de bacterias

FUENTE: Bergey *et al.* (2005)

El diagrama de flujo para la identificación de bacterias Gram positivas en forma de varilla (bacilos) (Bergey *et al.*, 2005), se presenta en la figura 18.

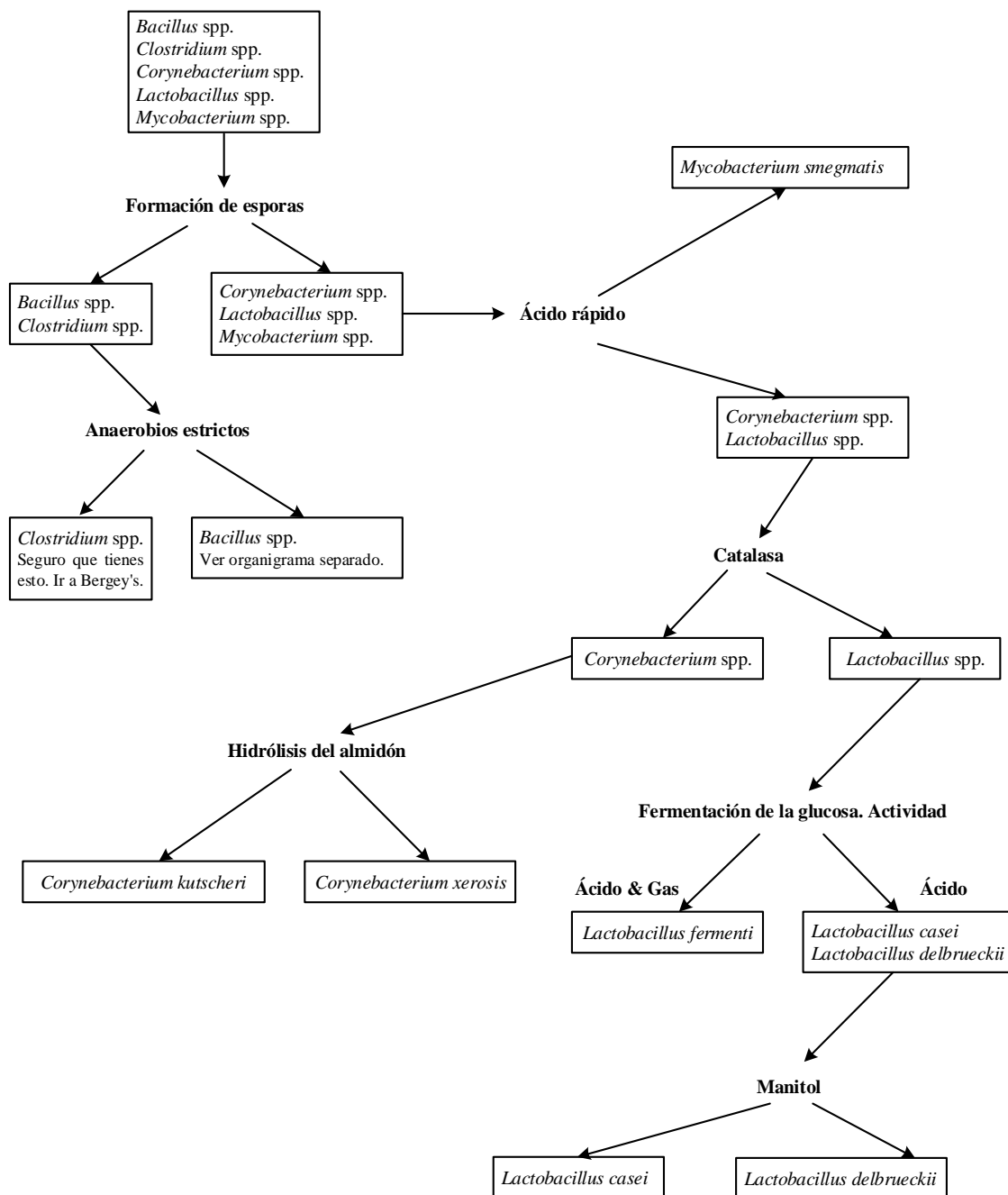


Figura 18: Organigrama de identificación de bacterias Gram positivas de acuerdo a su forma bacilar

FUENTE: Bergey *et al.* (2005)

Luego de identificar las bacterias en forma de bacilos, es necesario determinar la especie, para cumplir este propósito se debe cumplir el flujo para la identificación de *Bacillus* spp. (Bergey *et al.*, 2005), figura 19.

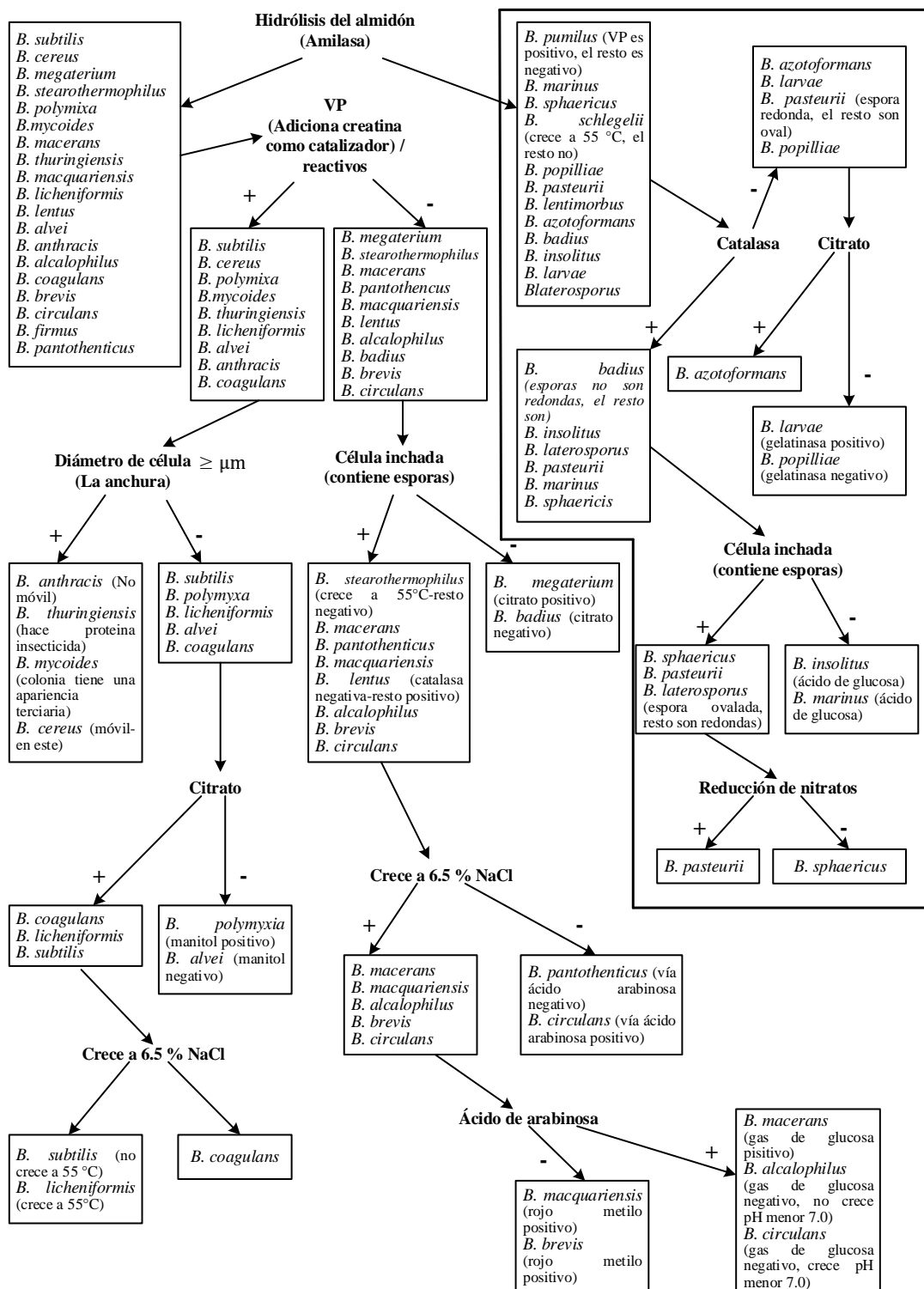


Figura 19: Diagrama para identificación de *Bacillus* spp.

FUENTE: Bergey et al. (2005)

c. Test bioquímico

Las pruebas bioquímicas realizadas comúnmente, pueden ser agrupadas según la naturaleza del ensayo, (Rojas, 2011):

- Enzimas vinculadas con la respiración: Oxidasa y catalasa.
- Descomposición de azúcares simples, ácidos orgánicos y otros.
- Requerimientos de oxígeno: OF (Oxidación-Fermentación), crecimiento en caldo Tioglicolato.
- Producción de ácido, o ácido y gas: Fermentación de carbohidratos.
- Detección de enzimas y vías metabólicas:

RM-VP (Rojo de Metilo - Voges Proskauer).

Gluconato.

O.N.P.G. (orto nitro β -D-galactopiranosido).

Esculina.

Hipurato.

- Fuente única de carbono
Citrato.
Malonato.
Hipurato para coliformes.
- Utilización de compuestos nitrogenados
Reducción de nitrato.
Asimilación.
Denitrificación.
- Descomposición de carbohidratos aminoácidos y otros.
Indol (a partir de triptófano).
H₂S.
Fenilalanina.
Decarboxilación de Lisina, Arginina, Ornitina, etc.
Urea.
- Ensayos combinados.

TSI (Triple Hierro tres Azúcares).

LIA (Agar Lisina-Hierro).

Bilis Esculina.

- Detección de exoenzimas.

Lecitinasa.

Proteasas, coagulasa.

Amilasas.

Celulasas.

Desoxirribonucleasa.

Hemólisis.

- Misceláneos.

KCN.

Bilis.

Producción de pigmentos.

- Test de crecimiento o inhibición.

Temperatura.

NaCl.

Antibióticos

2.6.2 Caracterización molecular

a. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés, es una técnica de biología molecular desarrollada en 1987 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; para alcanzar el resultado propuesto, es necesario:

- El DNA a partir del cual queremos obtener una copia de un fragmento, es decir, el DNA que queremos amplificar. Este DNA se conoce como DNA molde.
- Una enzima capaz de generar una copia de DNA a partir del DNA molde: una DNA polimerasa. La reacción se lleva a cabo en un tampón apropiado para el funcionamiento de la enzima polimerasa. Además, como cofactores de la polimerasa se añaden cationes divalentes, generalmente en forma de cloruro de magnesio ($MgCl_2$).

- Iniciadores de la reacción: Las enzimas DNA polimerasas únicamente son capaces de añadir nucleótidos al extremo 3' libre de una doble cadena de DNA. Son necesarios por tanto moléculas cortas (entre 10 y 30 bases) de DNA de cadena sencilla. Estas moléculas son los cebadores o primers de la reacción. Son los cebadores los que van a delimitar el fragmento a amplificar.
- Nucleótidos libres: las enzimas DNA polimerasas van a crear una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de nucleótidos al extremo 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena molde. Los nucleótidos se añaden en forma de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) (Pérez de Castro, 2011).

Este proceso se lleva a cabo cíclicamente. En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello, se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97 °C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.

En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que se desea amplificar. En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por complementariedad) en la dirección 5' → 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio, siguiendo la cadena molde. Una vez completado el primer ciclo, se dispone de 2 copias de la muestra original, al final del segundo ciclo se tienen 4, al final del tercero 8 y así sucesivamente.

Si los ciclos se producen un número "n" de veces y suponiendo que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo, se obtiene una cantidad de ADN de 2^n , por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica. La PCR se ha empleado en una gran cantidad de estudios para detectar *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en un variado tipo de muestras (Amorocho, 2011).

El protocolo para la reacción en cadena de la polimerasa (Amorocho, 2011), se presenta en la figura 20.

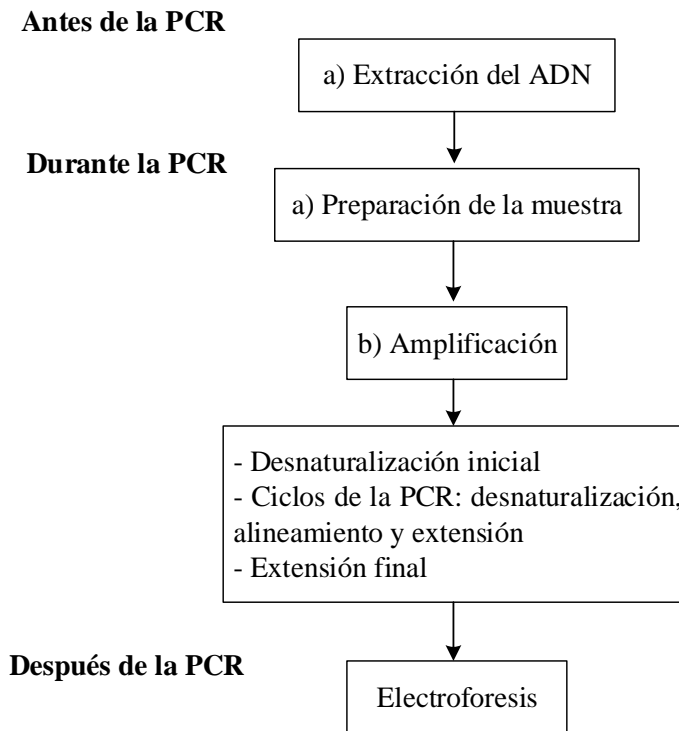


Figura 20: Protocolo para la reacción en cadena de la polimerasa

FUENTE: Amorocho (2011)

2.6.3 Caracterización genómica

a. Ribotipado

El Ribotipado es un método que permite identificar y clasificar bacterias en función de los genes del RNA ribosomal.

Los genes del rRNA se encuentran dentro de las regiones mejor conservadas del genoma bacteriano. Existen varias copias de genes para el rRNA en cada célula y su número y localización específica en el cromosoma varían según las especies. Por tanto, los patrones de bandas (su número, tamaño e intensidad) del DNA cromosómico digerido e hibridado con sondas marcadas para los genes rRNA son específicos de cada cepa bacteriana, por lo que pueden ser utilizados para reflejar diferencias a nivel de especies y subespecies, es decir, para identificar y caracterizar bacterias al comparar dichos patrones con los obtenidos a partir de bacterias conocidas.

La técnica del Ribotipado consiste en los siguientes procesos:

- Extracción y digestión del DNA a partir de una colonia bacteriana en placa.
- Separación mediante electroforesis de los fragmentos de DNA.

- Transferencia de los fragmentos separados a una membrana de Nylon.
- Hibridación con una sonda del operón rRNA marcada químicamente.
- Adición de un conjugado enzima-anticuerpo que se une al marcaje de la sonda.
- Detección de las bandas mediante quimioluminiscencia.
- Análisis y comparación de las bandas frente a una base de datos, lo que permite la caracterización y presunta identificación de la cepa bacteriana.

Si se realiza de forma manual, la técnica de Ribotipado es larga y tediosa y podría llevarle a un operador experimentado unos dos días de trabajo. El uso de equipos sofisticados permite una total automatización del proceso con el consiguiente ahorro de tiempo, ausencia de errores de manipulación y una mayor capacidad de procesamiento de muestras; el equipo permite analizar hasta 48 muestras/día en bloques de 8 muestras cada 2 horas (el proceso total para cada bloque de 8 muestras lleva 8 horas, sin embargo, el equipo es modular, lo que permite iniciar un nuevo proceso sin haber completado el anterior, admitiendo bloques de 8 muestras cada dos horas). Los 7 procesos de la técnica de Ribotipado descritos anteriormente se realizan de manera totalmente automática. El gel de agarosa donde se realiza la electroforesis consta de 13 pocillos, 8 para las muestras y 5 para marcadores de tamaño conocido. El software del Riboprinter usa la posición e intensidad de estos marcadores conocidos para normalizar el resto de bandas de la membrana permitiendo corregir y compensar las variaciones entre líneas y entre membranas, estandarizando el proceso y haciendo fácilmente comparables los resultados intra e inter laboratorios. El patrón de bandas obtenido para cada muestra consistirá en una serie de bandas discretas de mayor o menor intensidad, a manera de “huella dactilar génica” o código de barras”. El sistema comparará estas bandas con las obtenidas previamente, bien de microorganismos conocidos o bien de muestras desconocidas, pero ya procesadas con anterioridad. Como resultado de esa comparación el software podrá caracterizar la bacteria (agrupándola dentro de un “Ribogrupo” de bacterias con disposición de bandas muy similares o creando un nuevo “Ribogrupo” si la disposición de bandas es diferente a cualquiera de las procesadas hasta ese momento) y/o identificar a la bacteria comparando sus bandas con las de estándares conocidos presentes en bases de datos (Prats, 2006).

2.6.4 La electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente (DGGE)

La DGGE es un método de electroforesis en gel que separa los genes del mismo tamaño que difieren en la secuencia de bases. La técnica utiliza un gradiente de una mezcla de urea y formamida que desnaturaliza el DNA. Un fragmento de DNA bicatenario se desplaza por el gel y cuando llega a una determinada concentración desnaturalizante las cadenas de DNA se separan y el desplazamiento se interrumpe. Las diferencias en las propiedades de separación de las cadenas dependen en gran parte de las diferencias en la secuencia de bases. Por tanto, las bandas observadas en un gel de EGGE con formas diferentes de un gen determinado que varían, a veces muy poco, en sus secuencias. Las bandas individuales obtenidas se pueden cortar y secuenciar. Con genes de rRNA 16S. Secuenciando estas bandas, es posible determinar las especies presentes en la comunidad por comparación de las secuencias de las especies conocidas disponibles a partir de base de datos apropiadas (Madigan *et al.*, 2004).

El protocolo de manera detallado de los pasos requeridos para la separación electroforética de una mezcla de fragmentos de ADN previamente amplificados por PCR mediante DGGE (Cornejo, 2014), se presenta en la figura 21.

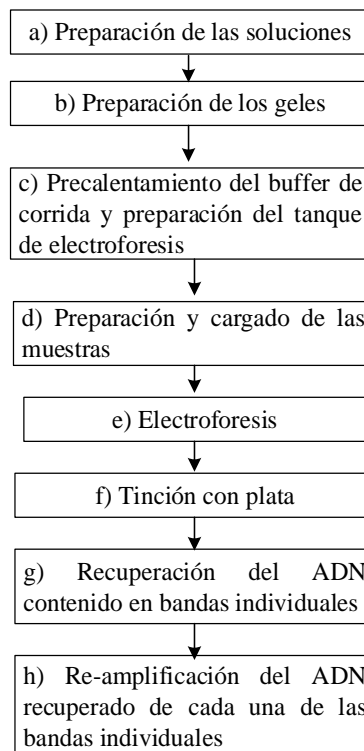


Figura 21: Protocolo para la separación electroforética de una mezcla de fragmentos de ADN

FUENTE: Cornejo (2014)

2.7 EL CULTIVO DE LA FRESA

La fresa es una de las frutas muy apreciadas ya desde la antigüedad, pequeña delicia que destaca por su intenso sabor y sus excelentes propiedades nutritivas, contiene proteínas de hidratos de carbono y grasas. Su principal valor es el alto contenido en vitamina C, también contiene vitamina A, E, B1, B2, B3 y B6. Entre sus minerales, las fresas aportan fundamentalmente potasio y magnesio, aunque también hierro, fósforo, yodo y calcio. El país que posee la mayor producción de fresas a nivel mundial es Estados Unidos que llegó a superar una producción de 1'312960 toneladas de fresa en el 2011. En segundo lugar, se ubica Turquía y posteriormente España y Egipto. Perú se encuentra en el puesto 24 en la producción de fresa a nivel del mundo, llegó a producir 22972 toneladas en el 2011 (AREX, 2015).

Entre las grandes limitantes para producir fresa, se destaca la presencia constante de fito patógenos, lo que conlleva a utilizar pesticidas para el control, que a la par demanda recursos económicos y puede afectar a la calidad de la fruta, así como a la salud de las personas cuando no se maneja correctamente esta técnica, razón por la cual cada día se busca alternativas ecológicas que minimicen la afección de patógenos y favorezcan el incremento de las cosechas.

El uso de organismos bio controladores es una alternativa para el control de *Botrytis cinerea* ya que permite disminuir los residuos de pesticidas en el ambiente (Merchán *et al.*, 2014), en estudios realizados se demuestra que la bacteria *Azospirillum brasilense* reduce la antracnosis y promueve el crecimiento de las plantas. *A. brasilense* participan activamente en la inducción de protección sistémica en plantas de fresa en contra de la enfermedad antracnosis causada *C. acutatum* (Tortora *et al.*, 2012), en la investigación realizada por Anandhakumar y Zeller (2007) se enfatiza que cepas bacterianas de la rizosfera presentan efecto antagonista contra *Phytophthora fragariae* var. *Fragariae* y *P. cactorum*, además tres bacterias de diferentes géneros *Raoultella terrigena*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Pseudomonas fluorescens* evidencian mayor efecto inhibitor sobre el crecimiento del micelio de ambos *Phytophthoras* spp.

2.7.1 Características morfológicas

El sistema radicular es fasciculado, compuesto de raíces y raicillas. La profundidad del sistema radicular es muy variable, dependiendo entre otros factores del tipo de suelo y la

variedad. El tallo está constituido por un eje corto de forma cónica llamado “corona”, en el que se observan numerosas escamas foliares. Las flores tienen cinco pétalos blancos, cinco sépalos, de 20 a 35 estambres y varios cientos de pistilos sobre un receptáculo carnoso. Cada óvulo fecundado da lugar a un fruto de tipo aquenio. Las hojas aparecen en la roseta y se insertan en la corona, son largamente pecioladas y provistas de dos estípulas rojizas. Su limbo está dividido en tres folíolos pediculados, de bordes aserrados. La fresa es la única fruta con las semillas en el exterior (aquenios), en lugar de su interior. Lo que se consume de esta planta es un eterio de color rojo, dulce y aromático, un engrosamiento del receptáculo floral cuya función es contener dentro de sí los frutos verdaderos de la planta, pequeños aquenios de color oscuro que en número de entre 150 y 200 se alojan en cada eterio (Santos y Obregón, 2009).

2.7.2 Requerimientos de cultivo

Para cultivar la fresa se debe preparar el suelo con la debida anticipación al trasplante, se realiza platabandas a 0,40 m del suelo, que permitan cultivar dos hileras, dependiendo de la variedad, la distancia de plantación generalmente es 0,30 m por 0,30 m, se cubre toda la parcela con plástico “mulch” que reduce la evapotranspiración además evita el desarrollo de malezas y el contacto entre la fruta y el suelo.

La fresa se adapta a muchos tipos de suelos, se desarrolla muy bien en suelos francos, ricos en nutrientes con alto contenido de materia orgánica, prefiere suelos limosos, livianos, no muy profundos con un buen drenaje, un pH entre 5,5 – 6,5 no tolera suelos alcalinos ni salinos. <<La influencia del suelo, su estructura física y contenido químico es una de las bases para el desarrollo de la fresa>> (Maroto, 2008).

Un factor ambiental importante para el desarrollo de la planta es el número de horas de luz que conjuntamente con la temperatura, inciden en la maduración y color de la fruta. Requiere de una humedad relativa entre 60 a 70 por ciento, cuando esta es excesiva la planta es susceptible a la presencia de enfermedades causadas por hongos, mientras cuando es deficiente, las plantas sufren daños fisiológicos que repercuten en la producción y en casos extremos producen la muerte de la planta (Alvarez y Morales, 2007). Para el crecimiento ideal del cultivo y buen rendimiento de la planta, es importante la cantidad y calidad del agua suministrada, la misma que debe estar disponible en el suelo en capacidad de campo, un déficit de agua en la época de producción afecta el rendimiento y calidad de los frutos, es preferible instalar un sistema de riego por goteo para optimizar el agua y evitar el contacto

entre el fruto y la humedad, ya que esta es la condición ideal para la presencia de *Botrytis*, <<se considera que la planta tiene un consumo hídrico de 400 a 900 mm anuales>> (Folquer, 1986).

2.7.3 Plagas y enfermedades

Tanto las plagas y así como las enfermedades de la fresa afectan a varios órganos en las diferentes fases de desarrollo, en algunos casos producen daños severos, irreversibles y la muerte de la planta, además inciden en las funciones vitales y dañan la calidad de la fruta.

Las principales plagas de la fresa son los Trips (*Frankliella occidentalis*) que atacan a flores y frutos; ácaros (*Tetranychus* sp.) se encuentra en el envés de las hojas y producen amarillamiento en las plantas en fuertes ataques; pulgones (*Aphis* sp.) se identifican por su ubicación en el envés de las hojas y el daño ocasiona deformación de brotes y hojas (Alvarez y Morales, 2007).

Con respecto a las enfermedades, condiciones climáticas extremas favorecen la presencia de los patógenos, que afectan a la raíz, al cuello de la planta, a las hojas y a los frutos. La pudrición café de la raíz (*Fusarium* sp.) produce la muerte de la planta; pudrición roja de la raíz (*Phytophthora fragariae*) afecta a los frutos que permanecen secos o se desecan antes de la maduración; marchitez de la raíz o verticilosis (*Verticillium albo-atrum*) ataca a la corona y el tejido cortical (corteza) de las raíces de tal forma que obstruyen los vasos; antracnosis (*Colletotrichum* sp.) el fruto presenta una mancha color café blanda; moho gris (*Botrytis* sp.) su desarrollo se ve favorecido con la alta humedad y bajas temperaturas, afecta a la calidad del fruto (Quishpe, 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ZONA DE ESTUDIO

La investigación inició en la provincia del Azuay en Ecuador. De diferentes plantas prevalentes en localidades ubicadas en tres pisos altitudinales (figura 22), se recolectaron muestras de hojas, tallos y ramas.

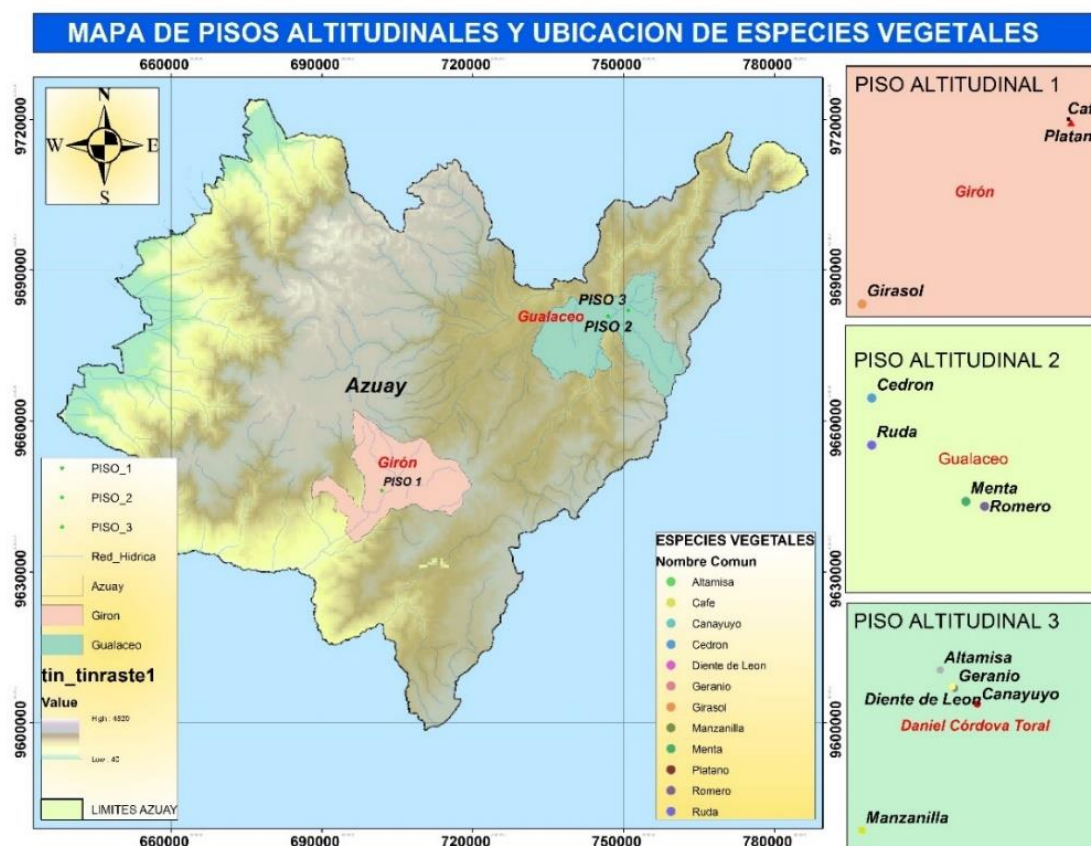


Figura 22: Mapa del área de estudio y ubicación de especies vegetales

Cada zona cuenta con características climáticas propias de la región, las cuales fueron seleccionadas por la presencia de plantas biodinámicas; la primera localidad está ubicada a 1950 ms.n.m. en la localidad “El Pongo” en el cantón Girón, al sur de la provincia del Azuay, la segunda a 2250 ms.n.m. pertenece a la parroquia central del cantón nor oriental de Gualaceo y la tercera zona se encuentra a 2550 ms.n.m. corresponde a la parroquia Daniel Córdova Toral.

Las muestras colectadas, se trasladaron hasta los laboratorios de la Universidad Nacional Agraria La Molina, en la ciudad de Lima – Perú, donde se prepararon soluciones líquidas para la caracterización e identificación de microorganismos benéficos.

3.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS VEGETALES

Previo a la recolección de muestras vegetales, en tres sitios con características climatológicas diferentes, se determinó la altitud sobre el nivel del mar, se utilizó un GPS de mano, marca GARMIN (figura 23). El primer sitio se ubicó a 1950 ms.n.m., el segundo se determinó a 2250 ms.n.m. y el tercer sitio se estableció a 2550 ms.n.m.

Una vez verificadas las localidades, se delimitó y recorrió cada sitio con la finalidad de identificar las principales plantas biodinámicas. Los habitantes de cada zona de estudio (figura 24) brindaron información básica sobre el uso, características y nombre común de las diferentes plantas seleccionadas en el lugar, en base a lo cual se seleccionaron las más relevantes.

En los diferentes sitios de estudio se determinaron las coordenadas geográficas de ubicación de cada una de las plantas seleccionadas, además se confirmó la altitud sobre el nivel del mar; con tijeras de podar debidamente desinfectadas, se cortaron trozos vegetativos de las diferentes partes de la planta, estas muestras se colocaron en papel periódico, por último, se guardaron en bolsas plásticas herméticas debidamente identificadas.



Figura 23: Verificación de la altitud del primer piso altitudinal



Figura 24: Levantamiento de información relacionada con cada una de las plantas y sus usos

3.3 TIPO DE MUESTRAS RECOLECTADAS

A 1950 metros sobre el nivel del mar, debido a las propiedades destacadas que poseen, se recolectaron muestras de las siguientes plantas: café (*Coffea arabica* L.), plátano (*Musa paradisiaca* L.) y girasol conocido también como falso girasol (*Tithonia diversifolia*) (figuras 25, 26 y 27).

Todas estas especies se encontraron en áreas donde los agricultores realizan sus prácticas agrícolas, pero no aplican pesticidas. La planta de café crece sin cuidados culturales en el sitio con un rendimiento casi nulo, la planta de plátano el follaje lo utilizan para alimento del ganado bovino, la planta de girasol es utilizada con fines ornamentales.



Figura 25: Planta de café (*Coffea arabica* L.)



Figura 26: Planta de plátano (*Musa paradisiaca* L.)



Figura 27: Planta de girasol (*Tithonia diversifolia*)

Las muestras vegetales de ruda (*Ruta graveolens* L.), romero (*Rosmarinus officinalis*), cedrón (*Aloysia triphylla*) y menta (*Mentha piperita*) (figuras 28,29,30 y 31) se recolectaron a 2250 ms.n.m., el sitio determinado se encuentra en el sector norte de la ciudad de Gualaceo.

Las plantas seleccionadas son principalmente especies aromáticas y medicinales que se encontraban en los jardines de los domicilios junto a la vía principal que no goza de un tráfico intenso. Los habitantes del lugar utilizan la ruda tratar dolores de cabeza; el romero es utilizado con fines medicinales, mientras que las hojas de las plantas de cedrón y menta emplean para preparar infusiones aromáticas.



Figura 28: Planta de ruda (*Ruta graveolens* L.)



Figura 29: Planta de romero (*Rosmarinus officinalis*)



Figura 30: Planta de cedrón (*Aloysia triphylla*)



Figura 31: Planta de menta (*Mentha piperita*)

A 2350 metros sobre el nivel del mar, para el estudio se recolectaron muestras de plantas de diente de león (*Taraxacum officinale* Weber.), manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.), geranio (*Pelargonium graveolens*), altamisa (*Artemisia vulgaris*) y canayuyo (*Sonchus oleraceus*) (figuras 32, 33, 34, 35 y 36); todas estas plantas se encontraban junto a la carretera principal que atraviesa la parroquia. La planta de diente de león, así como la de manzanilla son utilizadas para contrarrestar malestares estomacales, el geranio es aprovechado para preparar pastas con la finalidad de sanar heridas sobre la piel, las hojas de la planta de altamisa usan para tratar ectoparásitos en animales domésticos, mientras que la planta de canayuyo lo utilizan frecuentemente para tratar infecciones del sistema renal.



Figura 32: Planta de diente de león (*Taraxacum officinale* Weber.)



Figura 33: Planta de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.)



Figura 34: Planta de geranio (*Pelargonium graveolens*)



Figura 35: Planta de altamisa (*Artemisia vulgaris*)



Figura 36: Planta de canayuyo (*Sonchus oleraceus*)

El conjunto de muestras vegetativas fue tratado bajo las mismas condiciones para evitar la incidencia de factores externos, además se evitó el contacto directo entre ellas, luego de recolectadas, se identificaron y codificaron, como se presenta en el cuadro 2; a continuación se envolvieron en papel periódico seco y se colocaron en bolsas plásticas herméticas, condiciones en las cuales se trasladaron desde Ecuador hasta los laboratorios de la Universidad Nacional Agraria La Molina en la ciudad de Lima, donde se preparó la solución madre para producción de microorganismos benéficos, así como para su caracterización e identificación.

Cuadro 2: Código de las muestras vegetales de acuerdo al piso altitudinal

Piso Altitudinal	Muestra	Nombre Común	Nombre Científico
P1	M1	Café	<i>Coffea arabica</i> L.
	M2	Plátano	<i>Musa paradisiaca</i> L.
	M3	Girasol o falso girasol	<i>Tithonia diversifolia</i>
P2	M1	Ruda	<i>Ruta graveolens</i> L.
	M2	Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>
	M3	Cedrón	<i>Aloysia triphylla</i>
	M4	Menta	<i>Mentha piperita</i>
P3	M1	Diente de león	<i>Taraxacum officinale</i>
	M2	Manzanilla	<i>Matricaria chamomilla</i> L.
	M3	Geranio	<i>Pelargonium graveolens</i>
	M4	Altamisa	<i>Artemisia vulgaris</i>
	M5	Canayuyo	<i>Sonchus oleraceus</i>

3.4 PREPARACIÓN DEL CULTIVO MADRE

Para la obtención de microorganismos benéficos a partir de las muestras vegetales, en primer lugar, se preparó la solución madre; se cumplieron una serie ordenada de procedimientos a nivel de laboratorio (Meza, 2009).

Se codificó e identificó cada una de las muestras de acuerdo al piso altitudinal en el cual se recolectaron; a continuación, cada muestra fue cuidadosamente seccionada en fragmentos pequeños, se registró su peso (figura 37) y se colocó en bolsas plásticas que además contenían sal, hígado, melaza y agua (figuras 38 y 39) en proporciones que se especifican en el cuadro 3.

Cuadro 3: Ingredientes y cantidades necesarias para preparar la solución madre de MOBs

Descripción	Cantidad
Muestra vegetal	50 g
Agua	50 cc
Hígado	10 g
Sal	5 g
Melaza	20 cc

En la bolsa plástica se adicionó agua en la misma cantidad que la muestra vegetal los cuales constituyen el peso total, sobre el cual se agregó 10 por ciento de hígado, cinco por ciento de sal y aproximadamente 20 por ciento de melaza.



a b c
Figura 37: Preparación de muestras a) Muestra de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) b) Fragmentación de muestras c) Pesado de muestras



Figura 38: Bolsas plásticas con hígado, sal y muestra vegetal



Figura 39: Muestras de tres pisos altitudinales colocadas en bolsas plásticas

Una vez depositados todos los ingredientes en el interior de las bolsas plásticas, cuidadosamente se mezclaron, posteriormente se ubicaron en un lugar a temperatura ambiente sin exposición directa al sol por un periodo de ocho días; a cinco días de iniciado el proceso se evidenció en cada una de las bolsas plásticas el cambio de color en el líquido (figura 40) que presentó un olor agridulce con aroma característico de acuerdo a las plantas utilizadas. A ocho días de iniciada la labor, se observó la presencia de capas blanquecinas sobre las muestras vegetales (figura 41), lo que demostró que el proceso avanzaba de forma correcta.

Con absoluta precaución para evitar el contacto entre el contenido de las diferentes bolsas plásticas, con un pH meter AD12 marca Adwa se registró el pH y con un conductímetro WTW 330i se determinó la conductividad eléctrica y la temperatura del medio de cultivo de cada una de las muestras (figura 42 y figura 43), luego de cada medición el equipo utilizado fue lavado y secado; se recolectó información durante ocho días.



Figura 40: Estado de las muestras 4 días después preparada la solución



Figura 41: Estado de las muestras 8 días después de preparada la solución



Figura 42: Muestras y equipos para determinar el pH y conductividad eléctrica



Figura 43: Determinación de pH y conductividad eléctrica de la solución líquida

Después de diez días de iniciado el proceso, previa verificación que los contenidos de todas las bolsas plásticas presenten condiciones similares en lo referente a pH y CE, se obtuvo una solución base o madre de microorganismos benéficos que se utilizaron para obtener mayores valores de microorganismos.

3.5 PRODUCCIÓN DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS (MOBs)

La primera actividad previa a la producción de microorganismos benéficos consistió en preparar un medio con agua, hígado, sal y melaza (Meza, 2009), en proporciones que se especifican en el cuadro 4.

Cuadro 4: Ingredientes y cantidades necesarias para la producción de MOBs

Descripción	Cantidad
Agua	400 ml
Hígado	40 g
Sal	4 g
Melaza	40 ml

Los envases utilizados tenían capacidad para 500 ml, razón por la que se preparó una solución con 400 ml de agua pura (libre de cloro), más 10 por ciento de hígado, 1 por ciento de sal y aproximadamente 10 por ciento de melaza.

El contenido se esterilizó en la autoclave durante 15 minutos a 121 °C y una atmósfera de presión (figura 44), luego se dejó enfriar a condiciones ambientales (figura 45). De las bolsas plásticas se extrajo 40 ml de solución madre la cual se adicionó en cada uno de los frascos de acuerdo al tratamiento pertinente; se homogenizó la mezcla y por un lapso de diez días se dejó reposar en condiciones ambientales sin incidencia directa del sol.



Figura 44: Autoclavado de envases para activación de microorganismos benéficos



Figura 45: Envases y solución líquida luego del proceso de autoclavado

Después de la activación de los microorganismos benéficos, por un periodo de ocho días se registró el pH (figura 46) en cada una de las botellas, además se observó la presencia de capas blanquecinas en la parte superior (figura 47), lo cual evidenció la presencia de comunidades microbianas benéficas.



Figura 46: Determinación del pH de las muestras después de la activación de microorganismos benéficos



Figura 47: Estado de las muestras de microorganismos benéficos, ocho días después de la activación

3.6 DETERMINACIÓN DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC.ml⁻¹)

Para determinar las UFC, en el laboratorio de Biología de la Universidad Nacional Agraria La Molina, bajo condiciones controladas, en tubos de ensayo con agar peptona, se realizaron diluciones sucesivas de acuerdo al microorganismo en estudio, de tal manera que permita de forma ideal el recuento de las unidades formadoras de colonias, ya que la población microbiana en cada consorcio no es igual.

Se utilizó el Diseño Completo al Azar (DCA) con tres repeticiones; de los diferentes tubos de ensayo se utilizó 1 ml de solución que se aplicó en placas Petri con medios de cultivo específicos (cuadro 5) para levaduras, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., actinomicetos y *Pseudomonas* spp.

Cuadro 5: Medios de cultivo para microorganismos benéficos

Medio de cultivo	Microorganismo
Agar Sabouraud	Levadura
Agar Nutritivo	<i>Bacillus</i> spp.
Agar Rogosa	<i>Lactobacillus</i> spp.
Agar Avena	Actinomicetos
Agar Cetrimide	<i>Pseudomonas</i> spp.

3.6.1 Recuento de levaduras UFC.ml⁻¹

Para el recuento de levaduras en las muestras de los tres pisos altitudinales, se preparó diluciones sucesivas desde -3 hasta -6. La solución nutritiva para el cultivo se preparó con 65 gramos de Agar Sabouraud el cual se depositó en un Erlenmeyer, luego se enrasó a un litro con agua destilada, a continuación, se licó el medio hasta que no se observó grumos (en el microondas, recomendable dos minutos); se llevó a la autoclave para esterilizar, después de esterilizada y una vez que descendió la temperatura de la solución se vertió en placas Petri que contenían un mililitro de solución de microorganismos benéficos.

Con movimientos suaves en sentido horario y anti horario se uniformizó la mezcla. Los medios de cultivo se colocaron a temperatura ambiente por un periodo de 48 horas, luego de lo cual se realizó sin dificultad el conteo de las UFC de levaduras (figura 48) y se verificó los respectivos valores, anexo 1.

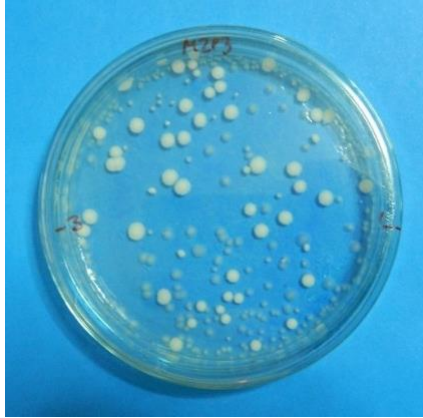


Figura 48: Desarrollo de colonias de levaduras en la muestra M2P3

3.6.2 Recuento de *Bacillus* spp. UFC.ml⁻¹

Para determinar el número de unidades formadoras de colonia de *Bacillus* spp., en primera instancia con la finalidad de eliminar organismos ajenos a los que estamos buscando, cada una de las muestras líquidas se colocaron a 85 °C por un periodo de 15 minutos, luego se dejó enfriar la solución y se realizó las diluciones desde -1 hasta -6 con, 3 repeticiones.

Para preparar la solución nutritiva se utilizó 28 gramos de Agar Nutritivo 28 que se depositó en un erlenmeyer, a continuación se enrasó a un litro con agua destilada, se licuó el medio hasta que no se observó grumos (en el microondas, recomendable dos minutos), luego el medio se llevó a la autoclave para su esterilización; una vez cumplido este propósito y que descendió la temperatura, se vertió aproximadamente 12 ml en cada placa que contenía un mililitro de solución de microorganismos benéficos.

Los cultivos se colocaron en una incubadora a 32 °C por un periodo de 24 horas, luego de lo cual se observó la presencia de UFC de *Bacillus* spp., (figura 49) e inmediatamente se se registro los correspondientes valores, anexo 2.

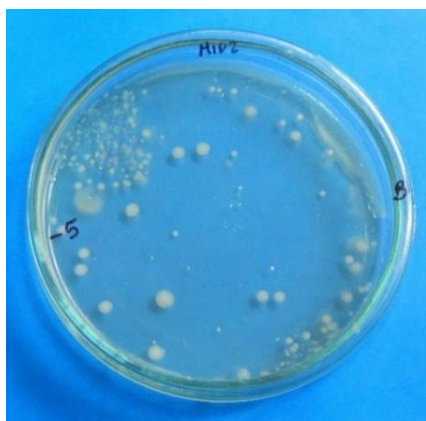


Figura 49: Desarrollo de colonias de *Bacillus* spp. en la muestra M1P2

3.6.3 Recuento de *Lactobacillus* spp. UFC.ml⁻¹

Para el recuento de *Lactobacillus* spp., se preparó diluciones sucesivas desde -9 hasta -13, esto debido a la cantidad significativas de UFC en las pruebas previas realizadas con diluciones menores.

En un erlenmeyer se adicionó 67,15 gramos de Agar Rogosa, lo cual se enrasó a un litro con agua destilada, a continuación, se licuó el medio hasta que no se observó grumos (en el microondas recomendable dejar dos minutos), posteriormente, se llevó la solución a la autoclave para su esterilización, ya fría se vertió en placas Petri debidamente identificadas que contenían un mililitro de solución de microorganismos benéficos, la mezcla cuidadosamente fue mezclada.

A continuación, se adicionó 15 gramos de Agar Agar a un litro de agua destilada, se autoclavó la solución y una vez a temperatura ambiente, se depositó aproximadamente 5 ml en las placas Petri que contenían Agar Rogosa, esto con la finalidad de propiciar un medio anaerobio.

Las muestras se colocaron en una incubadora a 36 °C por un periodo de 48 horas, luego de lo cual se procedió al recuento de colonias (figura 50) y se verificó los correspondientes valores, anexo 3.



Figura 50: Colonias de *Lactobacillus* spp. luego de 48 horas de incubación

3.6.4 Recuento de actinomicetos UFC.ml⁻¹

Para determinar las unidades formadoras de colonias de actinomicetos se realizó diluciones sucesivas desde -3 hasta -5, de cada una de estas diluciones se extrajo un mililitro de solución y se colocó en placas Petri, con tres repeticiones.

Para preparar la solución se utilizó solución nutritiva de Agar Avena (30 gramos de avena en hojuelas trituradas) más 15 gramos de Agar Agar y 0,1 por ciento de nistatina por cada litro de agua destilada.

Los 30 gramos de avena se licuaron hasta obtener un polvo no tan fino, se hirvió en agua destilada por media hora, luego se adicionó 15 gramos de Agar Agar y se enrazó a un litro; se autoclavó y se dejó enfriar hasta temperaturas entre los 40 °C y 50 °C, a continuación, se adicionó nistatina al 0.1 por ciento; la mezcla se vertió en las placas Petri.

El cultivo se dejó en condiciones ambientales por un periodo de 12 días, luego de lo cual se visualizó las colonias de actinomicetos (figura 51) y se registró los correspondientes valores, anexo 4.

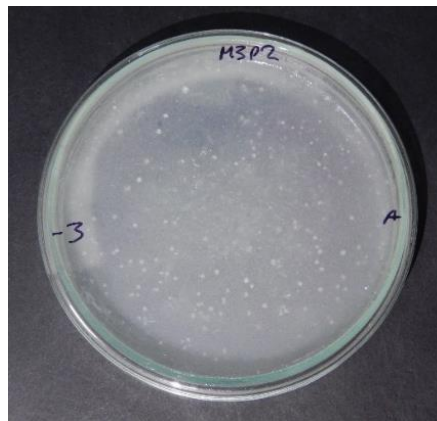


Figura 51: Desarrollo de colonias de actinomicetos en la muestra M3P2

3.6.5 Recuento de *Pseudomonas* spp. UFC.ml⁻¹

Para verificar el número de unidades formadoras de colonias de *Pseudomonas* spp., de todos los biopreparados se realizaron diluciones sucesivas desde -1 hasta -5.

Las muestras se colocaron en una incubadora a 28 °C por un periodo de 24 horas, sin embargo, a partir de este lapso no se observó ninguna colonia, la observación se realizó en las siguientes 24 horas y tampoco se observó UFC de *Pseudomonas* spp; el cultivo se repitió en dos ocasiones más y se descartó la presencia de este microorganismo en el consorcio en estudio (figura 52).

Para el recuento de unidades formadoras de colonias de *Pseudomonas* spp., se utilizó Agar Cetrimide y agua destilada.



Figura 52: Ausencia de *Pseudomonas* spp. en la muestra M1P3

3.7 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS

Con la finalidad de contar con cultivos puros se realizó la purificación de levaduras, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., y actinomicetos; mediante la técnica de estrías, cada uno de los microorganismos se sembró en medios de cultivo apropiados, en condiciones ideales se logró el desarrollo de los diferentes microorganismos benéficos, figuras: 53, 54, 55 y 56.



Figura 53: Cultivo puro de levadura de la muestra M3P2



Figura 54: Cultivo puro de *Lactobacillus* spp. de la muestra M2P2



Figura 55: Cultivo puro de *Bacillus* spp. de la muestra M4P3

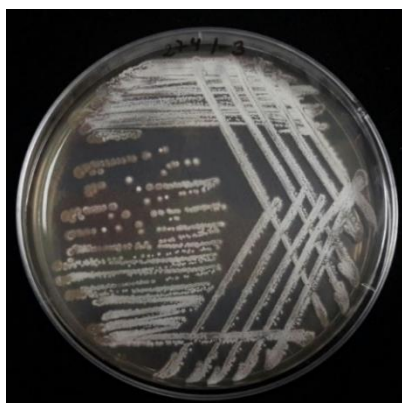


Figura 56: Cultivo puro de actinomicetos de la muestra M5P3

Se preparó tubos de ensayo con medio de cultivo inclinado para levaduras, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp. y actinomicetos; en condiciones controladas, con un asa bacteriológica se tomó una muestra de cada placa Petri y se realizó la siembra en los tubos que se conservaron en refrigeración hasta su identificación.

3.8 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS

Para corroborar la presencia de microorganismos benéficos en las soluciones líquidas, se realizó la tinción de Gram. El procedimiento se cumplió con las muestras de *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., y actinomicetos.

3.8.1 Observación de levaduras

Se realizó la tinción simple para todas las muestras de levaduras aisladas de las especies vegetales de los tres pisos altitudinales, se adicionó una gota de azul de metileno en un portaobjeto, luego se colocó la muestra y se cubrió con un portaobjeto. Estas muestras se observaron en el microscopio (100X), se constató que en todas las placas existe la presencia de los microorganismos (figuras 57 a 68) que no presentaron las mismas particularidades, lo que supone la existencia de varias especies. Las características observables fueron propias de las levaduras en diferentes estados de desarrollo.

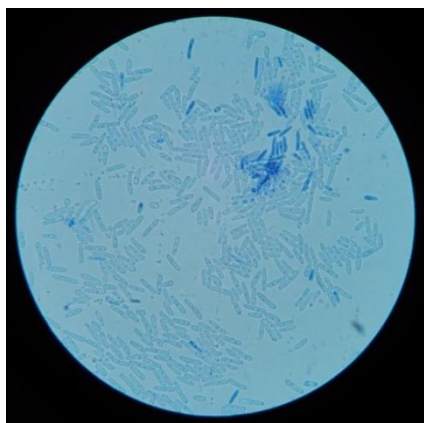


Figura 57: Observación microscópica de levaduras en la muestra M1P1



Figura 58: Observación microscópica de levaduras en la muestra M2P1

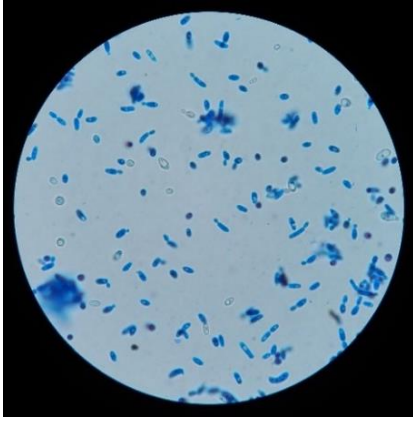


Figura 59: Observación microscópica de levaduras en la muestra M3P1

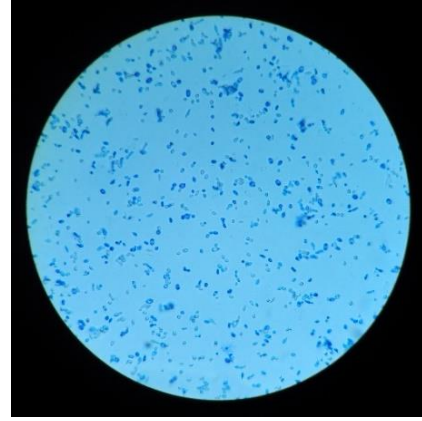


Figura 60: Observación microscópica de levaduras en la muestra M1P2

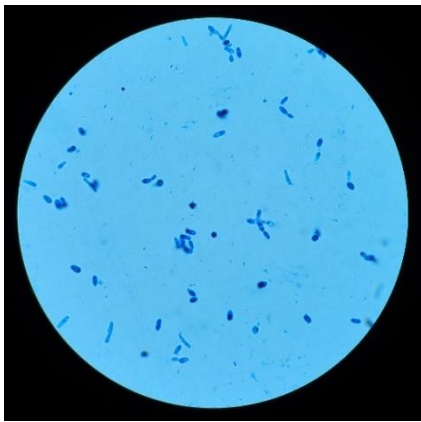


Figura 61: Observación microscópica de levaduras en la muestra M2P2

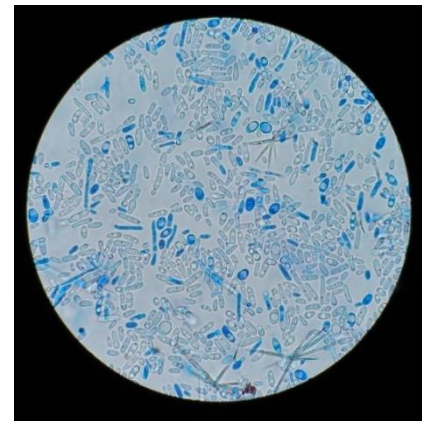


Figura 62: Observación microscópica de levaduras en la muestra M3P2

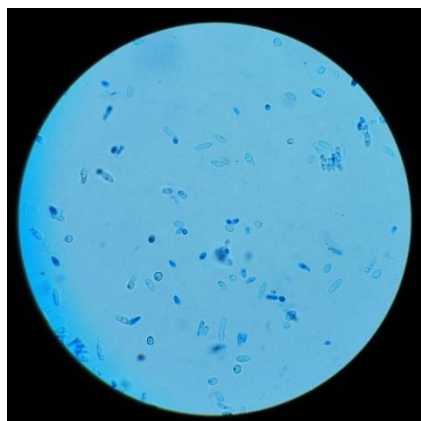


Figura 63: Observación microscópica de levaduras en la muestra M4P2

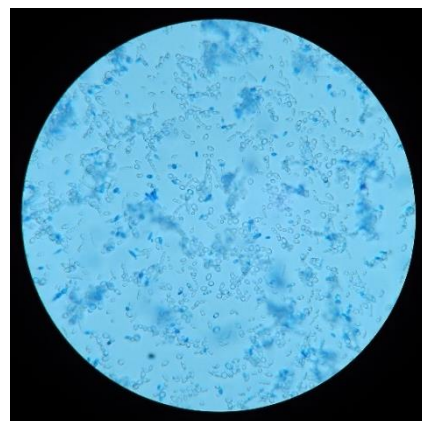


Figura 64: Observación microscópica de levaduras en la muestra M1P3

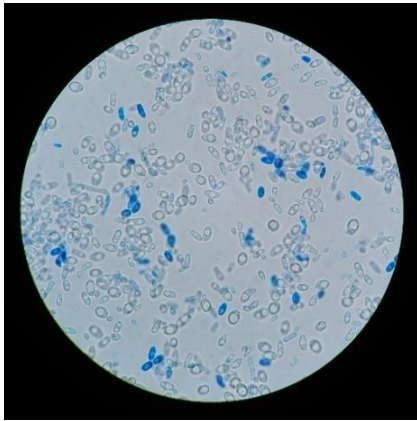


Figura 65: Observación microscópica de levaduras en la muestra M2P3



Figura 66: Observación microscópica de levaduras en la muestra M3P3



Figura 67: Observación microscópica de levaduras en la muestra M4P3

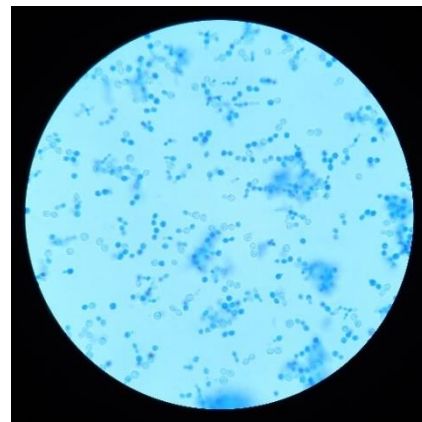


Figura 68: Observación microscópica de levaduras en la muestra M5P3

3.8.2 Observación de *Bacillus* spp.

Con referencia a *Bacillus* spp, la tinción de Gram realizada confirmó la presencia de estos microorganismos benéficos en las diferentes placas Petri con muestras líquidas obtenidas de especies vegetales de cada uno de los tres pisos altitudinales (figura 69 a 80).

Las apreciaciones preliminares evidenciaron características atribuidas a *Bacillus* spp., siendo necesaria su posterior identificación para confirmar las especies; la concentración de los microorganismos no fue igual en todas las placas en estudio.



Figura 69: Observación microscópica de *Bacillus* spp. en la muestra M1P1

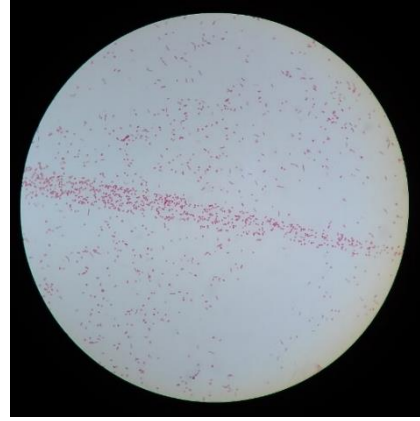


Figura 70: Observación microscópica de *Bacillus* spp. en la muestra M2P1



Figura 71: Observación microscópica de *Bacillus* spp. en la muestra M3P1



Figura 72: Observación microscópica de *Bacillus* spp. en la muestra M1P2



Figura 73: Observación microscópica de *Bacillus* spp. en la muestra M2P2



Figura 74: Observación microscópica de *Bacillus* spp. en la muestra M3P2



Figura 75: Observación microscópica de *Bacillus* spp. en la muestra M4P2



Figura 76: Observación microscópica de *Bacillus* spp. en la muestra M1P3



Figura 77: Observación microscópica de *Bacillus* spp. en la muestra M2P3

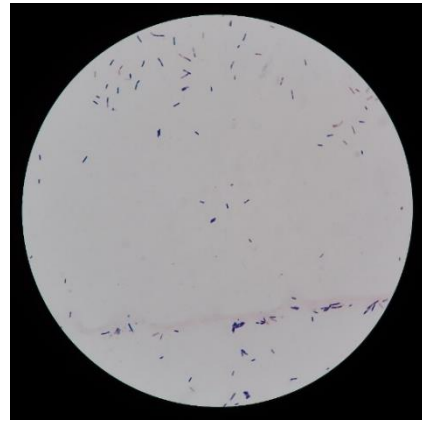


Figura 78: Observación microscópica de *Bacillus* spp. en la muestra M3P3

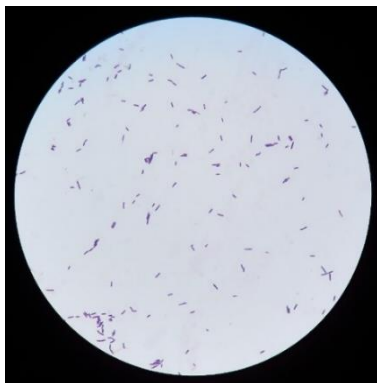


Figura 79: Observación microscópica de *Bacillus* spp. en la muestra M4P3



Figura 80: Observación microscópica de *Bacillus* spp. en la muestra M5P3

3.8.3 Observación de *Lactobacillus* spp.

Mediante la tinción de Gram para *Lactobacillus* spp., se constató la presencia de estos microorganismos en todas las muestras vegetales provenientes de los tres pisos altitudinales

(figuras 81 a 92). La observación microscópica confirmó la presencia de *Lactobacillus* spp. con particularidades y formas específicas de este tipo de microorganismos, sin embargo, de la evaluación morfológica se dedujo que existen varias especies, lo cual se confirmará con la identificación mediante sistemas miniaturizados API.

En ciertas placas se observó mayor concentración de microorganismos y en otros casos menor concentración, lo que coincide con la evaluación de las unidades formadoras de colonias que demostró que la población de estos microorganismos es diferente de acuerdo a la especie vegetal y al piso altitudinal.

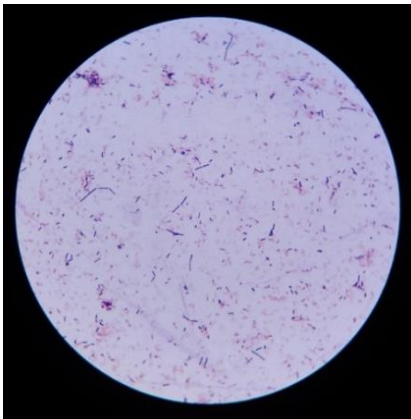


Figura 81: Observación microscópica de *Lactobacillus* spp. en la muestra M1P1



Figura 82: Observación microscópica de *Lactobacillus* spp. en la muestra M2P1

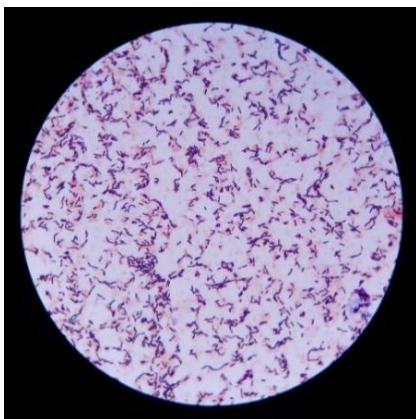


Figura 83: Observación microscópica de *Lactobacillus* spp. en la muestra M3P1



Figura 84: Observación microscópica de *Lactobacillus* spp. en la muestra M1P2

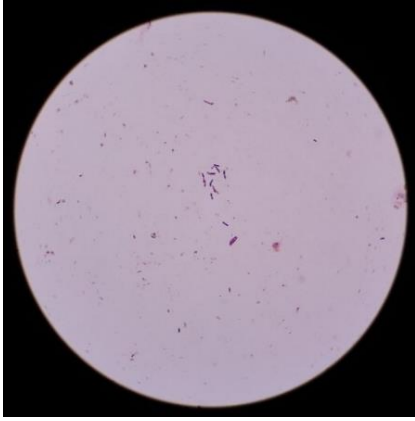


Figura 85: Observación microscópica de *Lactobacillus* spp. en la muestra M2P2



Figura 86: Observación microscópica de *Lactobacillus* spp. en la muestra M3P2

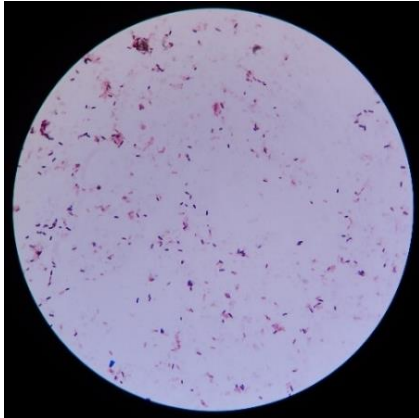


Figura 87: Observación microscópica de *Lactobacillus* spp. en la muestra M4P2



Figura 88: Observación microscópica de *Lactobacillus* spp. en la muestra M1P3



Figura 89: Observación microscópica de *Lactobacillus* spp. en la muestra M2P3



Figura 90: Observación microscópica de *Lactobacillus* spp. en la muestra M3P3



Figura 91: Observación microscópica de *Lactobacillus* spp. en la muestra M4P3

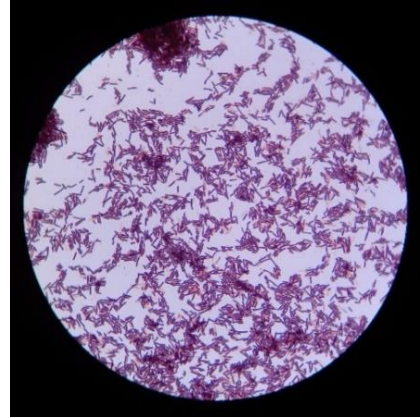


Figura 92: Observación microscópica de *Lactobacillus* spp. en la muestra M5P3

3.8.4 Observación de actinomicetos

El aislamiento de los actinomicetos se realizó en el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso”. Se observó características morfológicas inherentes a actinomicetos (figura 93 a 100), para confirmar estos atributos se realizó la amplificación 16S-PCR de los lisados de ADN de las cepas en estudio.

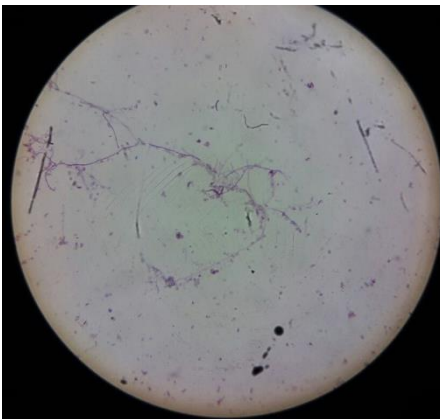


Figura 93: Observación microscópica de actinomicetos en la muestra M1P1

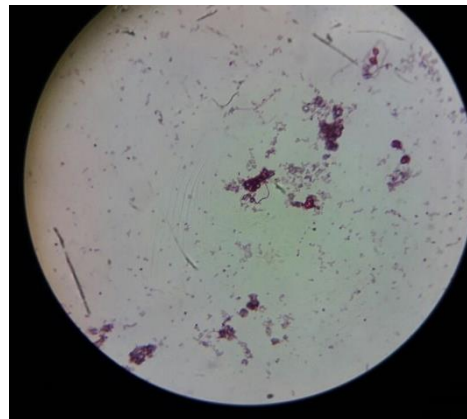


Figura 94: Observación microscópica de actinomicetos en la muestra M2P1

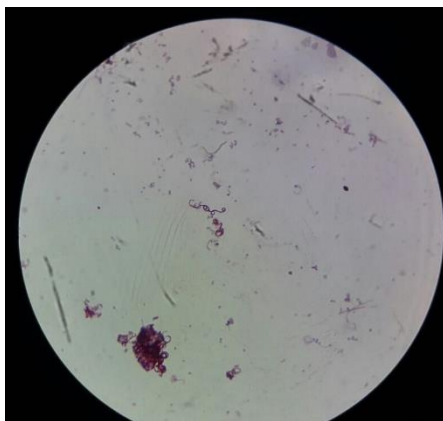


Figura 95: Observación microscópica de actinomicetos en la muestra M3P2

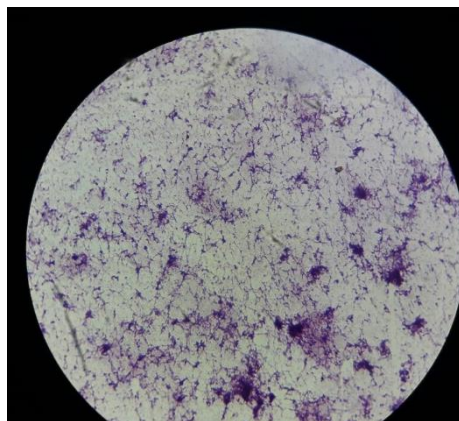


Figura 96: Observación microscópica de actinomicetos en la muestra M4P2

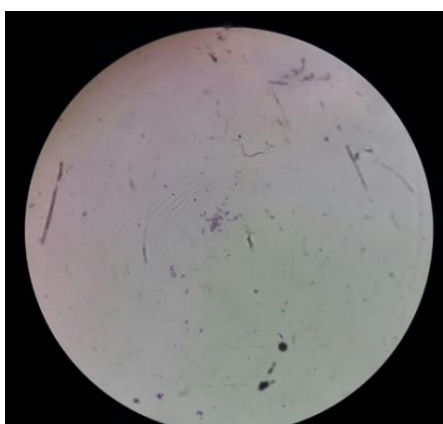


Figura 97: Observación microscópica de actinomicetos en la muestra M4P3

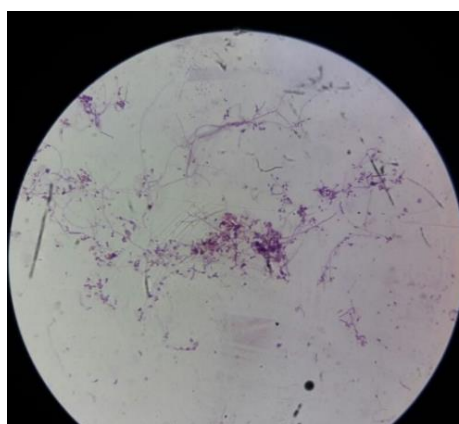


Figura 98: Observación microscópica de actinomicetos en la muestra M5P3A1

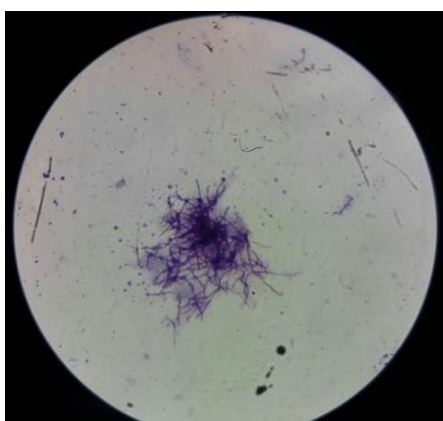


Figura 99: Observación microscópica de actinomicetos en la muestra M5P3A2

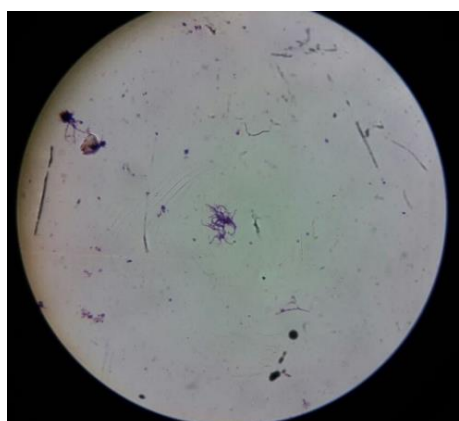


Figura 100: Observación microscópica de actinomicetos en la muestra M5P3A3

3.8.5 Observación de *Pseudomonas* spp.

En las evaluaciones preliminares no se detectó la presencia de *Pseudomonas* en las soluciones líquidas de microorganismos benéficos de las doce muestras vegetales, provenientes de 3 pisos altitudinales.

3.9 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

3.9.1 Identificación de levaduras

Par la identificación de levaduras se utilizó los sistemas miniaturizados API 20 C AUX (cámara de incubación) que contiene 20 microtubos diferentes en su interior. Se utilizó el procedimiento del fabricante, adjunto en el producto (BIOMÉRIEUX, 2007).

En cada galería, en forma uniforme y cuidadosa se aplicó 5 ml de agua destilada, en la parte lateral se especificó el código de la muestra. Se preparó cultivos puros de levaduras 48 horas antes de las pruebas API, con la finalidad de contar con cepas jóvenes.

En un tubo de ensayo previamente esterilizado se colocó 2 ml de NaCl 85 por ciento, sobre esta solución se depositó la muestra de levaduras; la concentración ideal para la prueba se determinó comparando la turbidez de la muestra líquida con el patrón 2 de McFarland incluida en el kit, de esta concentración con una micropipeta se llenó cada una de las 20 cúpulas con la suspensión líquida, evitando la formación de burbujas, después de llenados todos los espacios, se cerró la cámara de incubación y se colocó en una incubadora a 29 °C.

Luego de 72 horas de incubación, en cada cúpula minuciosamente se observó la turbidez o cambio de tonalidad, la cual se comparó con respecto a la cúpula cero que no cambió de color, como se aprecia en la figura 101.



Figura 101: Observación de turbidez en diferentes cúpulas de API 20 C AUX

En una hoja de registro suministrada por el distribuidor (figura 102), todas las cúpulas que presentaron turbidez se marcaron con signo positivo (+) y las que no presentaron turbidez se marcaron con signo negativo (-). A continuación, se sumaron únicamente los negativos (-) que nos brindó un valor entre 1 y 7. Con los siete dígitos se formó un perfil numérico que fue enviado al distribuidor para la identificación de las levaduras mediante un *software* específico.

48 h	0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADD	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	Hyphe/Pseudo-Hyphe
72 h	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
	6			6			2			7			3			7			0		

Figura 102: Hoja de registro de turbidez de API 20 C AUX

Los códigos de levaduras de las muestras de la solución de microorganismos benéficos de las especies vegetales de los tres pisos altitudinales en estudio, se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 6: Código de las pruebas API 20 CAUX para identificación de levaduras

Nº de Muestras	Muestra	Código obtenido
1	M1P1 Le2	2 0 3 1 2 3 1
2	M1P1 Le1	6 6 2 6 7 3 0
3	M3P1 Le3	2 0 6 0 5 0 1
4	M2P2 Le1	0 0 0 0 0 0 0
5	M2P2 Le2	2 1 4 0 0 1 0
6	M3P2 Le4	2 0 4 4 0 7 2
7	M3P2 Le2	2 0 4 4 0 3 2
8	M3P2 Le3	7 3 3 0 0 1 0
9	M4P2 Le3	2 1 0 0 0 0 0
10	M1P3 Le3	6 7 0 0 1 0 0
11	M1P3 Le2	0 5 0 6 0 3 3
12	M2P3 Le1	6 3 3 4 0 1 0
13	M3P3 Le2	6 1 0 7 4 1 1
14	M3P3 Le4	6 7 3 0 1 0 0
15	M4P3 Le2	6 3 0 0 1 0 0
16	M4P3 Le1	6 0 0 0 0 0 0
17	M5P3 Le4	6 6 2 7 3 7 2

3.9.2 Identificación de *Bacillus* spp.

Para la identificación de *Bacillus* spp. se utilizó los sistemas miniaturizados API 50 CHB V4.1. Se utilizó el procedimiento del fabricante, adjunto en el producto (BIOMÉRIEUX, 2007).

La cámara de incubación contenía 5 galerías con 10 microtubos en cada una. En primera instancia se rotuló el código de cada una de las muestras. A continuación, se preparó la cámara de incubación, con una jeringa se midió 10 ml de agua destilada estéril y se adicionó a los alveolos, de inmediato se tapó creando un ambiente húmedo en su interior. Acto seguido, en un tubo de ensayo (N° 1) se adicionó 1 ml de agua destilada estéril, al cual se agregó colonias de *Bacillus* spp., preparada 48 horas antes, hasta observar una turbidez fuerte.

En un tubo de ensayo (N° 2) se adicionó 5 ml de NaCl estéril, luego se añadió gota a gota la suspensión del tubo de ensayo (N° 1) hasta que la turbidez quedó similar a la turbidez del patrón 2 de McFarland (incluido en el kit), se contó el número de gotas (n).

Luego, a una ampolla API 50 CHB/E Medium se le adicionó del tubo de ensayo (N° 1) el doble de gotas contabilizadas anteriormente (2n); inmediatamente se abrió cada galería de su respectivo empaque y se le adicionó gota a gota la ampolla previamente inoculada, hasta llenar cada pocillo (o tubo), en este caso a la cúpula no se le agregó parafina ya que se suponía que son microorganismos aerobios.

Con cuidado cada galería se acomodó en la cámara húmeda la cual se llevó a incubar a 29 °C ± 2 °C durante 24 horas (± 2 horas) y 48 horas (± 6 horas). A partir de las 24 se observó la reacción manifiesta en el cambio de color de cada pocillo, el microtubo número 25 se tornó de color negro, mientras que todos los demás tomaron diferentes tonalidades de rojo a amarillo (figura 103).

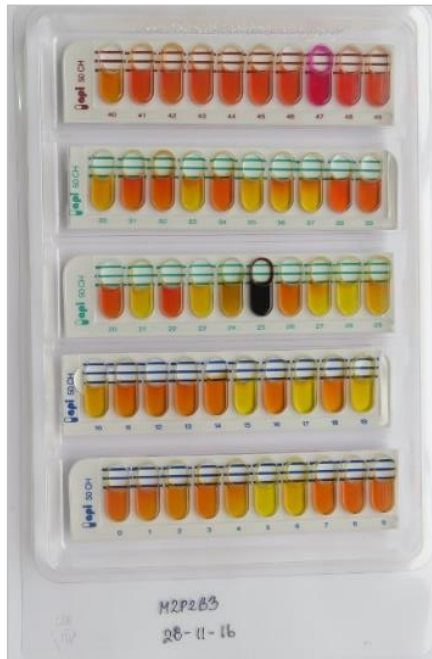


Figura 103: Diferentes tonalidades de color en los microtubos de API 50 CHB (24 horas)

Dependiendo de la tonalidad que presentó cada microtubo, se verificó el código en una hoja de registro suministrada por el distribuidor. El pocillo 25 de color negro fue positivo y las tonalidades más bajas fueron negativas (figura 104).

api® 50 CH		CE 12138 A	REF: M191B4	2016/30/1.1	BIOMÉRIEUX																																													
		Origine / Source / Herkunft / Origen / Origem / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :																																																
48 h / 24 h	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
											+	+											+	+	+																									
	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADD	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SCR	MDM	MDG	NAG	AMY	ABB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFIC	LFUC	DARL	LAPL	GNT	ZKG	5HG	
Inoc./Inok./Υλικό ενοφθαλμισμού :	Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy :														Ident. / Ταυτοποίηση :																																			
Incub./Inkub./Θερμοκρασία επώασης :																																																		

Figura 104: Hoja de registro de códigos API 50 CHB para identificación de *Bacillus* spp.

Se registró todos los códigos de cada uno de los diez microtubos de las cinco galerías de API 50 CHB (cuadro 7), los mismos que se utilizaron para la identificación de *Bacillus* spp. mediante *software* específico.

Cuadro 7: Código de las pruebas API 50 CHB para identificación de *Bacillus* spp.

		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49				
REF		0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DDYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MIZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG				
24 horas	M1P1B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	M3P1B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	M1P2B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	M4P3B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	M5P3B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	M3P3B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	M5P3B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	M2P3B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M2P2B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M2P2B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.9.3 Identificación de *Lactobacillus* spp.

Para la identificación de *Lactobacillus* spp. se utilizó los sistemas miniaturizados API 50 CHL V5.2. Se procedió de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante, adjunto en el producto (BIOMÉRIEUX, 2007).

En primera instancia se rotuló el código de la muestra en la cámara de incubación que contenía 5 galerías con 10 microtubos en su interior. Luego con una jeringa se adicionó 10 ml de agua destilada estéril a los alveolos de la cámara e inmediatamente se tapó esta para favorecer un ambiente húmedo en su interior. En un tubo de ensayo (N° 1) se agregó 2 ml de agua destilada estéril, a este tubo de ensayo (N° 1) se agregó hasta que se observó turbidez fuerte, colonias de *Lactobacillus* spp., preparadas 48 horas antes.

En un tubo de ensayo (N° 2) se agregó 5 ml de NaCl estéril y gota a gota la suspensión del tubo de ensayo (N° 1) hasta que la turbidez quedó similar a la del patrón 2 de McFarland (incluido en el kit), se registró el número de gotas (n). Luego a una ampolla API 50 CHL Medium se adicionó del tubo de ensayo (N° 1) el doble de gotas contabilizadas anteriormente (2n). Se abrió cada galería de su respectivo empaque y se adicionó cuidadosamente gota a gota la solución de la ampolla previamente inoculada, hasta llenar cada pocillo (o tubo), en seguida a la cúpula se agregó parafina con la finalidad de generar un medio anaerobio. Con cuidado cada galería se acomodó en la cámara húmeda y se llevó a incubar a $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas (± 2 horas) y 48 horas (± 6 horas).

En un periodo entre 24 y 48 horas se observó el cambio de color con tonalidades de púrpuras a amarillo en cada uno de los pocillos, el microtubo 25 se tornó de color negro, como se muestra en la figura 105.



Figura 105: Diferentes tonalidades de color en las cúpulas de API 50 CHL (48 horas)

El pocillo 25 de color negro fue positivo y las tonalidades más bajas fueron negativas. En una hoja de registro suministrada por el distribuidor se procedió a verificar el respectivo código de acuerdo a la tonalidad que presentó cada microtubo. (figura 106).

API 50 CH		REF: M2P2L2	2016/30/11																																																				
12138 A		Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :																																																					
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49						
48 h - 24 h																																																							
0	GLY	ERY	DABA	LARA	RIB	DNXL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRIU	IME	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDA	MOD	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	IMAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RIF	AMD	GAVG	XLT	GEN	TUR	LXX	TAG	DFUC	LFLC	DARL	LARL	GMT	ZAG	SKG							
Inoc./Inok./Υλικό ενοφθαλμισμού :		Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy :																				Ident. / Ταυτοποίηση :																																	
Incub./Inkub./Θερμοκρασία επώασης :																																																							

Figura 106: Hoja de registro de código de API 50 CHL para *Lactobacillus* spp.

Se verificaron los códigos de cada uno de los diez microtubos de las cinco galerías de API 50 CHL para *Lactobacillus* spp., (cuadro 8), los mismos que se utilizaron para la identificación mediante *software* específico.

Cuadro 8: Código de las pruebas API 50 CHL para identificación de *Lactobacillus*

REF	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49				
	0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MIZ	RAF	AMD	GLYG	SLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG				
48 horas	M2P2L1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	M3P1L2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	M3P2L1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M4P3L1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M4P3L2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M4P3L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M2P3L1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M2P2L2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M1P1L1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M1P3L1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.9.4 Identificación de actinomicetos

En el Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” de la Universidad Nacional Agraria La Molina se realizó la amplificación 16S-PCR de los lisados de ADN de las cepas en estudio; se emplearon los primers fd1 (5’–CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG–3’) y rD1 (5’–CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC–3’). Los productos de PCR obtenidos y purificados fueron secuenciados por Macro Gen Inc., Seúl- Korea. Las secuencias de cada primer se limpiaron mediante el empleo del programa BioEdit versión 7.0.5.3 y el banco de datos de la “National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), obteniéndose las secuencias del gen ribosomal 16S de las posibles especies tipo a las que se asociaba. Dichas secuencias fueron comparadas con las presentes en la base de datos del GenBank, usando el programa BLASTN y el EzTaxon server.

3.10 EVALUACIÓN DE ANTAGONISMO DE *Bacillus* spp. y *Lactobacillus* spp. ANTE *Fusarium* sp.

Fusarium sp. es un patógeno causante de severas enfermedades en las plantas, provoca descensos en la producción y finalmente la muerte de los vegetales. En el cultivo de fresa, *Fusarium* sp., representa uno de los principales agentes causantes de enfermedades. Los *Bacillus* spp., y *Lactobacillus* spp., presentan propiedades antagónicas ante ciertos organismos del suelo lo que permite realizar un control natural de patógenos sin el uso de pesticidas que afecten la calidad de la fruta y la salud de los consumidores. Por esta razón se evaluó a nivel de laboratorio el efecto de *Bacillus* spp., y *Lactobacillus* spp., ante *Fusarium* sp., con la finalidad de conocer el nivel de antagonismo y seleccionar los microorganismos prominentes para la agricultura.

Para este propósito se preparó Agar Sabouraud en las placas Petri correctamente identificadas y divididas en cuatro partes iguales; en cada cuadrante se ubicó ya sea a un *Bacillus* spp., o *Lactobacillus* spp., (dependiendo del caso) y en el centro de la placa se situó el *Fusarium* sp. Con la finalidad de comparar los resultados se utilizó un testigo con el patógeno, pero sin los microorganismos potencialmente antagonísticos.

Para la prueba se seleccionaron dos microorganismos por cada muestra vegetal, de acuerdo a una evaluación cualitativa de desarrollo del patógeno, el nivel de antagonismo se calificó como:

- Ninguno: en aquellas muestras en las que *Fusarium* sp., invadió completamente al microorganismo benéfico, figura 107.
- Bajo: los microorganismos benéficos inicialmente ofrecen resistencia ante *Fusarium* sp., pero luego este avanza ya sea sobre *Bacillus* spp. o *Lactobacillus* spp., figura 108.
- Medio: *Fusarium* sp., no presenta facilidad para invadir a los microorganismos benéficos, tiene dificultad para cubrir las zonas pobladas de microbios beneficiosos, figura 109.
- Alto: Los microorganismos beneficiosos presentan total antagonismo ante *Fusarium* sp. y evitan completamente el crecimiento del patógeno, figura 110.

Diariamente durante un periodo de diez días se observó la inhibición del halo de *Fusarium* sp., por los *Bacillus* spp., y *Lactobacillus* spp., provenientes de las muestras de las especies vegetales. Todos los microorganismos no demostraron el mismo nivel de antagonismo, incluso algunos no presentaron ningún nivel de antagonismo.

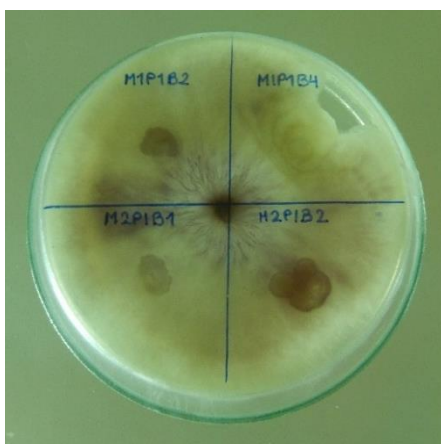


Figura 107: Ausencia de antagonismo de *Bacillus* spp. de la muestra M1P1B1 ante *Fusarium* sp.

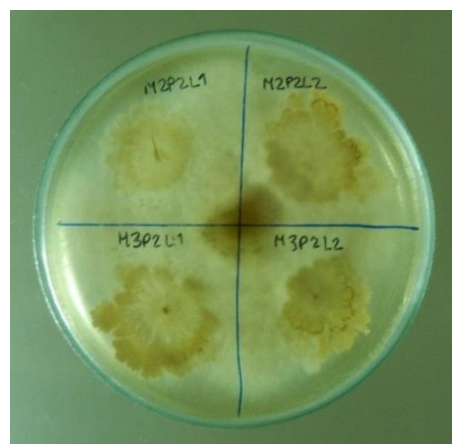


Figura 108: Bajo nivel de antagonismo de *Lactobacillus* spp. de la muestra M3P2L1 ante *Fusarium* sp.

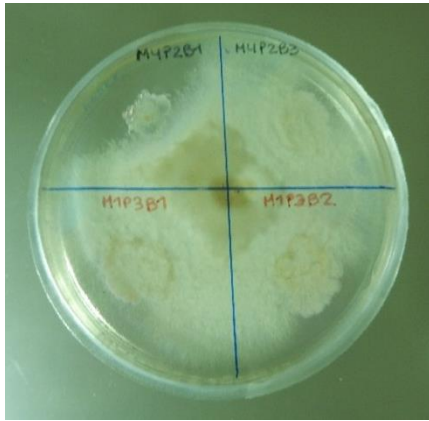


Figura 109: Nivel medio de antagonismo de *Bacillus* spp. de la muestra M4P2B1 ante *Fusarium* sp.

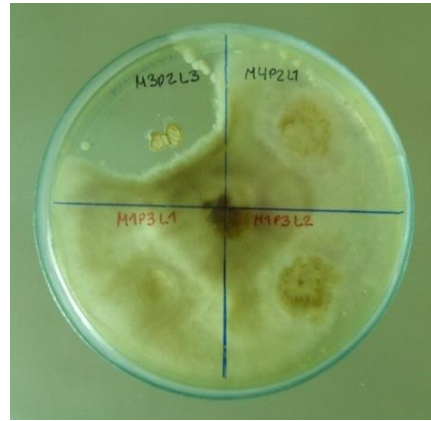


Figura 110: Alto nivel de antagonismo de *Lactobacillus* spp. de la muestra M3P2L3 ante *Fusarium* sp.

3.11 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES PROTEOLÍTICAS DE *Bacillus* spp. y *Lactobacillus* spp.

La proteólisis es una propiedad importante en los microorganismos, ya que ciertos *Bacillus* spp., y *Lactobacillus* spp., tienen la capacidad de degradar proteínas mediante determinadas enzimas, razón por la que se evaluó el efecto proteolítico de los *Bacillus* spp., y *Lactobacillus* spp., aislados de las muestras vegetales de los tres pisos altitudinales.

Para este propósito en placas Petri divididas en cuatro partes iguales, se depositó Agar Gelatina. En cada uno de los cuadrantes se inoculó una muestra de *Bacillus* spp., o *Lactobacillus* spp. respectivamente (según el caso), las placas Petri con los cultivos se dejaron en condiciones ambientales por un periodo de ocho días, durante este lapso de tiempo, se realizaron observaciones diarias con la finalidad de verificar la presencia de un halo que evidencian propiedades proteolíticas de los microorganismos en el estudio. Se observó halos de diferente magnitud, se registró la presencia de halos pequeños (figura 111), medianos y grandes (figura 112) y en algunos casos no se observó ninguno (los microorganismos no evidenciaron proteólisis). Finalmente, en cada cuadrante se aplicó una gota de ácido acético para perfeccionar el contraste y apreciar mejor la formación de aureolas.

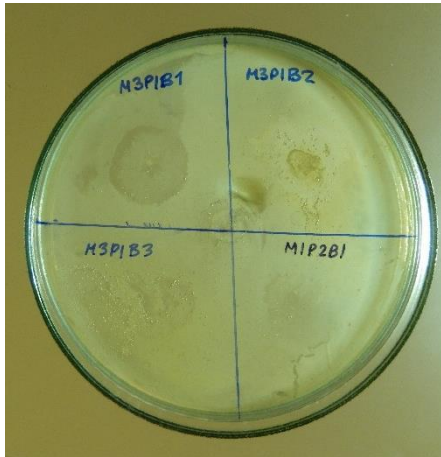


Figura 111: Halo pequeño en *Bacillus* de la muestra M3P1B1

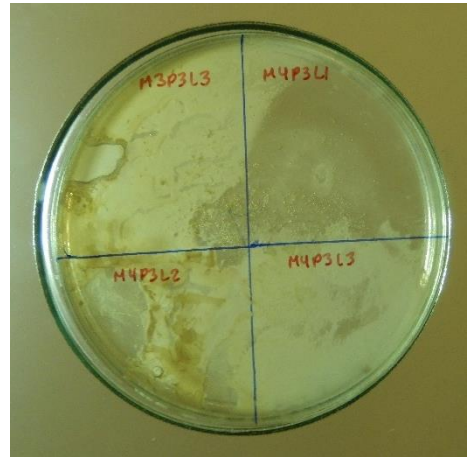


Figura 112: Halo grande en *Lactobacillus* de la muestra M4P3L1

3.12 EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS EN EL CULTIVO DE FRESA

Para evaluar la incidencia de los microorganismos benéficos en el cultivo de fresa, de acuerdo a las características relevantes (UFC de los microorganismos que conforman la carga microbiana, propiedades proteolíticas y características antagonicas) se seleccionó un consorcio microbiano por cada piso altitudinal. Del primer piso altitudinal se seleccionó el consorcio M1P1 (*Coffea arabica* L.), del segundo piso altitudinal el consorcio M4P2 (*Mentha piperita*) y del tercer piso altitudinal el consorcio microbiano M4P3 (*Artemisia vulgaris*). Se inoculó en el suelo dos dosis de cada solución seleccionada, la dosis uno al 2,5% (D1) y la dosis dos al 5% (D2); en otro tratamiento se aplicó microorganismos benéficos de uso comercial EM1 al 5% (acorde a instrucciones del producto) y un tratamiento blanco sin la aplicación de ninguna solución. Los tratamientos y la descripción correspondiente se presentan en el cuadro 9.

Cuadro 9: Tratamientos para evaluación de microorganismos benéficos en el cultivo de fresa (*Fragaria* sp.)

Nº	Piso altitudinal	Dosis	Interacciones	Tratamiento
1	P1	D1	D1P1	T1
2		D2	D2P1	T2
3	P2	D1	D1P2	T3
4		D2	D2P2	T4
5	P3	D1	D1P3	T5
6		D2	D2P3	T6
7	-	-	EM1	T7
8	-	-	Blanco	T8

Para los 8 tratamientos en estudio se utilizó el Diseño de Bloques Completos Aleatorizados (DBCA) con 4 repeticiones, con un total de 32 unidades experimentales. Las distribuciones de las áreas en estudio y las dimensiones del campo experimental se presentan en la figura 113.

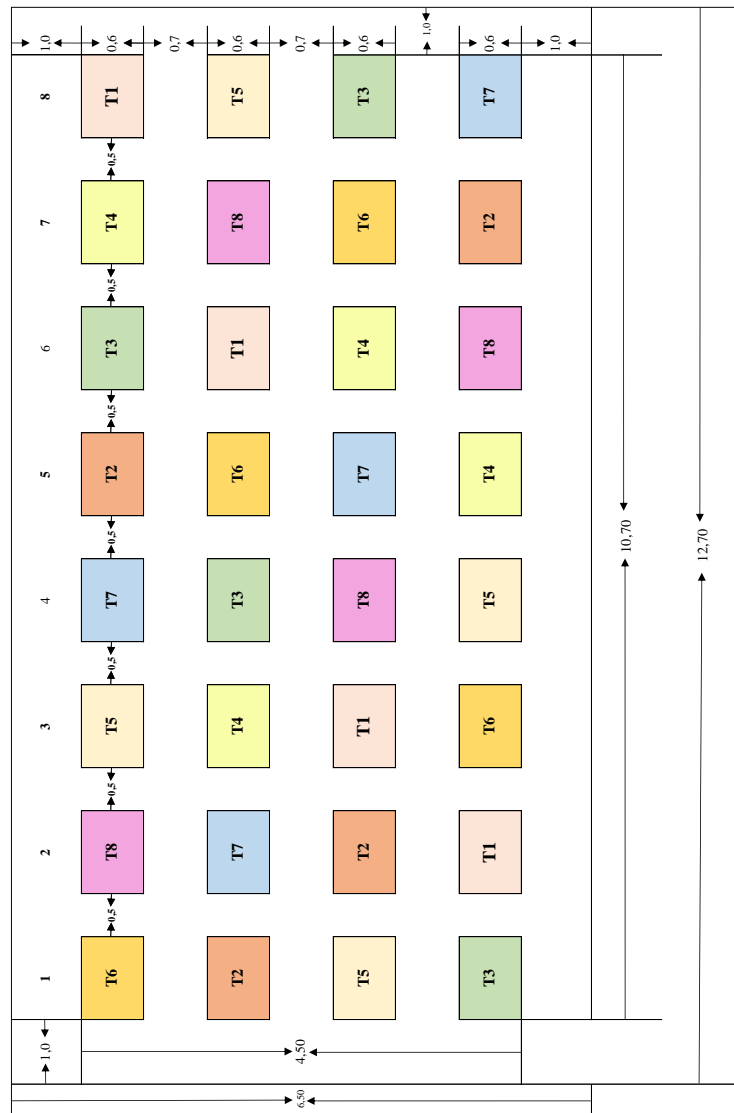


Figura 113: Distribución de las unidades experimentales y dimensiones del campo experimental

3.12.1 Preparación del suelo

La preparación del suelo se realizó con la debida anticipación al trasplante, en primer lugar se delimitó el área de cultivo de acuerdo a las medidas especificadas en la figura 113, luego se utilizó maquinaria agrícola con arado de discos (figura 114) con la finalidad de voltear adecuadamente las capas de suelo; cinco días después de esta actividad se utilizó la rastra (figura 115) con el propósito de dejar el suelo completamente suelto para el enraizamiento y posterior desarrollo de las plantas.



Figura 114: Preparación de suelo con arado de discos



Figura 115: Mullido de suelo con rastra

3.12.2 Análisis de suelo

Previo a la inoculación de consorcios microbianos, se realizó análisis del suelo para conocer sus propiedades físicas, químicas y biológicas. En puntos distribuidos en forma de zigzag se realizaron excavaciones con una profundidad aproximada de 20 cm (figura 116), donde se recolectaron varias submuestras de suelo que fueron depositadas en un envase plástico en el que se mezclaron y homogenizaron. Finalmente se obtuvo tres muestras de 1 kg cada una. La muestra número uno se envió a los Laboratorios de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes para la caracterización física y química (anexo 5); la muestra número dos se envió a la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología para el análisis fitopatológico de hongos y nematodos (anexo 6 y 7); la muestra número tres se envió al Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” para verificar la carga microbiana de mohos, levaduras, *Pseudomonas* sp., actinomicetos, *Bacillus* sp., y *Lactobacillus* sp., (anexo 8). Todos estos laboratorios ubicados en la Universidad Nacional Agraria La Molina.



Figura 116: Excavación del suelo para recolección de muestra

3.12.3 Elaboración de parcelas

Para elaborar las parcelas en primer lugar se delimitó el campo experimental, con las siguientes especificaciones:

- Ancho de la parcela 0,60 m
- Largo de la parcela 0,90 m
- Separación entre bloques 0,70 m
- Separación entre parcelas 0,50 m
- Caminos laterales 1 m
- Camino frontal y posterior 1 m

Una vez especificadas las dimensiones se elaboró los caminos centrales, para lo cual el excedente de tierra se colocó en el área destinado para las parcelas con la finalidad de dar forma a las unidades experimentales (figura 117).



Figura 117: Formas de parcelas para cultivo de fresa (*Fragaria* sp.).

3.12.4 Instalación del sistema de riego

Luego de elaboradas las parcelas se instaló dos laterales de riego en cada una, separados 0,30 m (figura 118), con una distancia entre goteros de 0,30 metros y una capacidad de irrigación de 2,5 litros por hora por planta. La presión del sistema de riego se basó en una bomba de 0,5 HP, además se instaló un Venturi con la finalidad de aplicar soluciones nutritivas mediante el agua de riego. El sistema contó con un filtro de anillos para evitar el paso de impurezas que pudieran obstruir los goteros.



Figura 118: Dos laterales de riego por cada parcela

3.12.5 Colocación de acolchado

Después de instalado el sistema de riego, se instaló el acolchado, para lo cual utilizamos láminas de polietileno color blanco en el anverso y color negro en el reverso. Para esta actividad primero se excavó en uno de los extremos de la parcela donde se colocó el plástico y se cubrió con tierra, a continuación, se realizó la misma actividad en el otro extremo, de esta manera se fijó el plástico sobre el suelo, luego cubrimos con tierra el plástico de los lados de la parcela; finalmente quedó fijo el acolchado. Esta misma actividad se realizó en las cuatro parcelas.

En el sitio destinado para las plantas de fresa, es decir cada 0,30 m con un dispositivo metálico se realizó orificios, la perforación coincidió con la ubicación de cada gotero que suministrará el riego a la planta. Por último, se identificó las parcelas de acuerdo a los tratamientos establecidos (figura 119).



Figura 119: Parcelas con acolchado blanco e identificación de tratamientos

3.12.6 Variedad cultivada

La variedad de fresa (*Fragaria* sp.) utilizada para esta investigación fue la “San Andreas” que es una variedad de día neutro moderado de excelente calidad de fruta, excelente sabor, con poca necesidad de frío en vivero, resistente a enfermedades. Es precoz, con curva de producción sin picos y estable durante todo el ciclo, mantiene tamaño de la fruta hasta final de la cosecha, muy buena producción, ofrece fruta de calidad a lo largo de todo el ciclo. Se adapta muy bien a distintos tipos de plantación, las fechas de plantación y producción de fruta es durante todo el año en distintos países del mundo, produce pocos estolones cuando está en producción de fruta.

3.12.7 Inoculación de microorganismos benéficos

Con la finalidad de colonizar el suelo con microorganismos benéficos de los consorcios microbianos beneficiosos provenientes de tres pisos altitudinales de Azuay - Ecuador, la inoculación se comenzó a realizar una vez por semana desde 21 días antes del trasplante, para este propósito se utilizó una regadera plástica y se aplicó 150 ml de solución preparada en cada sitio (figura 120).

La preparación del medio líquido se realizó de la siguiente manera:

- Se midió 8 litros de agua
- Se midió 200 ml de microorganismos benéficos (2,5%) o 400 ml de microorganismos benéficos (5%)
- Se adicionó el volumen de microorganismos benéficos a los 8 litros de agua
- Se homogenizó la mezcla
- Se aplicó la solución líquida

Para preparar la solución comercial de Microorganismos Eficientes, se procedió de la siguiente manera:

- Se midió 8 litros de agua
- Se midió 400 ml (5%) de solución con microorganismos (de acuerdo a las recomendaciones del producto)
- Se adicionó los 400 ml de solución a los 8 litros de agua
- Se homogenizó la mezcla
- Se aplicó la solución líquida

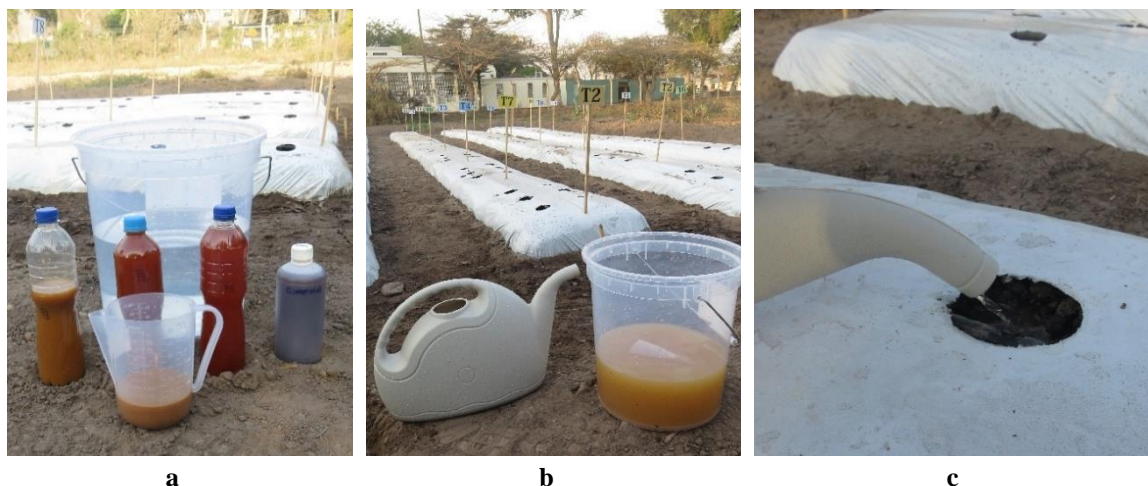


Figura 120: Secuencia de preparación de microorganismos benéficos a) Determinación de volúmenes b) Solución de agua con MOBs c) Aplicación de la solución en cada sitio

3.12.8 Trasplante

Con la finalidad de inocular microorganismos en las raíces de las plantas de fresa (*Fragaria* sp.) previo al trasplante, de forma secuencial todas las plantas excepto el tratamiento blanco fueron sumergidas durante cinco minutos en una solución con microorganismos benéficos (figura 121) ya sea al 2,5% o 5% dependiendo del tratamiento con microorganismos del primer piso altitudinal, segundo piso altitudinal, tercer piso altitudinal o EM1 comercial. Luego se procedió a trasplantar una planta por sitio en los lugares previamente establecidos y debidamente identificados, se presionó ligeramente junto al cuello de la planta para que quede bien fija (figura 122). A continuación, con una regadera se aplicó agua con microorganismos o sin microorganismos dependiendo del tratamiento, al concluir la plantación se proporcionó humedad uniforme a todas las plantas.



Figura 121: Plantas sumergidas en solución de microorganismos benéficos y solución de microorganismos benéficos del piso altitudinal uno, al 2,5%

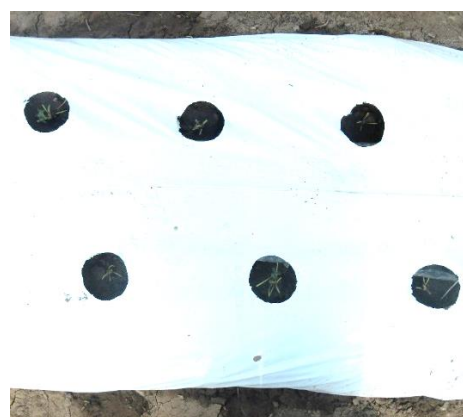


Figura 122: Plantas de fresa correctamente trasplantadas

3.12.9 Riego

Para conocer con certeza el contenido de humedad en el suelo, se utilizó un medidor de humedad que indicaba que si el suelo se encontraba seco, húmedo o mojado como se aprecia en la figura 123. Cada planta contó con un gotero (figura 124), la duración y frecuencia de riego dependió del estado fenológico de las plantas, así como también de las condiciones climáticas imperantes en el lugar.

La capacidad de riego de cada gotero fue 2,5 litros por hora, de tal manera que cada planta recibió 45,66 ml por minuto. Fue necesario fraccionar los riegos con la finalidad de evitar el lavado de nutrientes y riesgos fitosanitarios.



Figura 123: Instrumento utilizado para determinar la humedad del suelo



Figura 124: Riego localizado en cada planta

Las características físicas y químicas del agua aplicada en el riego fueron determinadas en el Laboratorio de Agua, Suelo, Medio Ambiente y Fertirriego de la UNALM (Universidad Nacional Agraria la Molina) (anexo 9) mientras que el análisis microbiológico del agua se realizó en el laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” (anexo 10).

3.12.10 Fertilización

Con la finalidad de incorporar elementos nutritivos al suelo, a inicio del cultivo todos los tratamientos recibieron 1kg de vermicompost por cada metro cuadrado de superficie (figura 125). La caracterización del vermicompost se realizó en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes (anexo 11), de la Universidad Nacional Agraria La Molina.



Figura 125: Vermicompost incorporado al suelo antes del trasplante

Luego los nutrientes se suministraron a través del agua de riego. Los fertilizantes utilizados fueron aplicados de acuerdo a cada fase fenológica del cultivo. Las formulas nutritivas A y B fueron específicas para cultivo de fresas, se adquirieron en el centro de hidroponía de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.12.11 Desarrollo del cultivo

A pocos días de realizado el trasplante comenzaron a brotar las primeras hojas de las plantas, a la par también se presentaron las primeras flores (figura 126) que fueron eliminadas con la finalidad de propender al vigor y desarrollo vegetativo. No se notó emisión significativa de estolones (figura 127) y aquellos que aparecieron fueron oportunamente eliminados en todos los tratamientos.



Figura 126: Brotación de hojas y flores 15 días después del trasplante

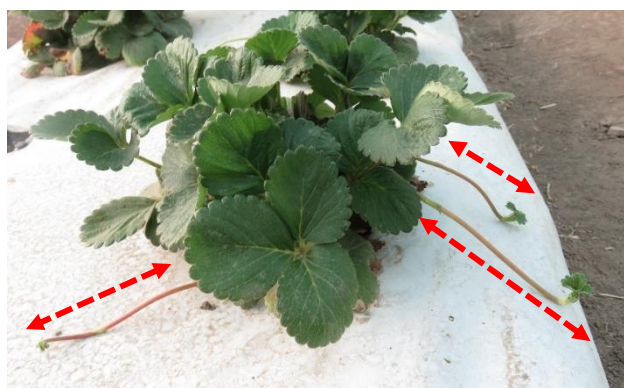


Figura 127: Estolones emitidos por las plantas de fresa

Durante los primeros días de establecido el cultivo se comenzó a notar diferencias en el desarrollo de las plantas de los distintos tratamientos (figura 128), aunque los contrastes no fueron tan significativas debido al estado fenológico inicial del cultivo.

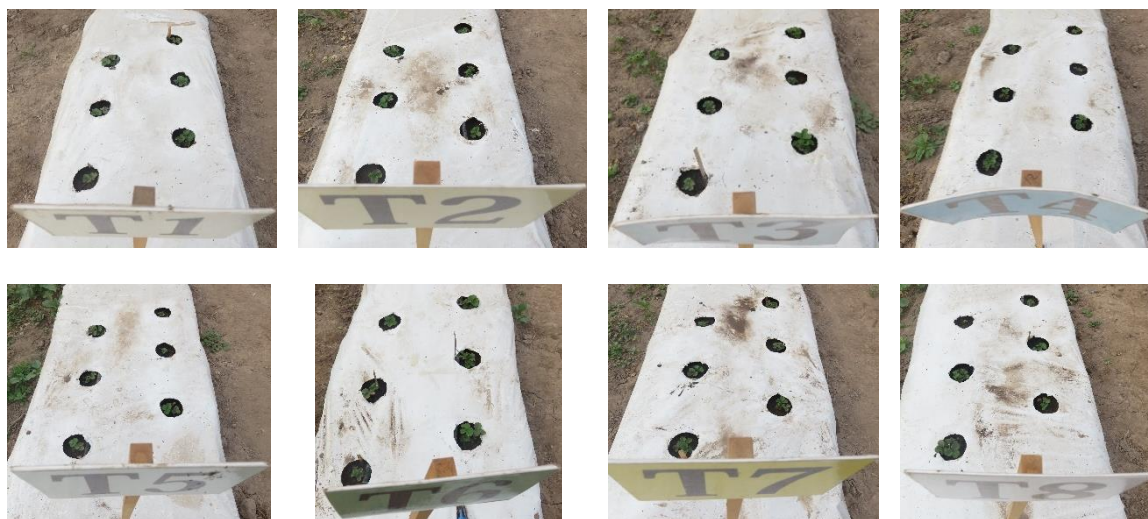


Figura 128: Estado de desarrollo de las plantas de fresa 20 días después de la plantación

En las siguientes fases de desarrollo se observaron claras diferencias en el crecimiento longitudinal y diametral de las plantas de cada uno de los tratamientos que recibieron inoculación de microorganismos benéficos (figura 129), el tratamiento utilizado como testigo siempre presentó menor crecimiento.



Figura 129: Estado de desarrollo de las plantas de fresa 90 días después de la plantación

Después del primer trimestre de cultivo se constató diferencias evidentes en el desarrollo de las plantas (figura 130) tanto en altura, diámetro y número de hojas por planta, el tratamiento que no recibió aplicación de microorganismos benéficos fue el que presentó menor desarrollo.



Figura 130: Estado de desarrollo de las plantas de fresa 100 días después de la plantación

Después de 120 del trasplante, las diferencias tanto en altura, diámetro, número de hojas y condiciones fitosanitarias se acentuó entre las plantas de los diferentes tratamientos, se verificó la incidencia positiva de los microorganismos benéficos provenientes de los tres pisos altitudinales, así como los microorganismos comerciales, como se presenta en la figura 131 y figura 132.



Figura 131: Estado de desarrollo de las plantas de fresa 120 días después de la plantación.



Figura 132: Estado de desarrollo del tratamiento T5, 120 días después de la plantación.

3.12.12 Controles culturales

Las principales labores culturales se realizaron al inicio del cultivo, consistió básicamente en la eliminación de malezas en las zonas inmediatas a las parcelas, así como también en algunos lugares donde se plantó las fresas, conforme se desarrolló el cultivo las malezas no

volvieron a brotar como consecuencia de la falta de humedad en los caminos adyacentes y a la función que cumplió el acolchado sobre las parcelas. Otra actividad que se realizó fue la eliminación de estolones que no emitieron en gran número las plantas, la mayor cantidad se presentó en los primeros 60 días después del trasplante. Conforme se desarrolló el cultivo fue evidente la madurez fisiológica de las hojas razón por la que se eliminó las más deterioradas. Con la finalidad de contribuir al estado nutricional de las plantas se aplicó Novafol (abono foliar) 5 ml por cada litro de agua cada 15 días.

3.12.13 Plagas y enfermedades

Dentro de las plagas más relevantes se destacó la presencia de minador de las hojas de la fresa (*Liriomyza* sp.) debido a la presencia de malezas en las zonas adyacentes al cultivo, para el control, eliminamos las malezas y por consiguiente también se eliminó la plaga. Además, se detectó la presencia de ácaros (arañas) (*Tetranychus* sp.), el ataque se manifestó por la presencia de telaraña entre las hojas (figura 133), el factor principal que favoreció la presencia de esta plaga fueron las altas temperaturas, para su control se utilizó NewMectin 1.8 EC cada 10 días por dos oportunidades, el producto aplicado es un insecticida y acaricida bionatural ambientalmente amigable extraído de la fermentación de *Streptomyces avermetilis*, una bacteria gram-positiva del suelo.



Figura 133: Planta de fresa afectada por ácaros (*Tetranychus* sp.)

Con referencia a las enfermedades, se identificó daño en las plantas de algunos tratamientos; de acuerdo al análisis de tejidos de la raíz (anexo 12,13, 14 y 15) causado por *Macrophomina* sp. (figura 134) y *Fusarium solani* (figura 135). Debido a la toxicidad de fungicidas requeridos para combatir estas enfermedades, no se realizó ninguna aplicación de pesticidas sistémicos, con la finalidad de evitar la incidencia sobre la vida de los microorganismos inoculados al suelo.



Figura 134: Planta de fresa en el tratamiento T4 afectada por *Macrophomina* sp.



Figura 135: Planta de fresa en el tratamiento T4 afectada por *Fusarium solani*

3.12.14 Altura de plantas

Se verificó la altura de las plantas a 60, 90 y 120 días después del trasplante, se utilizó una cinta de medición, se constató la distancia desde la base de la planta hasta la parte superior de la hoja más alta figura 136.



Figura 136: Registro de altura de plantas

3.12.15 Diámetro de plantas

Con la finalidad de conocer la incidencia de los microorganismos benéficos en el crecimiento diametral de las plantas, se evaluó el crecimiento a 60, 90 y 120 después del trasplante, para lo cual se utilizó una cinta de medición, se registró la distancia entre los extremos más alejados de las hojas, como se presenta en la figura 137.



Figura 137: Registro del diámetro de plantas

3.12.16 Número de hojas por planta

Las hojas de las plantas de fresa (figura 138) cumplen una función importante en el proceso fotosintético de las especies vegetales, razón por la que es importante conocer el número de estas, ya que allí se da lugar la síntesis de la sabia bruta en sabia elaborada en presencia de la luz solar. Se evaluó este parámetro a los 60, 90 y 120 días después de establecido el cultivo. En cada planta se contó minuciosamente el número de hojas formadas completamente.



Figura 138: Estado de desarrollo de las hojas de plantas de fresa del tratamiento T1, 90 días después del trasplante

3.12.17 Longitud de raíces

Las raíces cumplen una función fundamental para la vida de las plantas, ya que absorben el agua y nutrientes desde el suelo, los mismos que son transportarlos a través del xilema hasta las hojas donde la sabia bruta es transformada en sabia elaborada en presencia de la luz solar, razón por la que es importante conocer la longitud y volumen de raíces que conllevan a un mejor aprovechamiento de los elementos nutritivos del suelo. Para determinar la masa radicular se utilizó una pala y se extrajo la planta completa con todo el suelo de la zona

radicular, evitando romper las raíces (figura 139), luego esta planta se colocó en un envase con agua donde se removió la tierra y las raíces quedaron completamente limpias.

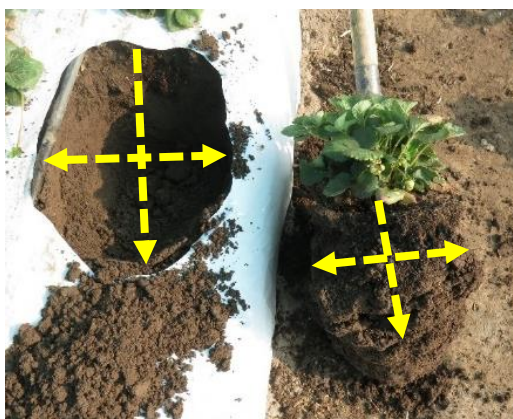


Figura 139: Proceso de extracción de raíces de plantas de fresa (*Fragaria* sp.)

3.12.18 Características físicas, químicas y biológicas del suelo 120 días después del trasplante

Con la finalidad de comparar entre las características físicas, químicas y biológicas del suelo 120 días después del trasplante y las características iniciales, se recolectaron 3 muestras de 1 kg de suelo cada una de la zona radicular (figura 140) de todos los tratamientos. Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas (figura 141) y posteriormente se envió una muestra al Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizantes para la caracterización del suelo (anexo 16), otra muestra se envió a la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología para el análisis fitopatológico y nematológico (anexo 17 y anexo 18), la tercera muestra se envió al Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso” para determinar la carga microbiana de mohos, *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., actinomicetos y *Pseudomonas* sp., (anexo 19).



Figura 140: Zona radicular donde se recolectó las muestras del suelo



Figura 141: Muestras de suelos de los ocho tratamientos

3.13 ANÁLISIS DE DATOS

Se utilizó la técnica de análisis de varianza (ANOVA) para comparar las medias entre tratamientos, se revisó que se cumpla la linealidad de los residuales y la homogeneidad de varianzas, la información se procesó con el software estadístico InfoStat.

Se realizó el análisis de la varianza para contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado; si se presenta diferencia significativa entre los tratamientos se realiza el análisis de la diferencia mínima significativa LSD por sus siglas en inglés (Least significant difference) de Fisher r ($P \leq 0.05$) que es un test de comparaciones múltiples para determinar los niveles de significancia entre tratamientos (figura 142).

	Piso	Medias	Error Estándar	Significancia
Tratamientos	P3	$8,50 \times 10^4$	$1,22 \times 10^4$	A
	P2	$6,11 \times 10^4$	$1,87 \times 10^4$	A
	P1	$8,44 \times 10^3$	$1,17 \times 10^3$	B

Dos niveles de significancia

Figura 142: Ilustración de análisis estadístico y determinación de niveles de significancia

Se obtuvo una gráfica en la que se aprecia la media y el error estándar de cada tratamiento, si hay solapamiento entre las medias de los diferentes tratamientos no existe diferencia significativa, caso contrario si (figura 143).

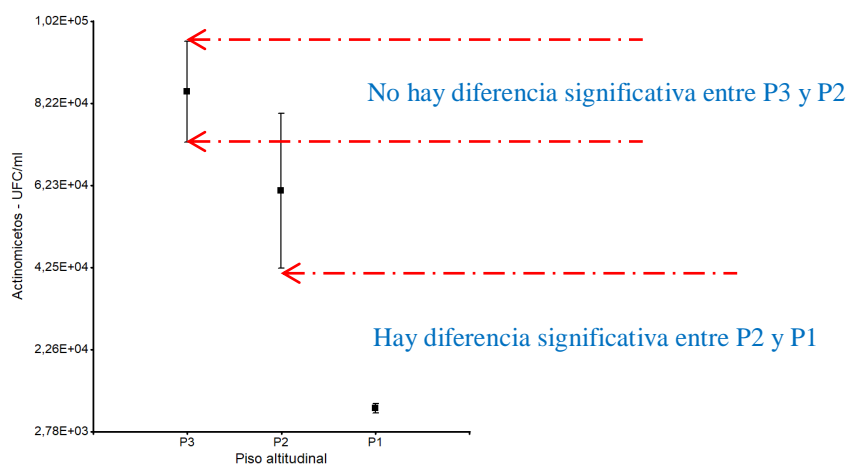


Figura 143: Ilustración de solapamiento entre medias de los tratamientos

Se utilizaron modelos lineales generales y mixtos para considerar una posible heterogeneidad de varianza durante el período analizado, luego se seleccionó el modelo más apropiado utilizando los valores del criterio de Akaike (AIC), Schwarz (BIC) y la prueba de máxima verosimilitud (LRT). Para todas las variables medidas se analizó la normalidad de

los errores usando la prueba de Shapiro-Francia. Para analizar la homogeneidad de varianzas, se usó un gráfico de dispersión de residuos versus valores predichos, se debió observar una nube de puntos sin patrón alguno.

Cuando no se cumplió la distribución normal de errores y la homogeneidad de varianzas, se realizó la modelación de datos, razón por la que el modelo lineal mixto se utilizó para las siguientes variables en estudio:

- Unidades formadoras de colonias de levaduras (UFC.ml⁻¹)
- Unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp. (UFC.ml⁻¹)
- Unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp. (UFC.ml⁻¹)
- Unidades formadoras de colonias de actinomicetos (UFC.ml⁻¹)

Cuando se cumplió la distribución normal de errores y homogeneidad de varianzas, no fue necesario la modelación de datos por lo que se realizó directamente el ANOVA (Analysis of variance) para las siguientes variables en estudio:

- Altura de plantas 60 días después del trasplanta
- Altura de plantas 90 días después del trasplanta
- Altura de plantas 120 días después del trasplanta
- Diámetro de plantas 60 días después del trasplante
- Diámetro de plantas 90 días después del trasplante
- Diámetro de plantas 120 días después del trasplante
- Número de hojas por planta 90 días después del trasplante
- Número de hojas por planta 120 días después del trasplante
- Longitud de raíces 120 días después del trasplante

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EVALUACIÓN DEL pH EN EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS

4.1.1 Determinación del pH en el medio de cultivo madre

a. Evaluación del pH en el medio de cultivo madre de las muestras provenientes del piso altitudinal uno

En el primer día de la experimentación, el valor de pH más alto que se registró corresponde a la muestra M3P1 con un valor de 6,66; mientras que en el día ocho el valor más bajo que se constató fue 4,37 el cual incumbe a la muestra M2P1. Durante ocho días, en todas las muestras se evidenció descenso en los valores de pH, la disminución fue gradual y casi uniforme (cuadro 10).

Cuadro 10: Valores de pH en el medio de cultivo madre de las muestras del piso altitudinal uno

X Tratamientos	Día							
	1	2	3	4	5	6	7	8
M1P1	6,07	5,05	4,83	4,67	4,66	4,60	4,56	4,48
M2P1	6,09	4,95	4,81	4,63	4,56	4,50	4,46	4,37
M3P1	6,66	5,31	5,01	4,88	4,85	4,75	4,70	4,52

En la figura 144, se observa que en los medio de cultivos madre de las muestras M1P1, así como M2P1, los valores de pH descendieron más rápido que en la muestra M3P1, sin embargo, en el octavo día el pH alcanzó valores similares en todas las muestras.

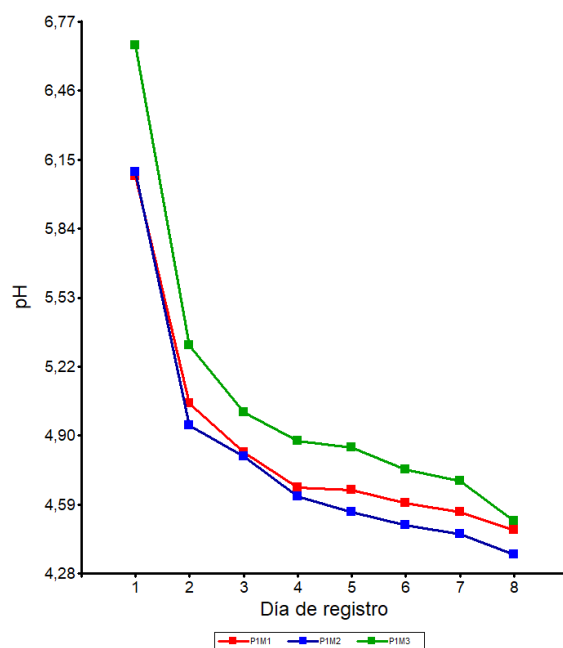


Figura 144: Variación de pH en los medios de cultivo madre de las muestras del piso altitudinal uno

b. Evaluación del pH en el medio de cultivo madre de las muestras provenientes del piso altitudinal dos

En el cultivo madre de micrororganismos benéficos de las muestras vegetales provenientes del piso altitudinal dos, en el cuadro 11 se constata que en el primer día de evaluación la muestra M3P2 presentó el más alto valor de pH con 6,66 mientras que en el día ocho el valor más bajo se registró en la muestra M3P2 con un valor de 4,45. En el último día de registro de pH, los cultivos madre de las muestras M2 P2, así como M4P2 alcanzaron el mismo valor 4,47.

Cuadro 11: Valores de pH en los medios de cultivo madre de las muestras del piso altitudinal dos

X Tratamientos	Día							
	1	2	3	4	5	6	7	8
M1P2	6,35	5,1	4,93	4,75	4,73	4,71	4,66	4,48
M2P2	6,24	5,08	4,88	4,79	4,76	4,70	4,63	4,47
M3P2	6,66	5,01	4,85	4,45	4,46	4,45	4,45	4,45
M4P2	6,36	5,29	5,16	4,68	4,56	4,51	4,48	4,47

En la figura 145, se verifica que en las muestras del piso altitudinal dos, los valores iniciales de pH fueron superiores a 6 pero inferiores a 7, con el transcurso de los días se produjo un descenso casi paralelo en todas las muestras, en las cuales al final de la medición se registró valores cercanos a 4,5.

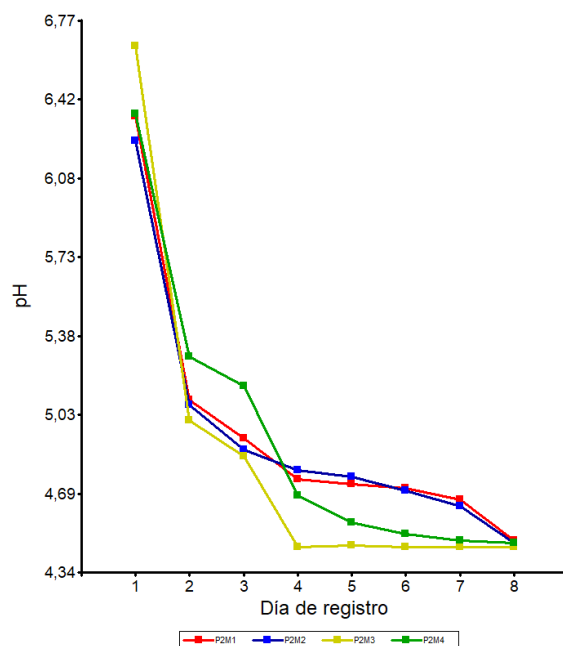


Figura 145: Variación de pH en los medios de cultivo madre de las muestras del piso altitudinal dos

c. Evaluación del pH en el medio de cultivo madre de las muestras provenientes del piso altitudinal tres

En el cuadro 12, con respecto a los valores de pH, se observa que en los cultivos madre de las muestras del piso altitudinal tres, el primer día de registro de información, M5P3 presentó el valor más alto con 6,46 además todas las muestras mostraron valores cercanos a neutro; en el día ocho el valor 4,31 fue el más bajo que se registró, corresponde a la muestra M1P3.

Cuadro 12: Valores de pH en los medios de cultivo madre de la muestras del piso altitudinal tres

X Tratamientos	Día							
	1	2	3	4	5	6	7	8
M1P3	6,27	4,9	4,86	4,74	4,60	4,48	4,43	4,43
M2P3	6,24	5,04	4,83	4,58	4,45	4,37	4,31	4,31
M3P3	6,04	4,90	4,78	4,77	4,66	4,59	4,54	4,54
M4P3	6,35	5,04	4,87	4,78	4,76	4,63	4,54	4,53
M5P3	6,46	4,96	4,83	4,71	4,69	4,62	4,56	4,56

A partir del primer día de análisis, los valores de pH comenzaron a descender periódicamente (figura 146), todas las muestras presentaron un comportamiento similar; en el día ocho, en todas las muestras del piso altitudinal tres, se registró valores inferiores a 5.

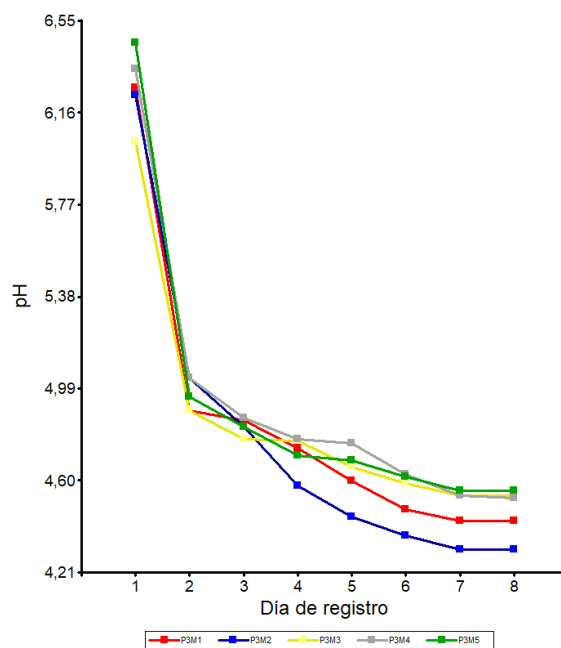


Figura 146: Variación de pH en los medios de cultivo madre de las muestras del piso altitudinal tres

4.1.2 Registro de pH en la producción de microorganismos benéficos de los diferentes pisos altitudinales.

En los medios de cultivo de microorganismos benéficos provenientes de los diferentes pisos altitudinales, se registró el pH por un periodo de ocho días. Se evidenció un descenso en los valores, la diferencia entre tratamientos no fue significativa.

a. Registro de pH en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de las muestras provenientes del piso altitudinal uno

El primer día de estudio, el pH más alto se registró en el medio de cultivo de la muestra M1P1 con un valor de 5,34 así mismo el último día de medición en esta misma muestra se presentó el valor más bajo, es decir 3,72. La información recolectada se presenta en el cuadro 13. Inicialmente todos los valores de pH fueron superiores a 5 mientras que en el último día de estudio en todos los medios de cultivo se registró valores inferiores a 4.

Cuadro 13: Valores de pH en los medios de cultivo de MOB's de las muestras del piso altitudinal uno

X Tratamientos	Día							
	1	2	3	4	5	6	7	8
M1P1	5,34	4,67	4,56	4,53	3,85	3,75	3,73	3,72
M2P1	5,31	4,61	4,54	4,54	3,86	3,76	3,75	3,74
M3P1	5,18	4,55	4,46	4,46	3,84	3,80	3,76	3,75

La variación de pH fue similar en todos los medios de cultivo (figura 147), a partir del primer día los valores descendieron de forma uniforme, en el octavo fueron inferiores a 4 y superiores a 3,5. En los primeros días, el descenso de pH fue más significativo mientras que en los tres últimos, presentaron tendencia a estabilizarse.

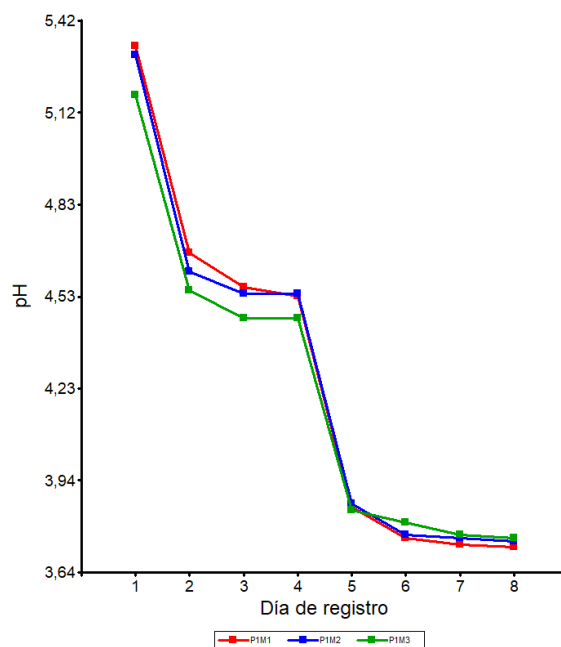


Figura 147: Variación de pH en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de las muestras del piso altitudinal uno

b. Registro de pH en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de las muestras provenientes del piso altitudinal dos

En el cuadro 14 se presentan los valores de pH registrados en los medios de cultivo de microorganismos benéficos del piso altitudinal dos, durante un periodo de ocho días. Inicialmente todos los valores presentaron valores cercanos a 5, en la muestra M4P2 se constató el valor más alto siendo 5,21; en el octavo día en la muestra M2P2 se registro 3,79 que fue el más bajo registrado. En las muestras M1P2, así como M4P2, se confirmó el mismo valor de pH correspondiente a 3,80 en el último día de estudio.

Cuadro 14: Valores de pH en los medios de cultivo de MOBs de las muestras del piso altitudinal dos

X Tratamientos	Día							
	1	2	3	4	5	6	7	8
M1P2	5,12	4,58	4,5	4,5	3,86	3,84	3,82	3,80
M2P2	5,13	4,53	4,48	4,48	3,85	3,82	3,79	3,79
M3P2	5,13	4,56	4,5	4,5	3,87	3,86	3,83	3,82
M4P2	5,21	4,54	4,49	4,49	3,89	3,86	3,82	3,80

El comportamiento de pH en los medios de cultivo de microorganismos benéficos correspondientes al piso altitudinal dos, se presentan en la figura 148.

Se observa que a partir del primer día todas las muestras presentaron tendencia a un descenso significativo y casi uniforme, la variación de pH fue similar para todas las muestras, en el día ocho los valores fueron cercanos.

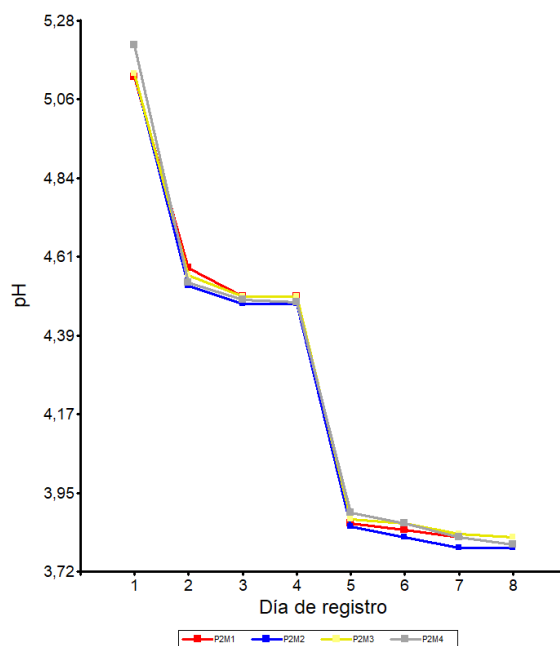


Figura 148: Variación de pH en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de las muestras del piso altitudinal dos

c. Registro de pH en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de las muestras provenientes del piso altitudinal tres.

Los valores de pH registrados en los medios de cultivo de microorganismos benéficos del piso altitudinal tres, se presentan en el cuadro 15. En el día uno el registro 5,25 fue el valor más alto y se constató en la muestra M3P3, todos los valores fueron superiores a 5 e inferiores a 5,25.

En el octavo día el valor más bajo se registró en la muestra M5P3 correspondió a 3,76; en todos los tratamientos los valores superaron 3,76 hasta un máximo de 3,81. El descenso fue similar en todas las muestras independientemente de la especie vegetal.

Cuadro 15: Valores de pH en los medios de cultivo de MOBs de las muestras del piso altitudinal tres

X Tratamientos	Día							
	1	2	3	4	5	6	7	8
M1P3	5,12	4,54	4,48	4,47	3,88	3,84	3,80	3,79
M2P3	5,16	4,52	4,47	4,47	3,85	3,83	3,80	3,78
M3P3	5,25	4,61	4,54	4,53	3,89	3,86	3,82	3,78
M4P3	5,18	4,59	4,55	4,55	3,96	3,9	3,87	3,81
M5P3	5,21	4,58	4,54	4,53	3,92	3,89	3,89	3,76

En la figura 149 se observa que en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de las muestras vegetales del piso altitudinal tres, los valores de pH en todas las muestras presentan comportamiento similar en cuanto a su descenso. En los primeros días de estudio los resultados variaron en forma más notoria hasta prácticamente estabilizarse en la fase final.

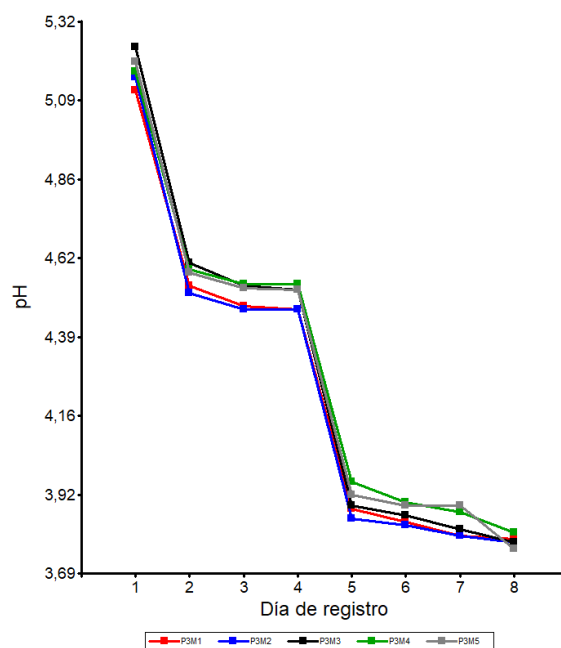


Figura 149: Variación de pH en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de las muestras del piso altitudinal tres

El pH está relacionado con la concentración de iones hidrógeno de una solución, se calcula como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno en una solución. Del análisis de los resultados obtenidos, se demuestra que el pH no depende de la especie vegetal, sino más bien de la flora microbiana presente en los diferentes consorcios. En los medios de cultivo de microorganismos benéficos, provenientes de muestras vegetales de tres pisos altitudinales, los valores iniciales de pH fueron similares entre ellos y el descenso paulatino fue prácticamente uniforme durante el

tiempo de análisis, hasta estabilizarse en valores ligeramente superiores a 3,50 que es semejante al pH de EM1 activado que de acuerdo a la ficha técnica del producto entre el cuarto a séptimo día la solución presenta un pH debajo de 4,0.

Los valores finales de pH permiten la estabilidad y supervivencia de los microorganismos benéficos; sin embargo, se debe tener presente que <<cada organismo tiene un rango de pH dentro del cual es posible el crecimiento y normalmente posee un pH óptimo bien definido>> (Madigan *et al.*, 2004), por lo tanto, es necesario tener en cuenta que mientras los microorganismos crecen, el mantenimiento de un determinado valor de pH es importante (Schlegel, 1997).

En la solución madre el pH es superior al del medio de cultivo de microorganismos benéficos, debido a que al momento que comienza el proceso existe una carga microbiana baja en el producto, pero con el transcurso de los días la presencia microbiana se incrementa, lo cual conlleva a cambios en el valor de pH que es similar pero no es igual entre todas las muestras vegetales, debido a la presencia de diferentes microorganismos en cada consorcio acorde a las propiedades particulares de cada planta, ya que los contenidos esenciales son únicos y selectivos con respecto a la flora microbiana.

Cuando se realiza la activación de la solución madre, potenciamos el desarrollo microbiano, la población de microorganismos se incrementa, por lo tanto, el medio sufre descensos en el valor de pH precisamente por la actividad de los grupos microbianos, los cuales no se encuentran en la misma concentración en todos los medios líquidos, por tal razón tampoco son iguales los parámetros medidos.

El descenso en el valor de pH puede ser el resultado de la liberación de ácidos orgánicos de cadena corta por ciertas bacterias; el ácido láctico es producido por las bacterias lácticas como consecuencia de su metabolismo y reduce el pH a valores inferiores a los tolerables por otros microorganismos. Prescott *et al.* (2002) refiere que <<los microorganismos cambian con frecuencia el pH de su propio hábitat, al producir productos residuales metabólicos ácidos o básicos>>.

Los resultados obtenidos sugieren que en las plantas del primer piso vegetal que son las que presentan el más bajo valor de pH, estarían presentes bacterias lácticas en concentraciones superiores que en las otras muestras vegetales.

Es importante tener presente que el descenso en el pH del medio les brinda ventajas a ciertos microorganismos frente a sus competidores. Pocos microorganismos crecen a pH extremos inferiores a 2 o mayores de 10 y los microorganismos que mejor soportan las condiciones de acidez son los hongos, pero muy pocos tienen éxito a pH 2, por lo general las bacterias son neutrófilas; Carr *et al.* (2002) indica que algunas bacterias ácido lácticas pueden crecer en valores de pH ácidos como 3, pero mayoritariamente las bacterias crecen a pH entre 4 y 4,5 lo que les permite sobrevivir de manera natural en medios en los que otras bacterias no tolerarían la actividad producida por los ácidos orgánicos; Palomino (1995) considera que *<<un medio ligeramente neutro es el adecuado para la gran mayoría de los microorganismos>>*.

Los valores finales de pH constatados en la producción de microorganismos benéficos provenientes de especies vegetales de tres pisos altitudinales, son los indicados para el desarrollo de muchos consorcios microbianos con propiedades benéficas, no obstante, son escasos los estudios afines, que ratifiquen o contrasten los valores registrados en estas especies vegetales.

4.2 UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE MICROORGANISMOS BENÉFICO (UFC.ml⁻¹) POR PISO ALTITUDINAL Y POR ESPECIE VEGETAL

4.2.1 Unidades formadoras de colonias de levaduras (UFC.ml⁻¹)

a. Unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos del piso altitudinal uno

La respuesta de las unidades formadoras de colonias de levaduras por mililitro de solución de las diferentes especies vegetales del piso altitudinal uno, se presentan en el cuadro 16. Cada planta presentó diferente potencial para las UFC en estudio, en todas las repeticiones se observó respuesta positiva.

Cuadro 16: Respuesta de UFC.ml⁻¹ para levaduras en el piso altitudinal uno

Piso	Planta	Repetición	Respuesta (UFC.ml ⁻¹)
P1	Café	R1	1,10 X 10 ⁵
P1	Café	R2	1,13 X 10 ⁵
P1	Café	R3	1,12 X 10 ⁵
P1	Plátano	R1	3,40 X 10 ⁵
P1	Plátano	R2	2,90 X 10 ⁵
P1	Plátano	R3	3,10 X 10 ⁵
P1	Girasol	R1	3,20 X 10 ⁵
P1	Girasol	R2	2,50 X 10 ⁵
P1	Girasol	R3	2,80 X 10 ⁵

En el piso altitudinal uno, de acuerdo a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de levaduras (cuadro 17) se presenta dos niveles de significancia. No existe diferencias significativas entre las plantas de plátano (*Musa paradisiaca* L.) que presentó la media más alta con 3,13 X 10⁵ UFC.ml⁻¹ y girasol (*Tithonia diversifolia*) con la que comparten el mismo nivel, pero difieren de la planta de café (*Coffea arabica* L.) la presentó la media más baja con 1,12 X 10⁵ UFC.ml⁻¹ de cultivo.

Cuadro 17: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos del piso altitudinal uno

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia
Plátano	3,13 X 10 ⁵	1,45 X 10 ⁴	A
Girasol	2,83 X 10 ⁵	2,03 X 10 ⁴	A
Café	1,12 X 10 ⁵	8,82 X 10 ²	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Con respecto a unidades formadoras de colonias de levadura por mililitro de solución, en la figura 150 se observa que la planta de plátano (*Musa paradisiaca* L.) presentó el mejor potencial destacándose entre las demás. La planta de café (*Coffea arabica* L.) fue la que evidenció el valor más bajo de UFC.ml⁻¹ muy por debajo de las otras dos especies vegetales.

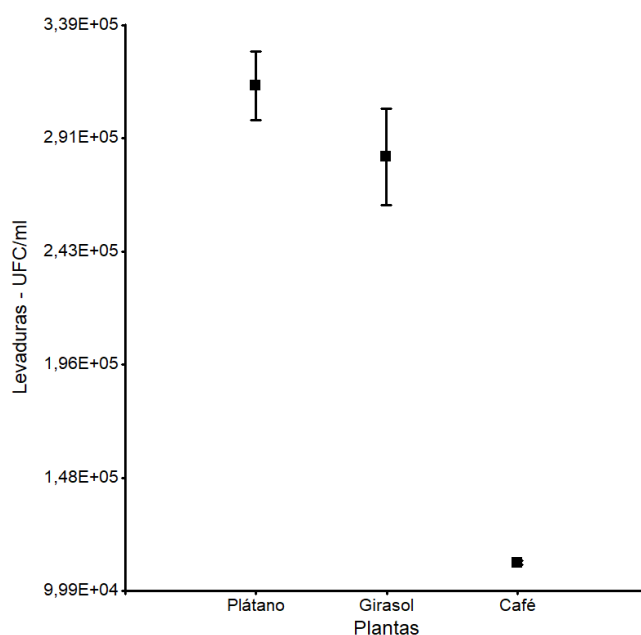


Figura 150: Comparación de UFC de levaduras en los medios de cultivo de microorganismos benéficos del piso altitudinal uno

b. Unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos

La respuesta de las unidades formadoras de colonias de levaduras por mililitro de solución de las diferentes especies vegetales del piso altitudinal dos se presentan en el cuadro 18. Todas las especies vegetales presentaron potencial para unidades formadoras de colonias de levaduras, pero la respuesta de UFC.ml⁻¹ fue diferente entre especies vegetales.

Cuadro 18: Respuesta de UFC.ml⁻¹ para levaduras en el piso altitudinal dos

Piso	Planta	Repetición	Respuesta (UFC.ml ⁻¹)
P2	Ruda	R1	5,30 X 10 ⁴
P2	Ruda	R2	5,70 X 10 ⁴
P2	Ruda	R3	5,50 X 10 ⁴
P2	Romero	R1	6,00 X 10 ⁵
P2	Romero	R2	5,20 X 10 ⁵
P2	Romero	R3	5,60 X 10 ⁵
P2	Cedrón	R1	1,85 X 10 ⁶
P2	Cedrón	R2	2,10 X 10 ⁶
P2	Cedrón	R3	1,95 X 10 ⁶
P2	Menta	R1	8,20 X 10 ⁵
P2	Menta	R2	7,10 X 10 ⁵
P2	Menta	R3	7,60 X 10 ⁵

En el piso altitudinal dos, de acuerdo a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de levaduras (cuadro 19), se presenta cuatro niveles de significancia. La media más alta corresponde a la planta de cedrón (*Aloysia triphylla*) con $1,97 \times 10^6$ UFC.ml⁻¹, la media más baja es $5,50 \times 10^4$ UFC.ml⁻¹ la cual pertenece a la planta de ruda (*Ruta graveolens* L.). Existe diferencia significativa entre todas las especies.

Cuadro 19: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia
Cedrón	$1,97 \times 10^6$	$7,26 \times 10^4$	A
Menta	$7,63 \times 10^5$	$3,18 \times 10^4$	B
Romero	$5,60 \times 10^5$	$2,31 \times 10^4$	C
Ruda	$5,50 \times 10^4$	$1,15 \times 10^3$	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la figura 151, con respecto a las unidades formadoras de colonias de levaduras por mililitro de solución en el piso altitudinal dos, se evidencia que la planta de cedrón (*Aloysia triphylla*) registró rangos de valores muy superiores con respecto a las otras especies vegetales. La planta de ruda (*Ruta graveolens* L.) fue la que menos se destacó, ya que presentó un potencial reducido para UFC.ml⁻¹ para levaduras.

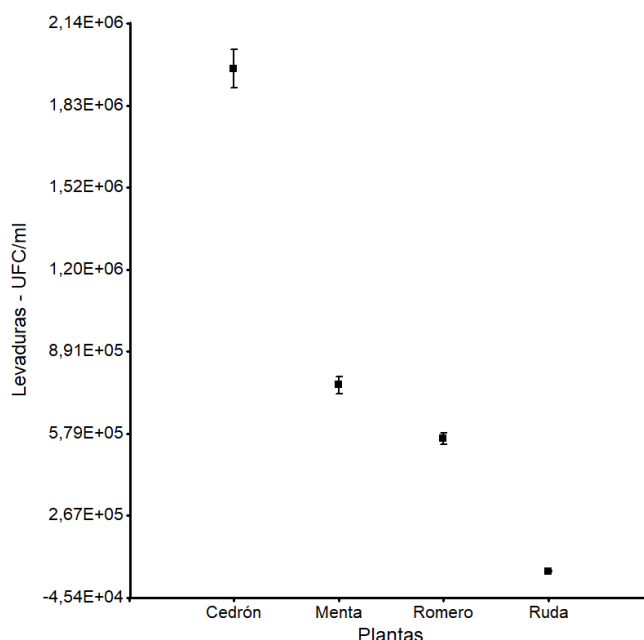


Figura 151: Comparación de UFC de levaduras en los medios de cultivo de microorganismos benéficos del piso altitudinal dos

c. Unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos del piso altitudinal tres

La respuesta de las unidades formadoras de colonias de levaduras por mililitro de solución de las diferentes especies vegetales del piso altitudinal tres se presentan en el cuadro 20. En cada una de las tres repeticiones de los medios de cultivo de las diferentes especies vegetales, se observó respuesta positiva para UFC de levaduras.

Cuadro 20: Respuesta de UFC.ml⁻¹ para levaduras en el piso altitudinal tres

Piso	Planta	Repetición	Respuesta (UFC.ml ⁻¹)
P3	Diente de león	R1	8,60 X 10 ⁵
P3	Diente de león	R2	1,01 X 10 ⁶
P3	Diente de león	R3	9,40 X 10 ⁵
P3	Manzanilla	R1	3,30 X 10 ⁵
P3	Manzanilla	R2	3,90 X 10 ⁵
P3	Manzanilla	R3	3,60 X 10 ⁵
P3	Geranio	R1	3,60 X 10 ⁵
P3	Geranio	R2	2,60 X 10 ⁵
P3	Geranio	R3	3,10 X 10 ⁵
P3	Altamisa	R1	5,80 X 10 ⁶
P3	Altamisa	R2	5,10 X 10 ⁶
P3	Altamisa	R3	5,40 X 10 ⁶
P3	Canayuyo	R1	9,50 X 10 ⁵
P3	Canayuyo	R2	1,34 X 10 ⁶
P3	Canayuyo	R3	1,14 X 10 ⁶

La prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de levaduras por mililitro de solución, en los cultivos microbianos del piso altitudinal tres, presenta tres niveles de significancia (cuadro 21). La planta de altamisa (*Artemisia vulgaris*) exhibe la media más alta con 5,43 X 10⁶ UFC.ml⁻¹, a continuación, se encuentran las plantas de canayuyo (*Sonchus oleraceus*) con una media de 1,14 X 10⁶ UFC.ml⁻¹ y diente de león (*Taraxacum officinale* Weber.) con 1,14 X 10⁶ UFC.ml⁻¹ que comparten el mismo rango de significancia. Las plantas de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) con 3,60 X 10⁵ UFC.ml⁻¹ así como geranio (*Pelargonium graveolens*) con una media 3,10 X 10⁵ UFC.ml⁻¹ se encuentran dentro del mismo rango de significancia C y son las medias más bajas.

Cuadro 21: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos del piso altitudinal tres

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia
Altamisa	$5,43 \times 10^6$	$2,02 \times 10^5$	A
Canayuyo	$1,14 \times 10^6$	$1,11 \times 10^5$	B
Diente de León	$9,37 \times 10^5$	$4,37 \times 10^4$	B
Manzanilla	$3,60 \times 10^5$	$1,92 \times 10^4$	C
Geranio	$3,10 \times 10^5$	$2,66 \times 10^4$	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la figura 152 se observa que la planta de altamisa (*Artemisia vulgaris*) es una especie vegetal que se distinguió ampliamente sobre las demás, por su alto potencial para unidades formadoras de colonias de levaduras. Se constata que la planta de geranio (*Pelargonium graveolens*) es la menos prometedora para UFC de levaduras por mililitro de solución.

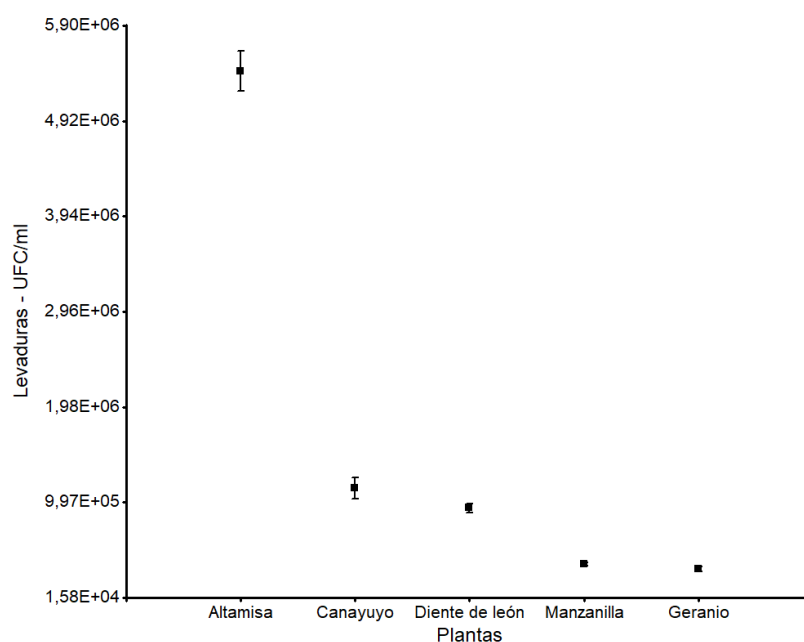


Figura 152: Comparación de UFC de levaduras en los medios de cultivo de microorganismos benéficos del piso altitudinal tres

d. Unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos de tres pisos altitudinales

Con respecto a la comparación de medias de las unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos de los tres pisos altitudinales, de acuerdo a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05), en el cuadro 22, se observa nueve rangos de significancia. Con una concentración de $5,43 \times 10^6$ UFC.ml⁻¹ la planta de altamisa

(*Artemisia vulgaris*) es la más relevante la cual se destaca sobre todas las demás especies, la planta de ruda (*Ruta graveolens* L.) con $5,50 \times 10^4$ UFC.ml⁻¹ es la de menos interés por su bajo potencial para UFC de levaduras.

Cuadro 22: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de levaduras en los consorcios microbianos de tres pisos altitudinales

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia						
Altamisa	$5,43 \times 10^6$	$2,03 \times 10^5$	A						
Cedrón	$1,97 \times 10^6$	$7,26 \times 10^4$		B					
Canayuyo	$1,14 \times 10^6$	$1,13 \times 10^5$			C				
Diente de León	$9,37 \times 10^5$	$4,33 \times 10^4$			C				
Menta	$7,63 \times 10^5$	$3,18 \times 10^4$				D			
Romero	$5,60 \times 10^5$	$2,31 \times 10^4$					E		
Manzanilla	$3,60 \times 10^5$	$1,73 \times 10^4$						F	
Plátano	$3,13 \times 10^5$	$1,45 \times 10^4$						F	G
Geranio	$3,10 \times 10^5$	$2,89 \times 10^4$						F	G
Girasol	$2,83 \times 10^5$	$2,03 \times 10^4$							G
Café	$1,12 \times 10^5$	$8,82 \times 10^2$							H
Ruda	$5,50 \times 10^4$	$1,15 \times 10^2$							I

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

El máximo potencial para unidades formadoras de colonias de levaduras entre todas las especies vegetales de los tres pisos altitudinales de acuerdo a la figura 153 corresponde a la planta altamisa (*Artemisia vulgaris*), que se destacó significativamente sobre todas las demás especies vegetales, lo que la convierte en una planta prometedora para la obtención de levaduras. Mientras que la planta de ruda (*Ruta graveolens* L.) presentó valores muy inferiores con respecto a las otras especies en estudio.

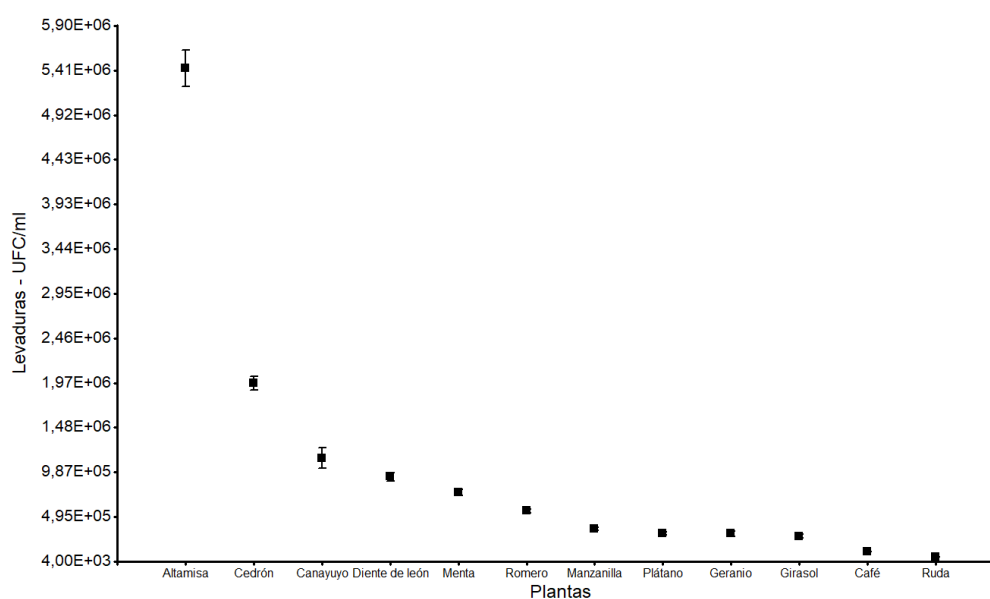


Figura 153: Comparación de UFC de levaduras en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de tres pisos altitudinales

De los resultados obtenidos se verifica que la planta de altamisa (*Artemisia vulgaris*), presentó un elevado potencial para unidades formadoras de colonias de levaduras, muy superior a todas las demás especies vegetales. La respuesta, sería consecuencia de los contenidos de la planta, particularmente los componentes químicos y aceites esenciales; los fitoquímicos son metabolitos secundarios no nutritivos de las plantas que tienen propiedades protectoras o preventivas de enfermedades (Sharma, 2017).

Por sus características particulares, los diferentes componentes de la planta de altamisa, son utilizados para elaborar biopreparados, que poseen particularidades repelentes ante ciertas plagas. Estudios extensos de los componentes químicos de *Artemisia* han conducido a la identificación de muchos compuestos, así como aceites esenciales (Abad *et al.*, 2012), los cuales generalmente tienen una gama diversa de actividades, porque poseen diferentes constituyentes activos que trabajan a través de varios modos de acción (Pandey y Singh, 2017), que precisamente serían responsables de la compatibilidad con el desarrollo de levaduras.

La composición química de la planta de altamisa, siempre despertó el interés de investigación. Se concluyó que todos los aceites y sustancias volátiles, estaban constituidas principalmente por hidrocarburos monoterpénicos (Mohammad *et al.*, 2017); es en este medio donde las levaduras han demostrado su mejor capacidad de desarrollo, por consiguiente, *Artemisia* representa una importante fuente microbiana que podría ser directamente aprovechada.

Con respecto a la planta de cedrón (*Aloysia triphylla*) que evidencia menor potencial para unidades formadoras de levaduras que altamisa, pero superior a las demás; es una planta medicinal con hojas aromáticas que produce aceite esencial rico en citral (Schmidt *et al.*, 2016); en esta planta se han identificado veintidos componentes, los principales fueron geranial (27,3%), neral (22,5%), geraniol (6,2%), biciclogermacreno (5,2%) y nerol (4,9%) (Rojas y Velasco, 2010). Así mismo su extracto acuoso contiene cantidades considerables de compuestos polifenólicos a saber, flavonoides y ácidos fenólicos (Zamorano-Ponce *et al.*, 2006), este medio sería el que permite el desarrollo significativo de levaduras.

En la planta de ruda (*Ruta graveolens* L.) se constató la más baja concentración de unidades formadoras de colonias de levaduras; esta planta se usa medicinalmente como un remedio homeopático en varias áreas del mundo (Reddy y Al-Rajab, 2016). Las

especies de ruda son fuentes de diversas clases de productos naturales con actividades biológicas incluyendo antifúngicos, antioxidantes, fitotóxicos, abortivos, depresivos, antidotales y antiinflamatorios (Mejri *et al.*, 2010). Se han encontrado 34 aceites esenciales, identificado 20 compuestos que se representan con alcoholes, aldehídos y cetonas. Los principales componentes del aceite esencial de la parte aérea de la planta son 2-undecanona (2650,2 mg / kg), acetato de 2-nonanol (1826,8 mg / kg), 2-undecanol (733,9 mg / kg), 2 - nonanona (699,2 mg / kg) (Melnyk *et al.*, 2015)

En estudios realizados se determinaron los efectos de los compuestos químicos de los aceites de especies de ruda, los resultados revelaron una poderosa actividad antifúngica contra los hongos filamentosos (Haddouchi *et al.*, 2013), la cual sería la razón por las que no desarrollaron con éxito las colonias de levaduras. El aceite volátil extraído mostró actividad antibacteriana contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, así como para la levadura *Candida albicans* (Reddy y Al-Rajab, 2016).

e. Unidades formadoras de colonias de levaduras de acuerdo al piso altitudinal

En los 3 pisos altitudinales el potencial para unidades formadoras de colonias de levaduras por mililitro de solución no fue igual. En el cuadro 23 se observa que de acuerdo a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) no existe diferencias significativas entre el piso altitudinal tres y el piso altitudinal dos que comparten el mismo rango de significancia, mientras que el piso altitudinal uno, con $2,36 \times 10^5$ UFC.ml⁻¹ presenta diferencias significativas con los otros dos pisos.

Cuadro 23: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de levaduras en consorcios microbianos de tres pisos altitudinales

Pisos altitudinales	Medias	Error Estándar	Significancia
P3	$1,64 \times 10^6$	$5,16 \times 10^5$	A
P2	$8,36 \times 10^5$	$2,12 \times 10^5$	A
P1	$2,36 \times 10^5$	$3,22 \times 10^4$	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la figura 154 se observa que las muestras vegetales del piso altitudinal tres presentaron el mayor potencial para unidades formadoras de colonias de levaduras, mientras que las especies vegetales del piso uno, no demostraron potencial significativo para unidades formadoras de estos microorganismos.

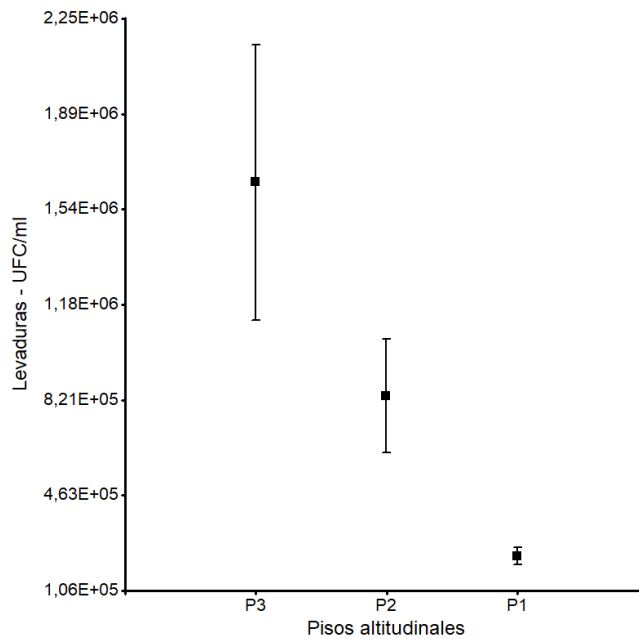


Figura 154: Comparación de UFC de levaduras en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de acuerdo al piso altitudinal

El potencial para unidades formadoras de colonias de levaduras, no es igual en los tres pisos altitudinales de los cuales provienen las muestras vegetales, en el piso altitudinal tres, se constata la más alta concentración para UFC, ya que en la parroquia Daniel Córdova Toral se encuentra la planta de altamisa (*Artemisia vulgaris*), que es la que se destaca por su afinidad para estos microorganismos en estudio. En el segundo piso altitudinal se ubica la planta de cedrón (*Aloysia triphylla*) que presenta particularidades favorables para levaduras. El piso altitudinal uno, evidencia el más bajo potencial para unidades formadoras de colonias de levaduras, ya que todas las especies seleccionadas a 1950 ms.n.m. demostraron baja carga microbiana de levaduras.

El clima incide en el desarrollo de las plantas cultivadas. Todas las tres zonas, presentan condiciones climáticas diferentes. De acuerdo con Köppen y Geiger (Merkel, 2017), el clima en la zona de estudio se clasifica como sigue: Gualceco Cfb, temperatura media anual es 17.1 °C; Daniel Córdova Toral Cfb, temperatura media anual es 14.4 °C y Girón Cwb, temperatura media anual es 17.2 °C; esto conspira de manera particular para el desarrollo ideal de las especies vegetales, por consiguiente, para los microorganismos que habitan en la superficie externa de las plantas, así como para los endófitos.

4.2.2 Unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp. (UFC.ml⁻¹)

a. Unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal uno

La respuesta de las unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp. por mililitro de solución de las diferentes especies vegetales del piso altitudinal uno, se presentan en el cuadro 24. En cada una de las repeticiones, las tres especies vegetales en estudio evidenciaron respuestas diferentes para UFC.

Cuadro 24: Respuesta de UFC.ml⁻¹ para *Bacillus* spp., en el piso altitudinal uno

Piso	Planta	Repetición	Respuesta (UFC.ml ⁻¹)
P1	Café	R1	1,00 X 10 ⁶
P1	Café	R2	1,16 X 10 ⁶
P1	Café	R3	1,08 X 10 ⁶
P1	Plátano	R1	1,07 X 10 ⁴
P1	Plátano	R2	1,23 X 10 ⁴
P1	Plátano	R3	1,15 X 10 ⁴
P1	Girasol	R1	1,12 X 10 ⁶
P1	Girasol	R2	9,20 X 10 ⁵
P1	Girasol	R3	1,02 X 10 ⁶

De acuerdo a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para UFC de *Bacillus* spp., en el piso altitudinal uno se presenta dos niveles de significancia (cuadro 25). En el rango A se ubican la planta de café (*Coffea arabica* L.) con una media de 1,08 X 10⁶ UFC.ml⁻¹ además de la planta de girasol (*Tithonia diversifolia*) con una media de 1,02 X 10⁶ UFC.ml⁻¹, son las especies que mostraron los más altos valores, en tanto que la planta de plátano (*Musa paradisiaca* L.) se ubica en el rango B con una media de 1,15 X 10⁴ UFC.ml⁻¹ es la que demostró menos viabilidad para UFC de *Bacillus* spp.

Cuadro 25: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., en los consorcio microbianos del piso altitudinal uno

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia
Café	1,08 X 10 ⁶	4,62 X 10 ⁴	A
Girasol	1,02 X 10 ⁶	5,77 X 10 ⁴	A
Plátano	1,15 X 10 ⁴	4,62 X 10 ²	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

De acuerdo a la figura 155, la planta de café (*Coffea arabica* L.) y la planta de girasol (*Tithonia diversifolia*) se destacaron por el potencial para unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp. muy superior a la plata de plátano (*Musa paradisiaca* L.).

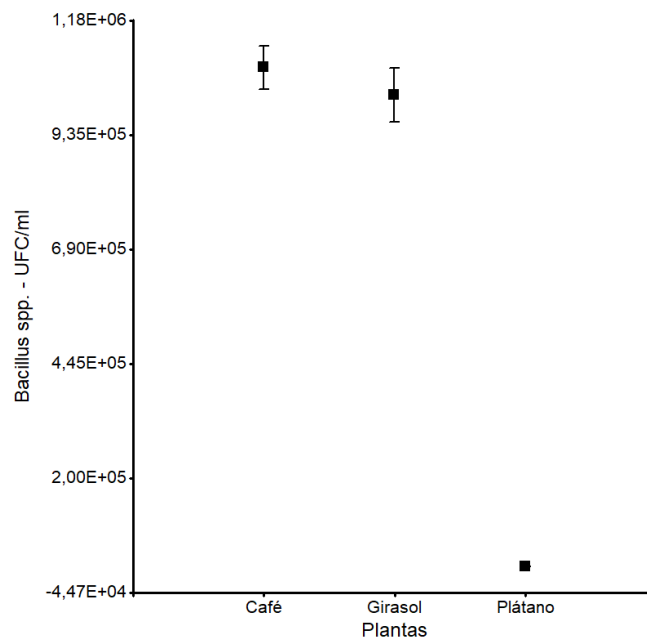


Figura 155: Comparación de UFC de *Bacillus* spp., en los medios de cultivo de microorganismos benéficos del piso altitudinal uno

b. Unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos

La respuesta de las unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., por mililitro de solución de las diferentes especies vegetales del piso altitudinal dos, se presentan en el cuadro 26. Los medios de cultivo de las cuatro especies vegetales demostraron potencial para formar colonias de *Bacillus* spp., la respuesta fue diferente entre especies.

Cuadro 26: Respuesta de UFC.ml⁻¹ para *Bacillus* spp. en el piso altitudinal dos

Piso	Planta	Repetición	Respuesta (UFC.ml ⁻¹)
P2	Ruda	R1	1,19 X 10 ⁷
P2	Ruda	R2	1,72 X 10 ⁷
P2	Ruda	R3	1,46 X 10 ⁷
P2	Romero	R1	2,40 X 10 ⁵
P2	Romero	R2	3,30 X 10 ⁵
P2	Romero	R3	2,90 X 10 ⁵
P2	Cedrón	R1	5,10 X 10 ³
P2	Cedrón	R2	2,30 X 10 ³
P2	Cedrón	R3	3,70 X 10 ³
P2	Menta	R1	5,30 X 10 ⁴
P2	Menta	R2	6,20 X 10 ⁴
P2	Menta	R3	5,80 X 10 ⁴

De acuerdo a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., en el piso altitudinal dos, en el cuadro 27 se aprecia cuatro niveles de significancia. La planta de ruda (*Ruta graveolens* L.) con una media de 1,46

$\times 10^7$ UFC.ml⁻¹ se ubica en el rango A que es el que presenta el más alto valor, a continuación, en el rango B se encuentra la planta de romero (*Rosmarinus officinalis*) con una media de $2,87 \times 10^5$ UFC.ml⁻¹, seguido de la planta de menta (*Mentha piperita*) que para unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., presenta una media de $5,77 \times 10^4$ UFC.ml⁻¹. Finalmente, con la media más baja $3,70 \times 10^3$ UFC.ml⁻¹ se ubica la planta de cedrón (*Aloysia triphylla*).

Cuadro 27: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia
Ruda	$1,46 \times 10^7$	$1,53 \times 10^6$	A
Romero	$2,87 \times 10^5$	$2,60 \times 10^4$	B
Menta	$5,77 \times 10^4$	$2,60 \times 10^3$	C
Cedrón	$3,70 \times 10^3$	$8,08 \times 10^2$	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la figura 156 se observa que la planta de ruda (*Ruta graveolens* L.) presentó un elevado potencial para unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., con respecto a las plantas de romero (*Rosmarinus officinalis*), menta (*Mentha piperita*) y cedrón (*Aloysia triphylla*).

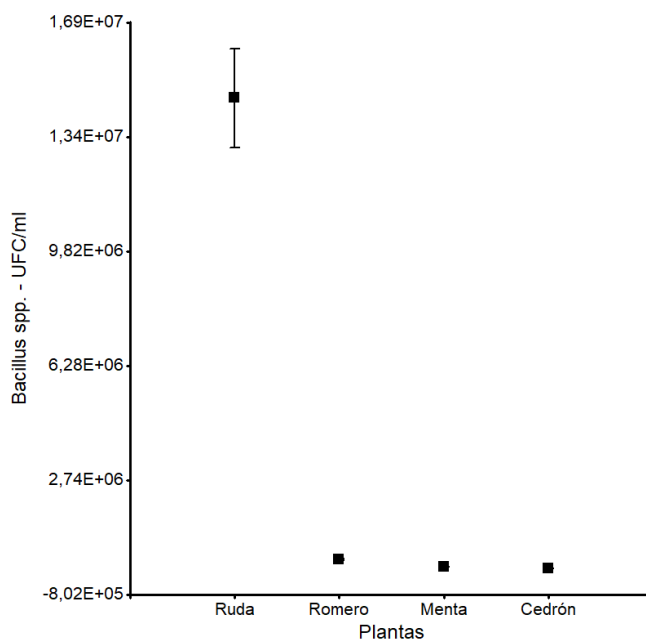


Figura 156: Comparación de UFC de *Bacillus* spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos

c. **Unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal tres**

La respuesta de las unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., por mililitro de solución de las diferentes especies vegetales del piso altitudinal tres, se presentan en el cuadro 28. En la solución líquida de todas las repeticiones, se constató potencial para formar colonias de *Bacillus* spp., que no fue igual entre plantas.

Cuadro 28: Respuesta de UFC.ml⁻¹ para *Bacillus* spp., en el piso altitudinal tres

Piso	Planta	Repetición	Respuesta (UFC.ml ⁻¹)
P3	Diente de león	R1	9,40 X 10 ³
P3	Diente de león	R2	1,34 X 10 ⁴
P3	Diente de león	R3	1,14 X 10 ⁴
P3	Manzanilla	R1	3,00 X 10 ³
P3	Manzanilla	R2	4,00 X 10 ³
P3	Manzanilla	R3	3,50 X 10 ³
P3	Geranio	R1	1,69 X 10 ⁵
P3	Geranio	R2	1,31 X 10 ⁵
P3	Geranio	R3	1,50 X 10 ⁵
P3	Altamisa	R1	3,50 X 10 ⁴
P3	Altamisa	R2	2,20 X 10 ⁴
P3	Altamisa	R3	2,90 X 10 ⁴
P3	Canayuyo	R1	2,30 X 10 ³
P3	Canayuyo	R2	3,60 X 10 ³
P3	Canayuyo	R3	3,00 X 10 ³

En el piso altitudinal tres, para unidades formadoras de colonias de *Bacillus* se observa cuatro niveles de significancia de acuerdo a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) que se presenta en el cuadro 29. La planta de geranio (*Pelargonium graveolens*) con una media de 1,50 X 10⁵ UFC.ml⁻¹ se ubica en el rango A con el más alto valor, a continuación, se ubica la planta de altamisa (*Artemisia vulgaris*) con una media de 2,87 X 10⁴ UFC.ml⁻¹, inmediatamente después se encuentra la planta de diente de león (*Taraxacum officinale* Weber.) con una media de 1,14 X 10⁴ UFC.ml⁻¹. En el rango D se ubican la planta de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.), con una media de 3,50 X 10³ UFC.ml⁻¹ así como canayuyo (*Sonchus oleraceus*) con una media de 2,97 X 10³ UFC.ml⁻¹ que son las especies vegetales con menor potencial.

Cuadro 29: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal tres

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia
Geranio	1,50 X 10 ⁵	1,10 X 10 ⁴	A
Altamisa	2,87 X 10 ⁴	3,76 X 10 ³	B
Diente de León	1,14 X 10 ⁴	1,15 X 10 ³	C
Manzanilla	3,50 X 10 ³	2,89 X 10 ²	D
Canayuyo	2,97 X 10 ³	3,76 X 10 ²	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En el piso altitudinal tres en concordancia con la figura 157 se verifica que la planta de geranio (*Pelargonium graveolens*) presentó un alto potencial para unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., mientras que la planta de altamisa (*Artemisia vulgaris*) es inferior a esta, pero superior a las plantas de diente de león (*Taraxacum officinale* Webe, manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) y canayuyo (*Sonchus oleraceus*).

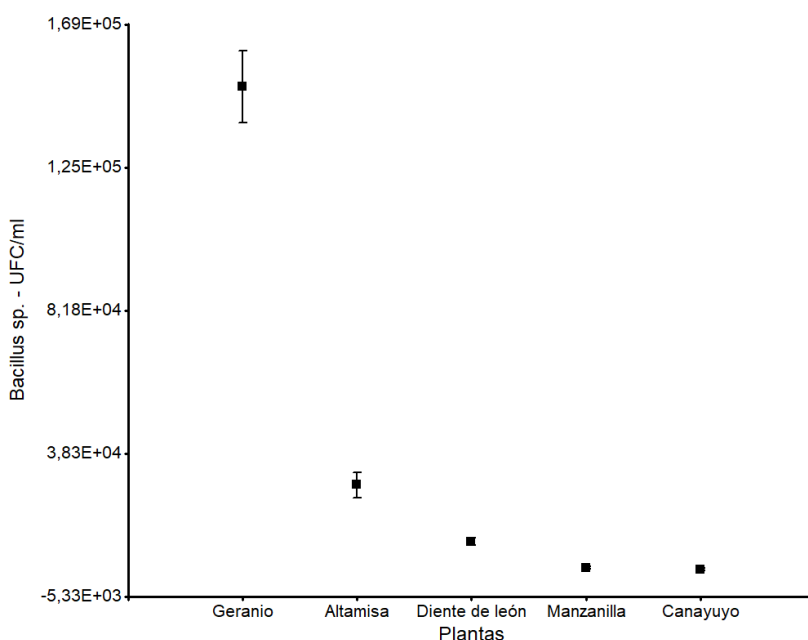


Figura 157: Comparación de UFC de *Bacillus* spp. en los consorcios microbianos del piso altitudinal tres

d. Unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., en los consorcios microbianos de tres pisos altitudinales

En el cuadro 30, de acuerdo a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., en consorcios microbianos de tres pisos altitudinales, se identifica ocho rangos de significancia. En el nivel A con la más alta media 1,46 X 10⁷ UFC.ml⁻¹ se encuentra la planta de ruda (*Ruta graveolens* L.), comparten el rango B la planta de café (*Coffea arabica* L.) así como la planta de girasol (*Tithonia diversifolia*) con medias de 1,08 X 10⁶ UFC.ml⁻¹ y 1,02 X 10⁶ UFC.ml⁻¹

respectivamente. La planta de cedrón (*Aloysia triphylla*) con una media de $3,70 \times 10^3$ UFC.ml⁻¹, la planta de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) con una media de $3,50 \times 10^3$ UFC.ml⁻¹ y la planta de canayuyo (*Sonchus oleraceus*) con una media de $2,97 \times 10^3$ UFC.ml⁻¹ se ubican en el rango F, son los valores de medias más bajo registrados.

Cuadro 30: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades de formación de colonias de *Bacillus* spp. en diferentes especies vegetales en tres pisos altitudinales

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia			
Ruda	$1,46 \times 10^7$	$1,53 \times 10^6$	A			
Café	$1,08 \times 10^6$	$4,62 \times 10^4$		B		
Girasol	$1,02 \times 10^6$	$5,77 \times 10^4$		B		
Romero	$2,87 \times 10^5$	$2,60 \times 10^4$			C	
Geranio	$1,50 \times 10^5$	$1,10 \times 10^4$			D	
Menta	$5,77 \times 10^4$	$2,60 \times 10^3$			E	
Altamisa	$2,87 \times 10^4$	$3,76 \times 10^3$				F
Plátano	$1,15 \times 10^4$	$4,62 \times 10^2$				G
Diente de León	$1,14 \times 10^4$	$1,15 \times 10^3$				G
Cedrón	$3,70 \times 10^3$	$8,08 \times 10^2$				H
Manzanilla	$3,50 \times 10^3$	$2,89 \times 10^2$				H
Canayuyo	$2,97 \times 10^3$	$3,76 \times 10^2$				H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

De acuerdo a la figura 158, la planta de ruda (*Ruta graveolens* L.), presentó el más alto potencial para unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., y se destaca ampliamente sobre las demás especies vegetales en estudio.

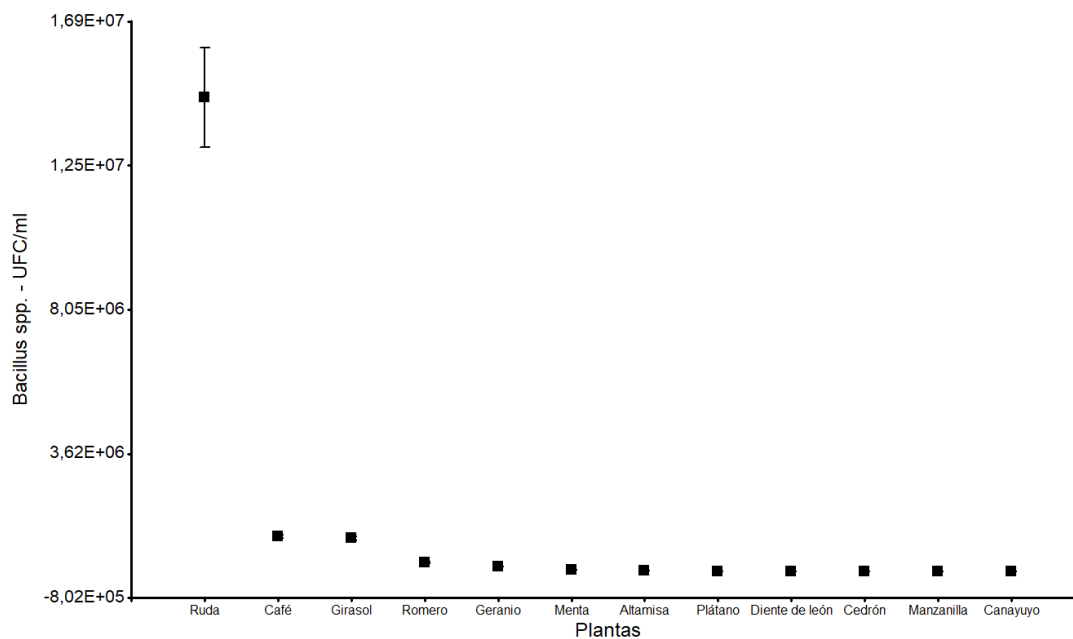


Figura 158: Comparación de UFC de *Bacillus* spp. en consorcios microbianos de tres pisos altitudinales

De acuerdo a los resultados obtenidos, se constata que la población microbiana de *Bacillus* spp., se destaca en la planta de Ruda (*Ruta graveolens* L.), las propiedades químicas de esta especie vegetal presentan baja compatibilidad para desarrollo de levaduras, pero, por lo contrario, son el medio ideal para el desarrollo de especies de *Bacillus*. El menor número de UFC de *Bacillus* spp., se registró en la planta de canayuyo (*Sonchus oleraceus*), esta planta es una fuente rica de polifenoles, además exhibe una fuerte actividad antioxidante (McDowell *et al.*, 2011).

Estudios sugieren que el extracto de *S. oleraceus* podría ser utilizado como fuente potencial de antioxidantes naturales (Yin *et al.*, 2007), análisis muestran que las plantas contienen un apreciable porcentaje de humedad, cenizas, proteína bruta, lípido crudo, fibra bruta e hidratos de carbono, también son ricas en minerales, flavonoides, flavonoles, proantocianidinas, fenoles totales y bajos niveles de saponinas, fitatos y alcaloides (Jimoh *et al.*, 2011). El contenido fitoquímico de *S. oleraceus*, es amplio, aunque se identificaron dieciocho compuestos, el linoleato de etilo (43,05%), el éster etílico del ácido (E) - 9 - octadecenoico (24,02%) representan los constituyentes principales (Ibrahim *et al.*, 2015).

A estos contenidos se les atribuiría la baja compatibilidad para éxito en el desarrollo de unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp. En la zona de estudio tanto *R. graveolens*, así como *S. oleraceus* son plantas utilizadas con fines medicinales, aunque difieren en sus usos, ambas se caracterizan por tener un sabor amargo y su uso no es mediante ingesta directa. Las dos especies fueron recolectadas en pisos altitudinales diferentes, pero en este caso el factor ambiental no sería el principal limitante, ya que otras plantas que se encuentran cerca de *S. oleraceus* no presentan potencial elevado para unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp.

Es relevante que los extractos de las plantas de *Sonchus oleraceus* muestran fuertes propiedades antioxidantes y anti-bacterianas (Jimoh *et al.*, 2011), que lo convertiría en una especie útil para atenuar el incremento de la población bacteriana. Además, se ha reportado que produce efectos alelopáticos, los resultados de investigaciones sugieren que las fitotoxinas liberadas pueden restringir la biosíntesis de flavonoides en las especies objetivo (Gomaa *et al.*, 2015), los análisis de HPLC para muestras de suelo indican la presencia de varios compuestos fenólicos entre los cuales el ácido cafeico y el catecol son abundantes (Hassan *et al.*, 2014).

e. Unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., de acuerdo al piso altitudinal

En el cuadro 31, acorde a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) se constata un solo nivel de significancia para unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp. en los consorcios microbianos de los tres pisos altitudinales, la media más alta corresponde a P2 con un valor de $3,73 \times 10^6$ UFC.ml⁻¹, mientras que la media más baja es para P3 con una media de $3,93 \times 10^4$ UFC de *Bacillus* spp. por mililitro de solución.

Cuadro 31: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., en consorcios microbianos de tres pisos altitudinales

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia
P2	$3,73 \times 10^6$	$1,91 \times 10^6$	A
P1	$7,04 \times 10^5$	$1,75 \times 10^5$	A
P3	$3,93 \times 10^4$	$1,51 \times 10^4$	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la figura 159, se observa que el mayor número de unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp. correspondió al piso altitudinal dos el cual es muy superior a la de los otros dos pisos altitudinales; el piso altitudinal tres presentó el más bajo potencial para UFC de *Bacillus* spp. por mililitro de solución.

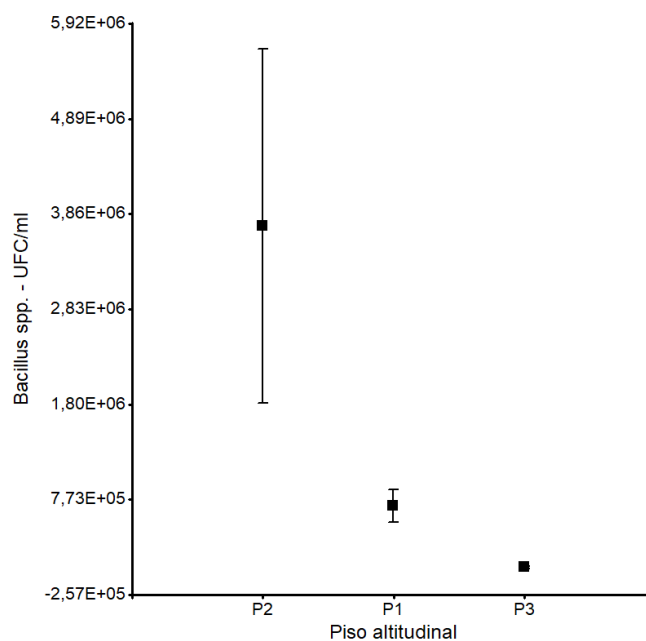


Figura 159: Comparación de UFC de *Bacillus* spp., en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de acuerdo al piso altitudinal

Se conoce que todas las tres zonas, presentan condiciones climáticas diferentes. De acuerdo con Köppen y Geiger (Merkel, 2017), el clima en la zona de estudio se clasifica

como sigue: Gualceño Cfb, temperatura media anual es 17.1 °C; Daniel Córdova Toral Cfb, temperatura media anual es 14.4 °C y Girón Cwb, temperatura media anual es 17.2 °C; las plantas que habitan en cada sitio geográfico son propias de la zona.

El mayor número de unidades formadoras de colonias se *Bacillus* spp., se registró en el piso altitudinal dos, que está ubicado a 2250 ms.n.m. Se debe fundamentalmente a la importante población bacteriana determinada en *R. graveolens*, ya que las otras plantas cultivadas en el mismo sitio, no presentan un significativo potencial para UFC de *Bacillus* spp.

En el piso altitudinal uno, las plantas cultivadas presentan bajo potencial para unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., pero la concentración bacteriana es superior a la del piso altitudinal dos; en todas las especies vegetales se ha determinado UFC, pero no en las mismas proporciones, ya que el éxito de desarrollo de *Bacillus* spp. estaría relacionado con la especie vegetal y los contenidos esenciales de estas.

4.2.3 Unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp. (UFC.ml⁻¹)

a. Unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal uno

Todas las especies vegetales presentaron un elevado potencial para unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp. en cada una de las repeticiones en estudio, no obstante, el potencial fue diferente en la solución líquida de cada planta. La respuesta de las UFC de las diferentes especies vegetales en el piso altitudinal uno, se presentan en el cuadro 32.

Cuadro 32: Respuesta de UFC.ml⁻¹ para *Lactobacillus* spp. en el piso altitudinal uno

Piso	Planta	Repetición	Respuesta (UFC.ml ⁻¹)
P1	Café	R1	2,75 X 10 ¹³
P1	Café	R2	1,86 X 10 ¹³
P1	Café	R3	2,31 X 10 ¹³
P1	Plátano	R1	2,32 X 10 ¹³
P1	Plátano	R2	1,04 X 10 ¹³
P1	Plátano	R3	1,68 X 10 ¹³
P1	Girasol	R1	3,30 X 10 ¹²
P1	Girasol	R2	3,20 X 10 ¹²
P1	Girasol	R3	3,10 X 10 ¹²

De acuerdo a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para UFC de *Lactobacillus* spp., en el piso altitudinal uno (cuadro 33), se distinguen dos niveles de significancia. Las plantas de café (*Coffea arabica* L.) con una media de $2,31 \times 10^{13}$ UFC.ml⁻¹ así como también la de plátano (*Musa paradisiaca* L.) con una media de $1,68 \times 10^{13}$ UFC.ml⁻¹ comparten el mismo nivel de significancia, mientras que la planta de girasol (*Tithonia diversifolia*) con una media de $3,20 \times 10^{12}$ UFC.ml⁻¹ es la especie con menos potencial para *Lactobacillus* spp.

Cuadro 33: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal uno

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia
Café	$2,31 \times 10^{13}$	$2,57 \times 10^{12}$	A
Plátano	$1,68 \times 10^{13}$	$3,70 \times 10^{12}$	A
Girasol	$3,20 \times 10^{12}$	$5,77 \times 10^{10}$	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la figura 160 se aprecia que la planta de café (*Coffea arabica* L.) presenta alto potencial para UFC de *Lactobacillus* spp., mientras que la de girasol (*Tithonia diversifolia*) no revistió importancia ya que registra el valor más bajo de UFC. La planta de plátano (*Musa paradisiaca* L.) fue la segunda en relevancia para unidades formadoras de colonias de estos microorganismos en estudio.

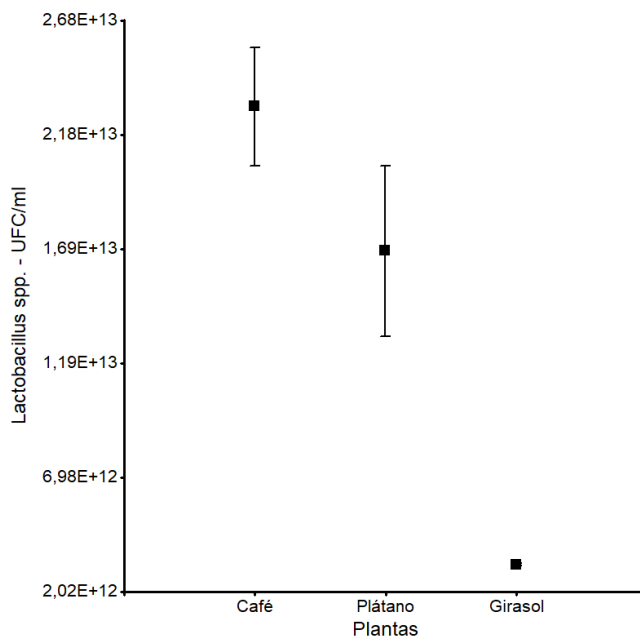


Figura 160: Comparación de unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en los medios de cultivo de microorganismos benéficos del piso altitudinal uno

b. Unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos

La respuesta de las unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., por mililitro de solución de las diferentes especies vegetales del piso altitudinal dos se presentan en el cuadro 34. Todas las especies en estudio presentaron alto potencial para unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp. en las diferentes repeticiones.

Cuadro 34: Respuesta de UFC.ml⁻¹ para *Lactobacillus* spp., en el piso altitudinal dos

Piso	Planta	Repetición	Respuesta (UFC.ml ⁻¹)
P2	Ruda	R1	6,20 X 10 ¹²
P2	Ruda	R2	6,70 X 10 ¹²
P2	Ruda	R3	6,40 X 10 ¹²
P2	Romero	R1	4,50 X 10 ¹²
P2	Romero	R2	2,40 X 10 ¹²
P2	Romero	R3	3,50 X 10 ¹²
P2	Cedrón	R1	8,00 X 10 ¹⁰
P2	Cedrón	R2	6,20 X 10 ¹⁰
P2	Cedrón	R3	7,10 X 10 ¹⁰
P2	Menta	R1	4,50 X 10 ¹⁰
P2	Menta	R2	4,10 X 10 ¹⁰
P2	Menta	R3	4,30 X 10 ¹⁰

Para unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en el piso altitudinal dos, conforme a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) (cuadro 35) se diferencian cuatro niveles de significancia. La planta de ruda (*Ruta graveolens* L.) con una media de 6,43 X 10¹² UFC.ml⁻¹ ocupa el rango más alto, en tanto que la planta de menta (*Mentha piperita*) con una media de 4,30 X 10¹⁰ UFC.ml⁻¹ se ubica en el más bajo. Las otras dos especies vegetales, romero (*Rosmarinus officinalis*) con una media de 3,47X 10¹² UFC.ml⁻¹ y cedrón (*Aloysia triphylla*) con una media de 7,10 X 10¹⁰ UFC.ml⁻¹ ocupan rangos intermedios.

Cuadro 35: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia
Ruda	6,43 X 10 ¹²	1,45 X 10 ¹¹	A
Romero	3,47 X 10 ¹²	6,06 X 10 ¹¹	B
Cedrón	7,10 X 10 ¹⁰	5,20 X 10 ⁹	C
Menta	4,30 X 10 ¹⁰	1,15 X 10 ⁹	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

De acuerdo a la figura 161, la planta de ruda (*Ruta graveolens* L.) fue la especie vegetal del piso altitudinal dos, que presentó mayor potencial para unidades de formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., su capacidad fue muy superior a las demás especies vegetales en investigación. Las plantas de cedrón (*Aloysia triphylla*) así como la de menta (*Mentha piperita*) no se destacaron, ya que su potencial fue muy bajo.

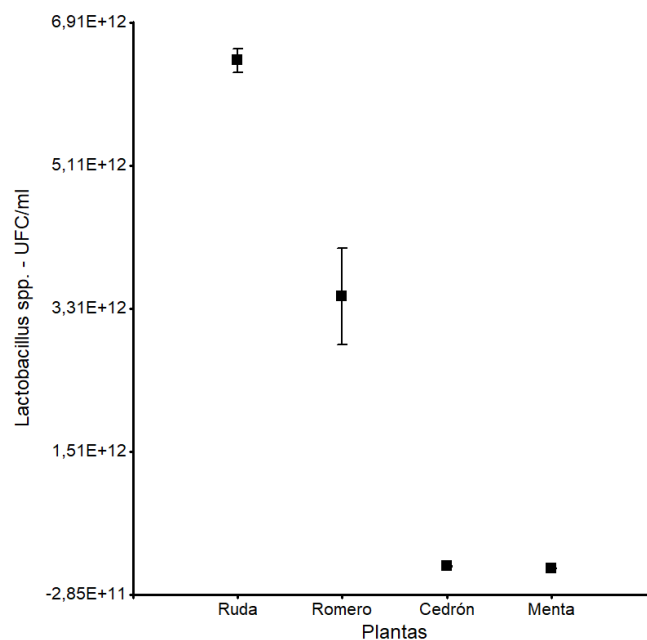


Figura 161: Comparación de unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en los en los medios de cultivo de microorganismos benéficos piso altitudinal dos

c. Unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal tres

La respuesta de las unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., por mililitro de solución de las diferentes especies vegetales del piso altitudinal tres, se presentan en el cuadro 36. En cada una de las repeticiones se evidenció respuesta positiva para UFC de colonias de *Lactobacillus* spp., el potencial fue diferente en cada especie vegetal.

Cuadro 36: Respuesta de UFC.ml⁻¹ para *Lactobacillus* spp. en el piso altitudinal tres

Piso	Planta	Repetición	Respuesta (UFC.ml ⁻¹)
P3	Diente de león	R1	5,00 X 10 ¹²
P3	Diente de león	R2	6,10 X 10 ¹²
P3	Diente de león	R3	5,60 X 10 ¹²
P3	Manzanilla	R1	4,80 X 10 ¹²
P3	Manzanilla	R2	2,90 X 10 ¹²
P3	Manzanilla	R3	3,90 X 10 ¹²
P3	Geranio	R1	4,50 X 10 ¹¹
P3	Geranio	R2	3,60 X 10 ¹¹
P3	Geranio	R3	4,10 X 10 ¹¹
P3	Altamisa	R1	5,40 X 10 ¹²
P3	Altamisa	R2	3,50 X 10 ¹²
P3	Altamisa	R3	4,50 X 10 ¹²
P3	Canayuyo	R1	3,40 X 10 ¹²
P3	Canayuyo	R2	2,20 X 10 ¹²
P3	Canayuyo	R3	2,80 X 10 ¹²

En el cuadro 37, se aprecia que en el piso altitudinal tres, acorde a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., existen cuatro niveles de significancia. La planta diente de león (*Taraxacum officinale* Weber.) con una media de 5,57 X 10¹² UFC.ml⁻¹ y la planta de altamisa (*Artemisia vulgaris*) con una media de 4,47 X 10¹² UFC.ml⁻¹ comparten el rango de significancia más alto. La planta de geranio (*Pelargonium graveolens*) con 4,07 X 10¹¹ UFC.ml⁻¹ es la media más baja *Lactobacillus* spp.

Cuadro 37: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en los consorcios microbianos del piso altitudinal tres

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia		
Diente de León	5,57 X 10 ¹²	3,18 X 10 ¹¹	A		
Altamisa	4,47 X 10 ¹²	5,49 X 10 ¹¹	A	B	
Manzanilla	3,87 X 10 ¹²	5,49 X 10 ¹¹		B	C
Canayuyo	2,80 X 10 ¹²	3,46 X 10 ¹¹			C
Geranio	4,07 X 10 ¹¹	2,60 X 10 ¹⁰			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Con respecto al potencial que tienen las plantas del piso altitudinal tres para unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en la figura 162 se observa que la especie vegetal diente de león (*Taraxacum officinale* Weber.) es la que presentó mejores perspectivas ubicándose sobre las demás. La planta de geranio (*Pelargonium graveolens*) fue la menos indicada para unidades formadoras de colonia de *Lactobacillus* spp.

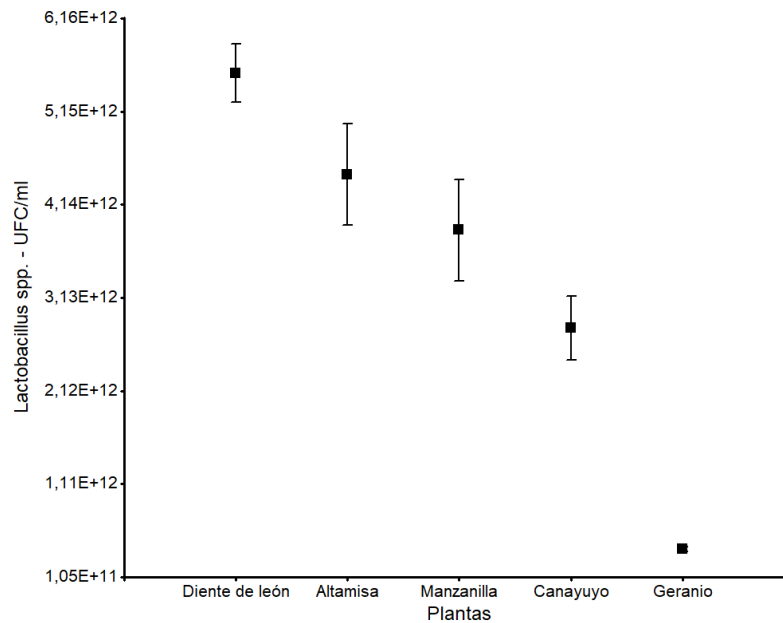


Figura 162: Comparación de unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en los medios de cultivo de microorganismos benéficos del piso altitudinal tres

d. Unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en los consorcios microbianos de tres pisos altitudinales

En el cuadro 38 se observan ocho niveles de significancia para unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en tres pisos altitudinales de acuerdo a la especie vegetal.

Cuadro 38: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en consorcios microbianos de tres pisos altitudinales

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia			
Café	2,31 X 10 ¹³	2,57 X 10 ¹²	A			
Plátano	1,68 X 10 ¹³	3,70 X 10 ¹²	A			
Ruda	6,43 X 10 ¹²	1,45 X 10 ¹¹		B		
Diente de león	5,57 X 10 ¹²	3,18 X 10 ¹¹			C	
Altamisa	4,47 X 10 ¹²	5,49 X 10 ¹¹			C	D
Manzanilla	3,87 X 10 ¹²	5,49 X 10 ¹¹			D	E
Romero	3,47 X 10 ¹²	6,06 X 10 ¹¹			D	E
Girasol	3,20 X 10 ¹²	5,77 X 10 ¹⁰				E
Canayuyo	2,80 X 10 ¹²	3,46 X 10 ¹¹				E
Geranio	4,07 X 10 ¹¹	2,60 X 10 ¹⁰				F
Cedrón	7,10 X 10 ¹⁰	5,20 X 10 ⁹				G
Menta	4,30 X 10 ¹⁰	1,15 X 10 ⁹				H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

La planta de café (*Coffea arabica* L.) con una media de 2,31 X 10¹³ UFC.ml⁻¹ así como la planta de plátano (*Musa paradisiaca* L.) con una media de 1,68 X 10¹³ UFC.ml⁻¹ comparten el mismo rango de significancia y son las especies con más alto potencial

para *Lactobacillus* spp., de inmediato, se ubica la planta de ruda con una media de $6,43 \times 10^{12}$ UFC.ml⁻¹. La planta de cedrón (*Aloysia triphylla*) con una media de $7,10 \times 10^{10}$ UFC.ml⁻¹ y la planta de menta (*Mentha piperita*) con una media de $4,30 \times 10^{10}$ UFC.ml⁻¹ son las que presentan menor potencial para UFC de *Lactobacillus* spp.

Todas las especies vegetales no presentaron el mismo potencial para UFC de *Lactobacillus* spp. En la figura 163 se constata que la planta de café (*Coffea arabica* L.) es la más viable para unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., seguida por la planta de plátano (*Musa paradisiaca* L.). Las plantas de ruda (*Ruta graveolens* L.), diente de león (*Taraxacum officinale* Weber.), altamisa (*Artemisia vulgaris*), manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.), romero (*Rosmarinus officinalis*), girasol (*Tithonia diversifolia*), canayuyo (*Sonchus oleraceus*), geranio (*Pelargonium graveolens*), cedrón (*Aloysia triphylla*) y menta (*Mentha piperita*) demostraron muy bajo potencial para unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp. respectivamente.

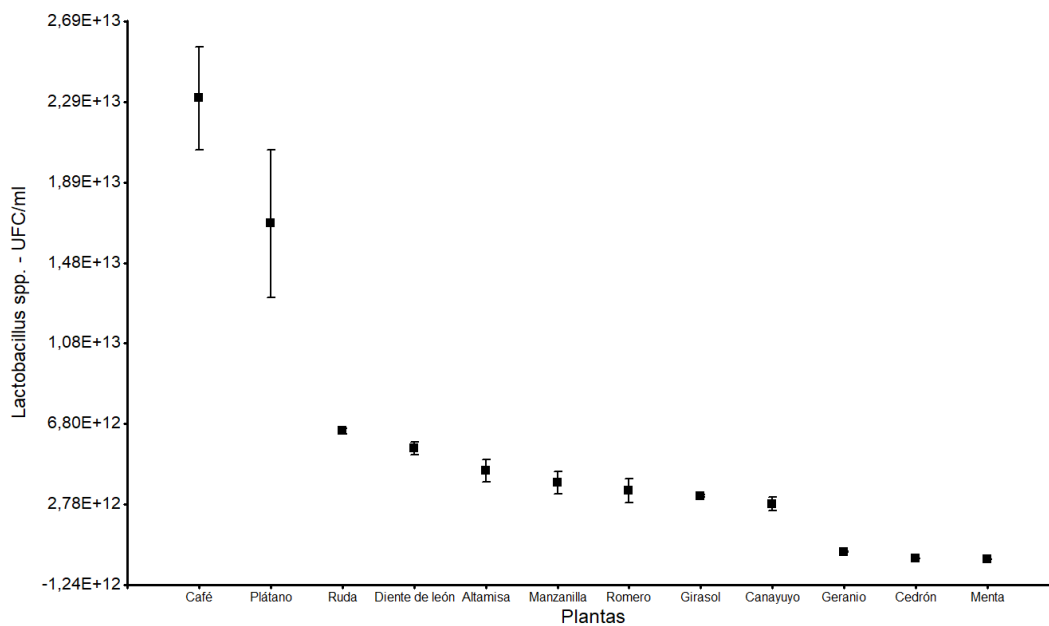


Figura 163: Comparación de unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de tres pisos altitudinales

Del análisis de los resultados obtenidos, se destaca que las unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., fue heterógena en las 12 plantas en estudio, el mayor número se registró en la planta de café (*Coffea arabica* L.) mientras que la menor población se constató en la planta de menta (*Mentha piperita*).

La planta de café se cultiva en la zona con la finalidad de cosechar los granos, secar, procesar y consumir como parte de la alimentación; existen muchas variedades, las propiedades químicas de este vegetal han sido motivo de investigación. Las diferencias en la química pueden distinguir las especies y variedades de café, y las plantas cultivadas bajo diferentes condiciones biogeográficas presentan diferentes quimiotipos. Se sabe que una serie de grupos químicos, como los alcaloides y los ácidos cafeoilquínicos, son insecticidas (Green *et al.*, 2015).

Probablemente por su composición química la planta de café presenta alta afinidad para el desarrollo de *Lactobacillus* spp. En las plantas hay aproximadamente 8000 compuestos fenólicos conocidos con un anillo aromático producido como metabolitos secundarios. La cafeína, el alcaloide más importante de las especies de café, se sintetiza en hojas jóvenes de plántulas, así como en los frutos inmaduros, y se acumula en las hojas maduras. Los carotenoides, generalmente presentes en hojas, flores, frutos y brotes de plantas, juegan un papel importante en la estabilización de las membranas lipídicas, la fotosíntesis y la protección contra la radiación fuerte y los procesos fotooxidativos (Patay *et al.*, 2016). Se ha cuantificado diferentes compuestos volátiles como alcoholes, aldehídos, cetonas, pirazinas, piridinas y furanos en granos verdes y tostados que pertenecen a diferentes clases químicas (Poyraz *et al.*, 2016).

Se verificó importante población de *Lactobacillus* spp. en *Musa paradisiaca*; las partes de estas plantas son ampliamente utilizadas en humanos para tratar diferentes enfermedades, como diarrea, disentería, lesiones intestinales en colitis ulcerosa, diabetes, sprue, uremia, nefritis, gota, hipertensión y enfermedad cardíaca (Imam y Akter, 2011). Las principales actividades farmacológicas son antilítica, antioxidante, antibacteriana, antidiabético, antiulceroso, antidiarreico, hipocolesterolémico, hepatoprotector, cicatrización de heridas, crecimiento del cabello, actividad antimicótica y antimeningorrágica (Lavanya *et al.*, 2016). Los principios activos responsables de la actividad podrían ser metabolitos secundarios tales como compuestos terpenoides y flavonoides presentes en la hoja y el tallo de la planta (Marie-Magdeleine *et al.*, 2014), estos compuestos son compatibles para el desarrollo de UFC de *Lactobacillus* spp.

Se ha evaluado el efecto del extracto etanólico de la hoja de *Musa paradisiaca* como antibacterianos contra bacterias gram positivas y gram negativos (Asuquo y Udobi,

2016), se reveló la presencia de fitoquímicos que tal vez sean responsables de las actividades expuestas contra las bacterias a saber, *Micrococcus flavus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Rao *et al.*, 2012).

La planta de menta (*Mentha piperita* L.) es utilizada para preparar infusiones medicinales, se caracteriza por su aroma suave y agradable; en esta especie vegetal se determinó el menor número de UFC de *Lactobacillus* spp., los contenidos químicos son completamente diferentes a la de las anteriores.

Se han identificado treinta y cinco componentes en el aceite esencial de *M. piperita*. Los principales compuestos identificados en el aceite son mentona (30,63%), mentol (25,16%), menthofurano (6,47%), β -phellandreno (5,59%), isomentona (4,74%), mentol acetato (4,61%), pulegona (%), β -cariofileno (3,05%), neomentol (2,83%), 1,8-cineol (2,15%) (Moghaddam *et al.*, 2013). Se estudió el efecto de extractos de *M. piperita* contra patógenos; se encontró que el aceite era eficaz contra patógenos fúngicos bajo análisis de laboratorio (Moghaddam *et al.*, 2013).

La concentración de *Lactobacillus* spp., es muy diferente en cada especie, también difiere las propiedades químicas entre las plantas, lo cual sería la condición fundamental para el desarrollo de este microorganismo benéfico; sin embargo, en todos los medios de cultivo de los tres pisos altitudinales, se presenta un desarrollo significativo de UFC *Lactobacillus* spp., que demostraría que todas las plantas en estudio, debido a sus propiedades químicas, características de los aceites esenciales y condiciones de cultivo, permiten el desarrollo exitoso de especies de *Lactobacillus*, pero mejor se adaptan en las plantas que tienen compuestos fenólicos, por lo tanto la planta de café (*Coffea arabica* L.) merece especial atención ya que la concentración microbiana en esta especie vegetal es elevadísima muy superior a las demás, pudiendo ser una importante fuente de bacterias ácido lácticas.

e. Unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en los consorcios microbianos de acuerdo al piso altitudinal

En cuanto a las unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp. en los tres pisos altitudinales, con la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) que se presenta en el cuadro 39, se constata que existen dos rangos de significancia, P1 se destaca con una media de 1,44 X 10¹³ UFC.ml⁻¹ es el piso con más alto potencial para *Lactobacillus* spp., mientras que

entre P3 con $3,42 \times 10^{12}$ UFC.ml⁻¹ y P2 con $2,50 \times 10^{12}$ UFC.ml⁻¹ no existe diferencias significativas y presentan menos potencial para estos microorganismos.

Cuadro 39: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en consorcios microbianos de tres pisos altitudinales

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia
P1	$1,44 \times 10^{13}$	$3,21 \times 10^{12}$	A
P3	$3,42 \times 10^{12}$	$4,93 \times 10^{11}$	B
P2	$2,50 \times 10^{12}$	$8,14 \times 10^{11}$	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

La comparación del potencial para unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp. entre los diferentes pisos altitudinales se presenta en la figura 164, se aprecia que P1 es el piso que se destaca ampliamente sobre los pisos altitudinales P3 y P2.

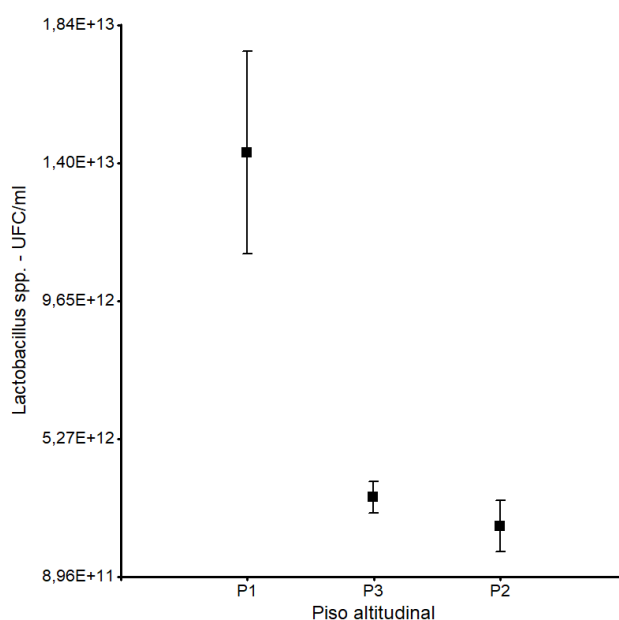


Figura 164: Comparación de unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de acuerdo al piso altitudinal

En los tres pisos altitudinales en análisis, la concentración de *Lactobacillus* spp. no es igual. En el piso altitudinal uno se registró el mayor número de unidades formadoras de colonias ya que a 1950 ms.n.m. se encuentran las especies vegetales con mayor potencial para UFC de este microorganismo. Las condiciones del medio en el cual se desarrollan las 12 plantas son diferentes y todas favorecen a la formación significativa de UFC de *Lactobacillus* spp., lo que evidencia que en la provincia del Azuay existe una riqueza en diversidad vegetariana que acoge a *Lactobacillus* spp. Los factores climáticos no serían la condición fundamental para el desarrollo microbiano, ya que el incremento poblacional no se evidencia en forma simétrica de acuerdo a la altura

(P1>P3>P2), no obstante, las propiedades de las plantas si presentan relación directa con el número de UFC.

4.2.4 Unidades formadoras de colonias de actinomicetos (UFC.ml⁻¹)

a. Unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos del piso altitudinal uno

La respuesta de las unidades formadoras de colonias de actinomicetos por mililitro de solución de las diferentes especies vegetales en del piso altitudinal uno, se presentan en el cuadro 40. Fue relevante el potencial para UFC de actinomicetos que presentaron cada una de las plantas objeto de estudio.

Cuadro 40: Respuesta de UFC.ml⁻¹ de actinomicetos en el piso altitudinal uno

Piso	Planta	Repetición	Respuesta (UFC.ml ⁻¹)
P1	Café	R1	8,00 X 10 ³
P1	Café	R2	7,00 X 10 ³
P1	Café	R3	6,00 X 10 ³
P1	Plátano	R1	1,50 X 10 ⁴
P1	Plátano	R2	1,00 X 10 ⁴
P1	Plátano	R3	1,30 X 10 ⁴
P1	Girasol	R1	6,00 X 10 ³
P1	Girasol	R2	5,00 X 10 ³
P1	Girasol	R3	6,00 X 10 ³

Aplicando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de actinomicetos en el piso altitudinal uno, presentada en el cuadro 41, se diferencia dos rangos de significación. La planta de plátano (*Musa paradisiaca* L.) con una media de 1,27 X 10⁴ UFC.ml⁻¹ se ubica en el nivel A y es el valor más alto registrado. El rango B lo comparten la planta de café (*Coffea arabica* L.) con una media de 7,00 X 10³ UFC.ml⁻¹ con la planta de girasol que evidencia una media de 5,67 X 10³ UFC.ml⁻¹.

Cuadro 41: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos del piso altitudinal uno

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia
Plátano	1,27 X 10 ⁴	1,45 X 10 ³	A
Café	7,00 X 10 ³	5,77 X 10 ²	B
Girasol	5,67 X 10 ³	3,33 X 10 ²	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

En la figura 165 se verifica que en el piso altitudinal uno, la planta de plátano (*Musa paradisiaca* L.) presenta el más alto potencial para unidades formadoras de colonias de

actinomicetos. La planta de café (*Coffea arabica* L.) supera al potencial de la planta de girasol (*Tithonia diversifolia*).

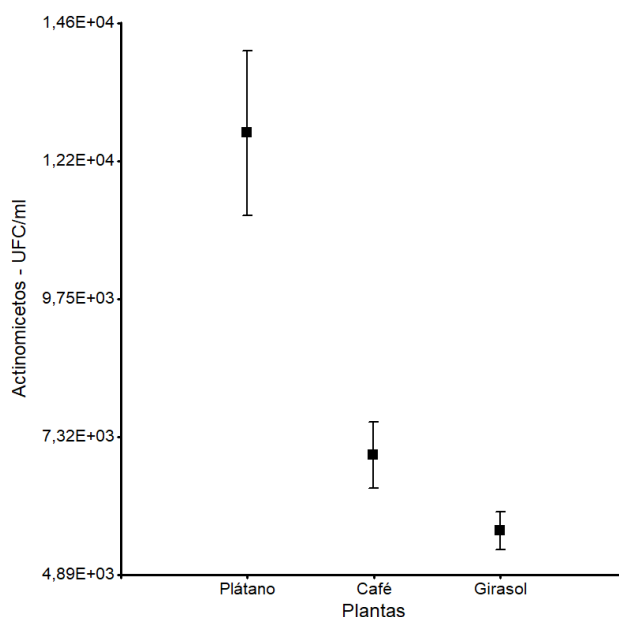


Figura 165: Comparación de UFC de actinomicetos en los medios de cultivo del piso altitudinal uno

b. Unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos

La respuesta de las unidades formadoras de colonias de actinomicetos por mililitro de solución de las diferentes especies vegetales en el piso altitudinal dos, se presentan en el cuadro 42. Cada planta presentó diferente potencial para formar colonias de actinomicetos, es relevante la respuesta observada en cada repetición.

Cuadro 42: Respuesta de UFC.ml⁻¹ para de actinomicetos en el piso altitudinal dos

Piso	Planta	Repetición	Respuesta (UFC.ml ⁻¹)
P2	Ruda	R1	1,00 X 10 ⁴
P2	Ruda	R2	7,00 X 10 ³
P2	Ruda	R3	9,00 X 10 ³
P2	Romero	R1	1,70 X 10 ⁵
P2	Romero	R2	1,50 X 10 ⁵
P2	Romero	R3	1,60 X 10 ⁵
P2	Cedrón	R1	7,00 X 10 ⁴
P2	Cedrón	R2	6,00 X 10 ⁴
P2	Cedrón	R3	7,00 X 10 ⁴
P2	Menta	R1	1,30 X 10 ⁴
P2	Menta	R2	5,00 X 10 ³
P2	Menta	R3	9,00 X 10 ³

Mediante la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de actinomicetos en el piso altitudinal dos, se constata tres niveles de significancia (cuadro 43). En el rango A con una media de $1,60 \times 10^5$ UFC.ml⁻¹ se ubica la planta de romero (*Rosmarinus officinalis*), en el rango B con una media de $6,67 \times 10^4$ UFC.ml⁻¹ se presenta la planta de cedrón (*Aloysia triphylla*). La planta de menta (*Mentha piperita*) con una media de $9,00 \times 10^3$ UFC.ml⁻¹ y la planta de ruda (*Ruta graveolens* L.) con una media de $8,67 \times 10^3$ UFC.ml⁻¹ se ubican en el rango C.

Cuadro 43: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos del piso altitudinal dos

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia
Romero	$1,60 \times 10^5$	$5,77 \times 10^3$	A
Cedrón	$6,67 \times 10^4$	$3,33 \times 10^3$	B
Menta	$9,00 \times 10^3$	$2,31 \times 10^3$	C
Ruda	$8,67 \times 10^3$	$8,82 \times 10^2$	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la figura 166, se comprueba que la planta de romero (*Rosmarinus officinalis*) presenta un potencial superior a las plantas de cedrón (*Aloysia triphylla*), menta (*Mentha piperita*) y ruda (*Ruta graveolens* L.) para unidades formadoras de colonias de actinomicetos.

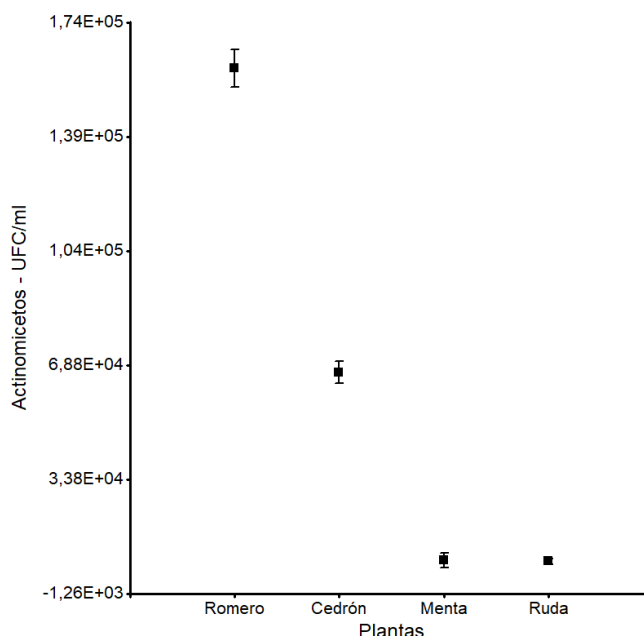


Figura 166: Comparación de UFC de actinomicetos en los en los medios de cultivo de microorganismos benéficos del piso altitudinal dos

c. Unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos del piso altitudinal tres

La respuesta de las unidades formadoras de colonias de actinomicetos por mililitro de solución de las diferentes especies vegetales en el piso altitudinal tres, se presentan en el cuadro 44. Todas las plantas en estudio presentaron potencial para formar colonias de actinomicetos lo cual se evidenció en la respuesta verificada en cada una de las repeticiones.

Cuadro 44: Respuesta de UFC.ml⁻¹ de actinomicetos en el piso altitudinal tres

Piso	Planta	Repetición	Respuesta (UFC.ml ⁻¹)
P3	Diente de león	R1	1,50 X 10 ⁵
P3	Diente de león	R2	1,10 X 10 ⁵
P3	Diente de león	R3	1,30 X 10 ⁵
P3	Manzanilla	R1	9,00 X 10 ⁴
P3	Manzanilla	R2	3,00 X 10 ⁴
P3	Manzanilla	R3	6,00 X 10 ⁴
P3	Geranio	R1	1,20 X 10 ⁵
P3	Geranio	R2	9,00 X 10 ⁴
P3	Geranio	R3	1,00 X 10 ⁵
P3	Altamisa	R1	2,30 X 10 ⁴
P3	Altamisa	R2	1,00 X 10 ⁴
P3	Altamisa	R3	1,20 X 10 ⁴
P3	Canayuyo	R1	1,40 X 10 ⁵
P3	Canayuyo	R2	9,00 X 10 ⁴
P3	Canayuyo	R3	1,20 X 10 ⁵

Según la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de actinomicetos en el piso altitudinal tres (cuadro 45), se presentan tres rangos de significancia.

Cuadro 45: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los medios de cultivo del piso altitudinal tres

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia
Diente de León	1,30 X 10 ⁵	1,15 X 10 ⁴	A
Canayuyo	1,17 X 10 ⁵	1,45 X 10 ⁴	A
Geranio	1,03 X 10 ⁵	8,82 X 10 ³	A
Manzanilla	6,00 X 10 ⁴	1,73 X 10 ⁴	B
Altamisa	1,50 X 10 ⁴	4,04 X 10 ³	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

En el rango A se encuentran la planta diente de león (*Taraxacum officinale* Weber.) con una media de 1,30 X 10⁵ UFC.ml⁻¹, la planta de canayuyo (*Sonchus oleraceus*) con una media de 1,17 X 10⁵ UFC.ml⁻¹ y la planta de geranio (*Pelargonium graveolens*) con una

media de $1,03 \times 10^5$ UFC.ml⁻¹. La planta de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.), con una media de $6,00 \times 10^4$ UFC.ml⁻¹ se encuentra en el rango B; la planta de altamisa (*Artemisia vulgaris*) con una media de $1,50 \times 10^4$ UFC.ml⁻¹ se ubica en el rango C.

En la figura 167, se confirma que la planta con más alto potencial para unidades formadoras de colonias de actinomicetos fue la planta diente de león (*Taraxacum officinale* Weber.), no obstante, la planta de canayuyo (*Sonchus oleraceus*) no difirió estadísticamente con esta ni con la planta de geranio (*Pelargonium graveolens*). La planta con más bajo potencial para unidades formadoras de colonias de actinomicetos fue la planta de altamisa.

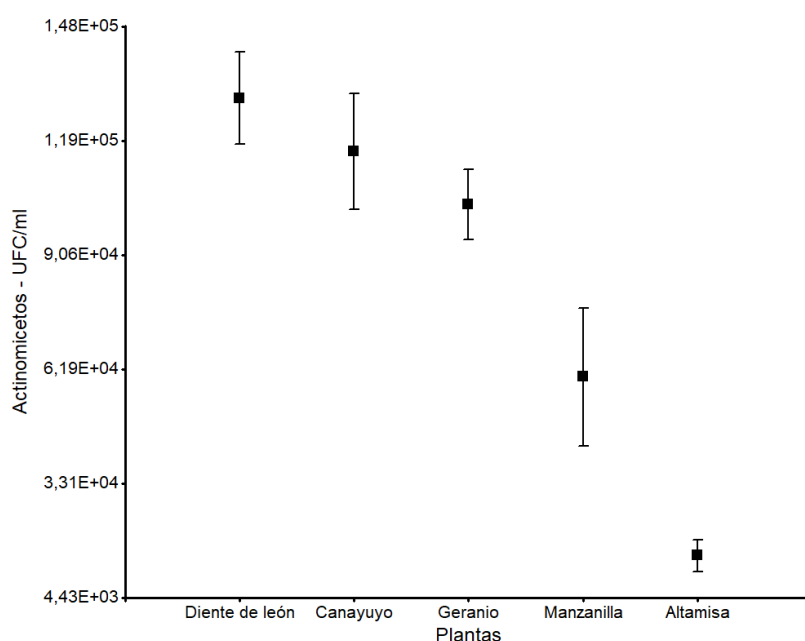


Figura 167: Comparación de UFC de actinomicetos en los medios de cultivo del piso altitudinal tres

d. Unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos de tres pisos altitudinales

Según la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos de tres pisos altitudinales (cuadro 46), se distinguen cinco niveles de significancia. En el rango A se ubica solamente la planta de romero (*Rosmarinus officinalis*) con una media de $1,60 \times 10^5$ UFC.ml⁻¹. En el rango B se ubican tres plantas; diente de león (*Taraxacum officinale* Weber.) con una media de $1,30 \times 10^5$ UFC.ml⁻¹, canayuyo (*Sonchus oleraceus*) con una media de $1,17 \times 10^5$ UFC.ml⁻¹ y lageranio (*Pelargonium graveolens*) con una media de $1,03 \times 10^5$ UFC.ml⁻¹. En el rango C están las plantas de cedrón (*Aloysia triphylla*) con una media de 6,67

X 10^4 UFC.ml⁻¹ así como la planta de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) con una media de $6,00 \times 10^4$ UFC.ml⁻¹. No se evidencia diferencias estadísticas entre las plantas de menta (*Mentha piperita*), ruda (*Ruta graveolens* L.), café (*Coffea arabica* L.) y girasol (*Tithonia diversifolia*) que se ubican dentro del mismo rango de significancia E.

Cuadro 46: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de actinomicetos en consorcios microbianos de tres pisos altitudinales

Planta	Medias	Error Estándar	Significancia	
Romero	$1,60 \times 10^5$	$5,77 \times 10^3$	A	
Diente de León	$1,30 \times 10^5$	$1,15 \times 10^4$	B	
Canayuyo	$1,17 \times 10^5$	$1,45 \times 10^4$	B	
Geranio	$1,03 \times 10^5$	$8,82 \times 10^3$	B	
Cedrón	$6,67 \times 10^4$	$3,33 \times 10^3$	C	
Manzanilla	$6,00 \times 10^4$	$1,73 \times 10^4$	C	
Altamisa	$1,50 \times 10^4$	$4,04 \times 10^3$	D	
Plátano	$1,27 \times 10^4$	$1,45 \times 10^3$	D	
Menta	$9,00 \times 10^3$	$2,31 \times 10^3$	D	E
Ruda	$8,67 \times 10^3$	$8,82 \times 10^2$	D	E
Café	$7,00 \times 10^3$	$5,77 \times 10^2$	D	E
Girasol	$5,67 \times 10^3$	$3,33 \times 10^2$	E	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la figura 168, se observa que la planta de romero (*Rosmarinus officinalis*) es la que presenta el más alto potencial para unidades formadoras de colonias de actinomicetos. Las plantas de menta (*Mentha piperita*), ruda (*Ruta graveolens* L.), café (*Coffea arabica* L.) y girasol (*Tithonia diversifolia*) presentaron el más bajo potencial para unidades formadoras de colonias de actinomicetos.

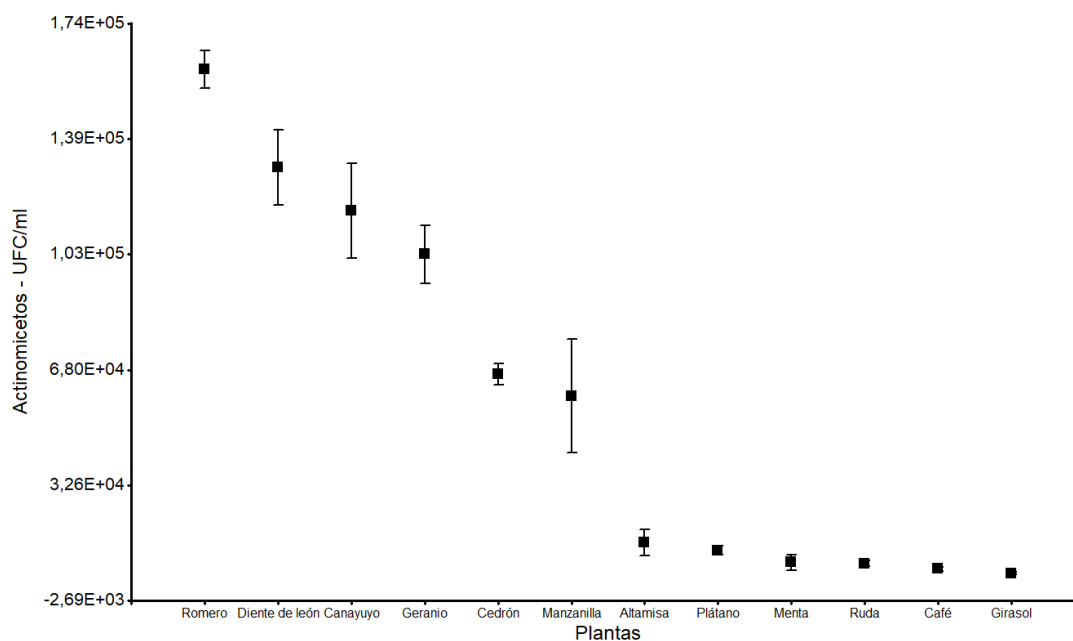


Figura 168: Comparación de UFC de actinomicetos en los medios de cultivo de tres pisos altitudinales

Los resultados obtenidos evidencian la presencia de actinomicetos en todas las especies vegetales de los tres pisos altitudinales. El mayor número de unidades formadoras de colonias de actinomicetos, se comprobó en la planta de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) que es una hierba medicinal ampliamente utilizada en la medicina popular de todo el mundo (Hcini *et al.*, 2013), en tratamientos analgésicos, anti inflamatorios y de trastornos gastrointestinales (Takayama *et al.*, 2016), debido a sus propiedades químicas.

Diecisiete bioactivos se han identificado en el extracto metanólico de *R. officinalis*, se demostró la presencia de alcanos, compuestos flúor alifáticos, alcoholes, éteres, ácidos carboxílicos, ésteres, compuestos nitrosos, alcanos, aldehídos, compuestos cetónicos (Hameed *et al.*, 2015). En el análisis de los principales constituyentes de los aceites reveló 51 compuestos, de los cuales los principales constituyentes fueron eucaliptol (11,6%), 3-careno (10,1%), ciclofencheno (9,9%), 1-alcanfor (7,6%), 1-borneol (Z) - cininerona (5,5%), α -linalol (4,4%) y cariofileno (3,6%), etc. (Jan *et al.*, 2017).

Los compuestos químicos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) son utilizados en la medicina tradicional, demuestran alta afinidad para las unidades formadoras de colonias de actinomicetos, por no ser tóxicos.

En la planta de falso girasol *Tithonia diversifolia* que es una maleza invasora comúnmente encontrada en ecosistemas tropicales (Sampaio *et al.*, 2016), se determinó el menor potencial para unidades formadoras de colonias de actinomicetos, esta especie vegetal es una fuente importante de diversos productos naturales, particularmente lactonas sesquiterpénicas, diterpenos y flavonoides (Chagas-Paula *et al.*, 2012), que no permitirían que estos microorganismos benéficos desarrollen de forma ideal. Se sabe que la planta produce tagitininas, que son lactonas sesquiterpénicas con un sabor amargo dotado de toxicidad contra varios insectos tales como mosquitos, áfidos y escarabajos (Pavela *et al.*, 2016), el aceite presenta una composición compleja de aproximadamente 50 compuestos, una mezcla de monoterpenos y sesquiterpenos, 54% y 46%, respectivamente. Veinticuatro por ciento de los 50 compuestos y la mayoría de los monoterpenos se encontraron en la literatura relacionados con algunas propiedades de repelencia (Wanzala *et al.*, 2016) lo cual también sería tóxico para microorganismos benéficos, ya que los metabolitos secundarios del aceite de *T. diversifolia* resultan eficaces contra las bacterias y algunas especies de hongos (Agboola *et al.*, 2016).

e. Unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos de acuerdo al piso altitudinal

Conforme a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de actinomicetos en tres pisos altitudinales, no existe significancia entre el piso altitudinal tres (P3) y el piso altitudinal dos (P2) los cuales difieren estadísticamente con el piso altitudinal uno (P1), cuadro 47.

Cuadro 47: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para unidades formadoras de colonias de actinomicetos en los consorcios microbianos de acuerdo al piso altitudinal.

Piso	Medias	Error Estándar	Significancia
P3	$8,50 \times 10^4$	$1,22 \times 10^4$	A
P2	$6,11 \times 10^4$	$1,87 \times 10^4$	A
P1	$8,44 \times 10^3$	$1,17 \times 10^3$	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En concordancia a la figura 169, el piso altitudinal tres presenta el más alto potencial para unidades formadoras de colonias de actinomicetos, mientras que el piso altitudinal uno presenta el más bajo potencial.

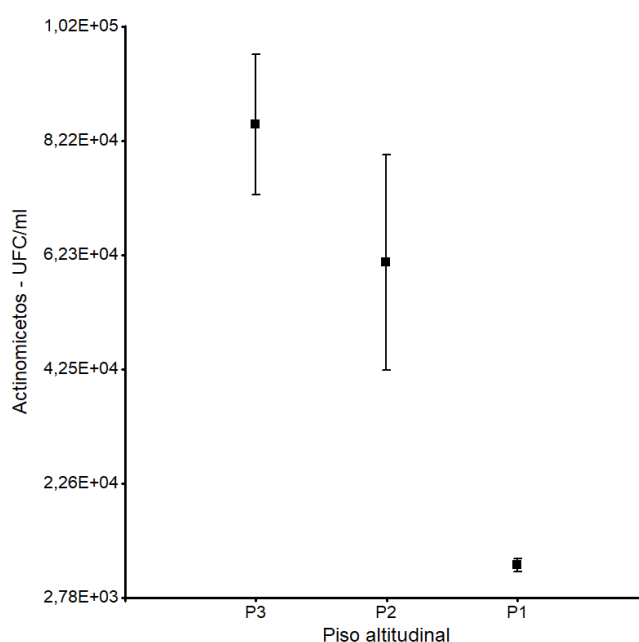


Figura 169: Comparación de UFC de actinomicetos en los medios de cultivo de microorganismos benéficos de acuerdo al piso altitudinal

En el análisis de unidades formadoras de colonias de actinomicetos de acuerdo al piso altitudinal, se constató que a 2550 ms.n.m. es el mayor potencial para UFC de los microorganismos benéficos en estudio, esto se debe a que en conjunto las especies vegetales cultivadas en el piso altitudinal tres, superan a las unidades formadoras de

colonias de actinomicetos de la planta de romero del piso altitudinal dos, donde esta es la única especie que se destaca. En el piso altitudinal uno, todas las plantas presentan bajo potencial para UFC de actinomicetos, por lo tanto, en grupo son poco representativas.

Las tres zonas, presentan condiciones climáticas diferentes. De acuerdo con Köppen y Geiger (Merkel 2017), el clima en la zona de estudio se clasifica como sigue: Gualceco Cfb, temperatura media anual es 17.1 °C; Daniel Córdova Toral Cfb, temperatura media anual es 14.4 °C y Girón Cwb, temperatura media anual es 17.2 °C. Las plantas en análisis del piso altitudinal tres se desarrollan sin dificultad bajo las condiciones imperantes del piso altitudinal dos, por lo tanto, sería oportuna evaluar la concentración microbiana en una misma especie vegetal cultivada en diferentes altitudes con la finalidad de evaluar la incidencia del clima en el desarrollo microbiano benéfico.

Finalmente, del análisis de los resultados obtenidos de unidades formadoras de colonias de levaduras, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp. y actinomicetos, se demuestra que cada especie vegetal presenta un potencial único para unidades formadoras de colonias de microorganismos benéficos (figura 170 y 171).

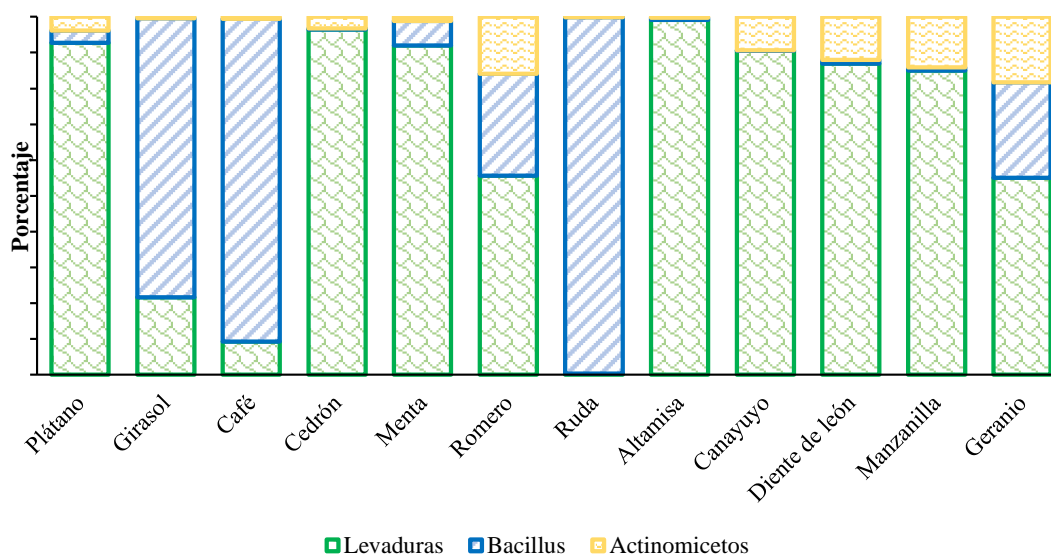


Figura 170: Potencial de especies vegetales para unidades formadoras de colonias de levaduras, *Bacillus* spp., y actinomicetos

Las unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp., es muy superior a las UFC de los otros microorganismos y no permite la comparación dentro de un solo gráfico, razón por la que se presenta por separado.

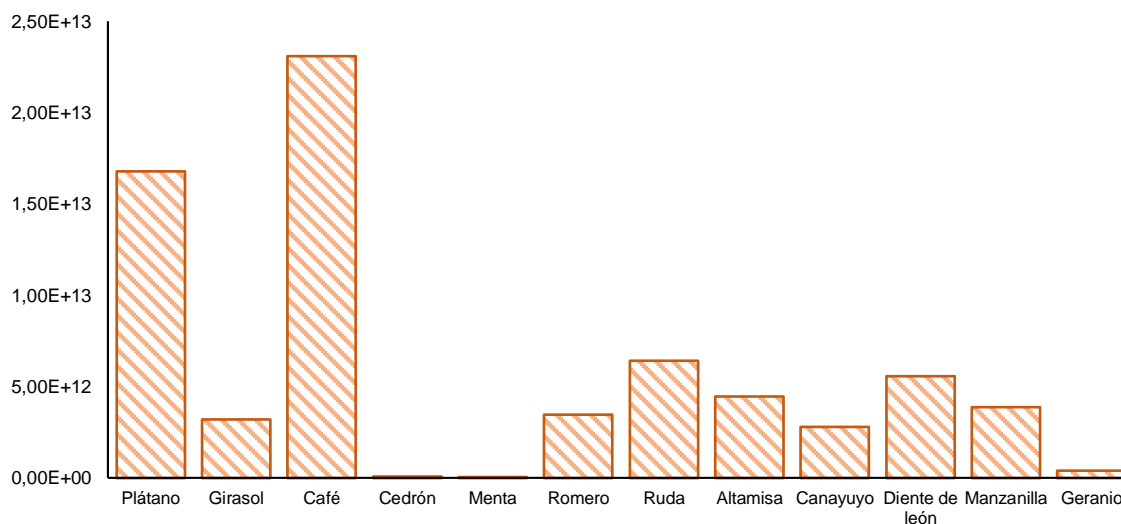


Figura 171: Potencial de especies vegetales para unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* spp.

Mediante la comparación de medias, usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) se determinó que en cada muestra vegetal difiere el potencial para unidades formadoras de colonias de microorganismos benéficos en estudio.

Para levaduras existe diferencia significativa entre altamisa (*Artemisia vulgaris*) con $5,43 \times 10^6$ UFC.ml⁻¹ que presentó el más alto potencial de UFC y las demás especies vegetales; las plantas del piso altitudinal tres, así como las del piso altitudinal dos, presentaron el mejor potencial para UFC de levaduras.

Con referencia a unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp., la planta de ruda (*Ruta graveolens* L.) con una media de $1,46 \times 10^7$ UFC.ml⁻¹ presentó el más alto potencial y difiere estadísticamente de todas las demás; no existe diferencia significativa para UFC de *Bacillus* spp., entre pisos altitudinales.

En cuanto a *Lactobacillus* spp., las plantas de café (*Coffea arabica* L.) así como la de plátano (*Musa paradisiaca* L.) con medias de $2,31 \times 10^{13}$ UFC.ml⁻¹ y $1,68 \times 10^{13}$ UFC.ml⁻¹ respectivamente, son las que evidenciaron un elevadísimo potencial para unidades formadoras de colonias y difieren estadísticamente de las demás especies vegetales; en el piso altitudinal uno, se registró el mejor potencial para UFC de *Lactobacillus* spp.

Para actinomicetos, la planta de romero (*Rosmarinus officinalis*) con una media de $1,60 \times 10^5$ UFC.ml⁻¹ fue la que presentó el más alto potencial para UFC, se distingue

estadísticamente de todas las demás especies vegetales en estudio; los pisos altitudinales tres y dos evidenciaron el mayor potencial para UFC de actinomicetos.

En ninguna de las muestras en análisis, se determinó unidades formadoras de colonias de *Pseudomonas* spp., probablemente debido a que todas fueron tomadas de la parte aérea de las plantas y las *Pseudomonas* spp., se encuentran habitualmente en el suelo.

Cada especie vegetal presenta un potencial único para unidades formadoras de colonias de determinados microorganismos <<*las actividades de las plantas, la nutrición y los componentes celulares proveen una fuente de nutrimentos para dichos microorganismos*>> (Rosas *et al.*, 2004). Los contenidos de la planta, particularmente los componentes químicos y aceites esenciales son metabolitos secundarios no nutritivos de las plantas que tienen propiedades protectoras o preventivas de enfermedades (Sharma, 2017), por lo tanto se deduce que las características de las especies vegetales <<*los microorganismos que forman parte de la flora residente (autóctonos) se encuentran normalmente en el ambiente que los acoge*>> (Palomino, 1995) e indirectamente las condiciones ambientales inciden principalmente en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos benéficos, debido a que los hábitats naturales microbianos son extremadamente diversos (Madigan *et al.*, 2004).

Las propiedades químicas de las especies vegetales son únicas y difieren entre ellas, <<*los microorganismos pueden ser selectivos con respecto al tipo de sustratos en los que crecen*>> (Coyne, 2000). Las muestras de las plantas provienen de tres pisos altitudinales con características climatológicas diferentes entre sí, por lo tanto <<*el crecimiento de los microorganismos está influido notablemente por la naturaleza química y física del ambiente*>> (Prescott, 2002), no todos los microorganismos benéficos presentan el mismo potencial para unidades formadoras de colonias en los tres pisos altitudinales ya que <<*los requerimientos de los distintos microorganismos en cuanto a la composición del medio de cultivo y a las demás condiciones ambientales son muy variables*>> (Schlegel, 1997).

Entre las condiciones ambientales la temperatura es uno de los factores más importantes que afectan el desarrollo de los microorganismos debido a que <<*dependiendo de su procedencia requerirá una temperatura óptima determinada para su crecimiento*>> (Palomino, 1995). Los tres pisos altitudinales difieren en condiciones climáticas y <<*las temperaturas cardinales o fundamentales definen las temperaturas mínima, óptima y*

máxima en la que crece cada microorganismo>> (Madigan *et al.*, 2004) la temperatura de manera indirecta sería una limitante para el crecimiento de los microorganismos benéficos debido a que *<<la temperatura ambiental afecta intensamente a los microorganismos, así como al resto de organismos>>* (Prescott, 2002), pero en los pisos altitudinales en estudio el delta no es significativo, más bien la temperatura condicionaría el éxito en el desarrollo de las especies vegetales.

Además, la actividad del agua es un factor importante para el desarrollo de los microorganismos benéficos; para crecer y reproducirse los microorganismos necesitan agua y la disponibilidad de esta en el ambiente es muy variable (Palomino, 1995) de acuerdo al piso altitudinal, por lo que se especula que el agua también afecta la presencia microbiana benéfica debido a que *<<el crecimiento de los microorganismos va ligado a la presencia de agua >>* (Schlegel, 1997) en el ambiente, *<<algunos microorganismos son capaces de crecer mejor con potenciales de agua reducidos, e incluso algunos elevados requieren niveles de sales para crecer >>* (Madigan *et al.*, 2004).

La nutrición de cada microorganismo difiere y se considera que está incide en el crecimiento de los microorganismos benéficos *<<las sustancias disueltas en el agua, a partir de las cuales los microorganismos forman su material celular y obtienen energía, son los nutrientes>>* (Schlegel, 1997), las unidades formadoras de colonias de microorganismos benéficos varían de acuerdo a la especie vegetal y piso altitudinal, y *<<como todo ser vivo, los microorganismos necesitan de nutrientes y determinadas condiciones para poder crecer y desarrollar sus diversas funciones vitales>>* (Palomino, 1995).

Es evidente que cada planta tiene una composición química única, lo cual le permitirá hospedar con mayor facilidad a unos microorganismos más que a otros. La composición química cualitativa, así como el contenido cuantitativo de los componentes individuales de las plantas y los aceites esenciales, pueden diferir mucho y dependen de varios factores (morfológicos, partes, agrícolas, suelo, condiciones climáticas, etc.) (Melnyk *et al.*, 2015).

En los últimos decenios se ha explorado una amplia gama de plantas medicinales y aromáticas por sus aceites esenciales que son compuestos volátiles complejos, sintetizados naturalmente en diferentes partes de las plantas durante el proceso del metabolismo secundario. Los aceites esenciales tienen un gran potencial en el campo

de la biomedicina ya que efectivamente destruyen varios patógenos bacterianos, fúngicos y virales (Swamy *et al.*, 2016), es necesario más estudios que refuercen esta investigación con respecto al potencial de las especies vegetales para unidades formadoras de colonias de microorganismos benéficos.

4.3 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS

4.3.1 Identificación de levaduras mediante perfil numérico de los sistemas miniaturizados API 20 CAUX V5.0

Del perfil numérico de las pruebas API 20 CAUX V50 de las muestras analizadas (anexo 20), con *software* específico, se confirmaron varios géneros y especies de levaduras (cuadro 48).

En la muestra M3P2 que corresponde a la planta de cedrón (*Aloysia triphylla*) se identificó certeramente la presencia de *Saccharomyces cerevisiae* 2 y *Saccharomyces cerevisiae* 1. En la muestra M1P3 que concierne a la planta diente de león (*Taraxacum officinale* Weber.) se identificó claramente la presencia de *Rhodotorula minuta* que son levaduras productoras de caretenoides. En la muestra M4P2 que corresponde a la planta menta (*Mentha piperita*) se identificó *Kloeckera* spp.

Cuadro 48: Levaduras identificadas mediante perfil numérico de los sistemas miniaturizados API 20 CAUX V50

Nº de Muestras	Muestra	Microorganismos identificados
1	M3P2 Le2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1
2	M3P2 Le4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2
3	M4P2 Le3	<i>Kloeckera</i> spp.
4	M1P3 Le3	<i>Rhodotorula minuta</i>

Saccharomyces cerevisiae es la principal especie utilizada por los fabricantes de vino para convertir el azúcar en alcohol durante la fermentación del licor (Hyma *et al.*, 2011), además es considerada como un promotor del crecimiento de las plantas, lo cual, en la última década la convirtió en una alternativa positiva a los fertilizantes utilizados, con seguridad para uso humano, los animales y el medioambiente (Shalaby y El-Nady, 2008). También, *Saccharomyces cerevisiae* se destaca por su versatilidad y eficiencia en la eliminación de metales del suelo y medio líquido; en el proceso de biorremediación ambiental, han demostrado ser eficientes en la bioacumulación de metales pesados (Damodaran *et al.*,

2011), los resultados mostraron una disminución de 44,52%, 26,26%, 51,54%, 43,20% y 65,19% de cobre, zinc, manganeso, hierro y níquel, respectivamente; es un microorganismo potencial para la remediación de metales pesados en efluentes (Izah *et al.*, 2017). Investigaciones confirmaron el impacto positivo de la inoculación de levadura con el 3% de sustancias humectantes, lo cual modificó el suelo con menos del 75% de fertilizantes minerales de NPK, por lo que causó un efecto positivo en el crecimiento y rendimiento del maíz (Tolba *et al.*, 2016).

Rhodotorula minuta es una levadura roja, que produce un citocromo P450, tentativamente llamado P450rm, catalizando la formación de isobuteno a partir de isovalerato. El sistema P450rm-monooxigenasa en microsomas de *R. minuta* podría funcionar en la degradación de L-fenilalanina en la ruta al β -cetoadipato (Fukuda *et al.*, 1996). *Rhodotorula minuta* producen ciertos metabolitos secundarios comercialmente importantes como antibióticos, pigmentos carotenoides, toxinas, etc., (Yadav y Prabha 2017); los carotenoides representan un gran grupo de diversos pigmentos naturales que aseguran la coloración típica de las plantas, microorganismos y varios animales, por lo tanto, se aplican en diferentes campos industriales, tales como la industria de farmacia, cosmética, alimentos y piensos (Tkáčová *et al.*, 2015), el carotenoide es un grupo de pigmentos y su producción es un fenómeno natural en el caso de ciertos microorganismos. Entre las levaduras, *Rhodotorula* sp., produce pigmentos carotenoides intra y extracelulares (Yadav y Prabha, 2017). Existe un mayor interés en el carotenoio como pigmentos antioxidantes naturales con muchas actividades biológicas importantes que pueden reducir las enfermedades crónicas (Kanzly *et al.*, 2015).

En estudios realizados, los resultados de la prueba preliminar en un huerto experimental (datos no proporcionados) sugirieron que *R. minuta* fue tan efectivo como el fungicida químico Mancozeb para el control de la antracnosis del mango; esta es la primera vez que se informa que la levadura *R. minuta* es un microorganismo antagonista del patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (Patiño-Vera *et al.*, 2005).

La levadura *Kloeckera apiculata* cepa 34-9 es un antagonista con actividad de control biológico contra las enfermedades poscosecha de los cítricos, se descubrió que pudo formar biopelículas en cítricos e incrustarse en una matriz extracelular, que creó una barrera mecánica interpuesta entre la superficie de la herida y el patógeno (Pu *et al.*, 2014). De *K. apiculata* se aisló una sustancia antifúngica, 2-feniletanol (PEA), y se demostró que tenía

actividad antimicrobiana contra hongos fitopatógenos seleccionados (*Penicillium digitatum* y *P. italicum*) que son importantes enfermedades poscosecha de los cítricos (Liu *et al.*, 2014).

En el estudio de la catalasa producida por *Kloeckera* sp., las células mostraron un cierto grado de similaridad en sus propiedades inmunoquímicas, a la enzima purificada a partir de *Candida tropicalis* cultivada con alcanos (Tkáčová *et al.*, 2015).

Todas las levaduras identificadas en el presente estudio, revisten importancia agrícola, ambiental y comercial, ya que constituyen un gran grupo de microorganismos caracterizados por la capacidad para crecer y sobrevivir en condiciones diferentes y estresantes para luego colonizar un amplio rango de ecosistemas ambientales y humanos (Muccilli y Restuccia, 2015), no obstante, entre los microorganismos del suelo, en comparación con bacterias, actinomicetos y hongos filamentosos antagonistas, las levaduras han recibido poca atención como agentes de control biológico de patógenos de plantas (El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006).

Las células de levadura se emplean a menudo en procesos de fermentación industrial por su capacidad para convertir eficientemente concentraciones relativamente altas de azúcares en etanol y dióxido de carbono. Además, las células de levadura de fermentación producen una amplia gama de otros compuestos, incluyendo varios alcoholes superiores, compuestos de carbonilo, compuestos fenólicos, derivados de ácidos grasos y compuestos de azufre (Dzialo *et al.*, 2017), en los tres pisos altitudinales, se encuentran levaduras con un gran potencial para la industria, por la capacidad de ciertas levaduras para multiplicarse rápidamente, así como para producir antibióticos, enzimas y reguladores del crecimiento de las plantas, (El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006); merecen especial atención para explotarlos como agentes de biocontrol y promotores del crecimiento vegetal.

4.3.2 Identificación de *Bacillus* spp., mediante código de los sistemas miniaturizados API 50 CHB V4.1

Utilizando las pruebas API 50 CHB V4.1 (anexo 21) se identificaron varias especies de *Bacillus* en los tres pisos altitudinales (cuadro 49).

Bacillus subtilis/amyloliquefaciens se identificó de muy buena manera en todos los pisos altitudinales; en el piso altitudinal uno se encontró en la muestra M3P1 que corresponde a la planta girasol (*Tithonia diversifolia*), en el piso altitudinal dos se determinó en la muestra

M1P2 que concierne a la planta ruda (*Ruta graveolens* L.) y en el piso altitudinal tres se encontró en la muestra M5P3 que pertenece a la planta canayuyo (*Sonchus oleraceus*).

Mientras que *Bacillus licheniformis* se encontró únicamente en muestras vegetales obtenidas a 2250 y 2550 metros sobre el nivel del mar; en el piso altitudinal dos se identificó en la muestra M2P2 concerniente a la planta romero (*Rosmarinus officinalis*), en el piso altitudinal tres se identificó en la muestra M2P3 que pertenece a la planta manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.), además en la muestras M3P3 que corresponde a la planta geranio (*Pelargonium graveolens*) y M4P3 que pertenece a la planta altamisa (*Artemisia vulgaris*).

Según la identificación realizada, se evidencia presencia de *Bacillus cereus* 2 en el piso altitudinal uno, en la muestra M1P1 correspondiente a la planta café (*Coffea arabica* L.).

Cuadro 49: *Bacillus* identificados mediante código de los sistemas miniaturizados API 50 CHB V4.1

N° de Muestras	Muestra	Microorganismos identificados
1	M1P1B4	<i>Bacillus cereus</i> 2
2	M3P1B1	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>
3	M2P2B1	<i>Bacillus licheniformis</i>
4	M2P2B3	<i>Bacillus licheniformis</i>
5	M1P2B1	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>
6	M4P3B2	<i>Bacillus licheniformis</i>
7	M5P3B1	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>
8	M3P3B1	<i>Bacillus licheniformis</i>
9	M5P3B2	<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>
10	M2P3B1	<i>Bacillus licheniformis</i>

El gran género bacteriano *Bacillus* está ampliamente distribuido en el medio ambiente y es capaz de colonizar nichos muy diversos (Diomandé *et al.*, 2015), en los últimos años, en especial algunas especies han recibido considerable atención para el control biológico de muchas enfermedades fúngicas (Zhao *et al.*, 2013).

Bacillus subtilis son bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPB) de muchos cultivos y se usan como inoculantes (Posada *et al.*, 2016). *Bacillus subtilis* y especies estrechamente relacionadas, se conocen por producir una variedad de sustancias antimicrobianas, partes de sus genomas se dedican a los genes que participan en la producción de sustancias antimicrobianas (Stein, 2005). El *Bacillus subtilis* XF-1 es una bacteria grampositiva asociada a plantas que estimula el crecimiento de vegetal, además produce metabolitos secundarios que suprimen los patógenos del suelo (Guo *et al.*, 2015).

Las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* son capaces de suprimir los patógenos del suelo, a través de la secreción de una serie de lipopéptidos y la colonización de raíces; la capacidad de formación de biopelículas se considera un requisito previo para una eficiente colonización de raíces (Xu *et al.*, 2012), en el análisis de producción de compuestos antimicrobianos primarios reveló que *B. amyloliquefaciens* exhibe una actividad significativa contra todas las bacterias y hongos ensayados en comparación con otras cepas (Kadaikunnan *et al.*, 2015).

B. amyloliquefaciens SQR9 puede usarse como un agente promotor del crecimiento de las plantas para aumentar el rendimiento de los cultivos, el crecimiento vegetal promovido por esta cepa rizosférica se puede atribuir a múltiples factores, incluida la producción de fitohormonas, compuestos volátiles y enzimas extracelulares (Shao *et al.*, 2014).

Bacillus licheniformis es una bacteria grampositiva del suelo formadora de esporas que se utiliza en la industria de la biotecnología para fabricar enzimas, antibióticos, productos bioquímicos y productos de consumo. Esta especie está estrechamente relacionada con el organismo modelo bien estudiado *Bacillus subtilis*, y produce una variedad de enzimas extracelulares que pueden contribuir al ciclo de nutrientes en la naturaleza (Rey *et al.*, 2004).

Todos estos aislados predominantes de cepas de *B. licheniformis* muestran una capacidad significativa para producir algunas de las principales enzimas hidrolíticas extracelulares de importancia industrial, incluyendo α -amilasa, glucoamilasa, proteasa, pectinasa y celulasa; tienen un gran potencial como cepas comerciales cuando se les proporciona condiciones óptimas de fermentación (Ghani *et al.*, 2013). En estudios de campo, la bacteria aumentó significativamente la altura de las plantas y el área foliar en los cultivos, esta cepa tuvo una considerable colonización y capacidad competitiva, y podría usarse como biofertilizante o agente de control biológico sin alterar el manejo normal en invernaderos (García *et al.*, 2004).

En los tres pisos altitudinales se encuentran importantes especies de *Bacillus* que presentan características beneficiosas, la flora en estudio de la provincia del Azuay constituye una fuente microbiana importante para aplicación agrícola con la finalidad de mejorar la sanidad de los cultivos y el rendimiento de las plantas, propendiendo a minimizar el uso de productos químicamente procesados.

Las bacterias del grupo de *Bacillus cereus*, son bacterias Gram-positivas de formación de esporas ubicadas de forma ubicua. A pesar del alto grado de similitud genética entre las

diferentes cepas, muestran una fuerte variabilidad fenotípica, desde cepas de mamíferos o entomopatógenos a saprófitas que habitan en el suelo, y de cepas psicrófilas a cepas termotolerantes (Patiño-Navarrete y Sanchis, 2017). Estudios sugieren que *B. cereus* se puede usar en tierras agrícolas salinizadas para aumentar la productividad de los cultivos, ya que, la inoculación en el suelo aumenta la actividad de la deshidrogenasa, la fosfatasa alcalina, el carbono de la biomasa microbiana, el fósforo disponible y el carbono orgánico total bajo estrés salino en comparación con el tratamiento con solución salina sola (Islam *et al.*, 2016).

Las cepas del grupo *Bacillus cereus* muestran una impresionante diversidad ecológica, que va desde su ciclo de vida saprofita en el suelo hasta la simbiosis (comensales y mutualistas) cerca de las raíces de las plantas y en las entrañas de los insectos y mamíferos a varios patógenos en diversos insectos y mamíferos hospedadores. Durante todos estos diferentes estilos de vida ecológicos, sus toxinas juegan un papel importante, roles que van desde proporcionar ventajas competitivas dentro de las comunidades microbianas a la inhibición de organismos patógenos específicos para su anfitrión y logro de infecciones dañando los tejidos de su huésped (Ceuppens *et al.*, 2013).

En contacto con los humanos, merece especial atención *Bacillus cereus* debido a su capacidad para causar enfermedades (Ceuppens *et al.*, 2013), son omnipresentes en la naturaleza y, por lo tanto, se encuentra naturalmente en una amplia gama de materias primas y productos alimenticios, las esporas son resistentes a la desecación y al calor, pueden sobrevivir al almacenamiento y la cocción en seco. Las células vegetativas producen varias toxinas que, en cantidades suficientes, pueden causar vómitos y/o diarrea, dependiendo de las toxinas producidas (Pitt *et al.*, 2015).

4.3.3 Identificación de *Lactobacillus* spp., mediante código de los sistemas miniaturizados API 50 CHL V5.2

Se identificó especies de *Lactobacillus* mediante las pruebas API 50 CHL V5.2 (anexo 22), los principales microorganismos reconocidos se presentan en el (cuadro 50).

Cuadro 50: *Lactobacillus* identificados mediante código de los sistemas miniaturizados API 50 CHB V4.1

N° de Muestras	Muestra	Microorganismos identificados
1	M1P1L1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp
2	M3P1L2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp
3	M2P2L2	<i>Lactobacillus plantarum</i>
4	M2P2L1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp
5	M3P2L1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp
6	M1P3L1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp
7	M2P3L1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
8	M4P3L1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp
9	M4P3L2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp
10	M4P3L3	<i>Pediococcus damnosus</i> 1

Lactobacillus delbrueckii ssp se encontraron en las muestras vegetales de todos los pisos altitudinales. En el piso altitudinal uno se constató en la muestra M1P1 que corresponde a la planta café (*Coffea arabica* L.), así como también en la muestra M3P1 que pertenece a la planta girasol (*Tithonia diversifolia*); en el piso altitudinal dos se identificó en la muestra M2P2 relativo a la planta romero (*Rosmarinus officinalis*) y en la muestra M3P2 concerniente a la planta cedrón (*Aloysia triphylla*); en el piso altitudinal tres se verificó en la muestra M1P3 perteneciente a la planta diente de león (*Taraxacum officinale* Weber.) y en la muestra M4P3 correspondiente a la planta altamisa (*Artemisia vulgaris*).

Lactobacillus plantarum con un perfil de identificación aceptable se identificó en el piso altitudinal dos en la muestra de la planta de romero (*Rosmarinus officinalis*) (M2P2) y en el piso altitudinal tres en la muestra M2P3 de la planta de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.). Con una baja discriminación de identificación se constató la presencia de *Peiococcus damnosus* 1, en el piso altitudinal tres en la muestra M4P3 de la planta altamisa (*Artemisia vulgaris*).

Las bacterias ácido lácticas (LAB) revisten importancia tanto en la industria como en el área agrícola. Son un grupo de microorganismos, cocos o bacilos, tolerantes a los ácidos y no esporulantes (Dhamale *et al.*, 2015), está constiuido por un grupo amplio de bacterias, *Lactobacillus delbrueckii* es la especie tipo del género *Lactobacillus* y comprende tres subespecies, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; cepas pertenecientes a las tres subespecies muestran un alto grado de relación entre ellas (Dellaglio *et al.*, 2005).

Todas las BAL identificadas en los tres pisos altitudinales, revisten importancia en el campo agrícola, por las características que posee este grupo de microorganismos. Las actividades proteolíticas de LAB son esenciales para comprender las propiedades biológicas, actualmente la actividad antimicrobiana es de importancia en la biología de las plantas (Dhamale *et al.*, 2015).

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* son bacterias termófilas del ácido láctico (LAB), que están altamente adaptadas para crecer sobre la lactosa y convertirla en ácido láctico. *Lactobacillus bulgaricus* mantiene extensos sistemas de transporte proteolítico y de aminoácidos que son útiles en el ambiente de leche rico en proteínas (Glušac *et al.*, 2015), por lo tanto, las especies vegetales albergan microorganismos con potencial industrial.

L. delbrueckii se encuentran generalmente en productos lácteos como el yogur, la leche y el queso, con excepción de *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* que residen en fuentes vegetales. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es un componente de los cultivos iniciadores termófilos utilizados para fabricar una serie de productos lácteos fermentados (Devi *et al.*, 2013).

Permanentemente se realizan investigaciones para estudiar las bondades de las LAB. *Lactobacillus plantarum* es una bacteria facultativamente anaeróbica que puede realizar la respiración bajo condiciones aeróbicas en presencia de hemo, con vitamina K2 actuando como fuente de menaquinona (Watanabe *et al.*, 2012). En estudio realizado para determinar los efectos de la inoculación de *Lactobacillus plantarum* en maíz ensilado en diferentes etapas de madurez, los resultados indicaron que la aplicación del inoculante bacteriano resultó más efectivo para mejorar la composición química y el valor nutritivo de ensilajes, además proporcionan un alimento bien conservado y de alto valor nutritivo para rumiantes (Haghparvar *et al.*, 2012).

En investigaciones realizadas a cerca de la incidencia de *Lactobacilos plantarum* sobre el desarrollo radicular de las plantas, se determinó que diferentes cepas ejercen efectos diversos sobre las plántulas: por ejemplo, la inoculación con ciertas cepas dio como resultado la estimulación del crecimiento de la raíz principal y la inoculación con otra cepa estimuló el crecimiento del brote o crecimiento de las raíces laterales (Limanska *et al.*, 2013), por lo tanto estas bacterias aisladas de especies vegetales podrían aportar importantes beneficios en los semilleros.

Pediococcus es un género de bacterias Gram-positivas de ácido láctico, está formado por las siguientes especies: *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P. halophilus*, *P. dextrinicus* y *P. urinaeequi*. A menudo denominado *P. cerevisiae*, actualmente se designa como *P. damnosus*, mientras que las cepas anteriormente conocidas como *P. cerevisiae* se distribuyen hoy entre *P. damnosus*, *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* (Papagianni y Anastasiadou, 2009).

La bacteria *P. damnosus* se produce tanto en el vino como en la sidra y se encuentra en ambientes cerveceros, la mayoría de las cepas fermentan la glucosa, la sacarosa y la galactosa en forma homofermentativa, y solo algunas cepas metabolizan la maltosa y la sacarosa (Papagianni y Anastasiadou, 2009); *Pediococcus damnosus* LMG 28219 es una bacteria de ácido láctico que domina la fase de maduración de las producciones de cerveza de ácido flamenco (Snauwaert *et al.*, 2015).

Reviste interés, ya que se ha reportado que *Pediococcus damnosus* produce una pediocina, designada como pediocina PD-1. Las pediocinas forman un grupo de bacteriocinas pertenecientes a la clase IIa de bacteriocinas, caracterizada como "antilisterial", que inhiben a bacterias patógenas (Fatima y Mebrouk, 2013). La pediocina PD-1, producida por *Pediococcus damnosus* NCFB 1832, es inhibidora de varias bacterias dañinas de los alimentos y patógenos transmitidos por los alimentos (Green *et al.*, 1997). *Pediococcus damnosus* a despertado interés en la investigación por la producción de exopolisacáridos y bacteriocina (Papagianni y Anastasiadou, 2009), en nuestro medio es necesario profundizar estudios relacionados al aprovechamiento de las bacteriocinas, ya que existe muy poca información al respecto.

4.3.4 Identificación de actinomicetos

Para la identificación de actinomicetos (anexo 23), se realizó la amplificación 16S-PCR de los lisados de ADN de las cepas en estudio, se determinó varios géneros de *Streptomyces* (cuadro 51). A 1950 ms.n.m. se identificó *Streptomyces sanglieri* en la muestra M1P1 que corresponde a la planta café (*Coffea arabica* L.), además se constató *Streptomyces lushanensis* en la muestra M2P1 que pertenece a la planta plátano (*Musa paradisiaca* L.). A 2550 ms.n.m. el género *Streptomyces* se determinó en dos especies vegetales, *Streptomyces griseorubens* se verificó en la muestra M4P3 relativo a la planta altamisa (*Artemisia vulgaris*), mientras que en la muestra M5P3 que pertenece a la planta canayuyo (*Sonchus*

oleraceus) se identificó *Streptomyces thermocarboxydus*, así como también *Streptomyces bungoensis*.

Cuadro 51: Actinomicetos identificados mediante amplificación 16S-PCR de los lisados de ADN de las cepas en estudio

N° de Muestras	Muestra	Microorganismos identificados	Número de accesión	Porcentaje de similaridad
1	M1P1A1	<i>Streptomyces sanglieri</i>	AB249945	99,93
2	M2P1A1	<i>Streptomyces lushanensis</i>	MAUD01000416	99,36
3	M4P3A1	<i>Streptomyces griseorubens</i>	AB184139	100,00
4	M5P3A1	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	U94490	99,93
5	M5P3A3	<i>Streptomyces bungoensis</i>	KQ948892	99,36

Los actinomicetos forman una gran cantidad de micelio de sustrato ramificado, produce hifas aéreas que típicamente se diferencian en cadenas de esporas (Saintpierre-Bonaccio *et al.*, 2004). *Streptomyces* es el género más extenso de las actinobacterias. Actualmente se conocen más de 500 especies de *Streptomyces*, de las cuales, la mayoría se han aislado de suelo. Este género posee una gran importancia biotecnológica por su producción de metabolitos secundarios de interés industrial (Avalos *et al.*, 2015), existe poca información relevante sobre especies de *Streptomyces* identificadas en nuestro medio.

Las cepas de *Streptomyces* son superiores a otras cepas de actinomiceto en su capacidad de producir grandes cantidades y variedades de antibióticos. Los estreptomycetos son grampositivos filamentosos gran valor comercial, son conocidos como los productores de varios metabolitos bioactivos útiles particularmente los antibióticos (Sripreechusak *et al.*, 2014).

Sería importante estudiar los antibióticos de los actinomicetos identificados en los pisos altitudinales en estudio, ya que el género *Streptomyces* es el mayor productor de antibióticos, representan más del 74% de los producidos por miembros de la orden Actinomycetales y aproximadamente el 34% de todos los antibióticos conocidos. Los antibióticos producidos por especies del género *Streptomyces* incluyen efecto antiinfeccioso, antibacteriano, antifúngico, agentes anticancerígenos y antitumorales (Nguyen y Kim, 2015). Muchos antibióticos importantes se han aislado de los actinomicetos del suelo, por lo que puede ser una fuente de interesantes metabolitos secundarios (Hamza *et al.*, 2013). Se descubrió que *Streptomyces sanglieri* AK 623 produce lactonamicina Z más fuerte que la producción de lactonamicina por *S. rishiriensis* (Zhang *et al.*, 2008).

Streptomyces lushanensis se identificó en las muestras en estudio, se conoce poco con respecto a este actinomiceto. La cepa JXJ 0135 (T), un actinomiceto anti-cianobacteriano, se aisló de una muestra de suelo recogida en Lushan Mountain, sur de China, y se identificó mediante el uso de un enfoque polifásico. Sobre la base de los datos polifásicos, la cepa JXJ 0135 (T) representa una nueva especie del género *Streptomyces*, para la cual el nombre *Streptomyces lushanensis* sp. nov. esta propuesto. Se trata de un actinomiceto aeróbio, grampositivo que forma sustrato bien ramificado y micelio aéreo (Zhang *et al.*, 2015).

Streptomyces griseorubens JSD-1 es un nuevo actinomiceto aislado del suelo que puede utilizar el nitrato como su única fuente de nitrógeno para el crecimiento y se espera que estos genes de asimilación de nitratos activos en esta biotransformación sean cruciales (Feng *et al.*, 2014).

La importancia de *Streptomyces thermocarboxydus* radica en estudios que demuestran que potencialmente puede usarse como un agente de control alternativo contra la enfermedad de la pudrición de la hoja en aloe vera en Bali (Kawuri *et al.*, 2011), son escasos los estudios realizados con estos microorganismos. La capacidad de aislamiento de *S. thermocarboxydus* NH50 para reducir el Cr (VI) en una solución resultó ser inducido y significativamente acelerado por la presencia de partículas sólidas, tal como arena o suelo suspendido en el medio (Desjardin *et al.*, 2002), lo cual resulta prometedor en procesos de bioremediación.

S. bungoensis MJM2077 es un productor nuevo de equinomicina y demostró la posibilidad de desarrollar medicamentos orales para las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos (Cheng *et al.*, 2013).

Todos los actinomicetos identificados en la zona de estudio son potencialmente útiles por las características particulares que estos presentan, requiere realizar investigaciones para confirmar los beneficios que ofrecen y poderlos aprovechar correctamente.

Mediante pruebas de laboratorio se identificó los microorganismos benéficos presentes en 12 muestras vegetales de tres pisos altitudinales. Utilizando los sistemas miniaturizados API se identificó levaduras, *Bacillus* spp. y *Lactobacillus* spp; mediante la amplificación 16S-PCR de los lisados de ADN de las cepas en estudio se identificó actinomicetos; todos estos microorganismos benéficos presentes en las especies vegetales, ya que <<las plantas superiores sirven como un ambiente donde pueden desarrollarse poblaciones y

comunidades microbianas, que incluyen bacterias, levaduras y hongos>> (Rosas et al., 2004).

En cuanto a las levaduras de interés a 2 250 ms.n.m. en la planta de cedrón (*Aloysia triphylla*) se identificó *Saccharomyces cerevisiae* y en la planta de menta (*Mentha piperita*) se registró *Kloeckera* spp. A 2 550 ms.n.m. en la planta de geranio (*Pelargonium graveolens*) se determinó *Rhodotorula minuta*.

Con respecto a *Bacillus* spp. se destaca que *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* está presente en los tres pisos altitudinales; a 1 950 ms.n.m. se registró en la planta de girasol (*Tithonia diversifolia*), a 2 250 ms.n.m. se encontró en la planta de ruda (*Ruta graveolens* L.) y a 2 550 ms.n.m. se constató en la planta de canayuyo (*Sonchus oleraceus*). *Bacillus licheniformis* se identificó a 2 250 ms.n.m en la planta de romero (*Rosmarinus officinalis*), a 2 550 ms.n.m. en las plantas de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.), geranio (*Pelargonium graveolens*), y altamisa (*Artemisia vulgaris*).

Con relación a *Lactobacillus* spp. es relevante que *Lactobacillus delbrueckii* ssp está presente en los tres pisos altitudinales; se identificó a 1 950 ms.n.m. en las plantas de café (*Coffea arabica* L.), y girasol (*Tithonia diversifolia*), a 2 250 ms.n.m. se registró en las plantas de romero (*Rosmarinus officinalis*) y cedrón (*Aloysia triphylla*) y a 2 550 ms.n.m. se identificó en las plantas de diente de león (*Taraxacum officinale* Weber.) y altamisa (*Artemisia vulgaris*). *Lactobacillus plantarum* se determinó a 2 250 ms.n.m. en la planta de romero (*Rosmarinus officinalis*) y a 2 550 ms.n.m. en la planta de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.). *Pediococcus damnosus* únicamente se verificó en el piso altitudinal tres en la planta de altamisa (*Artemisia vulgaris*).

En cuanto a actinomicetos, se determinó varios géneros de *Streptomyces* que revisten fundamental importancia. A 1950 ms.n.m. se identificó *Streptomyces sanglieri* en la planta café (*Coffea arabica* L.), además se constató *Streptomyces lushanensis* en la planta de plátano (*Musa paradisiaca* L.). A 2550 ms.n.m. el género *Streptomyces* se determinó en dos especies vegetales, *Streptomyces griseorubens* se verificó en la planta altamisa (*Artemisia vulgaris*), mientras que en la planta canayuyo (*Sonchus oleraceus*) se identificó *Streptomyces thermocarboxydus*, así como también *Streptomyces bungoensis*.

Los hallazgos coinciden con la gran mayoría de criterios con respecto a los microorganismos que forman parte de los consorcios microbianos benéficos. De acuerdo a (Higa y Parr, 1994)

los microorganismos benéficos están constituidos por un grupo amplio de microorganismos, que aún son desconocidos o están mal definidos, presentan interacciones favorables en suelos y plantas. Cada vez que se investiga sobre microorganismos y su beneficio, se identifican nuevas especies importantes, en cada sitio los consorcios microbianos están constituidos por grupos taxonómicos diferentes, que no son únicos. Entre los principales grupos de microorganismos beneficiosos se encuentran hongos, bacterias y otros microbios que desempeñan una función importante en la sanidad vegetal y la productividad (Wilkinson, 2009). Los microbios benéficos son compartidos por grupos taxonómicamente diferentes (Pineda *et al.*, 2013).

Algunos de los microorganismos beneficiosos utilizados en la agricultura en todo el mundo incluyen *Rizobium*, *Pseudomonas*, Micorrizas, *Trichoderma*, *Azospirillum*, *Bacillus*, especies de *Streptomyces* y muchos más (Vadakattu, 2012). Microorganismos de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* y *Penicilium* tienen la capacidad de solubilizar el fósforo orgánico en el suelo beneficiando la absorción de nutrientes por las plantas (Tan *et al.*, 2009).

A lo largo de los años han sido objeto de una extensa investigación bacterias benéficas promotoras de crecimiento que pertenecen a los géneros *Acetobacter*, *Dexia*, *Arthrobacter*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Stenotrophomonas* y *Zoogloea* (Babalola, 2010).

No se evidenció presencia de *Pseudomonas* spp., probablemente porque que las muestras fueron extraídas de la parte aérea de las plantas y estos microorganismos son mayormente habitantes del suelo.

Se demuestra que los microorganismos benéficos están presentes en especies vegetales. Las plantas de acuerdo a su ubicación geográfica son hospederos importantes de variedad de microorganismos beneficiosos, que pueden ser aislados y aprovechados de forma simple. Resultaría importante extender el estudio a más especies vegetales con la finalidad de conocer la riqueza en flora microbiana de una localidad e identificar y multiplicar especies de microorganismos con potencial benéfico para la agricultura, la industria y el medio ambiente.

Se comprobó que los microorganismos benéficos identificados, difieren de una planta a otra y entre pisos altitudinales y que no existe una especie vegetal única en la que se encuentren todos los microorganismos beneficiosos, debido a que <<los microorganismos que forman parte de la flora residente (autóctonos) se encuentran normalmente en el ambiente que los acoge >> (Palomino, 1995) y las condiciones ambientales inciden principalmente en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos ya que los hábitats naturales de los microorganismos son extremadamente diversos (Madigan *et al.*, 2004), es importante tener presente que <<los microorganismos pueden ser selectivos con respecto al tipo de sustratos en los que crecen>> (Coyne, 2000) y que en los tres pisos altitudinales <<el crecimiento de los microorganismos está influido notablemente por la naturaleza química y física del ambiente>> (Prescott, 2002).

4.4 ANTAGONISMO Y CAPACIDAD PROTEOLÍTICA DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS

4.4.1 Antagonismo de *Bacillus* spp. ante *Fusarium* spp.

De los medios de cultivo, se aisló varios microorganismos en base a características morfológicas diferentes, razón por la que se contó con varias cepas de *Bacillus* (B1, B2, B3 y B4).

En la evaluación de antagonismo de *Bacillus* spp., aisladas de las muestras vegetales del piso altitudinal uno ante *Fusarium*, en el cuadro 52, se observa que ninguna de las cepas presentó nivel medio o alto de antagonismo, las cepas de las muestras M1P1B4, M3P1B1 y M3P1B2 mostraron bajo nivel de antagonismo, mientras que todas las demás no presentaron antagonismos. Con referencia a las propiedades proteolíticas a excepción de M1P1B2 y M2P1B1 todas las demás cepas mostraron efecto proteolítico.

Cuadro 52: Niveles de antagonismo de *Bacillus* spp. de las muestras vegetales del piso altitudinal uno

Muestra	Niveles de antagonismo				Propiedades proteolíticas	
	Ninguno	Bajo	Medio	Alto	SI	NO
M1P1B2	X					X
M1P1B4		X			X	
M2P1B1	X					X
M2P1B2	X				X	
M3P1B1		X			X	
M3P1B2		X			X	
M3P1B3	X				X	

En de acuerdo al cuadro 53, se observa que en el piso altitudinal dos ninguna de las cepas de *Bacillus* spp. presentaron alto nivel de antagonismo, pero, las cepas de los biopreparados M2P2B1 y M4P2B1 mostraron nivel medio de antagonismo, mientras que las cepas de los medios de cultivo M1P2B3, M2P2B3, M3P2B1 y M3P2B2 no evidenciaron ningún nivel de antagonismo. Los microorganismos de las muestras M1P2B3, M4P2B1 y M4P2B3 no presentaron propiedades proteolíticas.

Cuadro 53: Niveles de antagonismo de *Bacillus* spp. de las muestras vegetales del piso altitudinal dos

Muestra	Niveles de antagonismo				Propiedades proteolíticas	
	Ninguno	Bajo	Medio	Alto	SI	NO
M1P2B1		X			X	
M1P2B3	X					X
M2P2B1			X		X	
M2P2B3	X				X	
M3P2B1	X				X	
M3P2B2	X				X	
M4P2B1			X			X
M4P2B3		X				X

En el cuadro 54 se observa que en el piso altitudinal tres, las cepas de *Bacillus* spp. de la muestra M4P3B3 no presentaron antagonismo ante *Fusarium* sp., en tanto que las cepas de las muestras M1P3B1, M1P3B2, M2P3B1, M2P3B3, M3P3B2 y M5P3B1 mostraron bajo nivel de antagonismo; nivel medio de antagonismo presentaron las cepas de las muestras M3P3B1, M4P3B2 y M5P3B2. Ninguna cepa presentó alto nivel de antagonismo. Los microorganismos de las muestras M1P3B1, M1P3B2, M2P3B3, M3P3B2, M4P3B3 no mostraron propiedades proteolíticas.

Cuadro 54: Niveles de antagonismo de *Bacillus* spp. de las muestras vegetales del piso altitudinal tres

Muestra	Niveles de antagonismo				Propiedades proteolíticas	
	Ninguno	Bajo	Medio	Alto	SI	NO
M1P3B1		X				X
M1P3B2		X				X
M2P3B1		X			X	
M2P3B3		X				X
M3P3B1			X		X	
M3P3B2		X				X
M4P3B2			X		X	
M4P3B3	X					X
M5P3B1		X			X	
M5P3B2			X		X	

El control biológico de enfermedades en las plantas, es una alternativa amigable con el ambiente, que permite reducir el uso de agroquímicos y cumplir con exigencias de mercados internacionales (Corrales *et al.*, 2012), razón por la que se evaluó el nivel de antagonismo

de cepas de *Bacillus* spp obtenidas de muestras vegetales de tres pisos altitudinales, ante *Fusarium* spp., que son los hongos más frecuentemente asociados a la infección de los órganos subterráneos de las plantas (Rosado-Álvarez *et al.*, 2014), particularmente *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* (Fof), que es el agente causal del marchitamiento y es una seria amenaza para la producción comercial de fresas en todo el mundo (Fang y Barbetti, 2014).

Los *Bacillus* spp. presentan antagonismos ante patógenos <<a través de la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas, polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos>> (Corrales *et al.*, 2012) y por la facilidad de digerir la quitina, así como por la producción de los antibióticos: bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina, entre otros (Bernal *et al.*, 2002).

Con las cepas de *Bacillus* aisladas de las muestras vegetales de tres pisos altitudinales se evaluó la tasa de microorganismos antagónicos y el nivel de antagonismo ante *Fusarium* spp., se valuó el efecto de las cepas en el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del patógeno.

De las cepas de *Bacillus* spp. analizadas en el piso altitudinal uno, el 57,15 por ciento no presentó ningún nivel de antagonismo mientras el 42,85 por ciento presentó bajo nivel de antagonismo, ninguna muestra presentó alto nivel de antagonismo. En el piso altitudinal dos, el 50 por ciento de *Bacillus* spp. no presentaron antagonismo, el 25 por ciento presentó bajo antagonismo y el 25 por ciento presentó medio nivel de antagonismo, ninguna muestra presentó alto nivel de antagonismo. En el piso altitudinal tres, el diez por ciento de cepas de *Bacillus* spp. no presentó ningún nivel de antagonismo, el 60 por ciento presentó bajo nivel de antagonismo y el 30 por ciento presentó medio nivel de antagonismo, ninguna muestra evidenció alto nivel de antagonismo. Es decir, ante *Fusarium* spp. del total de muestras de *Bacillus* analizadas en los tres pisos altitudinales, el 33,33 por ciento no registró ningún nivel de antagonismo, el 45,83 por ciento demostró bajo nivel de antagonismo, el 20,83 por ciento presentó medio nivel de antagonismo y el 0,00 por ciento demostró alto nivel de antagonismo.

El grado de antagonismo de las cepas de *Bacillus* spp. ante *Fusarium* spp. no es igual entre los microorganismos de los tres pisos altitudinales, probablemente debido a que se tratan de especies diferentes, ya que *Bacillus* << incluye más de 100 especies y sus miembros se

consideran ubicuos>> (Tejera *et al.*, 2011). En estudios realizados in vitro *Bacillus subtilis* ha demostrado alta efectividad ante *Fusarium*, además posiblemente debido a la propiedad biofungicida *Bacillus licheniformis* presenta un comportamiento similar a *Bacillus subtilis* (Corrales *et al.*, 2012). *Bacillus cereus*, *B. licheniformis* y *B. megaterium* han sido reportadas como microorganismos biocontroladores por la producción de antibióticos (Guillen *et al.*, 2006). En la investigación realizada por Corrales *et al.* (2011) *Bacillus liqueniformis* y *Bacillus subtilis* demostraron un buen desempeño en las pruebas in vitro contra *Fusarium*.

Ninguno de las cepas de *Bacillus* demostró alto nivel de antagonismo ante *Fusarium* spp. posiblemente porque son microorganismos extraídos de hojas de plantas y no de la rizósfera del suelo, además no se conoce con certeza la especie del patógeno, sin embargo, las cepas de las muestras M2P2B1 (*Bacillus licheniformis*), M3P3B1 (*Bacillus licheniformis*), M4P3B2 (*Bacillus amyloliquefaciens*) y M5P3B2 (*Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*), revisten interés por su nivel medio de antagonismos ante *Fusarium* sp, por lo que amerita profundizar el estudio a nivel de campo.

Se evaluó la capacidad proteolítica de las cepas de *Bacillus* spp., ya que las proteasas y enzimas proteolíticas constituyen uno de los grupos más importantes de enzimas y están atrayendo la atención mundial en los intentos de explotar sus aplicaciones fisiológicas y biotecnológicas (Kotlar *et al.*, 2015), la proteasa neutra tiene un alto potencial para aplicaciones industriales (Wang *et al.*, 2016), el alto nivel de expresión y la estabilidad genética extrema hacen de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* 110N-6 más favorable para la producción en masa de proteasa neutra para usos industriales (Wang *et al.*, 2016). Entre las bacterias, las cepas de *Bacillus* son los productores más importantes de enzimas extracelulares comerciales, incluidas las proteasas (Kotlar *et al.*, 2015).

En esta investigación se constató que el 71,42 por ciento de las cepas de *Bacillus* spp. procedentes de las muestras del piso altitudinal uno presentaron propiedades proteolíticas, mientras que en el segundo piso altitudinal el 62,50 por ciento de cepas demostró esta capacidad, en el tercer piso altitudinal el 50 por ciento de cepas en estudio evidenció propiedades proteolíticas. Las cepas se identificaron como *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* (M1P2B1, M5P3B1, M5P3B2) y *Bacillus licheniformis* (M2P2B1, M3P3B1).

4.4.2 Antagonismo de *Lactobacillus* spp. ante *Fusarium* spp.

De los diferentes medios de cultivo de los tres pisos altitudinales, se aisló varios microorganismos en base a características morfológicas diferentes, razón por la que se cuenta con varias cepas de *Lactobacillus* (L1, L2, L3) en una misma muestra.

Con respecto al nivel de antagonismo de *Lactobacillus* spp. de las muestras vegetales del piso altitudinal uno, en el cuadro 55 se observa que con excepción de M1P1L2 que no presentó ningún nivel de antagonismo todas las demás muestras presentan un nivel bajo de antagonismo. M1P1L1 y M3P1L2 presentaron características proteolíticas.

Cuadro 55: Niveles de antagonismo de *Lactobacillus* spp. de las muestras vegetales del piso altitudinal uno

Muestra	Niveles de antagonismo				Propiedades proteolíticas	
	Ninguno	Bajo	Medio	Alto	SI	NO
M1P1L1		X			X	
M1P1L2	X					X
M2P1L1		X				X
M2P1L2		X				X
M3P1L1		X				X
M3P1L2		X			X	

En el piso altitudinal dos, de acuerdo al cuadro 56, las cepas de los *Lactobacillus* spp. de la muestra M4P2L3 presentaron un alto nivel de antagonismo frente a *Fusarium* sp., mientras que todas las demás *Lactobacillus* spp. mostraron un bajo nivel de antagonismo. Los microorganismos de las muestras M2P1L1, M2P2L2 y M3P2L1 presentaron propiedades proteolíticas.

Cuadro 56: Niveles de antagonismo de *Lactobacillus* spp. de las muestras vegetales del piso altitudinal dos

Muestra	Niveles de antagonismo				Propiedades proteolíticas	
	Ninguno	Bajo	Medio	Alto	SI	NO
M1P2L1		X				X
M1P2L2		X				X
M2P2L1		X			X	
M2P2L2		X			X	
M3P2L1		X			X	
M3P2L2		X				X
M4P2L3				X		X

Del análisis realizado en el piso altitudinal tres, en el cuadro 57 se observa que las cepas de *Lactobacillus* spp. de los medios de cultivo de las muestras M4P3L2 y M4P3L3

evidenciaron alto nivel de antagonismo frente a *Fusarium* sp., mientras que las cepas de M2P3L3 y M3P3L2 presentaron nivel medio de antagonismo, en tanto que M1P3L1, M1P3L2, M2P3L1, M3P3L3, M4P3L1, M5P3L2 y M5P3L3 presentaron bajo nivel de antagonismo, en el medio de cultivo de la muestra M2P3L2 no se observó ningún nivel de antagonismo. Los *Lactobacillus* spp. de las muestras M1P3L1, M2P3L1, M2P3L2, M4P3L1, M4P3L2 y M4P3L3 presentaron propiedades proteolíticas.

Cuadro 57: Niveles de antagonismo de *Lactobacillus* spp. de las muestras vegetales del piso altitudinal tres

Muestra	Niveles de antagonismo				Propiedades proteolíticas	
	Ninguno	Bajo	Medio	Alto	SI	NO
M1P3L1		X			X	
M1P3L2		X				X
M2P3L1		X			X	
M2P3L2	X				X	
M2P3L3			X			X
M3P3L2			X			X
M3P3L3		X				X
M4P3L1		X			X	
M4P3L2				X	X	
M4P3L3				X	X	
M5P3L2		X				X

Las especies de *Lactobacillus* se caracterizan por la producción de metabolitos bioactivos que actúan contra un amplio espectro de microorganismos patógenos como bacterias y hongos (Shrestha *et al.*, 2014).

Razón por la que con las cepas de *Lactobacillus* aisladas de las muestras vegetales de tres pisos altitudinales se evaluó la tasa de microorganismos antagónicos y el nivel de antagonismo ante *Fusarium* spp; se evaluó el efecto de la cepa acidoláctica en el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del patógeno. De las cepas de *Lactobacillus* estudiadas en el piso altitudinal uno, el 16,67 por ciento no presentó ningún nivel de antagonismo, el 83,33 por ciento registró bajo antagonismo, ninguna muestra evidenció nivel de antagonismo medio o alto. En el piso altitudinal dos, el 87,50 por ciento de cepas de *Lactobacillus* spp. evidenció bajo antagonismo y el 12,50 por ciento registró alto nivel de antagonismo. En el piso altitudinal tres, el 8,33 por ciento de cepas de *Lactobacillus* spp. no demostró ningún nivel de antagonismo, el 58,33 por ciento evidenció bajo nivel de antagonismo, el 16,67 por ciento presentó nivel medio de antagonismo y el 16,67 por ciento mostró alto nivel de

antagonismo. Por lo tanto, ante *Fusarium* spp. del total de cepas de *Lactobacillus* spp. evaluadas en los tres pisos altitudinales, el 7,69 por ciento no mostró antagonismo, el 73,08 por ciento presentó bajo nivel de antagonismo, el 7,69 por ciento registró nivel medio de antagonismo y el 11,54 por ciento demostró alto nivel de antagonismo.

Se determinó que el nivel de antagonismo de las cepas de *Lactobacillus* spp. de los tres pisos altitudinales ante *Fusarium* sp. no es igual, se deduce que se tratarían de diferentes especies de microorganismos benéficos los que están presentes en cada especie vegetal. Según Daeschel *et al.* (1987) en las superficies externas de las plantas vivas se encuentran: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus arabinosus*, *L. brevis*, *L. casei*, además de *Pediococcus acidilactici* y *P. pentosaceus*, representando al género *Streptococcus* se encuentran *S. faecalis*, *S. faecalis* var. *liquenfaciens*, *S. lactis*, y *S. faecium*; el grupo de bacterias ácido lácticas <<está compuesto de un número de géneros incluyendo *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*>> (Parra, 2010).

Los resultados alcanzados están acordes a los obtenidos en otras investigaciones; en el estudio realizado por Mauch *et al.* (2010) *Lactobacillus brevis* mostró una actividad antifúngica importante ante *Fusarium* spp. con hasta 43 por ciento de inhibición sobre el patógeno, también se determinó la actividad de inhibición de *Lactobacillus acidophilus* sobre *Fusarium oxysporum* alcanzando el 10 por ciento de inhibición (Hamed *et al.*, 2011).

En la investigación realizada por Laitila *et al.* (2002), se estudió el efecto de las cepas E76 y E98 de *Lactobacillus plantarum* ante *Fusarium*, se determinó que las cepas en estudio presentaron efecto fungistático afectando el desarrollo normal de varios de estos hongos fitopatógenos.

Al respecto se indica que dos especies de lactobacilos (*Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus paracasiae* subsp. *Paracasiae*) fueron probado por su capacidad para inhibir el crecimiento y la producción de micotoxinas de tres especies de *Fusarium*, (*F. graminearum*, *F. culmorum* y *F. proliferation*), los resultados obtenidos confirman que las especies seleccionadas de bacterias del ácido láctico se pueden usar con éxito como agente de control biológico (Gomah y Zohri, 2014).

En este estudio se encontró que las cepas de *Lactobacillus* de las muestras vegetales M4P2L3, M4P3L2 (*Lactobacillus delbrueckii* ssp) y M4P3L3 (*Pediococcus damnosus* 1) demostraron alto nivel de antagonismo ante *Fusarium* sp., ya que inhibieron completamente

el crecimiento del patógeno, en virtud de lo cual es necesario estudios complementarios en el campo para confirmar las bondades antimicrobianas de estas cepas.

En cuanto a las propiedades proteolíticas, se determinó que el 33,33 por ciento de las cepas del piso altitudinal uno, presentan esta capacidad, mientras que en el piso altitudinal dos el 42,85 por ciento de cepas evidenciaron propiedades proteolíticas, en el piso altitudinal tres el 60 por ciento de cepas estudiadas evidenciaron proteólisis. No hay una cepa en particular que se distinga entre todas las estudiadas, prácticamente son pocos los estudios realizados al respecto por lo que la información es escasa.

4.5 CARACTERÍSTICAS DEL SUELO

De acuerdo a la caracterización del suelo (anexo 5) se destaca lo siguiente: C. E: 1,10 dS/m; clase textural: Franco Arcillo Arenosa; pH: 8,18 (Moderadamente alcalino) y CIC: 11,52.

4.5.1 pH del suelo

En el análisis inicial de suelo se registró un valor de pH de 8,18 en todos los tratamientos, mientras que en el análisis final de suelos todos los valores registrados son inferiores a 8,18 pero superiores a 7. El tratamiento T7 presentó un pH de 7,95 siendo el más alto verificado mientras que T1 registró un valor de 7,27 que es el valor más bajo exhibido, todos los valores registrados se presentan en el cuadro 58.

Cuadro 58: Comparación entre valores de pH

Tratamientos	pH	
	(Día 0)	(Día 120)
T1	8,18	7,27
T2	8,18	7,66
T3	8,18	7,86
T4	8,18	7,90
T5	8,18	7,70
T6	8,18	7,73
T7 (EM1)	8,18	7,95
T8 (Testigo)	8,18	7,56

En la figura 172 se observa que todos los valores de pH disminuyeron durante los 120 días de investigación, sin embargo, no todos los tratamientos presentaron el mismo comportamiento, el tratamiento T1 presentó el valor más bajo mientras que el suelo del tratamiento T7 presentó el pH más alto. El tratamiento que no recibió aplicación de microorganismos también presentó disminución en su valor de pH.

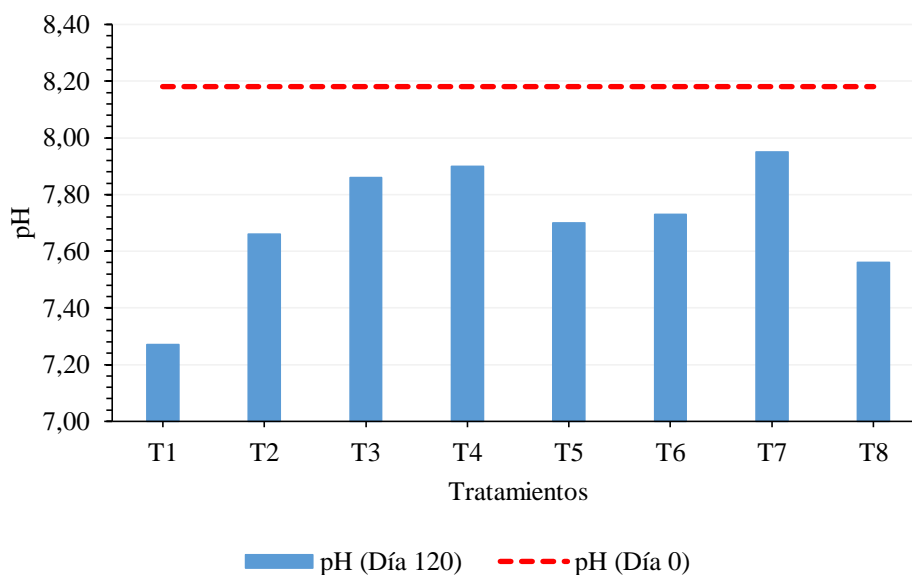


Figura 172: Comparación entre valores de pH de los diferentes tratamientos

Los suelos de todos los tratamientos presentaron descenso en los valores de pH. El 85,71 por ciento de los suelos de los tratamientos que recibieron inoculación de microorganismos benéficos superan el pH del suelo del tratamiento testigo. Zydlik y Zydlik (2008) indica que el pH del suelo cambia después de la aplicación de microorganismos eficientes.

Los factores que influyen en el valor del pH son diversos <<la mineralización de los residuos orgánicos genera amonio (NH_4^+) cuya posterior oxidación a nitrato (NO_3^-) ocurre con liberación de H^+ . Además, los ácidos húmicos, componentes de la materia orgánica más estable en el suelo, poseen grupos reactivos, carboxílicos y fenólicos, que se comportan como ácidos débiles>> (Quiroga y Bono, 2012), los organismos del suelo desempeñan una función importante en la alteración y mineralización de la materia orgánica (Porta, 2003), desde el punto de vista biológico esta favorece la actividad microbiana y activa la fauna edáfica, la materia orgánica aportada al suelo es de donde todos los microorganismos obtendrán sus fuentes energéticas (García, 2013).

Es necesario tener presente que el vermicompost adicionado como enmienda al suelo de todos los tratamientos no es una sustancia estable, sino que está sujeta a cambios, al respecto Prat (1981) manifiesta que “los cambios en el humus dan lugar a modificaciones de la reacción del suelo hacia un aumento de la acidez debido a que en los distintos procesos de su transformación se forman ácidos”, también los fertilizantes necesarios para el desarrollo de las plantas tienen efecto en la modificación de pH de los suelos, “hay algunos

fertilizantes que tienden acidificar el suelo y su aplicación continua puede ser perjudicial” (Prat, 1981).

Es evidente que el descenso en los valores de pH no es uniforme en todos los tratamientos. <<En lo que respecta a los microorganismos está suficientemente reconocido que las bacterias y los actinomicetos actúan mejor en suelos minerales con valores de pH intermedios y elevados. Su actividad se reduce notablemente cuando el pH es inferior a 5,5>> (Navarro, 2003), los actinomicetos son los responsables del proceso de humificación (Palomino, 1995). <<La reacción del suelo condiciona en forma decisiva no sólo la vida de los microorganismos y los importantes procesos que en ellos intervienen sino, también en la mayor o menor asimilabilidad de muchos elementos químicos que para la planta son esenciales>> (Navarro, 2003). Se asume que la carga microbiana es diferente en cada tratamiento, por lo tanto, también son diferentes los efectos, en el suelo del tratamiento testigo a pesar de no recibir inoculación de consorcios microbianos, están presente microorganismos propios del lugar, los mismos que se desarrollan cuando se presentan condiciones de cultivo.

Se considera importante el descenso en el valor de pH ya que las plantas de fresa se desarrollan mejor con valores ligeramente ácidos. El pH más favorable para la producción de fresas está entre 4,6 y 6,5 (Milosevic *et al.*, 2009).

4.5.2 Conductividad eléctrica

En el cuadro 59, se destaca que la conductividad eléctrica al inicio de la investigación fue de 1, 10 dS/m en el suelo de todos los tratamientos, no obstante 120 días después los valores ascendieron a un máximo de 2,93 dS/m en el suelo del tratamiento T1, sin embargo, en el tratamiento T7 descendió ligeramente el valor hasta 1,09 dS/m. En el caso del suelo del tratamiento T8 que no recibió aplicación de MOBs la conductividad eléctrica fue 1,42 dS/m.

Cuadro 59: Comparación entre valores de CE

Tratamientos	CE (dS/m)	CE (dS/m)
	Día 0	Día 120
T1	1,10	2,93
T2	1,10	1,99
T3	1,10	1,75
T4	1,10	1,89
T5	1,10	1,79
T6	1,10	1,65
T7 (EM1)	1,10	1,09
T8 (Testigo)	1,10	1,42

En la figura 173, se observa que el suelo del tratamiento T1 presentó la más alta conductividad eléctrica y que en el suelo del tratamiento T7 disminuyó la conductividad eléctrica con respecto al día de inicio de la investigación. Todos los demás tratamientos presentaron valores superiores a 1,10 dS/m pero inferiores a 2 dS/m. Los suelos que recibieron inoculación de Microorganismos Benéficos excepto el suelo del tratamiento T7 presentaron CE superior al suelo que no recibió aplicación de microorganismos.

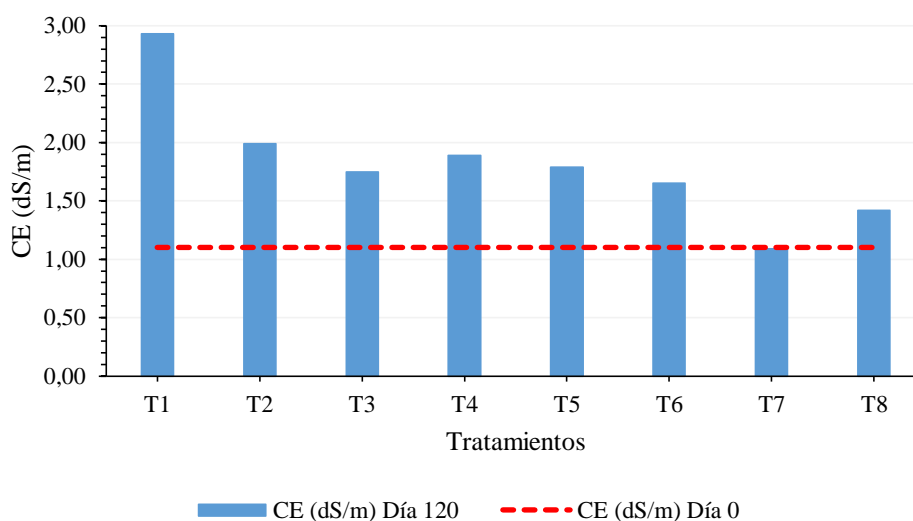


Figura 173: Comparación entre valores de CE de los diferentes tratamientos

Consideramos que la actividad de los consorcios microbianos afecta la conductividad eléctrica de los suelos, debido a que en el 85,71 por ciento de los tratamientos que recibieron inoculación de microorganismos benéficos se incrementó en forma heterogénea y en el 14,29 por ciento se presenta un leve descenso en el valor. El suelo que no recibió inoculación de microorganismos benéficos presenta aumento en la CE sin embargo es menor a los otros tratamientos.

Es importante considerar este parámetro debido a que los suelos con altas conductividades eléctricas afectan el desarrollo normal de las plantas; Yan *et al.* (2015) destaca que altas concentraciones de sales solubles afectan a los microbios y que los hongos resisten mejor el estrés salino que las bacterias. En la investigación realizada por Castro *et al.* (2015) confirma que la adición de microorganismos de montaña causa un incremento en los valores de la CE probablemente por la más alta solubilización de bases las cuales se acumulan en el suelo; en el mismo trabajo se cita que en la interacción de los iones H^+ y OH^- con el suelo provoca su neutralización, ya que estos iones conjuntamente con K, Ca, Mg y materia orgánica disuelta contribuyen en los valores de la CE.

4.5.3 Capacidad de intercambio catiónico

En el cuadro 60, se presenta la CIC antes de establecer el cultivo y 120 días después. Al inicio de la investigación la CIC en el suelo de todos los tratamientos fue de 11,52 meq/100 g, la cual varió durante el desarrollo del experimento. La capacidad de intercambio catiónico de los suelos de todos los tratamientos se incrementó, la CIC más alta se registró en el suelo del tratamiento T8 con un valor de 18,08 meq/100 g mientras que el suelo del tratamiento T5 presentó el menor valor de CIC correspondiente a 13,12 meq/100 g.

Cuadro 60: Comparación entre valores de la CIC meq/100 g

Tratamientos	CIC	CIC
	Día 0	Día 120
T1	11,52	17,60
T2	11,52	16,32
T3	11,52	15,68
T4	11,52	14,40
T5	11,52	13,12
T6	11,52	16,32
T7 (EM1)	11,52	13,60
T8 (Testigo)	11,52	18,08

En la figura 174, se presenta la CIC de los suelos de todos los tratamientos antes de establecer el cultivo y 120 días después. Se verifica que todos los tratamientos independientemente de la inoculación de MOBs incrementaron la capacidad de intercambio catiónico que es diferente en cada uno de ellos, la mayor CIC se constató en el suelo del tratamiento T8 y la más baja CIC en el suelo del tratamiento T5.

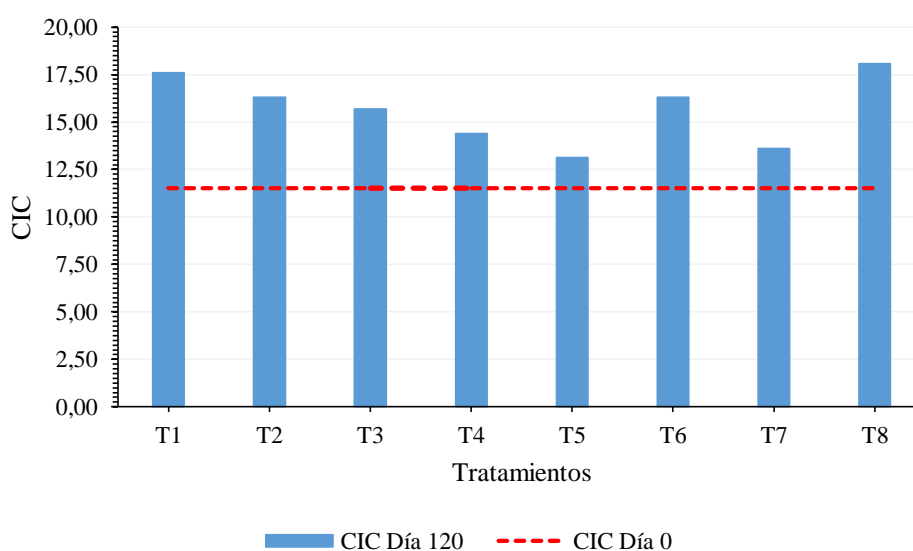


Figura 174: Comparación entre valores de la CIC de los diferentes tratamientos

Todos los tratamientos incrementaron la capacidad de intercambio catiónico. La CIC se incrementa en forma diversa en el 100 por ciento de los tratamientos que recibieron inoculación de microorganismos benéficos, pero son inferiores a los valores de la capacidad de intercambio catiónico del tratamiento testigo.

La CIC se también se incrementa de acuerdo al aumento de la materia orgánica, Iturri (2015) indica que <<los contenidos de materia orgánica, junto con la cantidad y el tipo de arcillas, definen la CIC>>, en los suelos con microorganismos benéficos el contenido de materia orgánica tiende a disminuir por la acción de la carga microbiana ya que <<los microorganismos utilizan el carbón, la energía y los nutrientes disponibles en la materia orgánica para producir nueva biomasa microbiana>> (García, 2013), en estudios realizados por Aldaba (2013) el suelo que presenta bajo contenido en materia orgánica también tenía baja capacidad de intercambio catiónico, Martínez *et al.* (2008) complementa que la CIC depende del contenido de materia orgánica del suelo que proporciona coloides de alta capacidad de intercambio catiónico y de los coloides inorgánicos como arcillas cristalinas, geles amorfos, óxidos, y sesquióxidos de hierro y aluminio, lo cual concuerda con Porta (2003) que expone que la CIC depende del tipo <<de minerales de arcilla y componentes orgánicos>>. El pH también puede incidir en la capacidad de intercambio catiónico, Quiroga y Bono (2012) manifiesta que en la mayoría de los suelos al aumentar el pH también aumenta la CIC como consecuencia de las denominadas cargas “pH dependientes”.

4.5.4 Materia orgánica

En el cuadro 61, se presenta el contenido de materia orgánica tanto en el día cero, así como 120 días después de iniciada la investigación. El suelo del tratamiento T8 que no recibió aplicación de microorganismos benéficos alcanzó un porcentaje de 4,37 por ciento y el suelo del tratamiento T4 presentó el más bajo valor con 1,15 por ciento.

Cuadro 61: Comparación entre valores de MO

Tratamientos	MO (%)	
	Día 0	Día 120
T1	1,67	2,76
T2	1,67	3,18
T3	1,67	2,07
T4	1,67	1,15
T5	1,67	2,63
T6	1,67	3,51
T7 (EM1)	1,67	1,25
T8 (Testigo)	1,67	4,37

En la figura 175, se constata que 120 días después de iniciada la investigación, el contenido de materia orgánica descendió en los tratamientos T4 y T7, mientras que en el tratamiento T8 se registró el más alto porcentaje. En los demás tratamientos los valores son superiores a 2 por ciento e inferiores a 3,51 por ciento.

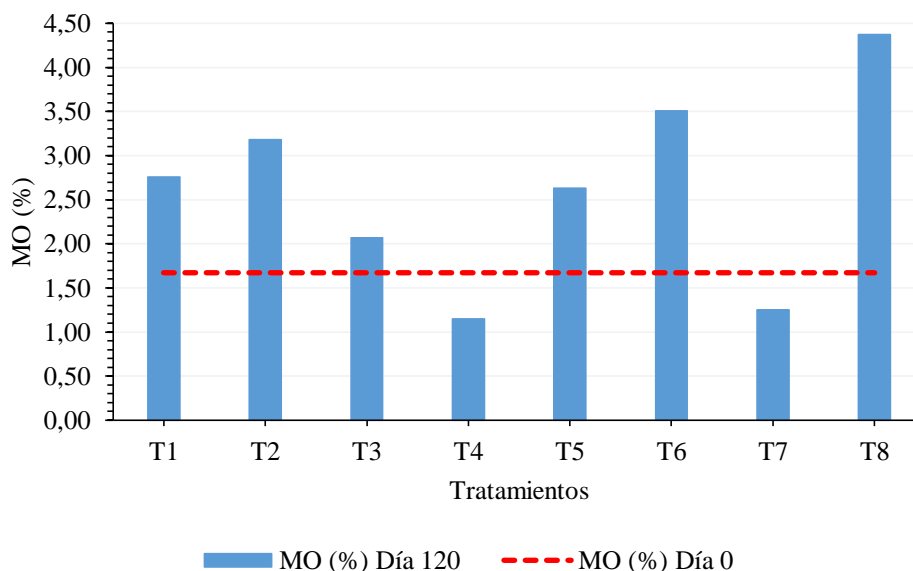


Figura 175: Comparación entre valores de MO de los diferentes tratamientos

En el 100 por ciento de los tratamientos que recibieron aplicación de microorganismos benéficos el porcentaje de materia orgánica descendió con respecto al tratamiento testigo; inclusive en un 28,57 por ciento disminuyó con relación al contenido inicial de MO en el suelo.

Todos los tratamientos no presentaron el mismo porcentaje de materia orgánica, muchos factores influyen en el contenido de esta, dentro de los cuales los organismos del suelo desempeñan una función importante ya que intervienen en la alteración y mineralización de la MO (Porta, 2003), puesto que desde el punto de vista biológico la materia orgánica favorece la actividad microbiana y activa la fauna edáfica, la materia orgánica aportada al suelo es de donde todos los microorganismos obtendrán sus fuentes energéticas (García, 2013), por lo tanto la MO juega un papel clave en la fertilidad de los suelos como fuente de nutrientes para las plantas y fuente de energía para los microorganismos, la incorporación de esta a los suelos va a reactivar sus propiedades microbiológicas y bioquímicas, estimulando la proliferación microbiana y su actividad metabólica (García, 2013).

La población y tipo de microorganismos no es igual en el suelo de todos los tratamientos, se asume por lo tanto que tampoco es igual la actividad microbiana, las comunidades microbianas se pueden dividir en grupos fúngicas y bacterianas, estos grupos funcionan de manera diferente en el proceso de descomposición (De Graaff *et al.*, 2010) y son responsables de la mayoría de los procesos de oxidación de la materia orgánica que se incorpora al suelo y, en consecuencia, de su mineralización (Luxton, 1982); la oxidación de la materia orgánica está catalizada por enzimas extracelulares producidas por bacterias, hongos y otros microorganismos del suelo (García y Bello, 2004).

La inoculación de consorcios microbianos de tres pisos altitudinales incrementó la carga de microorganismos existentes, por lo tanto también aumenta la degradación de la materia orgánica, que conlleva a descensos en los contenidos, lo cual es positivo, ya que en la degradación de la materia orgánica, que constituye un proceso básicamente biológico, existe liberación de nutrientes para las plantas, en ese proceso, parte del carbono es asimilado en los tejidos microbianos y otra parte es convertido en sustancias húmicas estables (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas) (Sánchez *et al.*, 2005) que contribuyen al desarrollo vegetal.

La degradación de la mayoría de los polímeros carbonados constituyentes de los tejidos vegetales, son procesos biológicos llevados a cabo sólo por microorganismos, estos compuestos vegetales constituyen la principal fuente de energía y carbono para los microorganismos del suelo (Pedraza *et al.*, 2010), <<los microorganismos utilizan el carbón, la energía y los nutrientes disponibles en la materia orgánica para producir nueva biomasa microbiana>> (García, 2013).

En el suelo del tratamiento testigo (T8) se registró el más alto contenido de materia orgánica, por lo tanto, la actividad microbiana degradativa es menor, lo cual no permite mayor liberación de nutrientes para el aprovechamiento de las plantas, que repercutirá en menor desarrollo vegetativo, así como disminución del rendimiento del cultivo.

En la presente investigación se aplicó vermicompost joven, que es sede de una intensa actividad microbiana, además la humidificación es una fase bastante rápida, durante la cual los microorganismos del suelo actúan sobre la materia orgánica desde el momento en que se la entierra, la cantidad de humus en el suelo depende de muchos factores, entre los cuales se destaca la incorporación de nuevos restos orgánicos al suelo y su velocidad de oxidación química y biológica, la velocidad de descomposición de la materia orgánica existente ya en

el suelo, la textura del suelo y la aireación (Julca *et al.*, 2006). <<Procesos como la mineralización y humificación de la materia orgánica se rigen en gran medida por reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, que como es sabido, son catalizadas por enzimas producidos por los microorganismos del suelo>> (García, 2013). Por lo tanto, la adición de microorganismos benéficos contribuye al proceso constante de transformación de la materia orgánica y consecuentemente a la liberación de nutrientes.

Los hongos, los actinomicetes y muchas bacterias tienen la capacidad de producir enzimas extracelulares que hidrolizan los polímeros y dan lugar a compuestos más sencillos que pueden ser utilizados por ellos y por otros que no poseen capacidad celulolítica o proteolítica (Pedraza *et al.*, 2010), en virtud de lo cual amerita identificar los microorganismos benéficos y los tipos de enzimas que producen, para potenciar su uso en la agricultura, lo cual contribuiría a un mejor aprovechamiento de la materia orgánica del suelo.

4.5.5 Nitrógeno

Con respecto al porcentaje del nitrógeno en el suelo, en el cuadro 62, se presentan los valores al inicio de la investigación y 120 días después. El contenido de N al inicio de del experimento presentó 0,10 por ciento mientras que 120 días después ascendió en todos los tratamientos, el suelo del tratamiento T8 presentó 0,30 por ciento y fue el valor más alto registrado, los suelos de los tratamientos T4 y T7 registraron 0,17 por ciento y fueron los valores más bajos constatados.

Cuadro 62: Comparación entre valores de N

Tratamientos	N (%)	
	Día 0	Día 120
T1	0,10	0,25
T2	0,10	0,24
T3	0,10	0,18
T4	0,10	0,17
T5	0,10	0,18
T6	0,10	0,21
T7 (EM1)	0,10	0,17
T8 (Testigo)	0,10	0,30

La variación del porcentaje de nitrógeno en los suelos de los diferentes tratamientos al inicio de la investigación y 120 días después, se presentan gráficamente en la figura 176. En todos los suelos se incrementó el contenido de nitrógeno, sin embargo, la variación no fue uniforme, en el suelo del tratamiento T8 se registró el más alto porcentaje, mientras que en los tratamientos T4 y T7 se verificó el más bajo contenido de nitrógeno.

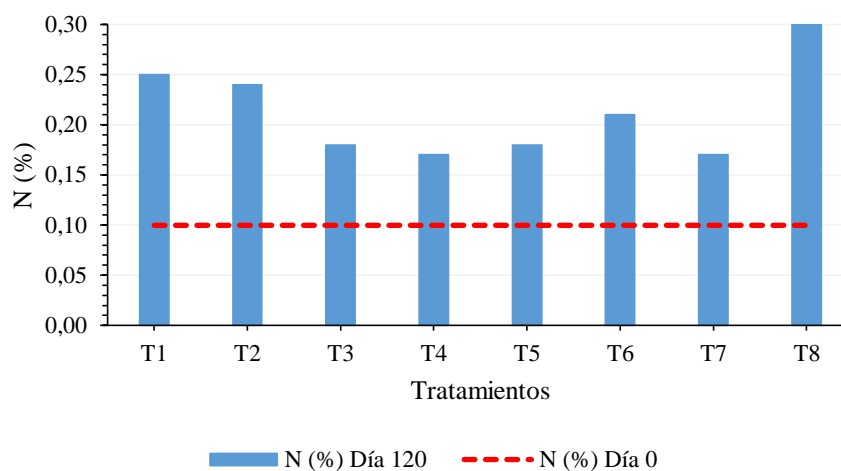


Figura 176: Comparación entre valores de N de los diferentes tratamientos

La principal forma que ingresó el nitrógeno a los suelos, fue a través de la aplicación de soluciones nutritivas, pero todos los tratamientos que recibieron aplicación de microorganismos benéficos presentaron una tasa de N inferior al tratamiento control.

Es importante considerar que los suelos agrícolas no son uniformes en su conjunto, aún dentro de los límites de una zona climática o confines de una finca e incluso dentro de una pequeña parcela el contenido de nitrógeno varía según las condiciones de drenaje, topografía o textura del suelo (Navarro, 2003), además, el nitrógeno orgánico está íntimamente relacionado con la materia orgánica del suelo.

En la variación del porcentaje de N en cada tratamiento es relevante destacar que la mineralización del nitrógeno orgánico a formas de N inorgánico disponible para las plantas (NO_3^- y NH_4^+) se desarrolla por microorganismos heterótrofos del suelo que utilizan las sustancias orgánicas carbonadas como fuente de energía; la humedad, la temperatura del suelo y el contenido de materia orgánica afectan la tasa de mineralización, suelos con mayores niveles de materia orgánica mineralizarán mayores cantidades de nitrógeno (Álvarez y Rimski, 2016), los microorganismos que intervienen en el proceso de amonificación son muy variados, es difícil establecer los que intervienen, así como los predominantes ya que los fenómenos de sinergia y competencia juegan un papel importante. No obstante las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Proteus*, *Bacillus* y *Bacterium* al parecer son los microorganismos amonificantes más extendidos, pero también intervienen notablemente actinomicetos y hongos (Navarro, 2003), la demanda de los mismos nutrientes conduce a una competencia significativa entre las plantas y los microorganismos en la rizósfera, los factores bióticos tienen un fuerte efecto en esta competición, la densidad de

raíces y la formación de micorrizas son cruciales en el cambio de la adquisición de N a las raíces (Kuzyakov y Xu, 2013).

La pérdida de nitrógenos en el suelo o desnitrificación es un proceso de reducción de nitratos hasta nitrógeno gas, <<los microorganismos responsables de la desnitrificación son especies bacterianas heterótrofas del género *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus* y *Achromobacter* y autótrofas del género *Thiobacillus*>> (Navarro, 2003).

La presencia de microorganismos benéficos de tres pisos altitudinales contribuye a la mineralización del N orgánico en inorgánico lo cual es importante ya que es aprovechado por las plantas y repercute en su crecimiento. En cada uno de los tratamientos la población microbiana es diferente; en la investigación de la conversión de la agricultura convencional a la gestión orgánica, los resultados indican que el manejo orgánico indujo un cambio en la composición de la comunidad microbiana que resultó en una comunidad más diversa hacia sustratos lábiles y una mayor capacidad para mineralizar N (Berthrong *et al.*, 2013), por lo tanto, el contenido de este nutriente en el suelo, desciende. En el Tratamiento T8 que no recibió inoculación de MOB, es posible que el proceso de mineralización del nitrógeno, así como de desnitrificación este directamente relacionado con la cantidad y especies de microorganismos presentes, propios del sitio.

4.5.6 Fósforo

En el cuadro 63, se presenta los contenidos de fósforo al inicio de la investigación y 120 días después de establecido el experimento. Inicialmente el fósforo presentó una concentración de 18,80 ppm y posteriormente ascendió de forma indistinta en los diferentes tratamientos. El suelo del tratamiento T1 presentó la más alta concentración de P con 385,30 ppm en tanto que el suelo del tratamiento T4 registró únicamente 68,40 ppm. La variación de la concentración de P en los suelos de los diferentes tratamientos no es uniforme.

Cuadro 63: Comparación entre valores de fósforo

Tratamientos	P (ppm)	
	Día 0	Día 120
T1	18,80	385,30
T2	18,80	176,60
T3	18,80	131,10
T4	18,80	68,40
T5	18,80	175,80
T6	18,80	208,80
T7 (EM1)	18,80	77,80
T8 (Testigo)	18,80	273,90

En la figura 177, se observa que 120 días después de establecido el cultivo los suelos de todos los tratamientos presentaron un incremento en la concentración de fósforo. La concentración de P en el tratamiento T1 fue la más elevada mientras que en el tratamiento T4 la concentración fue la más baja. Cada tratamiento presentó un comportamiento diferente con respecto a la variación de la concentración de este nutriente.

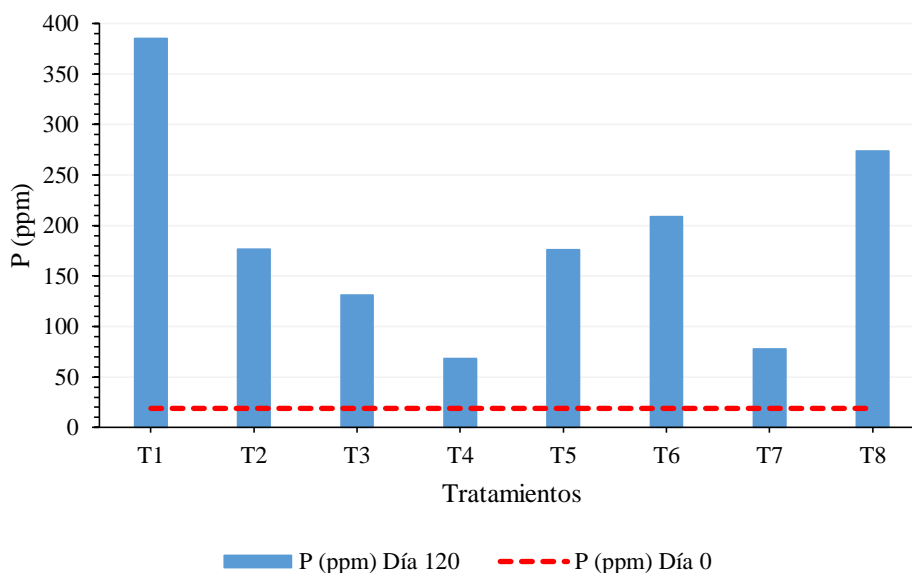


Figura 177: Comparación entre valores de fósforo en los diferentes tratamientos

Durante la fase de desarrollo del cultivo, mediante soluciones fertilizantes se aplicó fósforo en forma uniforme al suelo de todos los tratamientos, pero 120 días después del trasplante el contenido de P fue diferente entre todos los tratamientos; en el 85,71 por ciento de los tratamientos el contenido de fósforo fue inferior al tratamiento testigo y en el 14,29 por ciento de suelos la concentración de fósforo superó al del tratamiento control.

La principal forma que el fósforo ingresa a los suelos es por el agregado de enmiendas orgánicas o fertilizantes minerales, los microorganismos del suelo actúan en la descomposición de los residuos y la mineralización de la materia orgánica liberando P a la solución del suelo (Álvarez y Rimski, 2016), que es la forma en la que encontramos en diferentes concentraciones en los suelos de cada uno de los tratamientos, pero el fósforo que se encuentra en el suelo no es directamente aprovechado por las raíces de las plantas y es allí donde radica la importancia de los microorganismos que mejoran el aprovechamiento del P.

Las poblaciones de microorganismos realizan una función importante en la zona rizosférica ya que el fósforo insoluble del suelo, resultado de la aplicación de los fertilizantes fosforados,

que no pueden ser asimilados por la planta es solubilizado por microorganismos que usan diferentes mecanismos de solubilización, como la producción de ácidos orgánicos, entonces los fosfatos solubles son absorbidos y aprovechados por las plantas (Beltran, 2014), al respecto Rodríguez y Fraga (1999) manifiestan que <<el principal mecanismo para la solubilización de fosfato mineral es la producción de ácidos orgánicos, y ácido fosfatasas desempeñan un papel importante en la mineralización de fósforo orgánico en el suelo>>.

De acuerdo a Corrales *et al.* (2014) el género *Bacillus* se ha destacado como un potencial solubilizador del fósforo, también hay microorganismos que mejoran el aprovechamiento del P edáfico como las micorrizas, *Pseudomonas* y *Azospirillum* (Álvarez y Rimski, 2016), según Rodríguez y Fraga (1999) además de *Pseudomonas*, también las cepas de los géneros *Bacillus* y *Rhizobium* están entre los más potentes inductores de disolución de fosfato.

La solubilización de fosfatos es una de las funciones que se ha convertido en tema de investigación por su importancia para la agricultura. Entre los géneros bacterianos que poseen esta cualidad se destacan *Bacillus* sp, *Stenotrophomonas* sp, *Burkholderia* sp, *Pseudomonas* sp, *Rhizobium* sp, *Vibrio proteolyticus*, *Enterobacter aerogenes* y *Streptomyces* sp, entre otros (Bobadilla y Rincón, 2008); de acuerdo a Arévalo (2014) entre las especies potencialmente solubilizadoras de P se encuentran: *Bacillus licheniformes*, *B. pumilus*, *B. subtilis* y *B. brevis* <<de tal manera que el uso de microorganismos como inoculantes para movilizar fuentes de fósforo pobremente disponibles en el suelo, constituye una alternativa para reducir la contaminación ambiental y mejorar la productividad de los cultivos>> (Fernández y Rodríguez, 2005); por lo tanto, el <<uso de bacterias solubilizantes de fosfatos como inoculantes aumenta simultáneamente la absorción de P y rendimiento de la planta y el cultivo>> (Rodríguez y Fraga, 1999).

Se asume que en la carga microbiana inoculada en cada uno de los tratamientos existe la presencia de microorganismos que solubilizan el fósforo, que los microorganismos en cada caso son diferentes y también la carga microbiana, por lo tanto, es diferente la actividad solubilizadora, en el tratamiento utilizado como testigo la concentración inicial de microorganismos se incrementa con la adición de materia orgánica y más condiciones favorables.

Se concluye que en el suelo del tratamiento T1 y T8 la presencia de microorganismos solubilizadores de fósforo son escasas, razón por la que presentan altas concentraciones, el

fósforo asimilable es aprovechado por las plantas en sus procesos fisiológicos. Se deduce que en el suelo del tratamiento T4 la carga microbiana presenta afinidad para solubilizar el fósforo, razón por la que disminuye su contenido.

4.5.7 Potasio

La concentración de potasio al inicio de la investigación y 120 días después de establecido el cultivo se presenta en el cuadro 64. Inicialmente la concentración de K en el suelo donde se estableció el experimento fue de 466 ppm mientras que 120 días después se alcanzó concentraciones máximas de 678 ppm en el suelo del tratamiento T1. El valor más bajo registrado corresponde al suelo del tratamiento T4 que presentó una concentración de potasio de 577 ppm.

Cuadro 64: Comparación entre contenidos de potasio en el suelo

Tratamientos	K (ppm)	K (ppm)
	Día 0	Día 120
T1	466,00	678,00
T2	466,00	594,00
T3	466,00	628,00
T4	466,00	577,00
T5	466,00	634,00
T6	466,00	622,00
T7 (EM1)	466,00	584,00
T8 (Testigo)	466,00	646,00

En la figura 178, se observa que en el suelo de todos los tratamientos tanto en aquellos que recibieron aplicación de microorganismos benéficos, así como en el tratamiento que no recibió inoculación, presentaron un incremento en la concentración de potasio 120 días después de establecido el cultivo. El incremento de K varió entre los diferentes tratamientos, la más alta concentración se evidenció en T1 y la concentración más baja correspondió al suelo del tratamiento T4.

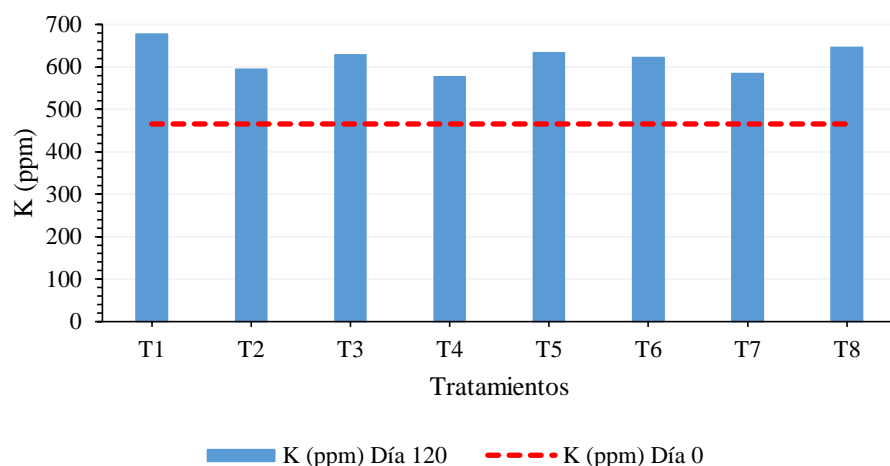


Figura 178: Comparación entre los valores de Potasio de los diferentes tratamiento

Durante el desarrollo del cultivo se adicionó continuamente en forma homogénea a todos los tratamientos soluciones nutritivas con contenidos de potasio. El potasio (K) es el tercer principal nutriente esencial de la planta y desempeña un papel esencial para la activación de la enzima, la síntesis de proteínas, la fotosíntesis y la calidad del producto (Biswas y Basak 2013).

Trascurridos 120 días de la plantación de fresas, en el 85,71 por ciento de los tratamientos con microorganismos benéficos la concentración de potasio fue inferior a la del tratamiento testigo sin embargo las diferencias entre concentraciones son muy pequeñas, no se evidenció clara influencia de los microorganismos inoculados en el suelo con respecto a la variación del contenido de K.

Diversos factores afectan el equilibrio del potasio en el suelo, entre los cuales se menciona: la composición coloidal del suelo, la humedad y sequedad, la temperatura y el pH del suelo (Navarro, 2003). Los microorganismos solubilizantes de potasio (KSM) son microorganismos rizosféricos que solubilizan el potasio (K) insoluble en formas solubles de K para el crecimiento y rendimiento de la planta (Meena *et al.*, 2014). Velázquez y Ramos (2015) cita que las *Pseudomonas* solubilizan el potasio, en todos los suelos de esta investigación incluyendo el tratamiento testigo está presente *Pseudomonas* sp. debido a su ingreso en el agua de riego. Prajapat *et al.* (2013) manifiesta que entre los hongos y bacterias con capacidad solubilizadora de potasio destacan *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aspergillus* y *Rhizobium*, los tres primeros se encontraron en todos los suelos en este estudio y pudieron haber afectado en la fluctuación de la concentración de K entre tratamientos. Meena *et al.* (2014) enfatiza que la solubilización de K se lleva a cabo por un gran número de bacterias

saprófitas (*Bacillus mucilaginosus*, *Bacillus edaphicus*, *Bacillus circulans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Paenibacillus* spp.) y cepas fúngicas (*Aspergillus* spp. y *Aspergillus terreus*).

4.6 RECUENTO DE MICROORGANISMOS DEL SUELO

El análisis microbiológico (anexo 8) mostró baja carga microbiana inicial de *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., mohos y actinomicetos, así como la ausencia de *Pseudomonas* sp.

Es relevante conocer la población microbiana antes y después de inoculado los microorganismos benéficos, con la finalidad de determinar los posibles factores que afectan la variación en la concentración microbiana en los diferentes tratamientos.

En primera instancia se realizará el análisis del recuento de *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., mohos, *Pseudomonas* sp., y actinomicetos para posteriormente analizar y discutir los factores que los afectan.

4.6.1 Recuento de *Bacillus* sp. (UFC.g⁻¹)

Con respecto a recuento y comparación de *Bacillus* sp. (UFC.g⁻¹) en el suelo antes de iniciar el cultivo y 120 días después del trasplante, en el cuadro 65 se observa que la concentración inicial fue 1,70 X 10⁶ (UFC.g⁻¹) de *Bacillus* sp. y transcurrido 120 días existió descenso en unos tratamientos e incremento en otros. En el suelo del tratamiento T2 descendió a 9,70 X 10⁵ (UFC.g⁻¹) mientras que en el suelo del tratamiento T4 las unidades formadoras de colonia por gramo de suelo ascendieron hasta 4,20 X 10⁶ UFC.g⁻¹ y fue el valor más alto registrado.

Cuadro 65: Comparación de recuento de *Bacillus* sp. (UFC.g⁻¹)

Tratamientos	UFC.g ⁻¹	UFC.g ⁻¹
	Día 0	Día 120
T1	1,70 X 10 ⁶	2,10 X 10 ⁶
T2	1,70 X 10 ⁶	9,70 X 10 ⁵
T3	1,70 X 10 ⁶	1,40 X 10 ⁶
T4	1,70 X 10 ⁶	4,20 X 10 ⁶
T5	1,70 X 10 ⁶	2,70 X 10 ⁶
T6	1,70 X 10 ⁶	3,70 X 10 ⁶
T7 (EM1)	1,70 X 10 ⁶	1,60 X 10 ⁶
T8 (Testigo)	1,70 X 10 ⁶	4,00 X 10 ⁶

En la figura 179, se constata que con respecto a las unidades formadoras de colonias de *Bacillus* sp., antes de establecer el trasplante y 120 días después de establecido el mismo, existen modificaciones en el número de UFC por gramo de suelo, en los suelos de los

tratamientos T2, T3 y T7 decreció, mientras que en los suelos de todos los demás tratamientos ascendió la concentración de *Bacillus* sp. El mayor incremento se evidenció en el suelo del tratamiento T4, el suelo del tratamiento T8 que no recibió inoculación de microorganismos benéficos presentó un importante aumento en el número de UFC.g⁻¹ de suelo.

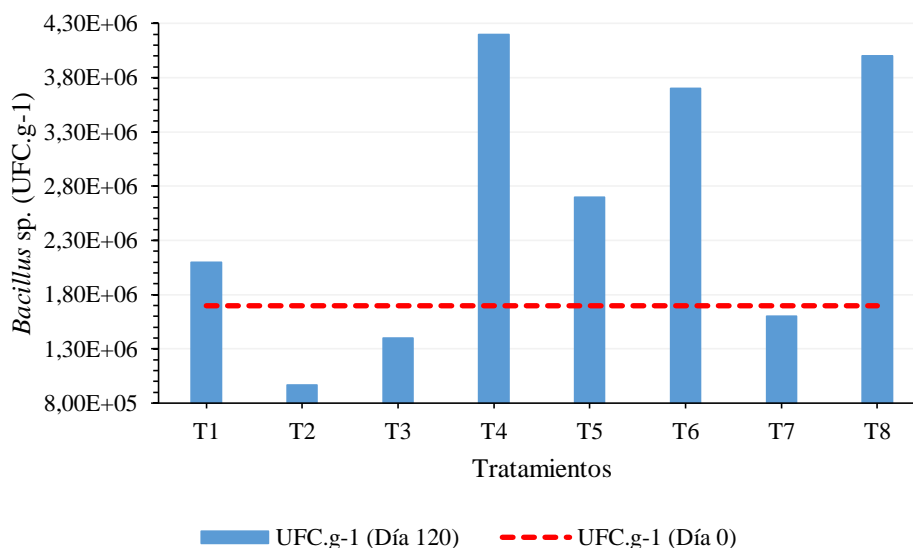


Figura 179: Comparación de recuento de *Bacillus* sp. (UFC.g⁻¹) de suelos, entre el día cero y 120 días después del trasplante de fresa (*Fragaria* sp.)

4.6.2 Recuento de *Lactobacillus* sp. (UFC.g⁻¹)

En el cuadro 66, se observa que la carga microbiana inicial de *Lactobacillus* sp., en el suelo antes de plantar la fresa fue $1,00 \times 10^4$ (UFC.g⁻¹) pero 120 días después del trasplante se incrementó en todos los tratamientos. En el suelo del tratamiento T2 se constató $1,30 \times 10^6$ (UFC.g⁻¹) y fue la concentración más alta registrada, mientras en T8 se verificó únicamente $1,00 \times 10^5$ (UFC.g⁻¹) que fue el registro de unidades formadoras de colonias más baja comprobado.

Cuadro 66: Comparación de recuento de *Lactobacillus* sp. (UFC.g⁻¹)

Tratamientos	UFC.g ⁻¹	UFC.g ⁻¹
	Día 0	Día 120
T1	$1,00 \times 10^4$	$2,40 \times 10^5$
T2	$1,00 \times 10^4$	$1,30 \times 10^6$
T3	$1,00 \times 10^4$	$5,90 \times 10^5$
T4	$1,00 \times 10^4$	$5,40 \times 10^5$
T5	$1,00 \times 10^4$	$5,10 \times 10^5$
T6	$1,00 \times 10^4$	$5,60 \times 10^5$
T7 (EM1)	$1,00 \times 10^4$	$3,30 \times 10^5$
T8 (Testigo)	$1,00 \times 10^4$	$1,00 \times 10^5$

En la figura 180, se evidencia que 120 días después del trasplantes todos los tratamientos incrementaron las unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* sp., en el suelo plantado con fresa, pero sin embargo el incremento no fue uniforme en todos los suelos, se constata que el tratamiento que no recibió aplicación de microorganismos benéficos también aumentó su población sin embargo fue muy inferior a los otros tratamientos, en el suelo del tratamiento T2 el crecimiento poblacional de *Lactobacillus* sp., fue muy significativo y superior a todos los demás.

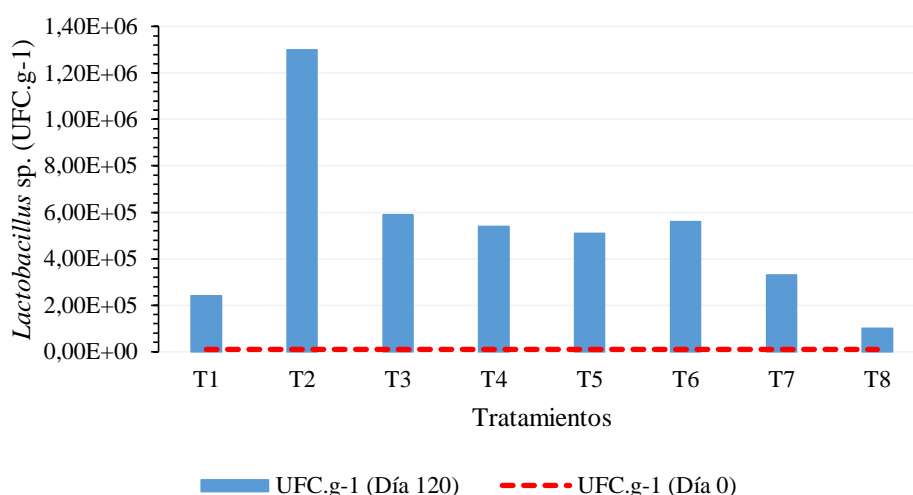


Figura 180: Comparación de recuento de *Lactobacillus* sp. (UFC.g⁻¹) de suelos, entre el día cero y 120 días después del trasplante de fresa (*Fragaria* sp.)

4.6.3 Recuento de mohos (UFC.g⁻¹)

En el cuadro 67, se observa que la concentración inicial de mohos UFC.g⁻¹ de suelo previo al cultivo de fresa fue baja, con una carga de 1,00 X 10⁴ UFC.g⁻¹ de suelo, pero después de realizado el trasplante, en el suelo de todos los tratamientos el incremento fue significativo, en el suelo del tratamiento T6 se constata 8,10 X 10⁴ UFC.g⁻¹ de suelo y fue la carga microbiana más alta registrada.

Cuadro 67: Comparación de recuento de mohos (UFC.g⁻¹)

Tratamientos	UFC.g ⁻¹	
	Día 0	Día 120
T1	1,00 X 10 ⁴	5,10 X 10 ⁴
T2	1,00 X 10 ⁴	5,10 X 10 ⁴
T3	1,00 X 10 ⁴	7,80 X 10 ⁴
T4	1,00 X 10 ⁴	7,90 X 10 ⁴
T5	1,00 X 10 ⁴	5,10 X 10 ⁴
T6	1,00 X 10 ⁴	8,10 X 10 ⁴
T7 (EM1)	1,00 X 10 ⁴	3,20 X 10 ⁴
T8 (Testigo)	1,00 X 10 ⁴	3,60 X 10 ⁴

En lo que respecta a la comparación de mohos en el suelo antes de realizar el trasplante y luego de establecido el cultivo, en la figura 181 se muestra que en el suelo de todos los tratamientos que recibieron aplicación de microorganismos benéficos y en el suelo que no recibió aplicación de microorganismos benéficos las UFC de mohos se incrementaron notablemente, pero el aumento no fue uniforme; en el suelo de los tratamientos T3, T4, y T6 se registró el mayor aumento mientras que en el suelo de los tratamientos T7 y T8 el incremento de UFC.g⁻¹ de suelo fue menor.

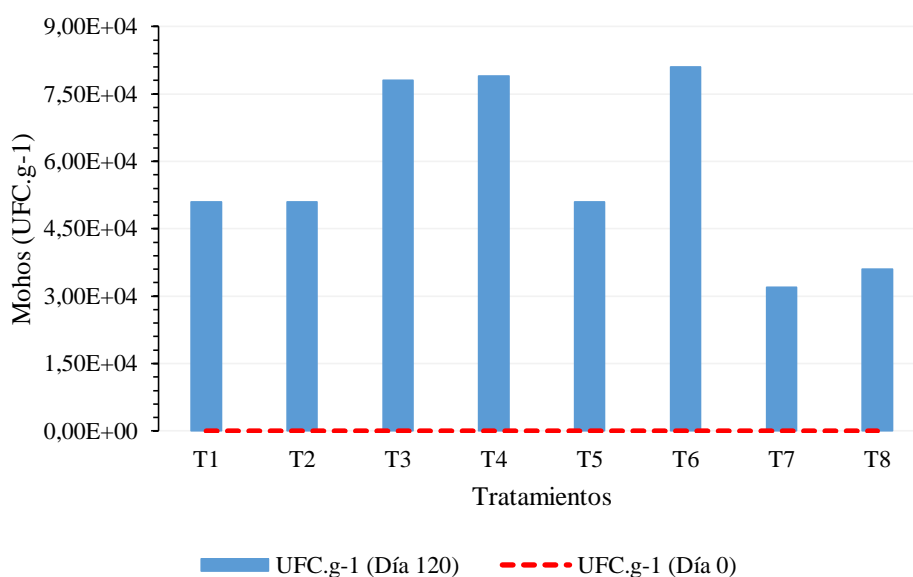


Figura 181: Comparación de recuento de mohos (UFC.g⁻¹) de suelos entre el día cero y 120 días después del trasplante de fresa (*Fragaria* sp.)

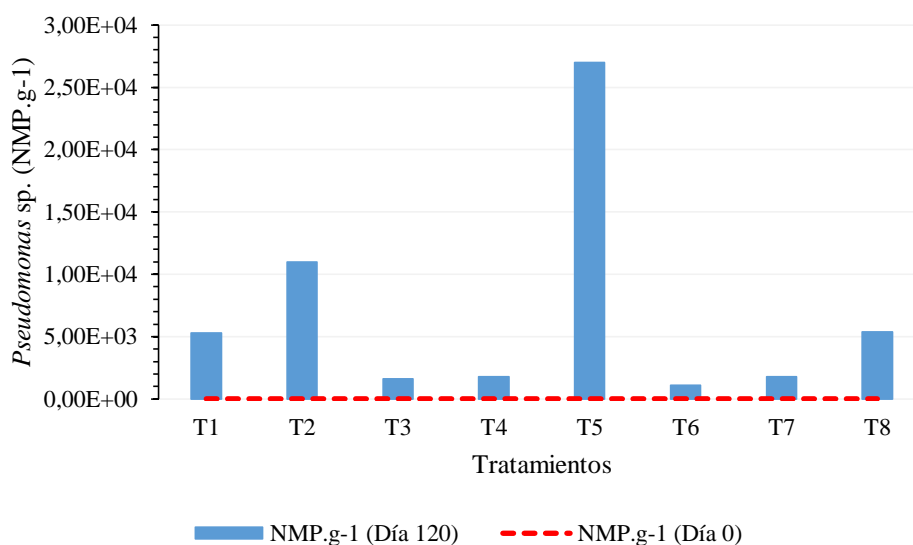
4.6.4 Enumeración de *Pseudomonas* sp. (NMP.g⁻¹)

La enumeración de *Pseudomonas* sp., en el suelo antes de establecer el cultivo y luego de realizado el trasplante de fresa se expone en el cuadro 68, se destaca que inicialmente no existe *Pseudomonas* sp. en el suelo de ninguno de los tratamientos, pero luego de iniciado el cultivo se registra presencia de *Pseudomonas* sp en el suelo de todos los tratamientos. En el tratamiento T6 se constata $1,10 \times 10^3$ (NMP.g⁻¹) de suelo que fue el menor valor registrado, mientras que en el tratamiento T5 se verifica $2,70 \times 10^4$ (NMP.g⁻¹) de suelo de *Pseudomonas* sp.

Cuadro 68: Comparación de enumeración de *Pseudomonas* sp. (NMP.g⁻¹)

Tratamientos	NMP.g ⁻¹	NMP.g ⁻¹
	Día 0	Día 120
T1	0,00	5,30 X 10 ³
T2	0,00	1,10 X 10 ⁴
T3	0,00	1,60 X 10 ³
T4	0,00	1,80 X 10 ³
T5	0,00	2,70 X 10 ⁴
T6	0,00	1,10 X 10 ³
T7 (EM1)	0,00	1,80 X 10 ³
T8 (Testigo)	0,00	5,40 X 10 ³

En la figura 182, se observa que 120 días después del trasplante de fresas, en el suelo del tratamiento T5 se presentó mayor concentración de *Pseudomonas* sp., mientras que en el suelo del tratamiento T6 la concentración de *Pseudomona* sp., fue inferior al suelo de todos los demás tratamientos. Es evidente que existe *Pseudomonas* sp. en el suelo de los tratamientos que recibieron inoculación de MOB's y en el suelo del tratamiento que no recibió aplicación de microorganismos benéficos inclusive el (NMP.g⁻¹) de suelo de *Pseudomonas* sp., en el tratamiento T8 fue superior al (NMP.g⁻¹) de suelo de *Pseudomonas* sp., de los tratamientos T3, T4, T6 y T7.

**Figura 182: Comparación de enumeración de *Pseudomonas* sp. (NMP.g⁻¹) de suelos, entre el día cero y 120 días después del trasplante de fresa *Fragaria* sp.**

4.6.5 Recuento de actinomicetos (UFC.g⁻¹)

En relación al recuento y comparación de actinomicetos en el suelo antes de establecer el cultivo de fresa y luego de realizado el trasplante, en el cuadro 69 se observa que la concentración inicial de actinomicetos fue 9,30 X 10⁵ (UFC.g⁻¹) de suelo y transcurrido un

periodo de 120 días la población de aumentó en todos los tratamientos excepto en el suelo del tratamiento T8 que presenta $5,70 \times 10^5$ (UFC.g⁻¹) de suelo. El tratamiento T2 presenta $1,80 \times 10^7$ unidades formadoras de colonias de actinomicetos por cada gramo de suelo y fue la mayor población microbiana registrada.

Cuadro 69: Comparación de recuento de actinomicetos (UFC.g⁻¹)

Tratamientos	UFC/g	
	Día 0	Día 120
T1	$9,30 \times 10^5$	$5,10 \times 10^6$
T2	$9,30 \times 10^5$	$1,80 \times 10^7$
T3	$9,30 \times 10^5$	$1,90 \times 10^6$
T4	$9,30 \times 10^5$	$1,00 \times 10^6$
T5	$9,30 \times 10^5$	$4,90 \times 10^6$
T6	$9,30 \times 10^5$	$3,10 \times 10^6$
T7 (EM1)	$9,30 \times 10^5$	$2,30 \times 10^6$
T8 (Testigo)	$9,30 \times 10^5$	$5,70 \times 10^5$

La comparación gráfica de las unidades formadoras de colonias de actinomicetos por cada gramo de suelo se presenta en la figura 183, todos los suelos que recibieron inoculación de microorganismos benéficos incrementaron la población microbiana, la misma que no es igual en todos los tratamientos; el suelo del tratamiento T2 se destacó por el mayor número de UFC de actinomicetos por cada gramo de suelo que superó ampliamente a los demás tratamientos especialmente a la carga microbiana del suelo de los tratamientos T3 y T4. En el suelo del tratamiento T8 las UFC de actinomicetos por cada gramo de suelo fue inferior a la carga inicial determinada.

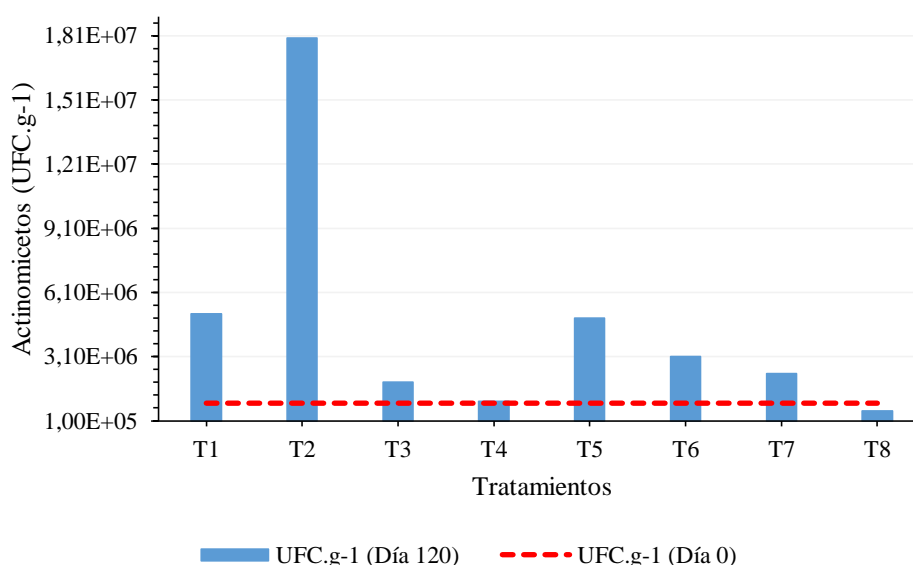


Figura 183: Comparación de recuento de actinomicetos (UFC.g⁻¹) de suelos entre el día cero y 120 días después del trasplante de fresa (*Fragaria* sp.)

Después de verificar la población microbiana en el suelo de todos los tratamientos antes de establecer el cultivo y 120 días más tarde, se comprobó que cada microorganismo tiene un comportamiento poblacional diferente y que la inoculación de microorganismos no garantiza el incremento poblacional, no obstante, en la mayoría de casos mejora las características biológicas del suelo.

Mediante análisis de suelo de todos los tratamientos se realizó la comparación poblacional de *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., mohos, *Pseudomonas* sp. y actinomicetos, teniendo presente la concentración de microorganismos antes de establecer el cultivo de fresa (*Fragaria* sp.) y 120 días después de realizado el trasplante.

Se determinó que la población de *Bacillus* sp. difiere entre todos los tratamientos y que las UFC.g⁻¹ de suelo se incrementó en cinco tratamientos y descendió en tres tratamientos, la mayor población se registró en suelo del tratamiento T4 y la menor población se constató en el tratamiento T2; el tratamiento que no recibió aplicación de microorganismos beéficos también aumentó la tasa de *Bacillus* sp., casi a la par del tratamiento T4.

En referencia a *Lactobacillus* sp. la población de estos microorganismos en el suelo de todos los tratamientos es heterogénea, las UFC.g⁻¹ de suelo aumentó en todos los tratamientos, el incremento más significativo se registró en el tratamiento T2, mientras que el menor crecimiento poblacional se constató en el suelo del tratamiento T8 que no recibió inoculación de microorganismo benéficos.

Con respecto a mohos, las UFC.g⁻¹ de suelo se incrementaron significativamente en todos los tratamientos que recibieron inoculación de microorganismos benéficos, la mayor tasa poblacional se constató en el suelo del tratamiento T6 mientras que la población más baja se verificó en los tratamientos T7 y T8.

Con referencia a *Pseudomonas* sp. al inicio del cultivo, en el suelo de ninguno de los tratamientos se determinó su presencia, pero transcurrido 120 días la carga microbiana se presentó en todos los tratamientos, la más alta concentración se evidenció en el suelo del tratamiento T5 mientras que la más baja concentración se constató en el suelo del tratamiento T6; la densidad poblacional de *Pseudomonas* sp., no fue uniforme entre los diferentes tratamientos.

La población de actinomicetos aumentó en todos los tratamientos que recibieron inoculación de microorganismos benéficos y de manera significativa en el suelo del tratamiento T2

mientras que en el suelo del tratamiento testigo (T8) la población de actinomicetos descendió.

La importancia de los microorganismos, radica en las funciones críticas que tienen en el funcionamiento del suelo, en el ciclo de nutrientes, la formación estructural y las interacciones de las plantas, tanto positivas como negativas (Harris, 2009), estos desempeñan un papel clave en el funcionamiento del ecosistema y se sabe que están influenciados por varios factores como la cobertura vegetal o los parámetros edáficos (Gourmelon *et al.*, 2016).

La carga microbiana de los suelos inoculados con microorganismos benéficos aumentó notablemente favoreciendo las condiciones del suelo y desarrollo de las plantas de fresa (*Fragaria* sp.), <<las poblaciones microbianas del suelo están inmersas en un marco de interacción que afecta el desarrollo de las plantas y la calidad del suelo>> (Pedraza *et al.*, 2010). De forma indistinta la población de microorganismos en los suelos que no recibieron inoculación de microorganismos benéficos también se incrementó, aunque no al nivel de los suelos tratados con consorcios microbianos beneficiosos, probablemente debido a la población inicial existente, al vermicompost incorporado como enmienda << *el humus joven es sede de una intensa actividad microbiana* >> (Julca *et al.*, 2006), a la carga microbiana presente en el agua de riego y a la presencia de vegetación. Acuña (2006) menciona que la situación de los microbios cambia drásticamente cuando se introducen plantas en el sistema, ya que los microorganismos aprovechan los sustratos energéticos suministradas por las especies vegetales cuando se encuentran en la zona próxima a la raíz y proliferan en ella.

Los consorcios de microorganismos de acuerdo al piso altitudinal del cual provienen presentaron desigual respuesta de densidad poblacional en el suelo de cada uno de los tratamientos, debido a que se tratarían de especies diferentes con propiedades particulares de adaptación, ya que <<los requerimientos de los distintos microorganismos en cuanto a la composición del medio de cultivo y a las demás condiciones ambientales son muy variables>> (Schlegel, 1997) ya que la población microbiana en el suelo es muy diversa (Nannipieri *et al.*, 2017).

Según Gálvez (2001) en una comunidad microbiana, la diversidad y abundancia de microorganismos está controlada por los recursos (alimentos) y por las condiciones (temperatura, humedad, concentración de oxígeno, etc.) que existen en el medio. Coyne

(2000) cita que la viabilidad del inóculo, la cantidad de inóculo para producir el cambio deseado y la capacidad de los microorganismos contenido en el inóculo para multiplicarse y sobrevivir en el suelo son tres factores que garantizan la inoculación. Además, las plantas producen una amplia gama de compuestos orgánicos, incluidos azúcares, ácidos orgánicos y vitaminas, que pueden ser utilizados como nutrientes por poblaciones microbianas (Ortíz-Castro *et al.*, 2009).

Especulamos que diversos factores afectaron la supervivencia y desarrollo de los microorganismos inoculados, ya que el suelo es un sistema biológico complejo y dinámico en el que es difícil determinar la composición de las comunidades microbianas (Nannipieri *et al.*, 2017), <<*muchos creen que, cuando los microorganismos benéficos son cultivados e inoculados en los suelos, su número es relativamente pequeño comparado con sus habitantes nativos, y ellos pueden ser rápidamente suprimidos por la microflora establecida en él*>> (Higa y Parr, 1994), en las interacciones microbianas en el suelo en estudio existiría una competencia entre microorganismos del sitio y las especies introducidas. La inoculación de microorganismos induciría al menos una perturbación transitoria del equilibrio de las comunidades microbianas del suelo (Trabelsi y Mhamdi, 2013), por lo que de acuerdo a Coyne (2000) al introducir poblaciones externas estas no presentan completo éxito de adaptación en un corto tiempo.

Los cambios en las concentraciones de microorganismos en todos los tratamientos en estudio, demuestra que las comunidades microbianas comprenden interacciones complejas entre organismos diversos, razón por la que deben estudiarse como tales, y no como una "caja negra" en la que se ingresan los insumos y se reciben los productos (Kennedy y Smith, 1995).

Es positiva la inoculación de microorganismos benéficos de tres pisos altitudinales al suelo, debido a que las comunidades microbianas son responsables del ciclo del carbono (C) y de los nutrientes en los ecosistemas, y sus actividades están reguladas por factores bióticos y abióticos, la temperatura y la humedad (Castro *et al.*, 2010).

4.7 ANÁLISIS FITOPATOLÓGICO DEL SUELO

Con la finalidad de conocer cómo cambia la población nativa de hongos del suelo con la inoculación de microorganismos benéficos de tres pisos altitudinales, se realizó el análisis

fitopatológico del suelo antes de establecer el cultivo y 120 días después de plantada la fresa (*Fragaria* sp.).

En primer lugar, examinaremos las unidades formadoras de colonias de *Rhizopus* sp, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxisporum*, *Fusarium solani* y *Cladosporium* sp., para posteriormente analizar la variación poblacional en cada caso.

4.7.1 *Rhizopus* sp. (UFC.g⁻¹)

Con respecto a las unidades formadoras de colonias de *Rhizopus* sp. por gramo de suelo, en el cuadro 70 se verifica que antes de establecer el cultivo las UFC.g⁻¹ de suelo fueron 5,00E+02 mientras que 120 días después la población varió, el mayor número de UFC.g⁻¹ de suelo se presentó en los tratamientos T1 y T2 con un valor de 5,00 X 10². En los suelos de los tratamientos T3, T4, T5 y T8 no se constató UFC de *Rhizopus* sp.

Cuadro 70: Comparación de recuento de *Rhizopus* sp. (UFC.g⁻¹)

Tratamientos	UFC.g ⁻¹	UFC.g ⁻¹
	(Día 0)	(Día 120)
T1	5,00 X 10 ²	1,00 X 10 ³
T2	5,00 X 10 ²	1,00 X 10 ³
T3	5,00 X 10 ²	0,00
T4	5,00 X 10 ²	0,00
T5	5,00 X 10 ²	0,00
T6	5,00 X 10 ²	5,00 X 10
T7 (EM1)	5,00 X 10 ²	5,00 X 10 ²
T8 (Testigo)	5,00 X 10 ²	0,00

En la figura 184, se confirma que las unidades formadoras de colonias del hongo *Rhizopus* sp., fue diferente en el suelo de cada uno de los tratamientos. En los suelos de los tratamientos T3, T4, T5 que recibieron inoculación de microorganismos benéficos, así como en el suelo del tratamiento T8 que no recibió inoculación de microorganismos benéficos no se verificó presencia del hongo en análisis 120 días después de establecido el cultivo, sin embargo, antes de la plantación existió *Rhizopus* sp. En el suelo del tratamiento comercial T7 la población microbiana no cambió mientras que en los suelos de los tratamientos T1 y T2 la población de hongos se incrementó.

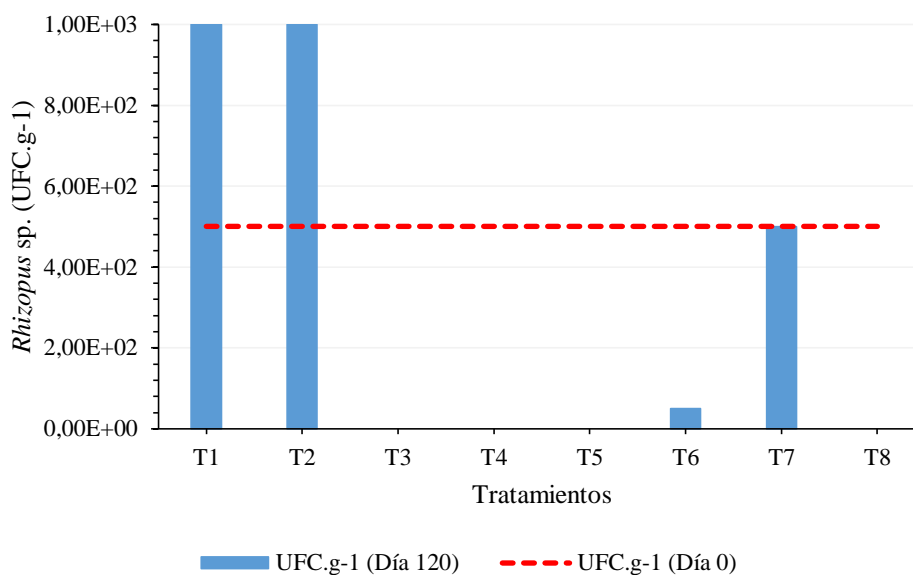


Figura 184: Comparación de recuento de *Rhizopus* sp. (UFC.g⁻¹)

4.7.2 *Aspergillus niger* (UFC.g⁻¹)

En el cuadro 71, se observa que las UFC.g⁻¹ de suelo de *Aspergillus niger* antes de establecer el cultivo de fresa (*Fragaria* sp.) fue de 2,00E+03, pero transcurridos 120 días la población de este microorganismo en los suelos de los diferentes tratamientos cambió. En los tratamientos T3 y T8 se observa el mayor incremento con 5,00E+03 UFC.g⁻¹ de suelo. En el suelo de todos los demás tratamientos las unidades formadoras de colonias de *Aspergillus niger* descendió.

Cuadro 71: Comparación de recuento de *Aspergillus niger* (UFC.g⁻¹)

Tratamientos	UFC.g ⁻¹	UFC.g ⁻¹
	(Día 0)	(Día 120)
T1	2,00 X 10 ³	1,50 X 10 ²
T2	2,00 X 10 ³	2,00 X 10 ²
T3	2,00 X 10 ³	5,00 X 10 ³
T4	2,00 X 10 ³	1,50 X 10 ²
T5	2,00 X 10 ³	1,00 X 10 ²
T6	2,00 X 10 ³	4,00 X 10 ²
T7 (EM1)	2,00 X 10 ³	5,00 X 10 ²
T8 (Testigo)	2,00 X 10 ³	5,00 X 10 ³

Con relación a unidades formadoras de colonias de *Aspergillus niger* en los suelos de los diferentes tratamientos antes de establecer el cultivo y transcurrido 120 días, en la figura 185, se verifica que solo en los suelos de los tratamientos T3 y T8 se incrementó la población microbiana de este hongo, mientras que en los suelos de todos los demás tratamientos las UFC por gramo de suelo descendió notablemente.

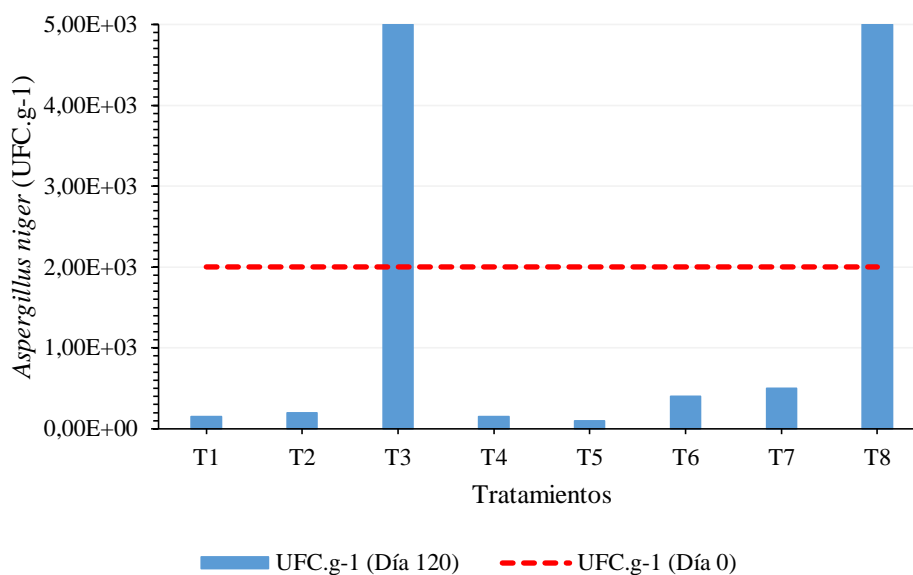


Figura 185: Comparación de recuento de *Aspergillus niger* (UFC.g⁻¹)

4.7.3 *Fusarium oxisporum* (UFC.g⁻¹)

En el cuadro 72, se confirma que antes de establecer el experimento en el suelo de todos los tratamientos no existió presencia de *Fusarium oxisporum*, pero transcurrido 120 días desde el inicio del estudio, este patógeno está presente solamente en el suelo del tratamiento T1 con $5,00 \times 10^1$ UFC por cada gramo de suelos.

Cuadro 72: Comparación de recuento de *Fusarium oxisporum* (UFC.g⁻¹)

Tratamientos	UFC.g ⁻¹	UFC.g ⁻¹
	(Día 0)	(Día 120)
T1	0,00	5,00 X 10
T2	0,00	0,00
T3	0,00	0,00
T4	0,00	0,00
T5	0,00	0,00
T6	0,00	0,00
T7 (EM1)	0,00	0,00
T8 (Testigo)	0,00	0,00

En la figura 186, se resalta que en los suelos de todos los tratamientos antes de establecer el cultivo no se constató la presencia del patógeno *Fusarium oxisporum*, no obstante 120 días después este hongo fitopatógeno está presente únicamente en el suelo del tratamiento T1.

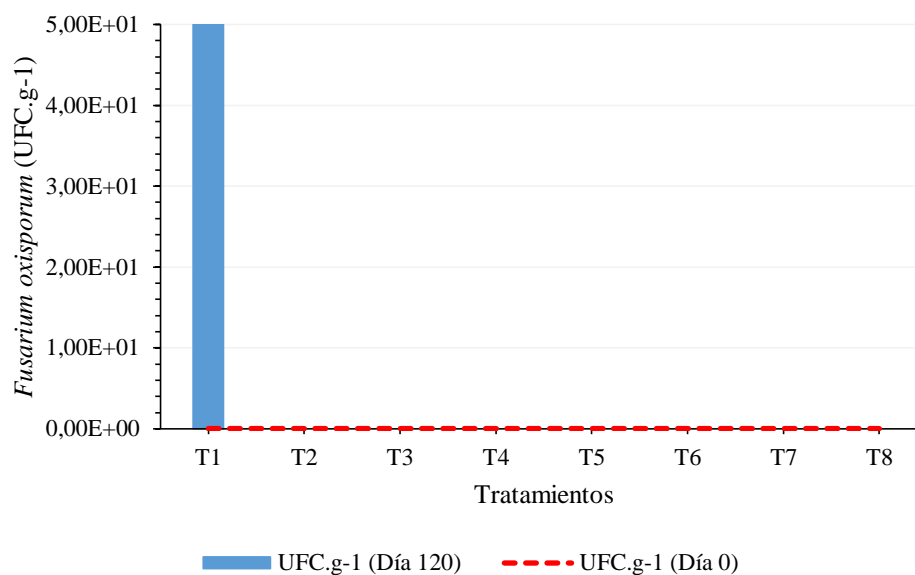


Figura 186: Comparación de recuento de *Fusarium oxisporum* (UFC.g⁻¹)

4.7.4 *Fusarium solani* (UFC.g⁻¹)

Con respecto a las unidades formadoras de colonias del hongo fitopatógeno *Fusarium solani*, en el cuadro 73 se aprecia que en los suelos de todos los tratamientos no se verificó su presencia previa a la plantación de fresas (*Fragaria* sp.), pero 120 días después del trasplante en el suelo del tratamiento T6 se determinó $5,00 \times 10^3$ UFC por gramo de suelo. En todos los demás tratamientos no existió UFC de *Fusarium solani*.

Cuadro 73: Comparación de recuento de *Fusarium solani* (UFC.g⁻¹)

Tratamientos	UFC.g ⁻¹	UFC.g ⁻¹
	(Día 0)	(Día 120)
T1	0,00	0,00
T2	0,00	0,00
T3	0,00	0,00
T4	0,00	0,00
T5	0,00	0,00
T6	0,00	$5,00 \times 10^3$
T7 (EM1)	0,00	0,00
T8 (Testigo)	0,00	0,00

De acuerdo a la figura 187, no se constató la presencia de *Fusarium solani* en los suelos de ninguno de los tratamientos antes de establecer el cultivo fresa (*Fragaria* sp.) y transcurrido 120 días únicamente se evidenció unidades formadoras de colonias de este hongo en el suelo del tratamiento T6.

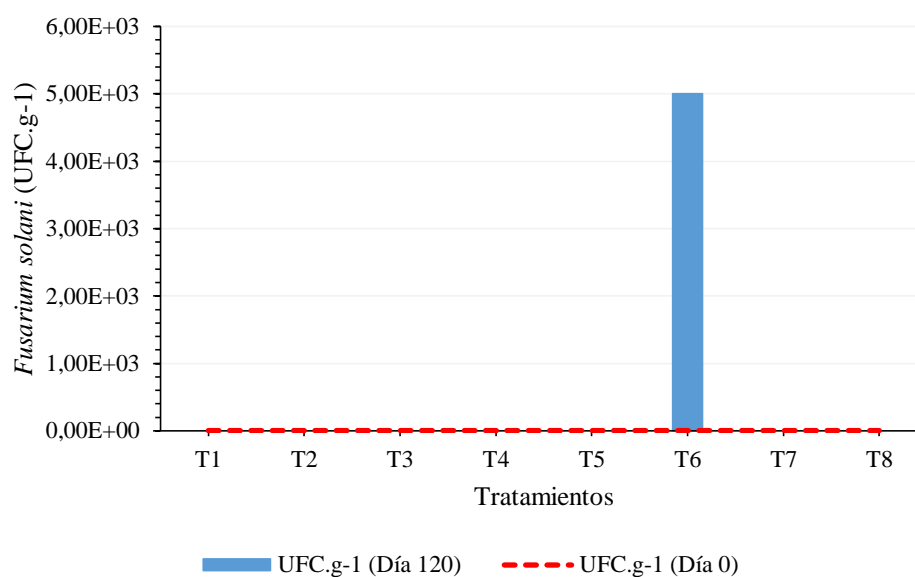


Figura 187: Comparación de recuento de *Fusarium solani* (UFC.g⁻¹)

4.7.5 *Cladosporium* sp. (UFC.g⁻¹)

En el cuadro 74, se observa que *Cladosporium* sp., no estuvo presente en los suelos de ninguno de los tratamientos antes de iniciar la investigación, pero luego de 120 días de establecida la plantación, en los suelos de los tratamientos T1 y T2 se registró la más alta población de este hongo con $5,00 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ de suelo. En los suelos de los tratamientos T3, T4 y T7 no se evidencia la presencia de *Cladosporium* sp.

Cuadro 74: Comparación de recuento de *Cladosporium* sp. (UFC.g⁻¹)

Tratamientos	UFC.g ⁻¹	UFC.g ⁻¹
	(Día 0)	(Día 120)
T1	0,00	$5,00 \times 10^4$
T2	0,00	$5,00 \times 10^4$
T3	0,00	0,00
T4	0,00	0,00
T5	0,00	$1,00 \times 10^3$
T6	0,00	$5,00 \times 10^3$
T7 (EM1)	0,00	0,00
T8 (Testigo)	0,00	$5,00 \times 10^2$

En concordancia con la figura 188, se destaca la ausencia de *Cladosporium* sp., en los suelos de todos los tratamientos antes de establecer el cultivo de fresa (*Fragaria* sp.), pero 120 días después se verifica la presencia de este hongo únicamente en los suelos de los tratamientos T1, T2, T5, T6 y T8, sin embargo, las unidades formadoras de colonias no fueron iguales entre los diferentes tratamientos.

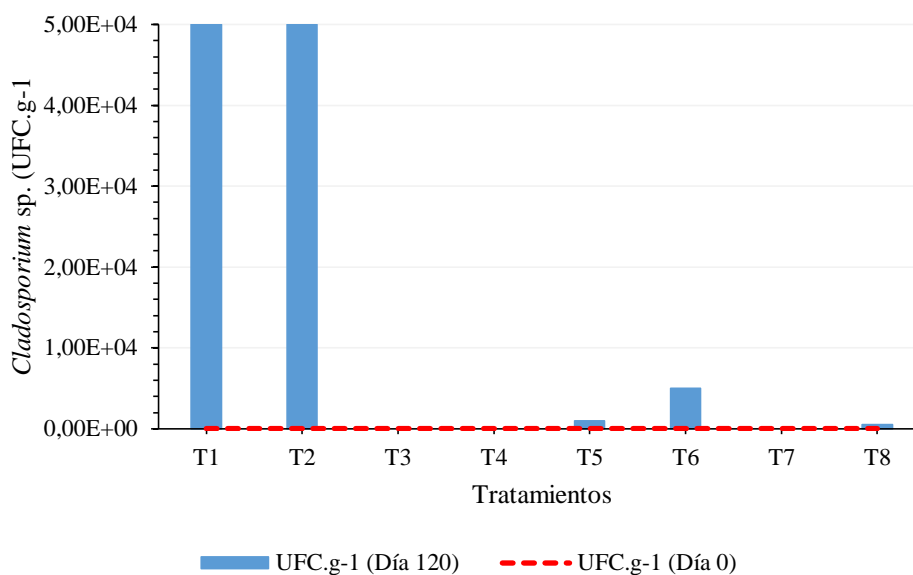


Figura 188: Comparación de recuento de *Cladosporium* sp. (UFC.g⁻¹)

Los hongos fitopatógenos se clasifican básicamente como necrótrofos, hemibiotrofos y biotrofos, constituyen uno de los principales agentes infecciosos de las plantas, causando alteraciones durante las etapas de desarrollo, incluida la poscosecha, obteniendo nutrientes de las plantas que invaden y, por lo tanto, causando un enorme daño económico (Pusztahelyi *et al.*, 2015). Razón por la que se verificó la población de microorganismos fitopatógenos antes de establecer el cultivo de fresa (*Fragaria* sp.) y 120 días de establecido el mismo, los microorganismos estudiados fueron *Rhizopus* sp., *Aspergillus niger*, *Fusarium oxisporum*, *Fusarium solani* y *Cladosporium* sp; todos estos microorganismos causan enfermedades en las plantas.

Con respecto a *Rhizopus* sp., 120 días de establecido el cultivo, este hongo en el 25% de tratamientos aumentó las UFC.g⁻¹ de suelo, además en el 25 por ciento de tratamientos disminuyó la concentración y en el 50% de tratamientos incluyendo el tratamiento testigo, no se registró en el suelo.

En relación a *Aspergillus niger* que es un hongo patógeno importante, solamente en el tratamiento T3 y en el testigo T8 aumentó la población, mientras que en todos los demás tratamientos (75 por ciento) las UFC.g⁻¹ de suelo descendió notablemente.

En cuanto a *Fusarium oxisporum* antes de establecer el cultivo este patógeno no existió en el suelo de ninguno de los tratamientos, pero luego se presentó únicamente en el suelo del tratamiento T1; mientras que *Fusarium solani* no se registró inicialmente en el suelo de

ninguno de los tratamientos sin embargo luego de establecer el cultivo se presentó en el suelo del tratamiento T6.

El hongo *Cladosporium* sp. no se constató en el análisis inicial de suelo, pero después de establecer el cultivo se presentó en los tratamientos T1 y T2 y en menor cantidad en T5, T6 y T8.

De acuerdo a información obtenida, en el sitio donde se realizó la investigación de campo, en ocasiones anteriores se han realizado otras investigaciones con patógenos y cultivos que no se conocen con certeza. Al momento de establecer el cultivo de fresa (*Fragaria* sp.) no se aplicó ningún pesticida en el suelo con la finalidad de no crear un ambiente desfavorable para los microorganismos benéficos inoculados, razón por la que inicialmente encontramos: *Rhizopus* sp. y *Aspergillus niger*; pero en el caso de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Cladosporium* sp. estos patógenos se presentaron luego de establecido el cultivo.

La supresión biológica natural de las enfermedades transmitidas por el suelo es una función de la actividad y composición de las comunidades microbianas del suelo (Penton *et al.*, 2014), todos los hongos analizados varían indistintamente su población en cada uno de los tratamientos, no existe un patrón de comportamiento ante la presencia de microorganismos benéficos, no obstante, deducimos que los MOB inoculados en los tratamientos en estudio inciden en el descenso de la población de los hongos analizados, debido al antagonismo que poseen ciertos microorganismos y particularmente *Bacillus* spp., y *Lactobacillus* spp. Los *Bacillus* presentan antagonismo ante patógenos <<a través de la liberación de compuestos con propiedades antifúngicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas, polipéptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos>> (Corrales *et al.*, 2012) y el grupo de bacterias ácido lácticas <<está compuesto de un número de géneros incluyendo *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*>> (Parra, 2010) que se caracterizan por la producción de metabolitos bioactivos que actúan contra un amplio espectro de microorganismos patógenos como bacterias y hongos (Shrestha *et al.*, 2014).

En el caso de *Rhizopus* sp. que desapareció en el suelo que no recibió inoculación de microorganismos benéficos sería debido al antagonismo y propiedades que presenta la carga microbiana de *Bacillus* sp. y *Lactobacillus* sp. propia del sitio, así como a las interacciones entre las comunidades microbianas. Se ha estudiado el control biológico de este hongo, en el trabajo realizado para determinar la actividad antagonista de bacterias para el control

biológico de *Rhizopus*, cuatro aislamientos mostraron actividad antifúngica entre los cuales se confirma que *Bacillus subtilis* obtenido del suelo es el aislamiento más efectivo (Chávez-Díaz *et al.*, 2014), además en la investigación ejecutada para determinar el efecto inhibitorio de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* contra los hongos de putrefacción, se determinó que *Rhizopus stolonifer* solo fue inhibido por *Lactobacillus plantarum* (Temitope y Oluchi, 2015), lo que evidencia diferente comportamiento antagónico de estos microorganismos. Cuando se produce incremento poblacional del hongo podría deberse a que los microorganismos presentes en esos consorcios, presentan bajo nivel de antagonismos.

Los hongos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* se presentaron únicamente en un tratamiento cada uno; los hongos del género *Fusarium* tienen una amplia distribución en el mundo, su ocurrencia es cosmopolita y las diversas especies son comunes en el suelo, en el aire y en el agua (Arbeláez, 2000), es probable que se encontraba en algún hospedero y luego llegó a los suelos en estudio, son patógenos que <<produce clamidosporas de pared gruesa y formadas por una o dos células que soportan la sequía y las bajas temperaturas>> (Agrios, 2009) lo cual les permitiría permanecer por periodos largos de tiempo en situaciones adversas, <<todas las cepas de *Fusarium* sp. son saprofitas y son capaces de crecer y sobrevivir por largos periodos en la materia orgánica del suelo y en la rizósfera de las plantas>> (Acosta, 2015).

El incremento poblacional de *Cladosporium* sp. estaría ocasionado por las características que presentan estos hongos ya que de acuerdo Tipismana *et al.* (2005) son especies saprófitas que están ampliamente distribuidas y toleran las condiciones ambientales.

En todos los casos la variación en la población de microorganismos también se relacionaría con la presencia de las plantas de fresa (*Fragaria* sp), ya que en concordancia con lo citado por Acuña (2006) la situación de los microbios cambia drásticamente cuando se introducen plantas en el sistema, debido a que los microorganismos aprovechan los sustratos energéticos suministradas por las especies vegetales cuando se encuentran en la zona próxima a la raíz y proliferan en ella; además los microorganismos encuentran condiciones favorables para su desarrollo debido a que <<el crecimiento de los microorganismos está influido notablemente por la naturaleza química y física del ambiente>> (Prescott, 2002).

Es fundamental considerar que las interacciones entre los hongos patógenos de plantas y las comunidades microbianas del suelo son multifacéticas y un alto nivel de fungistasis podría estar relacionado con la alta biomasa microbiana en el suelo, pero no con la estrategia de

manejo específica (Sipilä *et al.*, 2012). Varios autores han informado que los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* usan glucosa en diferentes procesos metabólicos, los azúcares se encuentran en el suelo y la mayoría de los hongos utilizan la glucosa como fuente de carbono y energía (Costa y Nahas, 2012), lo cual les permitiría la supervivencia.

Se asume que las condiciones climáticas imperantes en la zona conspiraron para el desarrollo de los patógenos, particularmente las altas temperaturas y la humedad; según Agrios (2009) <<*resulta obvio que, para que una enfermedad se produzca y desarrolle óptimamente, debe haber una combinación de tres factores: una planta susceptible, un patógeno infectivo y un medio favorable*>>, por lo tanto, las condiciones ambientales pueden tener una influencia decisiva en el crecimiento de los hongos, y las especies más adaptadas a la degradación de la materia orgánica pueden abrumar a otras especies que dependen del parasitismo para su supervivencia (Costa y Nahas, 2012)

Los agentes de control biológico fúngico contra los patógenos de las plantas, especialmente los que están en el suelo, operan dentro de los sistemas físicos, biológicos y espacialmente complejos por medio de una variedad de interacciones interespecíficas tróficas y no tróficas. Sin embargo, los propios agentes de control biológico también están sujetos a los mismos tipos de interacciones, que pueden reducir o en algunos casos mejorar su eficacia contra los patógenos de plantas objetivo (Knudsen y Dandurand, 2014).

El importante la interacción antagónica entre los habitantes microbianos beneficiosos y los patógenos, por lo tanto, se requiere un buen conocimiento de la composición de los habitantes microbianos y una comprensión de las funciones interactivas de la microflora y la fauna en el suelo (Lartey, 2006), para comprender la variación poblacional con la presencia de microorganismos benéficos.

4.8 ANÁLISIS NEMATOLÓGICO DEL SUELO

En los suelos existen nematodos de vida libre que no afectan a las raíces de las plantas, así como también nematodos que parasitan a las raíces de las especies vegetales cultivadas, la presencia de estos microorganismos puede afectar positiva o negativamente el desarrollo vegetal, por lo que fue importante comparar la población de nematodos antes y después de la inoculación de microorganismos beneficios. La densidad poblacional se verificó para *Aphelenchus*, *Dorylaimidos*, *Rhabditidos* y *Pratylenchus* y para *Meloidogyne* se evaluó el

grado de nodulación en las raíces. Posteriormente se realizó un análisis crítico de la variación poblacional en los diferentes tratamientos.

4.8.1 *Aphelenchus* (N° de individuos/100 cc de suelo)

El número de individuos de *Aphelenchus* por 100 cc de suelo antes de establecer el cultivo y 120 días después de establecido se presenta en el cuadro 75. Se constata que previo al trasplante en todos los tratamientos se presentó 10 individuos/100 cc de suelo, pero después de 120 días la población de estos fue diferente. En el tratamiento T8 se registró la mayor concentración de *Aphelenchus* con una densidad de 240 individuos/100 cc de suelo, la concentración más baja se verificó en el tratamiento T1 con una población de 20 individuos/100 cc de suelo. Los suelos de todos los tratamientos registraron presencia de *Aphelenchus*.

Cuadro 75: Comparación de número de *Aphelenchus* por 100cc de suelo

Tratamientos	N° Individuos/100 cc de suelo	N° Individuos/100 cc de suelo
	(Día 0)	(Día 120)
T1	10	20
T2	10	80
T3	10	80
T4	10	160
T5	10	40
T6	10	60
T7 (EM1)	10	60
T8 (Testigo)	10	240

Con respecto a la población de *Aphelenchus* en el suelo de los diferentes tratamientos 120 días después de inoculados microorganismos benéficos, en la figura 189 se observa que la población de estos nematodos se incrementó en todos los tratamientos, sin embargo, el aumento poblacional fue heterogéneo entre los tratamientos. La mayor población se registró en el suelo del tratamiento T8 que no recibió aplicación de microorganismos benéficos mientras que la población más baja se constató en el suelo del tratamiento T1.

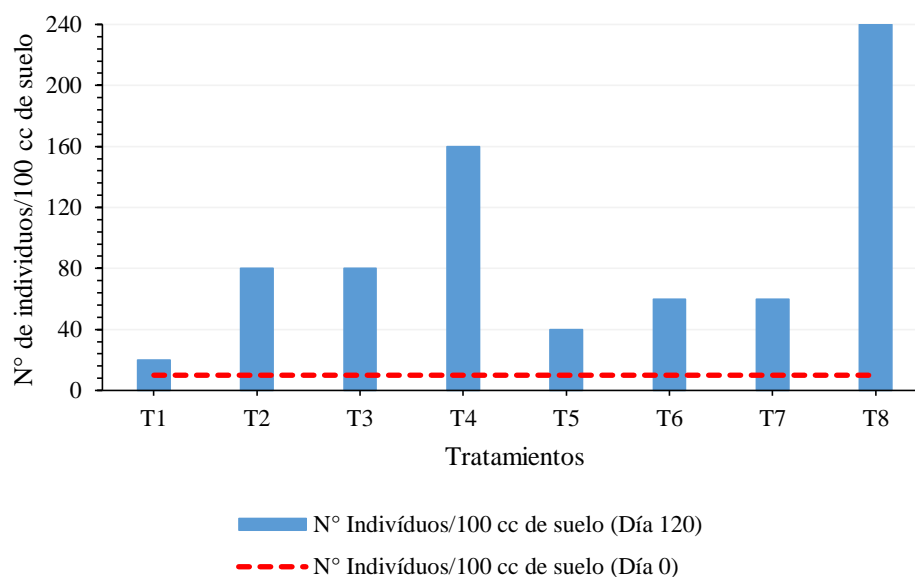


Figura 189: Comparación de número de *Aphelenchus* por 100cc de suelo

4.8.2 *Dorylaimidos* (Nº de individuos/100 cc de suelo)

En el cuadro 76, se presenta la comparación de número de *Dorylaimidos* por 100 cc de suelo en el día cero y 120 días después de establecido el cultivo. Antes de realizar la inoculación de microorganismos benéficos el número de individuos por 100 cc de suelo fue de 10 mientras que 120 días después en el suelo de todos los tratamientos la población de *Dorylaimidos* se incrementó indistintamente. En el tratamiento T4 se registró la población más alta con 120 individuos/100 cc de suelo, en tanto que en los tratamientos T3 y T5 se verificó la población más baja de *Dorylaimidos* con 50 individuos/100 cc de suelo.

Cuadro 76: Comparación de número de *Dorylaimidos* por 100cc de suelo

Tratamientos	Nº Individuos/100 cc de suelo	
	(Día 0)	(Día 120)
T1	10	60
T2	10	100
T3	10	50
T4	10	120
T5	10	50
T6	10	70
T7 (EM1)	10	100
T8 (Testigo)	10	70

En la comparación de número de *Dorylaimidos* por 100cc de suelo entre el día cero y 120 días después de inoculado los microorganismos benéficos, en la figura 190 se destaca que la población de estos nematodos se incrementó en el suelo de todos los tratamientos, en el suelo del tratamiento T4 se verifica la población más alta de *Dorylaimidos* mientras que en los

suelos de los tratamientos T3 y T5 se constata la más baja población de los nematodos en análisis. El incremento poblacional no fue uniforme en todos los tratamientos.

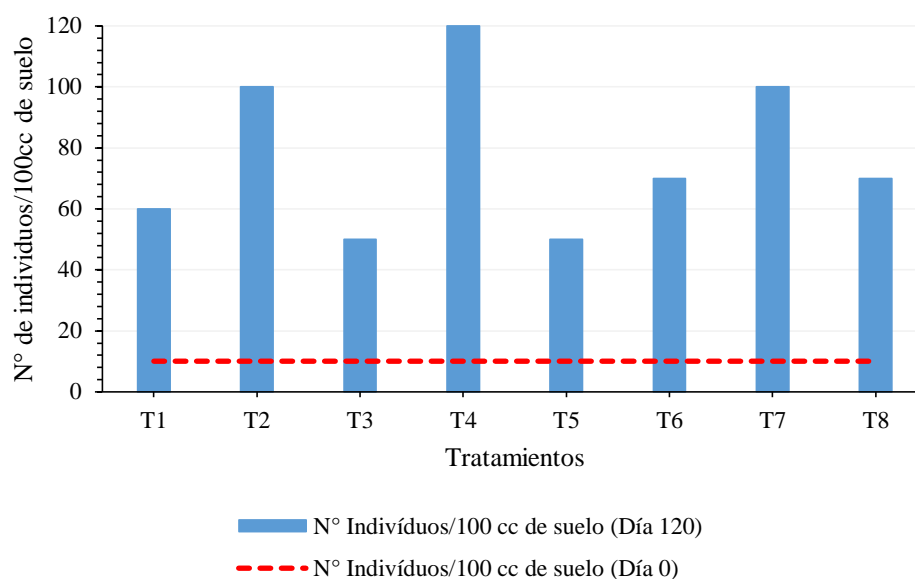


Figura 190: Comparación de número de *Dorylaimidos* por 100cc de suelo

4.8.3 *Rhabditidos* (N° de individuos/100 cc de suelo)

El número de *Rhabditidos* por 100 cc de suelo en todos los tratamientos varió entre el día cero y 120 días después de inoculado los microorganismos benéficos (cuadro 77). Inicialmente el número de individuos/100 cc de suelo fue 10 en todos los tratamientos y transcurrido 120 días alcanzó hasta 380 individuos/100 cc de suelo en el tratamiento T7. La población más baja de *Rhabditidos* se verificó en el tratamiento T5 con 140 individuos/100 cc de suelo.

Cuadro 77: Comparación de número de *Rhabditidos* por 100cc de suelo

Tratamientos	N° Individuos/100 cc de suelo	
	(Día 0)	(Día 120)
T1	10	260
T2	10	320
T3	10	260
T4	10	280
T5	10	140
T6	10	360
T7 (EM1)	10	380
T8 (Testigo)	10	340

En la figura 191, se constata que 120 días después de inoculado los microorganismos benéficos, la población de *Rhabditidos* por 100cc de suelo se incrementó en el suelo de todos

los tratamientos, el aumento poblacional es evidente tanto en los tratamientos que recibieron consorcios microbianos como en el tratamiento que no recibió inoculación de microorganismos benéficos. La mayor población de *Rhabditidos* se constató en el tratamiento T7 mientras que la menor población se verificó en el tratamiento T5.

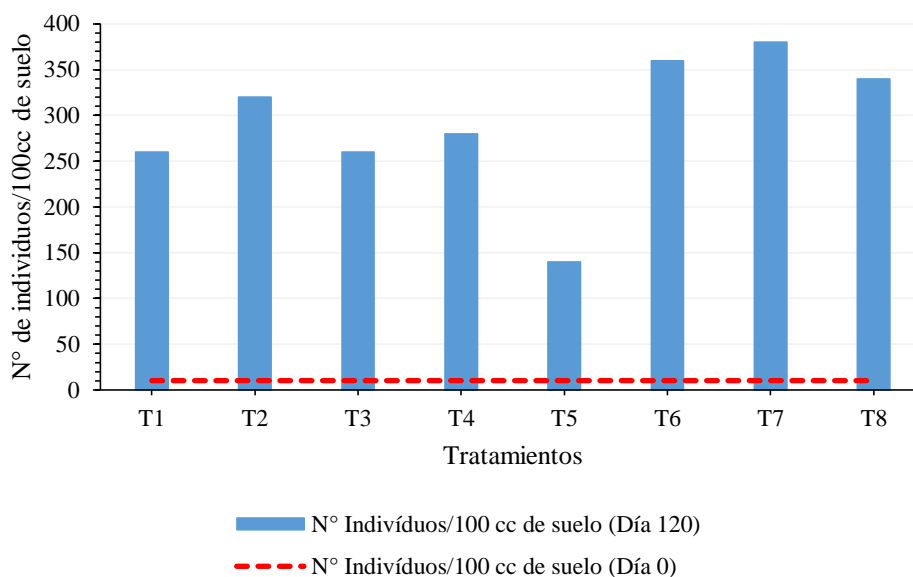


Figura 191: Comparación de número de *Rhabditidos* por 100cc de suelo

4.8.4 *Pratylenchus* (N° de individuos/100 cc de suelo)

En el análisis de suelo realizado antes de la inoculación de microorganismos benéficos no se verificó la presencia de *Pratylenchus*, pero 120 días después existe población de estos nematodos en los suelos de todos los tratamientos que recibieron inoculación de microorganismos benéficos. La mayor población se registró en el suelo del tratamiento T3 con 40 individuos/100 cc de suelo. En el suelo del tratamiento utilizado como testigo no se verificó población de *Pratylenchus* 120 días después de iniciada la investigación de campo (cuadro 78).

Cuadro 78: Comparación de número de *Pratylenchus* por 100cc de suelo

Tratamientos	N° Individuos/100 cc de suelo	
	(Día 0)	(Día 120)
T1	0	10
T2	0	20
T3	0	40
T4	0	20
T5	0	20
T6	0	20
T7 (EM1)	0	10
T8 (Testigo)	0	0

En lo referente a la comparación de número de *Pratylenchus* por 100cc de suelo en el día cero y 120 días después de realizado la aplicación de microorganismos benéficos, en la figura 192, se observa que inicialmente no se registró este nematodo en el suelo de ninguno de los tratamientos, sin embargo, transcurrido 120 días la población es variable entre tratamientos. El mayor número se registró en el suelo del tratamiento T3 mientras que en el suelo del tratamiento T8 existe ausencia de *Pratylenchus*.

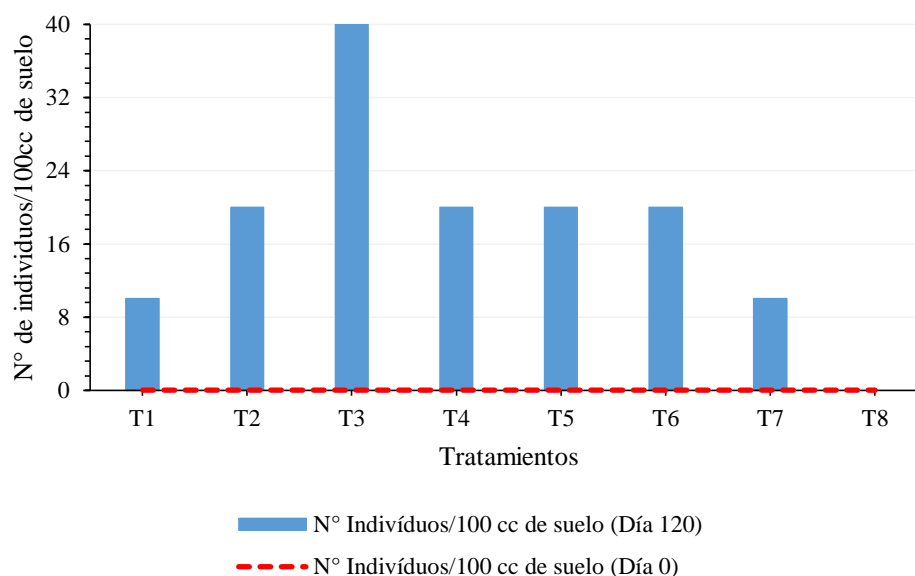


Figura 192: Comparación de número de *Pratylenchus* por 100cc de suelo

4.8.5 *Meloidogyne* (Nivel de nodulación)

En el cuadro 79, se observa que nematodos del género *Meloidogyne* inicialmente no existían en el suelo, pero luego de establecido el cultivo mediante análisis de nodulación en las plantas de fresa, se constató la presencia en el tratamiento T3 en niveles de nodulación bajos. Nodulación 1 en la escala de 0 a 5.

Cuadro 79: Comparación del nivel de nodulación de *Meloidogyne* en raíces de plantas de fresa (*Fragaria* sp.)

Tratamientos	Nivel de nodulación	
	(Día 0)	(Día 120)
T1	0	0
T2	0	0
T3	0	1
T4	0	0
T5	0	0
T6	0	0
T7 (EM1)	0	0
T8 (Testigo)	0	0

En la comparación de nivel de nodulación de nematodos del género *Meloidogyne* entre dos fases de estudio presentada en la figura 193, se observa que este nematodo parásito de especies vegetales no se determinó en las muestras iniciales de suelo, pero posteriormente se presentó únicamente en las raíces de las plantas del tratamiento T3 con un nivel de nodulación bajo.

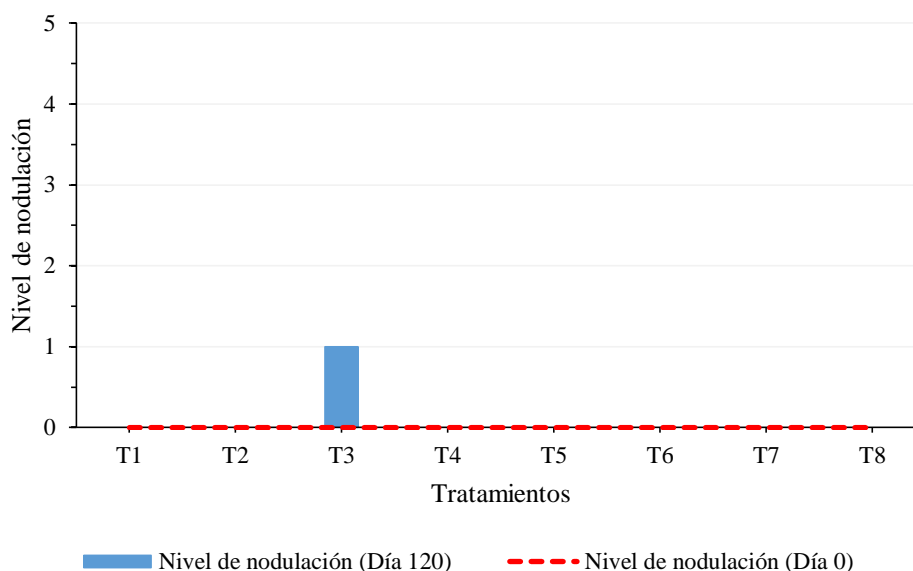


Figura 193: Comparación de nivel de nodulación de *Meloidogyne* sp. en raíces de plantas de fresa (*Fragaria*)

Los nematodos son habitantes ubicuos del suelo, que subsisten en organismos vivos de todo tipo y, a su vez, contribuyen a su biomasa y a la biota del suelo (Bernard, 1992). Mediante análisis de laboratorio se determinó el número de individuos de nemátodos de los géneros *Aphelenchus*, *Dorylaimidos*, *Rhabditidos* y *Pratylenchus* por cada 100 cc de suelo al inicio del cultivo de fresa (*Fragaria* sp.) y transcurrido 120 días después de la plantación; para el caso de *Meloidogyne* se verificó la presencia de nódulos en las raíces de las plantas de fresa (*Fragaria* sp.) al momento de la plantación y 120 días después de establecido el cultivo.

En todos los tratamientos la población de nematodos del género *Aphelenchus* incrementaron su densidad poblacional, en el tratamiento T8 que no recibió aplicación de microorganismos benéficos se registró el mayor número de individuos por cada 100 cc de suelo. Los nemátodos del género *Dorylaimidos* incrementaron el número de individuos por cada 100 cc de suelo analizado, el mayor aumento se constató en el suelo del tratamiento T4. La población de *Rhabditidos* inicialmente fue baja, pero transcurrido 120 días se acrecentó en el suelo de todos los tratamientos y de manera particular en los tratamientos T6, T7 y T8.

Inicialmente en el suelo no existía nematodos del género *Pratylenchus*, pero transcurrido el periodo de estudio, la población de estos organismos se presentó en todos los tratamientos excepto en el suelo del tratamiento que no recibió inoculación de microorganismos benéficos. Transcurrido 120 días los nemátodos fitoparásito del género *Meloidogyne* se verificó en un nivel bajo de nodulación únicamente en las raíces de plantas de fresa (*Fragaria* sp.) del tratamiento T3.

Aunque ha habido una amplia investigación agrícola aplicada, el conocimiento taxonómico es insuficiente, especialmente de los nematodos de vida libre (Mulder *et al.*, 2005), algunas especies son responsables de enfermedades de las plantas, pero se sabe mucho menos sobre la mayoría de los nematodos que juega un papel beneficioso en el suelo (Hoorman, 2011). De acuerdo a Angulo (2009) <<los principales nematodos fitoparásitos que afectan el cultivo de fresa son: *Meloidogyne*, (agallas en raíces), *Pratylenchus* (lesiones necróticas) y *Rotylenchus* (pequeñas lesiones en raíz)>>.

Después de 120 días de establecido el cultivo de fresa, todos los géneros de nematodos estudiados incrementaron su densidad poblacional en los suelos de los diferentes tratamientos, excepto *Pratylenchus* que se mantuvo ausente en el suelo del tratamiento T8 que no recibió inoculación de microorganismos benéficos. Los nematodos de la lesión de la raíz del género *Pratylenchus* Filipjev, 1936 son endoparásitos migratorios de raíces de plantas, considerados entre los nematodos parásitos más extendidos e importantes en una variedad de cultivos (Subbotin *et al.*, 2008). *Meloidogyne* se presentó únicamente en las raíces de las plantas de un tratamiento.

No existe un patrón de comportamiento similar de los diferentes nematodos ante los microorganismos benéficos inoculados en el suelo, debido a que estos varían en sensibilidad a los contaminantes y perturbaciones ambientales (Bongers y Ferris, 1999), los nematodos ejercen un control de arriba hacia abajo sobre los procesos de descomposición y ciclo de nutrientes mediados por microbios debido a su posición en la red trófica del suelo. La fertilización de suelos agrícolas puede aumentar los sustratos para poblaciones de nematodos (Liu *et al.*, 2016).

El incremento del número de nematodos por 100 cc de suelo no fue uniforme en todos los tratamientos, esto sería debido a la incidencia de la flora microbiana presente en los suelos <<entre los principales grupos microbianos con potencialidades como agentes de control

biológico de nematodos formadores de agallas se encuentran las bacterias y los hongos>> (Armendáriz, 2015), ya que todas las demás condiciones son uniformes.

Según lo expresado en la publicación realizada por la Cruzat *et al.* (2014) los *Bacillus* presentan control en la morfología de los huevos y de las formas juveniles de los nematodos mediante la liberación de toxinas y proteínas tóxicas. Una nueva cepa bacteriana Jdm2 se identificó como *Bacillus subtilis* la cual promueve el crecimiento de las plantas e inhibe la actividad de los nematodos, por lo tanto, tiene el potencial de ser un plaguicida microbiano seguro y efectivo (Wei *et al.*, 2014).

De acuerdo a lo citado por Flor (2013) existen rizobacterias que presentan diferentes tipos de efectos ante *Meloidogyne* spp; *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa* producen metabolitos nematocidas, reducen el agallamiento y la reproducción, mientras que *Bacillus subtilis* solamente reduce el agallamiento y reproducción, con respecto a los hongos menciona que *Aspergillus niger* inhibe la eclosión de huevos y produce metabolitos nematocidas. De los microorganismos que parasitan o depredan a los nematodos o reducen las poblaciones de nematodos por su comportamiento antagónico, los hongos ocupan posiciones importantes y algunos de ellos han mostrado un gran potencial como agentes de control biológico. Los hongos destruyen continuamente los nematodos en prácticamente todos los suelos debido a su asociación constante con los nematodos en la rizósfera (Siddiqui y Mahmood, 1996).

En la investigación realizada por Gallegos (2009) se determinó que los microorganismos benéficos aislados y asociados a la rizósfera del guayabo con uso potencial en control biológico de nematodos, pertenecen a las especies de *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* y *Paecilomyces farinosus*. La bacteria *Bacillus subtilis* conocida por su potencial antagonista contra los patógenos fúngicos suprimió *Meloidogyne incognita*, dichas bacterias "multiuso" pueden proporcionar nuevas opciones para estrategias de control, especialmente con respecto a los complejos de enfermedades con nematodos y hongos que causan pérdidas de rendimiento (Adam *et al.*, 2014).

Diecinueve aislamientos bacterianos rizosféricos y tres agentes de control biológico (*Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus thuringiensis* BT14) fueron evaluados contra nematodos agalladores (*Meloidogyne incognita*). Los aislamientos más potentes para la producción de bioagentes se identificaron como *Pseudomonas fluorescens* B103 y *Bacillus subtilis* B38 (Zaghloul *et al.*, 2015).

Por lo tanto, los microorganismos inoculados, así como los propios del sitio de investigación, estarían ejerciendo un papel fundamental en el control de nematodos. Las bacterias nematófagas exhiben diversos modos de acción: estos incluyen la parasitación, producción de toxinas, antibióticos o enzimas, competencia por nutrientes, inducción a resistencia sistémica y promoción de la salud de las plantas. Las bacterias son numéricamente los organismos más abundantes en el suelo, y algunos de ellos, por ejemplo, miembros de los géneros *Pasteuria*, *Pseudomonas* y *Bacillus* han demostrado un gran potencial para el control biológico de los nematodos (Tian *et al.*, 2007).

Los microorganismos secretan algunos metabolitos que son toxinas, antibióticos o inhibidores de los fito nemátodos y algunos tienen efecto estimulante. Actúan sinérgicamente a través de supresión directa de nematodos, promueven el crecimiento de las plantas y facilitan la colonización de la rizosfera. Rizobacterias tales como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, producen enzimas hidrolíticas como proteasa, lipasa y celulasa que reducen la eclosión, el reconocimiento y la penetración del huevo (Dihingia *et al.*, 2017).

En la presente investigación en el análisis bacteriológico del agua de riego se constató la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*, además en el análisis fitopatológico de suelo se registró *Aspergillus niger* en todos los tratamientos y en mayor número de UFC.g⁻¹ de suelo en los tratamientos T3 y T8, microorganismos que podrán estar afectando la vida de los nematodos, además se aplicó vermicompost que podría contener carga microbiana con enemigos naturales de nematodos, ya que las enmiendas orgánicas del suelo estimulan las actividades de los microorganismos que son antagonistas a los nematodos parásitos de las plantas. La descomposición de la materia orgánica produce la acumulación en los suelos de compuestos específicos que pueden ser nematocidas (Akhtar y Malik, 2000). La adición de materia orgánica contiene enemigos naturales de los nematodos y reduce los niveles de infestación en forma satisfactoria (Flor, 2013).

En los análisis iniciales de suelos *Pratylenchus* y *Meloidogine* están ausentes sin embargo más tarde se presentan, probablemente pudieron haber ingresado en el agua de riego aplicado al cultivo, Agrios (2009) manifiesta que <<en los nematodos, el inóculo puede ser el individuo adulto, las larvas o los huevecillos de ellos>> y se encuentran en el suelo, son atraídos hacia las especies vegetales debido a sustancias como azúcares y aminoácidos que la raíces difunden hacia el exterior, Cuya (2012) acota que los nematodos presentan poca movilidad, que el agua de riego es el medio de diseminación más frecuente.

El éxito en el desarrollo de los nematodos estaría condicionado por el tipo de carga benéfica en cada uno de los tratamientos, es decir por los diferentes géneros y especies presentes en el sitio. Siete cepas de rizobacterias demostraron ser efectivas para inhibir el daño o la reproducción del nematodo, estas son cepas de *Serratia marcescens*, *Comamonas acidovorans*, *Pantoea agglomerans*, *Sphingobacterium spiritivorum*, *Bacillus mycoides*, *Alcaligenes piechaudii* y *Serratia plymuthica* (Aballay *et al.*, 2013). Se ha demostrado que *Serratia marcescens* y *Pseudomonas fluorescens* son potentes agentes de control biológico para los nematodos agalladores (Mohamed *et al.*, 2009).

Además, la población de nematodos propia del sitio de investigación, podrían presentar características depredadoras y ser responsables del crecimiento de otras especies de nematodos. Los nematodos depredadores se alimentan de microorganismos del suelo, incluidos los nematodos fitoparásitos; reducen las poblaciones de nematodos fitoparásitos en prácticamente todos los suelos debido a su asociación constante con nematodos fitoparásitos en la rizosfera, y también liberan nutrientes en formas disponibles para las plantas, que pueden permitir resistir mejor la carga de nematodos en sus raíces. Se ha estudiado la depredación por nematodos de los órdenes Mononchida, Diplogasterida, Dorylaimida y Aphelenchida, pero los datos disponibles en condiciones de campo / naturales son insuficientes para concluir si son agentes eficaces de control biológico de nematodos fitoparásitos (Khan y Kim, 2007).

4.9 ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS DE FRESA (*Fragaria* sp.)

Desde el inicio del cultivo se realizó el seguimiento al estado fitosanitario de todas las plantas con la finalidad de constatar el porcentaje de plantas muertas. Inicialmente no se presentó ninguna afección; sin embargo, a partir de los 100 días después del trasplante, se detectó muerte de plantas en algunos tratamientos.

La afección inició en las plantas que no recibió inoculación de microorganismos benéficos, pero luego se manifestó en otros tratamientos en forma heterogénea. La manifestación fue en el área foliar que poco a poco evidenció deterioro, posteriormente las plantas murieron. Fue necesario extraer completamente la planta con toda la raíz, para realizar cultivo de tejidos e identificar los agentes causales de enfermedades.

Las plantas del tratamiento T8 que no recibieron aplicación de microorganismos benéficos fueron las primeras en presentar signos y síntomas de presencia agentes causales de

enfermedades, luego se verificó plantas muertas en otros tratamientos. Las plantas en la fase inicial de muerte fueron analizadas en la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología de la Universidad Nacional Agraria La Molina donde se verificó que el principal agente causal de la enfermedad fue *Macrophomina* sp. (anexo 14). Conforme avanzó la muerte de las plantas fue necesario nuevamente identificar el agente causal, se determinó en este caso que a más de *Macrophomina* sp. se encontraba también *Fusarium solani* (anexo 15). El número de plantas muertas varió entre tratamientos, no obstante, en las plantas que no recibieron aplicación de microorganismos beneficiosos se identificó mayores daños que en los otros tratamientos, por tratarse de una evaluación de relación entre microorganismos y enfermedades de plantas no se aplicó ningún fungicida sistémico que pudiera amenazar también la vida microbiana. En ninguno de los tratamientos se constató la presencia de *Rhizoctonia*, *Phytophthora* ni *Verticillium*. Los síntomas de las plantas enfermas se diferenciaron claramente de las plantas si afectación de enfermedad como se aprecia en la figura 194.



Figura 194: Plantas de fresa (*Fragaria* sp) enfermas en los diferentes tratamientos

Mediante análisis de laboratorio se identificó los principales patógenos que afectaron al cultivo de fresa (*Fragaria* sp.). En el cuadro 80, se presenta los agentes causales de las enfermedades y los tratamientos en los cuales se presentó la infección. Se verificó la presencia de *Macrophomina* sp., y *Fusarium solani*. En las plantas de los tratamientos T4, T7 y T8 se presentaron los dos patógenos, en las plantas del tratamiento T1 se presentó únicamente *Macrophomina* sp., y en las plantas de los tratamientos T2, T3, T5 y T6 no se presentaron ninguno de los hongos en estudio.

Cuadro 80: Enfermedades identificadas en el cultivo de fresa (*Fragaria* sp.)

Tratamientos	<i>Macrophomina</i> sp.		<i>Fusarium solani</i>	
	SI	NO	SI	NO
T1	X			X
T2		X		X
T3		X		X
T4	X		X	
T5		X		X
T6		X		X
T7 (EM1)	X		X	
T8 (Testigo)	X		X	

Las enfermedades transmitidas por el suelo son una de las principales limitaciones en la producción de muchos cultivos de importancia económica, especialmente hortalizas y plantas ornamentales (Dai *et al.*, 2016), es así que las enfermedades de las fresas son un importante factor limitante que afecta gravemente el rendimiento agronómico de las plantas (Mirmajlessi *et al.*, 2015), por tal razón en la presente investigación se identificó los agentes causales de enfermedades en el cultivo de fresa.

Las plantas de los tratamientos T1 y T2 contienen el mismo tipo de carga microbiana, pero en diferentes concentraciones, sin embargo, *Macrophomina* sp. solo afectó a las plantas del tratamiento T2 en la que se aplicó MOB del piso altitudinal uno al 5% de concentración; igual sucedió con los consorcios microbianos del piso altitudinal dos, mientras que los dos tratamientos T5 y T6 con microorganismos benéficos del piso altitudinal tres no sufrieron ataque de *Macrophomina* sp., ni de *Fusarium solani*.

En cuanto a la insidencia de *F. solani* solamente las plantas del tratamiento T4 con microorganismos benéficos del piso altitudinal dos al 5% de concentración sufrieron afección. Las plantas de los tratamientos T7 con producto comercial EM1 y las plantas del tratamiento testigo, presentaron incidencia de *Macrophomina* sp., y también de *Fusarium solani*.

La presencia de los agentes causantes de enfermedades no fue uniforme en todos los tratamientos; los patógenos afectaron a los tratamientos T1 y T4 que recibieron inoculación de microorganismos benéficos, así como al tratamiento con producto comercial T7 y al tratamiento testigo T8; mientras que a las plantas de los tratamientos T2, T3, T5 y T6 no fueron afectados por ninguno de los patógenos.

De acuerdo al análisis de suelo *Fusarium solani* se encontró en el suelo del tratamiento T6 y *Fusarium oxisporum* en el suelo del tratamiento T1, sin embargo, ninguno de estos hongos atacó a las plantas de fresa de esos tratamientos. No existe una correlación directa entre fitopatógenos identificados en el suelo y afección a las plantas de fresa.

Macrophomina sp., no se constató al inicio del cultivo. *Macrophomina phaseolina*, es el agente causal de la pudrición del carbón, es un patógeno principalmente transmitido por el suelo, la pudrición de carbón se ha vuelto cada vez más problemática en la fresa (*Fragaria × ananassa* Duch.) (Chamorro *et al.*, 2015).

Entre los agentes de control biológico de bacterias, el género *Pseudomonas* y *Azotobacter* ha recibido más atención que muchos otros grupos bacterianos (Juber *et al.*, 2014). Consideramos que en algunos tratamientos los microorganismos benéficos inoculados al suelo son antagonistas de *Fusarium* y *Macrophomina*, y que como estos proceden de tres pisos altitudinales diferentes, los consorcios microbianos también son diferentes, porque de acuerdo a Palomino (1995) <<los microorganismos que forman parte de la flora residente (autóctonos) se encuentran normalmente en el ambiente que los acoge >>. En estudios realizados por Hernández *et al.* (2006) encontraron que tres cepas de *Trichoderma* muestran capacidad antagonista ante un género de *Fusarium*, Reyes *et al.* (2011) destaca que *Bacillus subtilis* muestra actividad antifúngica contra un amplio grupo de hongos entre los cuales se encuentran *Fusarium oxisporum* y *Macrophomina phaseolina*, pero Cruz *et al.* (2014) encontró que *Bacillus subtilis* provoca poca inhibición del crecimiento micelial en *Macrophomina phaseolina*.

Las plantas del tratamiento testigo fueron afectadas tanto por *Fusarium*, así como por *Macrophomina*, probablemente la carga microbiana propia de este sitio no contenga especies antagonistas contrariamente a ciertos consorcios microbianos benéficos inoculados en el suelo que presentarían estas bondades, no obstante, en las plantas de los suelos con microorganismos benéficos al 5% de concentración, tanto del piso altitudinal uno así como del piso altitudinal dos, sufrieron afección por estos patógenos, por lo que es necesario realizar estudios complementarios dirigidos a confirmar el efecto de los consorcios microbianos benéficos en el desarrollo de fitopatógenos en las plantas de fresa.

Durante los últimos años, se han detectado nuevos problemas de colapso de plantas de fresa. Los análisis de diagnóstico de plantas confirmaron que estos problemas estaban asociados con dos hongos transmitidos por el suelo: *Macrophomina phaseolina* (agente causal de la

putrefacción del carbón) y *Fusarium oxysporum* (agente causal del marchitamiento por *Fusarium*) (De los Santos, 2016), por lo tanto, estos patógenos estarían latentes en el suelo, posteriormente con condiciones de cultivo agrícola (humedad, plantas, nutrientes) inician su ataque a las raíces de las plantas, sin embargo la comunidad microbiana de cada tratamiento desempeñaría un papel fundamental en el progreso de las enfermedades.

4.10 DESARROLLO DE LAS PLANTAS DE FRESA (*Fragaria* sp.)

Con la finalidad de conocer la incidencia de los microorganismos benéficos en el cultivo de fresa, a los 60, 90 y 120 días después de la plantación se evaluó la altura y diámetro de plantas, así como el número de hojas en cada planta de fresa. La raíz cumple funciones importantes en la absorción de nutrientes, razón por la que 120 días después de iniciado el cultivo se estudió la longitud de raíces, el peso fresco, así como también el peso seco y se correlacionó con las características morfológicas de las plantas. Finalmente se analizó los efectos de los consorcios microbianos en los diferentes atributos medidos.

4.10.1 Altura de plantas

a. Altura de plantas 60 días después del trasplante

Las plantas comenzaron a mostrar diferencias en altura después del primer mes de trasplante, todos los tratamientos que recibieron aplicación de microorganismos benéficos presentaron mayor desarrollo sobre el tratamiento que no recibió inoculación de MOB. El primer registro de altura se realizó 60 días después de establecida la investigación, los datos recolectados evidencian diferencias entre todos los tratamientos cuadro 81. Las plantas del tratamiento T2 presentaron mayor altura con un promedio de 10,55 cm mientras que las plantas del tratamiento T8 mostraron una altura de 8,61 cm.

Cuadro 81: Altura de plantas 60 días después del trasplante

Tratamientos	Repeticiones				Promedio (cm)
	R1	R2	R3	R4	
T1	10,10	9,90	9,83	9,65	9,87
T2	10,98	10,18	10,38	10,68	10,55
T3	10,60	9,48	10,53	9,53	10,03
T4	11,20	11,03	11,08	11,40	11,18
T5	11,30	11,33	11,50	11,50	11,41
T6	11,73	11,16	11,65	11,55	11,52
T7 (EM1)	10,73	10,45	10,08	10,13	10,34
T8 (Testigo)	8,25	8,73	8,70	8,75	8,61

Conforme a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para altura de plantas 60 días después del trasplante, se verifica cinco niveles de significancia (cuadro 82). El nivel A corresponde al tratamiento T8 y presenta la media más baja con 8,61 cm de altura. El tratamiento T1 con una media de 9,87 cm y el tratamiento T3 con una media de 10,04 cm corresponden al nivel de significancia B. En el nivel de significancia C se ubican T3 y T7 con medias de 10,04 cm y 10,35 cm respectivamente. En el rango D se encuentran los tratamientos T7 con 10,35 cm y T2 con 10,56 cm. Los mejores tratamientos se sitúan en el rango E y corresponde a T4 con una media de 11,18 cm; T5 con una media de 11,41 cm y T6 con una media de 11,52 cm, no existen diferencias significativas entre estos tratamientos.

Cuadro 82: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para altura de plantas 60 días después del trasplante

Tratamientos	Medias	Error Estándar	Significancia		
T8 (Testigo)	8,61	0,16	A		
T1	9,87	0,16	B		
T3	10,04	0,16	B	C	
T7 (EM1)	10,35	0,16		C	D
T2	10,56	0,16			D
T4	11,18	0,16			E
T5	11,41	0,16			E
T6	11,52	0,16			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

De acuerdo a la comparación de altura de plantas 60 días después del trasplante (figura 195), se verifica que las plantas correspondientes al tratamiento T6 presentaron el mayor crecimiento, mientras que las plantas que pertenecen al tratamiento T8 evidenciaron el menor desarrollo.

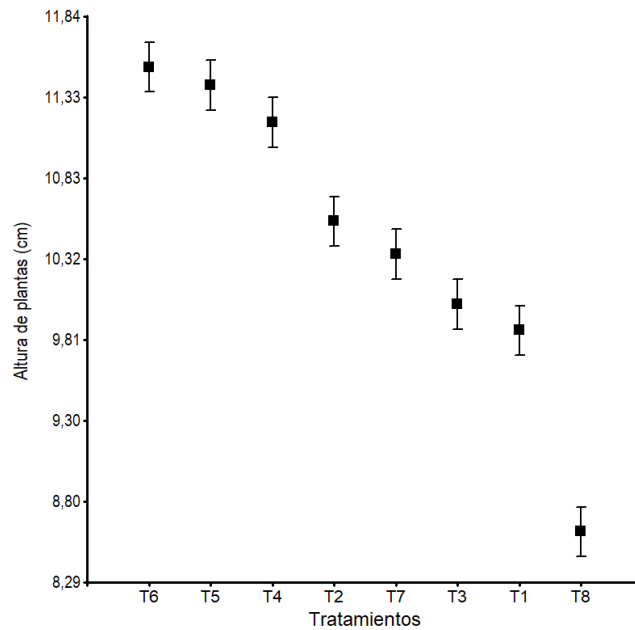


Figura 195: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para altura de plantas 60 días después del trasplante

b. Altura de plantas 90 días después del trasplante

El segundo registro de altura de plantas se efectuó 90 días después de realizado el trasplante, las tendencias se mantuvieron con respecto a la medición anterior, todos aquellos tratamientos que recibieron aplicación de microorganismos benéficos presentaron mayor desarrollo vertical sobre las plantas del tratamiento que no recibió. En el cuadro 83 se observa que el tratamiento T2 presentó una media de crecimiento de 14,38 cm mientras que el tratamiento T8 con una media de 10,50 son las plantas que menos crecieron.

Cuadro 83: Altura de plantas 90 días después del trasplante

Tratamientos	Repeticiones				Promedio (cm)
	R1	R2	R3	R4	
T1	12,75	12,60	12,53	12,63	12,63
T2	14,40	14,23	14,20	14,68	14,38
T3	13,15	13,05	13,58	13,38	13,29
T4	12,80	12,90	12,80	12,88	12,84
T5	12,40	12,55	12,88	12,63	12,61
T6	11,15	12,10	11,88	11,70	11,71
T7 (EM1)	12,60	12,50	12,35	12,65	12,53
T8 (Testigo)	10,63	10,50	10,65	10,23	10,50

De acuerdo a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para altura de plantas 90 días después del trasplante se verifica seis niveles de significancia (cuadro 84). El tratamiento T8 corresponde al rango A con una media de 10,50 cm. En el rango B se encuentra el

tratamiento T6 con una media de 11,37 cm. En el rango C se ubican los tratamientos T7, T5 y T1 con medias de 12,53 cm; 12,62 cm y 12,63 cm respectivamente. En el rango D tenemos T5 con una media de 12,62 cm, T1 con 12,63 cm y T4 con 12,85 cm. En el rango E con una media de 13,29 cm se encuentra T3. Con una media de 14,38 cm encontramos a T2 en el rango F.

Cuadro 84: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para altura de plantas 90 días después del trasplante

Tratamientos	Medias	Error Estándar	Significancia		
T8 (Testigo)	10,50	0,10	A		
T6	11,37	0,10	B		
T7 (EM1)	12,53	0,10	C		
T5	12,62	0,10	C	D	
T1	12,63	0,10	C	D	
T4	12,85	0,10		D	
T3	13,29	0,10			E
T2	14,38	0,10			F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

La diferencia de altura de plantas 90 días después del trasplante es evidente entre los diferentes tratamientos (figura 196). Las plantas del tratamiento T2 fueron las que presentaron desarrollo superior a las plantas de los demás tratamientos, mientras que las plantas correspondientes al tratamiento T8 fueron las que demostraron menor desarrollo.

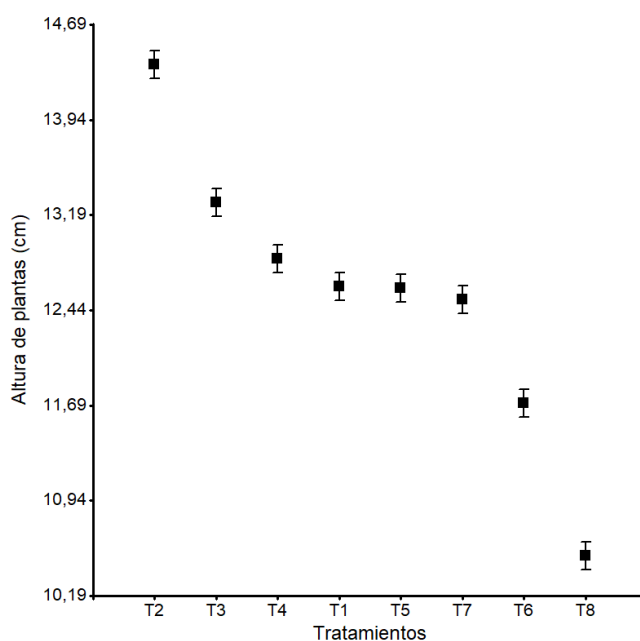


Figura 196: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para altura de plantas 90 días después del trasplante

c. Altura de plantas 120 días después del trasplante

A 120 días después del trasplante, todas las plantas de los tratamientos con inoculación de microorganismos benéficos presentaron mayor desarrollo que las plantas del tratamiento sin aplicación (cuadro 85). Las plantas del tratamiento T1 presentaron la mayor altura con una media de crecimiento de 15,11 cm en tanto que las plantas del tratamiento T8 evidenciaron la menor altura con una media de 10,56 cm.

Cuadro 85: Altura de plantas 120 días después del trasplante

Tratamientos	Repeticiones				Promedio (cm)
	R1	R2	R3	R4	
T1	15,53	14,37	15,00	15,55	15,11
T2	14,38	14,53	14,33	14,60	14,46
T3	13,40	13,38	13,63	12,93	13,34
T4	14,08	14,38	13,83	14,70	14,25
T5	14,88	14,25	14,10	14,50	14,43
T6	12,20	11,87	11,90	11,73	11,93
T7 (EM1)	14,85	14,70	15,10	14,53	14,80
T8 (Testigo)	11,05	10,50	10,50	10,20	10,56

De acuerdo a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para altura de plantas 120 días después del trasplante cuadro 86, se constata seis rangos de significancia; en el rango A con una media de 10,56 cm se ubica el tratamiento T8, mientras que en el rango F se encuentran los tratamientos T1 y T7 con medias de crecimiento de 15,11 cm y 14,80 cm. El rango E lo comparten los tratamientos T5 (14,43cm), T2 (14,46 cm) y T7 (14,80 cm).

Cuadro 86: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para altura de plantas 120 días después del trasplante

Tratamiento	Medias	Error Estándar	Significancia		
T8 (Testigo)	10,56	0,17	A		
T6	11,93	0,17		B	
T3	13,34	0,17			C
T4	14,25	0,17			D
T5	14,43	0,17		D	E
T2	14,46	0,17		D	E
T7 (EM1)	14,80	0,17		E	F
T1	15,11	0,17			F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la figura 197, se aprecia que las plantas de los tratamientos T1 y T7 son las que se destacan por ser las de mejor crecimiento, mientras que las plantas del tratamiento T8

son las que presentaron menor desarrollo. También mostraron bajo crecimiento las plantas de los tratamientos T6 y T3.

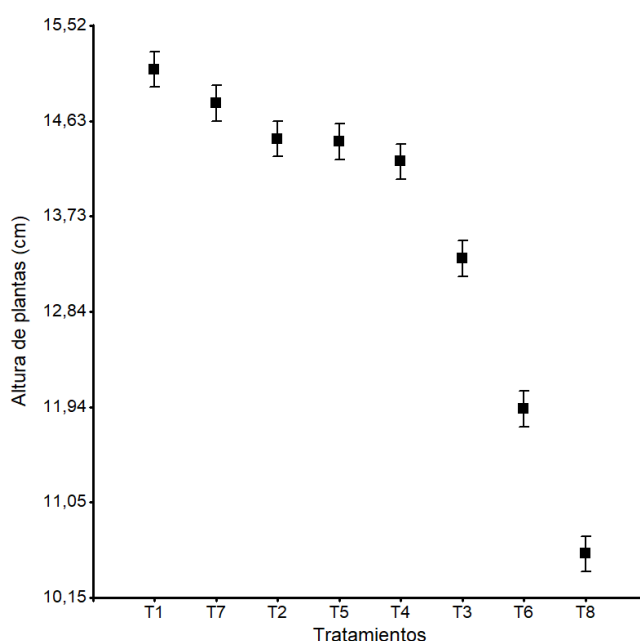


Figura 197: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para altura de plantas 120 días después del trasplante

4.10.2 Diámetro de plantas

a. Diámetro de plantas 60 días después del trasplante

Sesenta días después del trasplante los microorganismos benéficos presentaron efecto positivo en el desarrollo diametral de las plantas de fresa, en el cuadro 87 se observa que el tratamiento T6 presentó el mayor diámetro de plantas con una media de 18,47 cm mientras que el tratamiento que no recibió aplicación de microorganismos, presentó únicamente 14,52 cm en promedio y fue el valor más bajo registrado.

Cuadro 87: Diámetro de plantas 60 días después del trasplante

Tratamientos	Repeticiones				Promedio (cm)
	R1	R2	R3	R4	
T1	17,83	17,30	17,20	17,65	17,49
T2	17,10	17,18	17,13	17,53	17,23
T3	17,90	17,28	17,63	17,33	17,53
T4	16,68	16,33	16,48	16,53	16,50
T5	16,85	16,88	16,53	16,53	16,69
T6	18,88	18,43	18,25	18,33	18,47
T7 (EM1)	17,85	17,33	17,50	17,20	17,47
T8 (Testigo)	14,20	14,60	14,45	14,83	14,52

Mediante la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para diámetro de plantas 60 días después del trasplante, se constata cuatro rangos de significancia (cuadro 88). En el nivel de significancia A se ubica el tratamiento T8 con una media de 14,52 cm, el rango B lo comparten con medias de 16,51 cm y 16,70 cm los tratamientos T4 y T5 respectivamente. En el rango C con medias de 17,24 cm; 17,47 cm y 17,50 cm se ubican los tratamientos T2, T7 y T1 correspondientemente. En el rango D con una media de 18,47 cm se encuentra el tratamiento T6.

Cuadro 88: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para diámetro de plantas 60 días después del trasplante

Tratamientos	Medias	Error Estándar	Significancia
T8	14,52	0,12	A
T4	16,51	0,12	B
T5	16,70	0,12	B
T2	17,24	0,12	C
T7	17,47	0,12	C
T1	17,50	0,12	C
T3	17,54	0,12	C
T6	18,47	0,12	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la figura 198, se observa que 60 días después del trasplante, el tratamiento T8 presentó el menor desarrollo diametral mientras que las plantas del tratamiento T6 se destacaron por el mayor diámetro de las plantas; existió diferencias claras en el crecimiento de las plantas de acuerdo al consorcio microbiano inoculado.

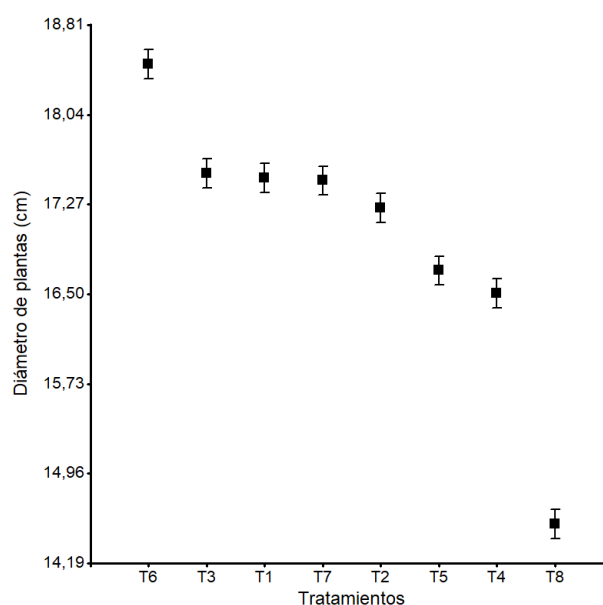


Figura 198: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para diámetro de plantas 60 días después del trasplante

b. Diámetro de plantas 90 días después del trasplante

A los 90 días después de iniciada la investigación, las plantas del tratamiento T2 presentaron una media de crecimiento diametral igual a 25,54 cm que fue el valor máximo registrado, mientras que las plantas del tratamiento T8 crecieron únicamente en promedio 19,67 cm (cuadro 89). Se constata que todos los tratamientos que recibieron inoculación microbiana benéfica presentaron desarrollo diametral superior al tratamiento que no recibió inoculación alguna.

Cuadro 89: Diámetro de plantas 90 días después del trasplante

Tratamientos	Repeticiones				Promedio (cm)
	R1	R2	R3	R4	
T1	21,63	22,20	21,68	21,90	21,85
T2	25,83	25,23	25,38	25,73	25,54
T3	24,03	24,13	24,90	24,28	24,33
T4	22,88	22,00	22,63	22,78	22,57
T5	21,05	21,43	21,70	21,78	21,49
T6	20,28	20,90	21,28	21,53	20,99
T7 (EM1)	20,75	21,20	21,40	21,73	21,27
T8 (Testigo)	19,98	19,38	19,55	19,78	19,67

Con la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para diámetro de plantas 90 días después del trasplante, se determinó seis rangos de significancia (cuadro 90). En el rango A con una media de 19,67 cm se encuentra el tratamiento T8. El rango B lo comparten los tratamientos T6 (20,99 cm), T7 (21,27 cm) y T5 (21,49 cm). En el rango C se ubican el tratamiento T5 con una media de 21,49 cm y el tratamiento T1 con una media de 21,85 cm. En el rango D se ubica el tratamiento T4 con una media de 22,57 cm. El tratamiento T3 con una media de 24,33 cm pertenece al rango E. En el rango F con una media de crecimiento diametral de 25,54 cm encontramos al tratamiento T2.

Cuadro 90: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para diámetro de plantas 90 días después del trasplante

Tratamientos	Medias	Error Estándar	Significancia		
T8 (Testigo)	19,67	0,19	A		
T6	20,99	0,19	B		
T7 (EM1)	21,27	0,19	B		
T5	21,49	0,19	B C		
T1	21,85	0,19	C		
T4	22,57	0,19	D		
T3	24,33	0,19	E		
T2	25,54	0,19	F		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

A 90 días después del trasplante las plantas del tratamiento T2 superaron en desarrollo diametral a todos los otros tratamientos. Las plantas del tratamiento T8 presentaron el menor crecimiento, mientras que el tratamiento comercial T7 solamente superó a T6 y T8. (figura 199).

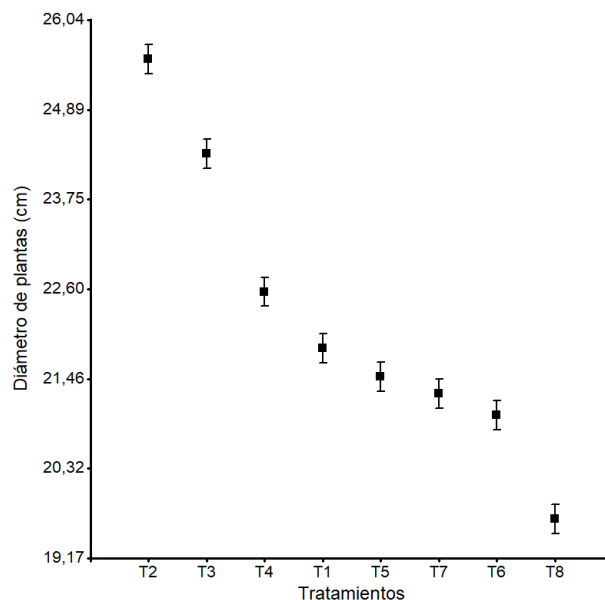


Figura 199: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para diámetro de plantas 90 días después del trasplante

c. Diámetro de plantas 120 días después del trasplante

Transcurridos 120 días después del trasplante predominó el efecto de los microorganismos benéficos en el crecimiento del diámetro (cuadro 91), las plantas del tratamiento T1 con una media de 28,38 cm fueron las que presentaron el mayor desarrollo diametral, mientras que las plantas del tratamiento T8 crecieron 20,73 cm y fue la media más baja registrada.

Cuadro 91: Diámetro de plantas 120 días después del trasplante

Tratamientos	Repeticiones				Promedio (cm)
	R1	R2	R3	R4	
T1	28,50	27,73	28,50	28,80	28,38
T2	26,43	25,33	26,43	26,93	26,28
T3	27,07	26,53	26,80	27,17	26,89
T4	25,68	25,25	24,93	25,97	25,46
T5	26,55	26,63	25,67	26,00	26,21
T6	22,43	22,83	22,50	21,93	22,42
T7 (EM1)	25,08	24,83	25,13	25,53	25,14
T8 (Testigo)	20,65	21,00	20,75	20,50	20,73

Mediante la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para diámetro de plantas 120 días después del trasplante (cuadro 92), se identifica seis rangos de significancia. En el rango A con una media de 20,73 se encuentra el tratamiento T8, en el rango B con una media de 22,42 cm se ubica el tratamiento T6. El tratamiento T1 con una media de 28,38 cm se encuentra en el rango F mientras que en el rango E se encuentran los tratamientos T2 y T3 con medias de 26,28 cm y 26,89 cm.

Cuadro 92: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para diámetro de plantas 120 días después del trasplante

Tratamientos	Medias	Error Estándar	Significancia		
T8 (Testigo)	20,73	0,21	A		
T6	22,42	0,21	B		
T7 (EM1)	25,14	0,21	C		
T4	25,46	0,21	C		
T5	26,21	0,21	D		
T2	26,28	0,21	D		E
T3	26,89	0,21	E		E
T1	28,38	0,21	F		F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la figura 200, se muestra que 120 días después del trasplante, las plantas del tratamiento T1 presentaron el mayor diámetro de plantas, mientras que las plantas del tratamiento T8 fueron las que presentaron el menor desarrollo diametral.

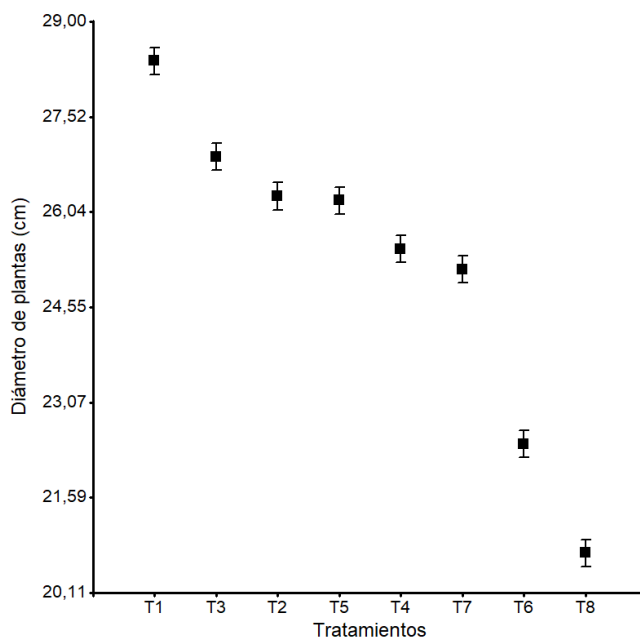


Figura 200: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para diámetro de plantas 120 días después del trasplante

4.10.3 Número de hojas por planta

a. Número de hojas por planta 90 días después del trasplante

Transcurridos 90 días después del trasplante, el número de hojas por planta fue diferente entre todos los tratamientos (cuadro 93). El tratamiento T3 presentó el mayor número de hojas con un promedio de 28,25 hojas y fue la media más alta registrada. Las plantas del tratamiento T8 presentaron un promedio de 19,13 hojas en cada una de las plantas y fue la menor media que se registró.

Cuadro 93: Número de hojas por plantas 90 días después del trasplante

Tratamientos	Repeticiones				Promedio
	R1	R2	R3	R4	
T1	24,50	24,50	24,25	24,50	24,44
T2	23,50	23,00	23,25	23,50	23,31
T3	28,25	28,25	28,25	28,25	28,25
T4	20,75	20,25	20,50	21,00	20,63
T5	22,50	22,00	22,25	22,75	22,38
T6	20,75	20,75	20,50	20,75	21,06
T7 (EM1)	22,75	22,25	22,25	22,50	22,44
T8 (Testigo)	19,00	19,00	19,25	19,25	19,13

En la comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para número de hojas por plantas 90 días después del trasplante, se registra seis niveles de significancia (cuadro 94). En el rango A con una media de 19,13 hojas se encuentra el tratamiento T8, mientras que en el rango F con una media de 28,25 hojas por planta se encuentra el tratamiento T3. El tratamiento comercial T7 con una media de 22,44 hojas comparte el rango C con el tratamiento T5 que presenta una media de 22,38 hojas.

Cuadro 94: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para número de hojas por plantas 90 días después del trasplante

Tratamiento	Medias	Error Estándar	Significancia
T8 (Testigo)	19,13	0,11	A
T4	20,63	0,11	B
T6	20,69	0,11	B
T5	22,38	0,11	C
T7 (EM1)	22,44	0,11	C
T2	23,31	0,11	D
T1	24,44	0,11	E
T3	28,25	0,11	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la figura 201, se evidencia que 90 días después del trasplante las plantas del tratamiento T3 presentaron el mayor número de hojas por planta mientras que las

plantas del tratamiento T8 presentaron el menor número; existe diferencias significativas en el número de hojas entre todos los tratamientos.

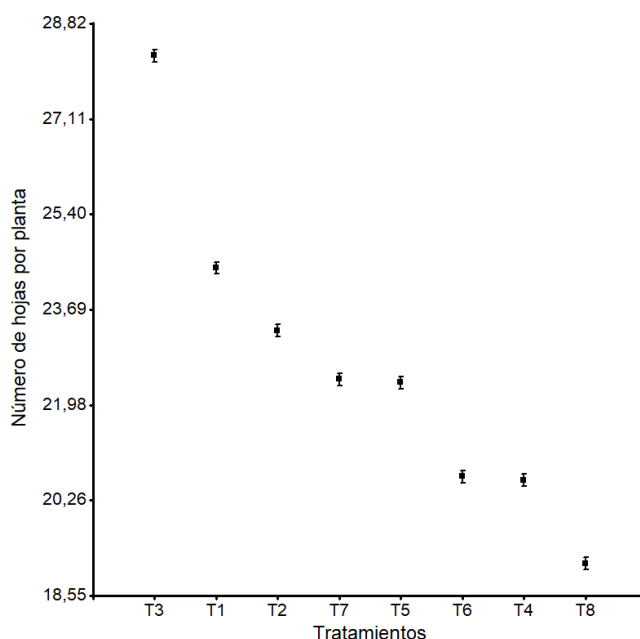


Figura 201: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para número de hojas por planta 90 días después del trasplante

b. Número de hojas por planta 120 días después del trasplante

El número de hojas por planta 120 días después de establecida la plantación varió entre cada uno de los tratamientos (cuadro 95). Los tratamientos que presentaron mayor número de hojas corresponden a los tratamientos que recibieron aplicación de microorganismos benéficos; el tratamiento T3 presentó una media de 54,25 hojas por planta y fue el valor más alto verificado, el tratamiento T8 mostró una media de 27,67 hojas por planta, fue el promedio más bajo registrado.

Cuadro 95: Número de hojas por plantas 120 días después del trasplante

Tratamientos	Repeticiones				Promedio
	R1	R2	R3	R4	
T1	45,00	43,50	44,00	44,00	44,13
T2	45,50	44,50	45,00	45,00	45,00
T3	54,00	55,00	54,50	53,50	54,25
T4	38,00	37,67	37,00	36,50	37,29
T5	39,00	38,67	38,50	38,00	38,54
T6	39,50	41,00	40,00	41,50	40,50
T7 (EM1)	41,67	41,33	42,50	42,00	41,88
T8 (Testigo)	28,00	27,67	27,50	27,50	27,67

En el cuadro 96, de acuerdo a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para número de hojas por plantas 120 días después del trasplante, se constata ocho rangos de significancia, verificándose diferencia significativa entre todos los tratamientos. En el rango A con una media de 27,67 hojas se encuentra el tratamiento T8 mientras que en el rango H con una media de 54,25 hojas por planta se encuentran las plantas del tratamiento T3.

Cuadro 96: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para número de hojas por plantas 120 días después del trasplante.

Tratamiento	Medias	Error Estándar	Significancia
T8 (Testigo)	27,67	0,29	A
T4	37,29	0,29	B
T5	38,54	0,29	C
T6	40,50	0,29	D
T7 (EM1)	41,88	0,29	E
T1	44,13	0,29	F
T2	45,00	0,29	G
T3	54,25	0,29	H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la figura 202, se observa que 120 días después de plantadas las fresa (*Fragaria* sp.) las plantas correspondientes al tratamiento T3 presentaron el mayor número de hojas, mientras que las plantas del tratamiento testigo T8 son las que presentaron menor número.

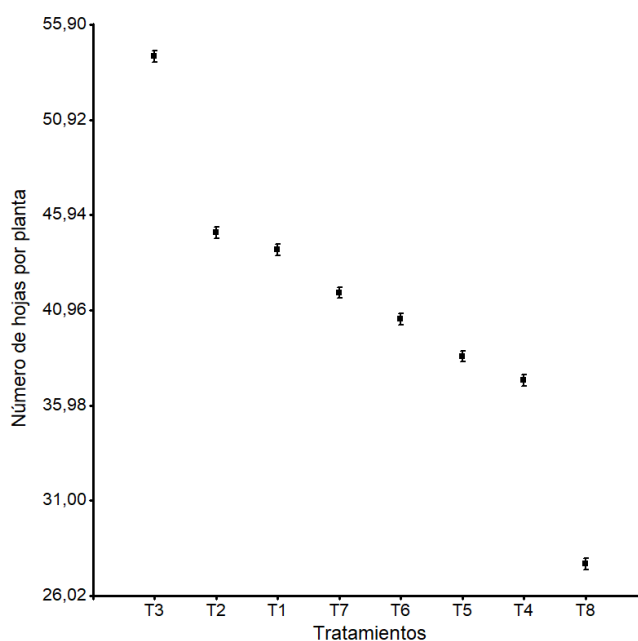


Figura 202: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para número de hojas por planta 120 días después del trasplante

4.10.4 Longitud de raíces

En el cuadro 97 se expone la longitud, peso fresco y peso seco de raíces. El área radicular de todas las plantas que recibieron aplicación de microorganismos benéficos presentó mayor desarrollo que aquellas plantas que no recibieron ninguna aplicación. Las plantas del tratamiento T1 se destacaron, ya que las raíces presentaron el mayor desarrollo mientras que las plantas del tratamiento T8 evidenciaron el menor crecimiento longitudinal de raíces.

En lo referente a peso fresco, las raíces de las plantas del tratamiento T4 registraron una media de 60,58 gramos en tanto que las raíces del tratamiento T8 presentaron un peso fresco de 12,63 gramos.

En peso seco de raíces se constató que el tratamiento T4 presentó la mayor media con un peso de 17,59 gramos mientras que el tratamiento T8 presentó únicamente un promedio de 3,76 gramos por raíz de cada planta. Se determinó que las raíces más largas no son las que presentaron mayor peso ni fresco ni seco, lo que evidenció que la cabellera de las raíces secundarias y crecimiento diametral es muy importante.

Cuadro 97: Características de las raíces de plantas de fresas 120 días después del trasplante

Tratamientos	Longitud de raíces (cm)	Peso fresco de raíces (g)	Peso seco de raíces (g)
T1	33,00	40,94	13,34
T2	25,00	20,42	4,72
T3	22,50	35,23	11,44
T4	23,00	60,58	17,59
T5	24,00	47,58	17,31
T6	22,00	32,43	10,58
T7 (EM1)	29,00	26,20	6,48
T8 (Testigo)	18,50	12,63	3,76

Transcurridos 120 días después del trasplante, la diferencia en el crecimiento longitudinal y volumétrico de raíces entre los tratamientos T1 (MOBs del piso altitudinal uno), T7 (producto comercial EM1) y T8 (tratamiento testigo), se exponen en la figura 203.



Figura 203: Diferencias en longitud de raíces de plantas de fresa entre los tratamientos T1, T7 y T8, 120 días después del trasplante

En la comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para longitud de raíces 120 días después del trasplante, se presenta seis niveles de significancia (cuadro 98). En el rango A con una media de 18,50 cm se encuentra el tratamiento T8, en el rango B se encuentran los tratamientos T6, T3 y T4 con medias de 22,00 cm; 22,50 cm y 23,00 cm respectivamente. El tratamiento T4 con una media de 23,00 cm y el tratamiento T5 con una media de 24 cm se ubican en el rango C. El rango D lo comparten el tratamiento T5 con una media de 24 cm y el tratamiento T2 con una media de 25 cm. El tratamiento T7 con una media de 29 cm se ubica en el rango E y el tratamiento T1 con una media de 33,00 cm se sitúa en el rango F.

Cuadro 98: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para longitud de raíces 120 días después del trasplante

Tratamiento	Medias	Error Estándar	Significancia		
T8 (Testigo)	18,50	0,42	A		
T6	22,00	0,42	B		
T3	22,50	0,42	B		
T4	23,00	0,42	B C		
T5	24,00	0,42	C D		
T2	25,00	0,42	D		
T7 (EM1)	29,00	0,42	E		
T1	33,00	0,42	F		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la figura 204, se observa que el tratamiento T1 presentó mayor desarrollo radicular, seguido del tratamiento T7 y T2. El tratamiento T8 fue el que demostró menor desarrollo de las raíces, estadísticamente muy diferente a todos los demás tratamientos. Se evidencia que todos los tratamientos que recibieron aplicación de microorganismos beneficios desarrollaron sus raíces más que el tratamiento sin microorganismos. El tratamiento comercial T7 presentó

excelente desarrollo radicular superior a todos los tratamientos excepto al tratamiento T1 que es el que mostró mayor longitud de raíces.

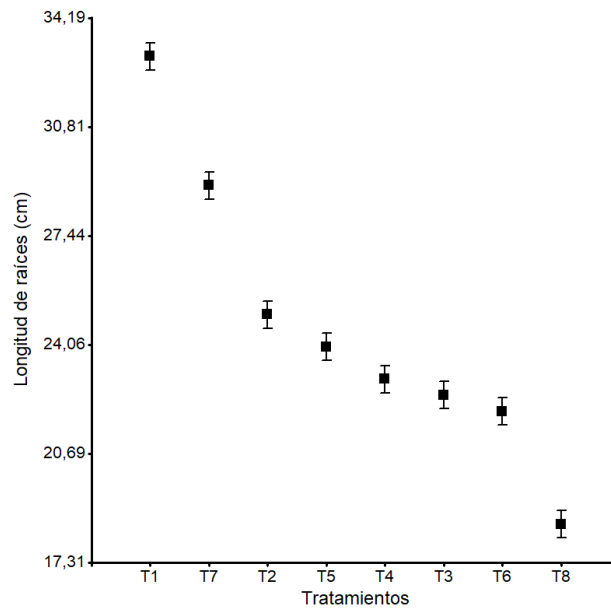


Figura 204: Comparación de medias usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) para longitud de raíces 120 días después del trasplante

4.10.5 Relación entre crecimiento de raíces y altura de plantas

La altura de plantas presentó correlación directa con la longitud de raíces, las plantas de cada uno de los tratamientos presentaron diferencias en la longitud de sus raíces (figura IV-60). Los tratamientos que recibieron inoculación de microorganismos benéficos presentaron mayor longitud de raíces con respecto al tratamiento que no recibió inoculación.

Las plantas del tratamiento T1 presentaron mayor altura y mayor longitud de sus raíces, el tratamiento comercial T7 presentó buen desarrollo longitudinal de sus raíces mientras que el tratamiento blanco T8 evidenció menor desarrollo radicular con respecto a todos los demás tratamientos figura 205.



Figura 205: Longitud de raíces de plantas de fresa 120 días después del trasplante

A 120 días después del trasplante, el tratamiento T1 presentó la mayor longitud de raíz con 33,00 cm de longitud, el tratamiento comercial T7 mostró un crecimiento de 29,00 cm mientras que el tratamiento T8 únicamente desarrollo la raíz 18,50 cm siendo el de menor crecimiento (cuadro 99). El crecimiento de la raíz presentó relación directa con la altura de plantas.

Cuadro 99: Comparación entre altura de plantas y longitud de raíces 120 días después del trasplante

Tratamiento	Altura de plantas (cm)	Longitud de raíces (cm)
T1	15,33	33,00
T2	14,46	25,00
T3	13,34	22,50
T4	14,25	23,00
T5	14,43	24,00
T6	11,93	22,00
T7 (EM1)	14,80	29,00
T8 (Testigo)	10,56	18,50

En la figura 206, se comprueba que existe una relación directa entre crecimiento de plantas y longitud de raíces, el tratamiento T1 que presentó la mayor altura de plantas fue también el que presentó el mayor crecimiento de raíces, mientras que el tratamiento T8 que registró el menor crecimiento de plantas es el que también presentó el menor desarrollo radicular. Se evidencia claramente que los microorganismos benéficos tienen un efecto positivo sobre el crecimiento de raíces y que los microorganismos provenientes de los diferentes pisos altitudinales no presentan el mismo efecto, T1 se destaca por la mayor longitud de raíces en tanto que T6 es el tratamiento con menor crecimiento de raíces, sin embargo las raíces de las plantas de todos los tratamientos que recibieron inoculación de consorcios microbianos presentaron desarrollo radicular superior a T8 que es el tratamiento blanco que no recibió inoculación alguna.

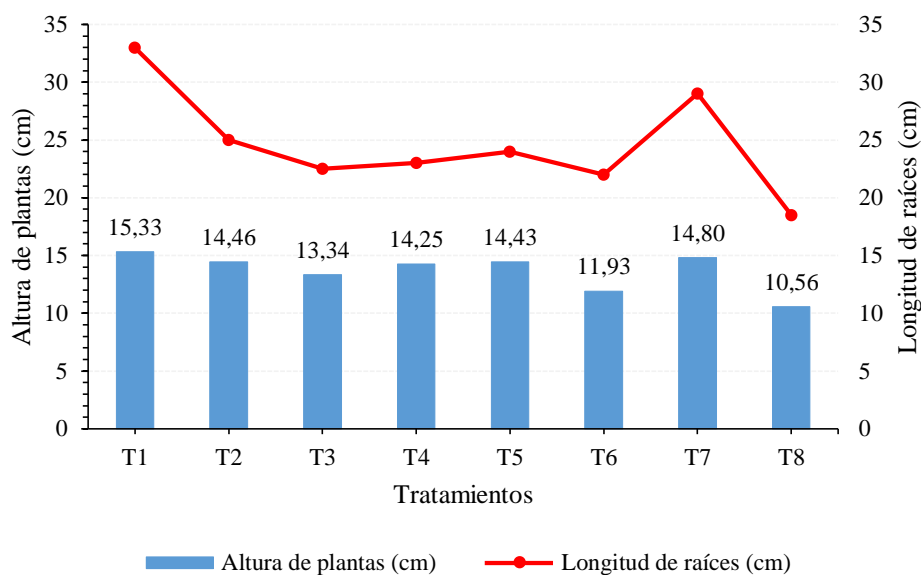


Figura 206: Relación entre altura de plantas y longitud de raíces 120 días después del trasplante

Después de 120 días del trasplante se evaluó la relación entre peso fresco y peso seco de las raíces de fresa (*Fragaria* sp), en peso fresco el tratamiento T4 presentó una media de 60,58 g que fue el mayor peso registrado, mientras que T8 presentó una media de 12,63 g y fue el menor peso constatado. En peso seco el mayor valor se registró en el tratamiento T4 con una media de 17,59 g y el menor peso se constató en el tratamiento T8 con una media de 3,76 g. (cuadro 100).

Cuadro 100: Relación entre peso fresco de raíces y peso seco de raíces 120 días después del trasplante

Tratamientos	Peso fresco de raíces (g)	Peso seco de raíces (g)
T1	40,94	13,34
T2	20,42	4,72
T3	35,23	11,44
T4	60,58	17,59
T5	47,58	17,31
T6	32,43	10,58
T7 (EM1)	26,20	6,48
T8 (Testigo)	12,63	3,76

En la figura 207 se observa que las raíces de las plantas del tratamiento T4 presentaron el mayor peso en estado fresco y este mismo tratamiento registró el peso mayor cuando las raíces fueron secadas. Todos los tratamientos que recibieron la aplicación de microorganismos benéficos se destacan por el mayor peso con relación al tratamiento T8 que presentó el menor peso tanto en estado fresco como en estado seco. Todos los

tratamientos exhiben una relación directa entre el peso evaluado en estado fresco y el peso registrado en estado seco.

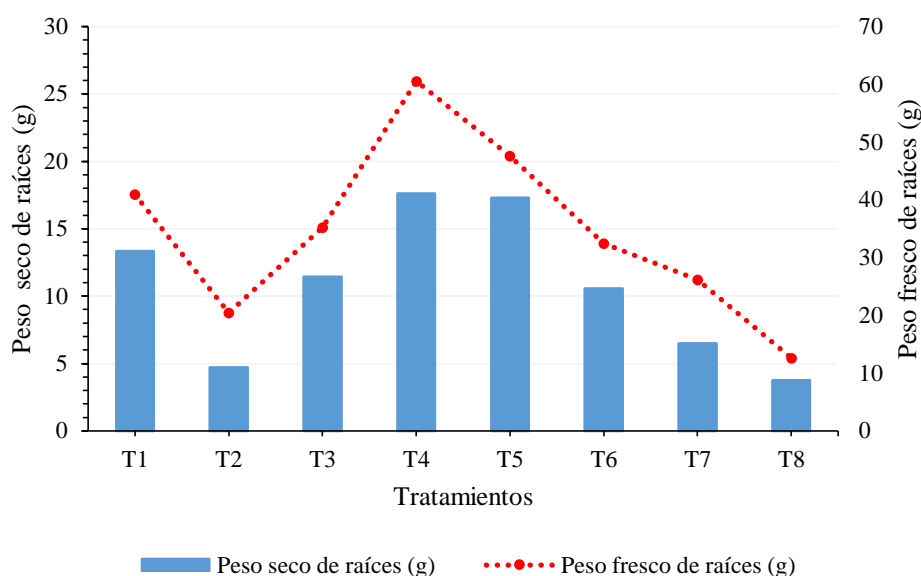


Figura 207: Relación entre peso seco y peso fresco de raíces 120 días después del trasplante

En el cuadro 101, se confirma que en peso fresco las hojas de las plantas del tratamiento T1 presentaron el mayor valor con una media de 129,35 g y que las hojas de las plantas del tratamiento T8 con una media de 32,46 g registraron el peso menor. Con respecto al peso de las hojas en estado seco en el tratamiento T1 se verifica una media de 35,43 g y en el tratamiento T8 una media de 8,37 g, que son los tratamientos que se destacan por el mayor y menor peso registrado.

Cuadro 101: Relación entre peso fresco de hojas y peso seco de hojas 120 días después del trasplante

Tratamientos	Peso fresco de hojas (g)	Peso seco de hojas (g)
T1	129,35	35,43
T2	65,24	15,97
T3	71,20	17,00
T4	121,92	30,31
T5	90,25	24,17
T6	51,73	13,55
T7 (EM1)	64,53	15,09
T8 (Testigo)	32,79	8,37

En la comparación de la relación entre peso fresco y peso seco de las hojas de plantas de fresa (*Fragaria* sp.) 120 días después del trasplante (figura 208), se observa claramente que existe una relación directa entre peso fresco y peso seco, de tal manera que los tratamientos que mostraron mayor peso en estado fresco son los mismos que registraron mayor peso en

estado seco. Lo que se destaca es que todos los tratamientos que fueron aplicados microorganismos benéficos presentaron pesos superiores al tratamiento que no recibió ninguna inoculación, lo que evidencia un efecto positivo de los microorganismos con respecto al peso de hojas.

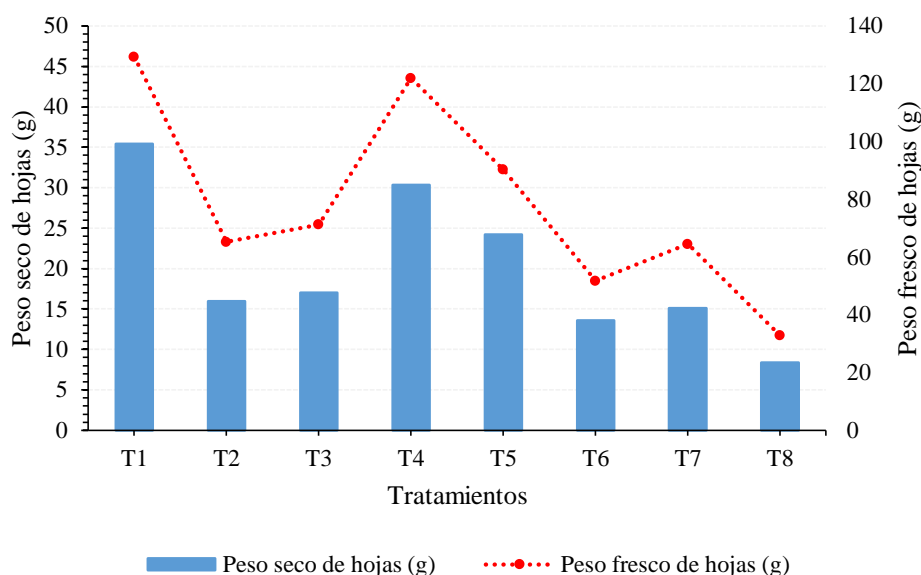


Figura 208: Relación entre peso fresco y peso seco de hojas 120 días después del trasplante

En el cuadro 102, se observa la relación entre peso seco de raíces y su longitud 120 días después de realizado el trasplante, las raíces de las plantas del tratamiento T1 presentaron la mayor longitud de raíces con una media de 33,00 cm y las raíces de las plantas del tratamiento T4 mostraron el mayor peso seco con una media de 17,59 g. Las plantas del tratamiento T8 presentaron una longitud de raíces de 18,50 cm y fue el valor más bajo verificado, además en este mismo tratamiento el peso seco de raíces es 3,76 g que es el menor peso evaluado entre todos los tratamientos.

Cuadro 102: Relación entre peso seco y longitud de raíces 120 días después del trasplante

Tratamientos	Peso seco de raíces (g)	Longitud de raíces (cm)
T1	13,34	33,00
T2	4,72	25,00
T3	11,44	22,50
T4	17,59	23,00
T5	17,31	24,00
T6	10,58	22,00
T7 (EM1)	6,48	29,00
T8 (Testigo)	3,76	18,50

En la comparación realizada entre peso seco y longitud de raíces de plantas de fresa (*Fragaria* sp.) que se presenta en la figura 209, se demuestra que no existe relación directa entre peso seco y longitud de raíces.

El tratamiento T1 presentó mayor longitud de raíces, pero el tratamiento T4 registró el mayor peso seco, también el tratamiento T7 presentó un importante desarrollo radicular, pero bajo peso seco en relación al crecimiento de las raíces.

Lo que evidencia que es importante no solamente el crecimiento longitudinal de la raíz sino también el crecimiento diametral de esta, es así que el tratamiento T5 presentó buen desarrollo longitudinal y buen peso seco. Se muestra el efecto importante de la aplicación de microorganismos benéficos sobre el crecimiento de las raíces que conlleva a mayor y mejor absorción de nutrientes. El tratamiento T8 que no recibió ninguna inoculación de microorganismos, no se destacó por el crecimiento longitudinal ni por el peso seco de las raíces.

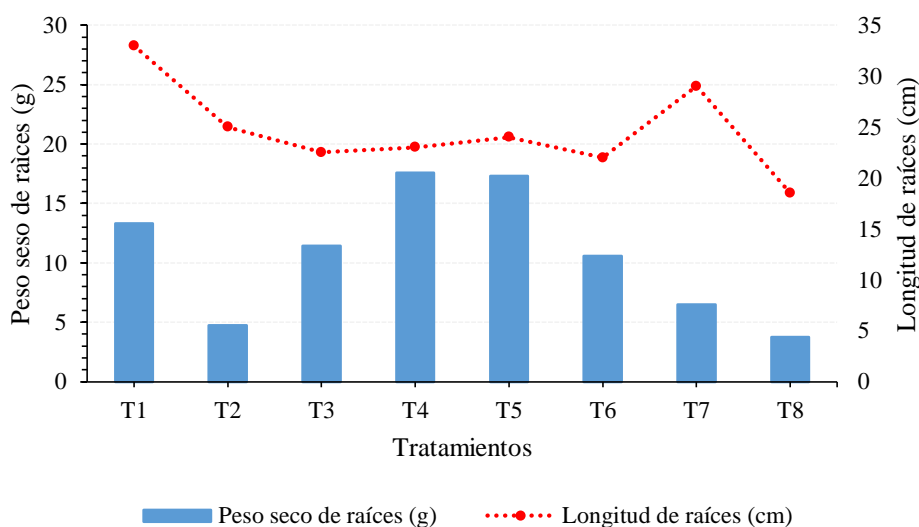


Figura 209: Relación entre peso seco y longitud de raíces 120 días después del trasplante

4.10.6 Correlación entre características de crecimiento de plantas de fresa

En el cuadro 103, se presentan las principales características morfológicas de plantas de fresa (*Fragaria* sp.) 120 días después del trasplante, donde se destaca altura y diámetro de plantas, así como longitud de raíces y número de hojas que presentaron las plantas de cada uno de los tratamientos en estudio. Además, se especifica información relevante referente al peso de las hojas y raíces tanto en estado fresco, así como en estado seco.

Cuadro 103: Características morfológicas de las plantas de fresa (*Fragaria* sp.) 120 días después del trasplante

Tratamientos	Altura de plantas (cm)	Diámetro de plantas (cm)	Longitud de raíces (cm)	Número de hojas por planta	Peso fresco de hojas (g)	Peso seco de hojas (g)	Peso fresco de raíces (g)	Peso seco de raíces (g)
T1	15,33	28,38	33,00	44,13	129,35	35,43	40,94	13,34
T2	14,46	26,28	25,00	45,00	65,24	15,97	20,42	4,72
T3	13,34	26,89	22,50	54,25	71,20	17,00	35,23	11,44
T4	14,25	25,46	23,00	37,29	121,92	30,31	60,58	17,59
T5	14,43	26,21	24,00	38,54	90,25	24,17	47,58	17,31
T6	11,93	22,42	22,00	40,50	51,73	13,55	32,43	10,58
T7 (EM1)	14,80	25,14	29,00	41,88	64,53	15,09	26,20	6,48
T8 (Testigo)	10,56	20,73	18,50	27,67	32,79	8,37	12,63	3,76

En el cuadro 104, se muestra la correlación que existe entre las diferentes variables en estudio.

Se constata que hay alta relación significativa entre altura de plantas y diámetro de plantas con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,90.

En lo referente a altura de plantas y longitud de raíces el coeficiente de correlación de Pearson es 0,82 lo que demuestra que existe alta relación significativa entre la altura de las plantas y la longitud de las raíces.

Se destaca que el peso fresco de las hojas tiene correlación significativa con peso seco de las hojas, el coeficiente de *Pearson* es 0,99 y un p valor de 0,000001. También es evidente que el peso fresco de hojas tiene una relación positiva significativa con peso fresco de raíces, el coeficiente de correlación es 0,83.

El peso fresco de las raíces tiene alta correlación positiva con el peso seco de raíces, el coeficiente de correlación es 0,97 y el p valor es 0,000087.

Cuadro 104: Correlación entre las características morfológicas de las plantas de fresa (*Fragaria* sp.) 120 días después del trasplante

Variable 1	Variable 2	n	Pearson	p-valor
Altura de plantas (cm)	Altura de plantas (cm)	8	1	0
	Diámetro de plantas (cm)	8	0,90	0,002605
	Longitud de raíces (cm)	8	0,82	0,011707
	Peso fresco de hojas (g)	8	0,75	0,033291
	Peso seco de hojas (g)	8	0,72	0,045782
Diámetro de plantas (cm)	Altura de plantas (cm)	8	0,90	0,002605
	Diámetro de plantas (cm)	8	1	0
	Longitud de raíces (cm)	8	0,73	0,040137
	Número de hojas por planta	8	0,72	0,044552
	Peso fresco de hojas (g)	8	0,75	0,030485
Longitud de raíces (cm)	Peso seco de hojas (g)	8	0,73	0,037849
	Altura de plantas (cm)	8	0,82	0,011707
	Diámetro de plantas (cm)	8	0,73	0,040137
Número de hojas por planta	Longitud de raíces (cm)	8	1	0
	Diámetro de plantas (cm)	8	0,72	0,044552
Peso fresco de hojas (g)	Número de hojas por planta	8	1	0
	Altura de plantas (cm)	8	0,75	0,033291
	Diámetro de plantas (cm)	8	0,75	0,030485
	Peso fresco de hojas (g)	8	1	0
	Peso seco de hojas (g)	8	0,99	0,000001
	Peso fresco de raíces (g)	8	0,83	0,011427
Peso seco de hojas (g)	Peso seco de raíces (g)	8	0,77	0,025616
	Altura de plantas (cm)	8	0,72	0,045782
	Diámetro de plantas (cm)	8	0,73	0,037849
	Peso fresco de hojas (g)	8	0,99	0,000001
	Peso seco de hojas (g)	8	1	0
	Peso fresco de raíces (g)	8	0,80	0,017242
Peso fresco de raíces (g)	Peso seco de raíces (g)	8	0,77	0,026239
	Peso fresco de hojas (g)	8	0,83	0,011427
	Peso seco de hojas (g)	8	0,80	0,017242
	Peso fresco de raíces (g)	8	1	0
Peso seco de raíces (g)	Peso seco de raíces (g)	8	0,97	0,000087
	Peso fresco de hojas (g)	8	0,77	0,025616
	Peso seco de hojas (g)	8	0,77	0,026239
	Peso fresco de raíces (g)	8	0,97	0,000087
	Peso seco de raíces (g)	8	1	0

En la figura 210 se verifica la correlación que existe entre la altura y el diámetro de plantas de fresa 120 días después de realizado el trasplante, constatándose que el diámetro tiene relación directa con la altura de plantas, es decir que las plantas obtienen mayor altura y a la par el desarrollo diametral aumenta.

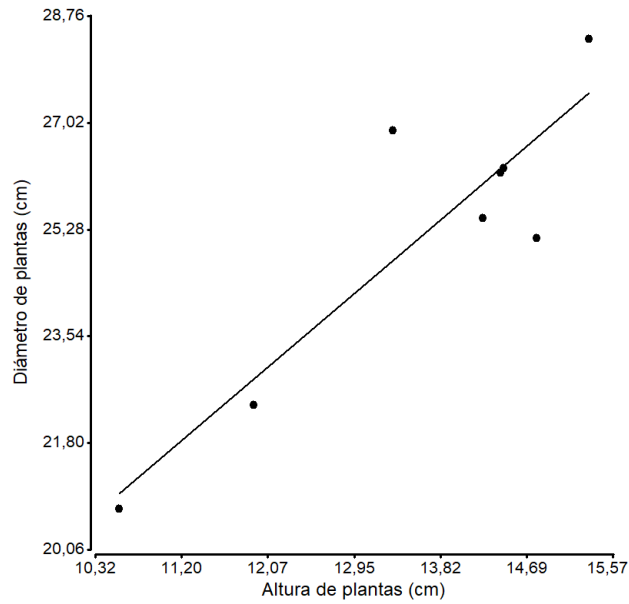


Figura 210: Correlación entre altura de plantas y diámetro de plantas 120 días después del trasplante

La figura 211, presenta la correlación entre la altura de plantas y la longitud de raíces, se observa que existe correlación significativa entre estas variables y que el desarrollo de las raíces tiene relación directa con la altura de las plantas, lo cual es importante para la absorción de nutrientes del suelo, ya que a más altura de plantas mayor posibilidad de absorber nutrientes por el crecimiento proporcional de las raíces.

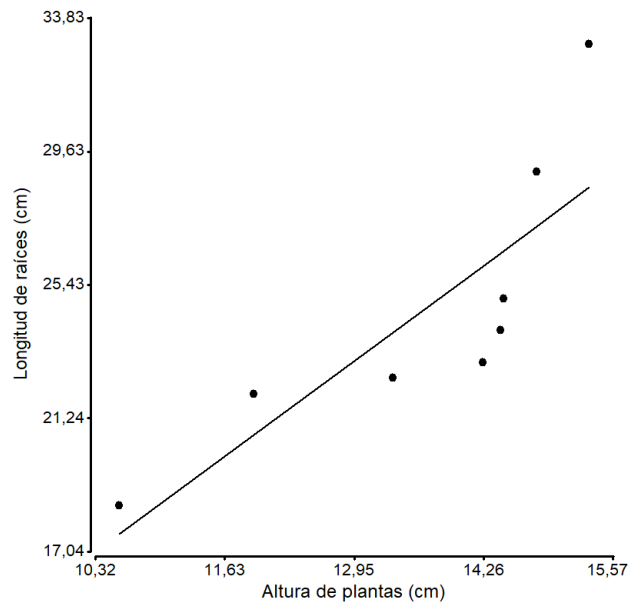


Figura 211: Correlación entre altura de plantas y longitud de raíces 120 días después del trasplante

En la figura 212, se verifica que existe alta correlación entre el peso fresco y el peso seco de hojas, las mismas que son importantes ya que en ellas se realiza la actividad fotosintética

que repercute en el crecimiento y rendimiento de las plantas, mientras más peso presenten en estado fresco más peso presentarán en estado seco.

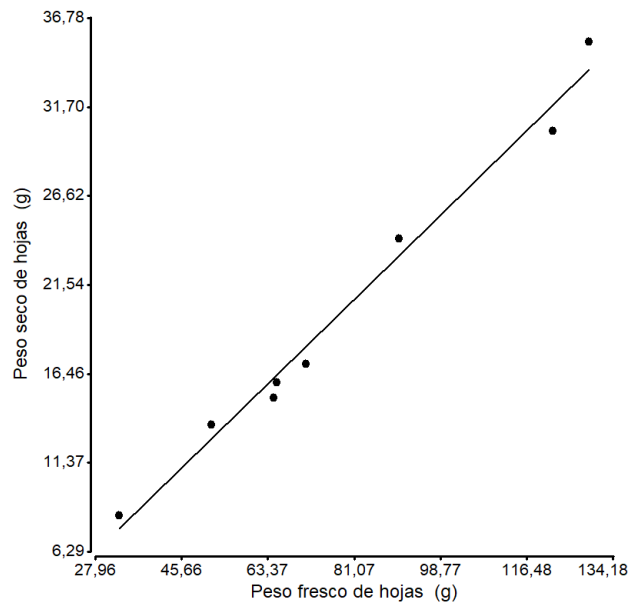


Figura 212: Correlación entre peso fresco de hojas y peso seco de hojas 120 días después del trasplante

En la figura 213, se constata que existe alta correlación entre el peso fresco y el peso seco de raíces de plantas de fresa (*Fragaria* sp.), por lo tanto, mientras más peso presenten las raíces en estado fresco más peso presentarán estas en estado seco.

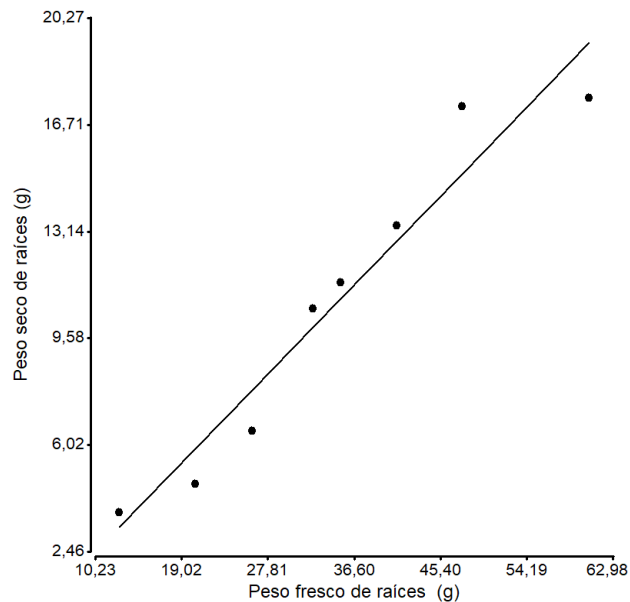


Figura 213: Correlación entre peso fresco de raíces y peso seco de raíces 120 días después del trasplante

Usando la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) se evaluó la altura y diámetro de plantas de fresa a los 60, 90 y 120 días después de la plantación; así como también el número de hojas

por planta a 90 y 120 días después de establecido el cultivo y la longitud de raíces 120 días después del trasplante. Se estableció la correlación entre las diferentes características morfológicas de las plantas de fresa.

Con respecto a la altura de plantas de fresa (*Fragaria* sp.) durante las fases de estudio, se presentó diferencias significativas entre todos los tratamientos, las plantas del tratamiento T1 con consorcios microbianos del piso altitudinal uno al 2,5% de concentración a los 60 días después del trasplante ocupó penúltimo lugar en desarrollo, luego a los 90 días incrementó su crecimiento longitudinal ubicándose en el rango C, finalmente a los 120 días alcanzó el máximo desarrollo y comparte el rango de significancia F con los microorganismos del tratamiento comercial, los microorganismos identificados en este consorcio microbiano fueron *Lactobacillus delbrueckii* ssp, y *Streptomyces sanglieri*, entre otros. Se constata que no es relevante la dosis aplicada y que los microorganismos probablemente sufren una etapa de adaptación antes de cumplir óptimamente sus funciones benéficas y favorecer el desarrollo de las plantas.

El efecto de los microorganismos benéficos de los tres pisos altitudinales difiere de acuerdo a la especie vegetal, probablemente por tratarse de especies diferentes ya que <<los microorganismos que forman parte de la flora residente (autóctonos) se encuentran normalmente en el ambiente que los acoge >> (Palomino, 1995), están influenciados por las condiciones ambientales de la zona, debido a que los hábitats naturales de los microorganismos son extremadamente diversos (Madigan *et al.*, 2004).

Las plantas de todos los tratamientos que recibieron inoculación de microorganismos benéficos en los suelos, presentaron mayor altura que las plantas utilizadas como testigo. Similares resultados se presentaron en el análisis del diámetro de plantas, las que recibieron aplicación de consorcios microbianos benéficos registraron mayor diámetro que aquellas que no recibieron inoculación de microorganismos, el mayor diámetro 120 días después del trasplante se verificó en tratamiento T1.

En lo concerniente a número de hojas por planta estadísticamente fue diferente entre todos los tratamientos, tanto a 90 días después del trasplante así como a los 120 días, el mayor número de hojas por planta se constató en las plantas del tratamiento T3 cuyos suelos recibieron inoculación de microorganismos benéficos provenientes del piso altitudinal dos al 2,5% de concentración, en este tratamiento se identificó claramente la presencia de *Kloeckera* sp., las

plantas del tratamiento testigo presentaron prácticamente la mitad de número de hojas que el tratamiento de mayor rendimiento.

Las plantas de fresa de todos los tratamientos que recibieron inoculación de microorganismos benéficos, presentaron mejores características morfológicas que las plantas testigo, los aciertos concuerdan con otras investigaciones. De acuerdo a Pedraza *et al.* (2010) las interacciones microbianas del suelo afectan el desarrollo de las plantas y la calidad del suelo, Cano (2011) acota que estas interrelaciones entre microorganismos repercuten de forma directa, en el crecimiento y en el desarrollo de las especies vegetales.

Estudios sugieren que la inoculación de raíces con *Bacillus* M3 solo o en combinación con *Bacillus* OSU-142 o *Pseudomonas* BA-8 tiene el potencial de aumentar el rendimiento, el crecimiento y el contenido nutricional de la planta de fresa (Esitken *et al.*, 2010). La inoculación de consorcios microbianos mejora la calidad y salud del suelo, además mejora el crecimiento de las plantas, así como el rendimiento y calidad de los cultivos (Singh *et al.*, 2011). El uso de microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPM) ayuda a aumentar los rendimientos además de la protección convencional de las plantas (Meena *et al.*, 2016).

Las influencias beneficiosas de los microorganismos sobre el crecimiento de las plantas incluyen la fijación de nitrógeno, la adquisición de los principales nutrientes, la promoción del crecimiento de las ramas y las raíces, el control o la supresión de enfermedades y la mejora de la estructura del suelo (Vadakattu, 2012). Los microorganismos del suelo desempeñan un papel importante en una serie de transformaciones químicas de los suelos y, por lo tanto, influyen en la disponibilidad de macro y micronutrientes plantas (Meena *et al.*, 2016).

Las plantas que presentan mayor longitud y diámetro no son las que presentan mayor número de hojas, pero se destaca el efecto positivo de la inoculación de consorcios microbianos benéficos en los suelos, esto se responsabilizaría a los diferentes grupos microbianos que contiene cada consorcio, porque cada microorganismo cumple funciones particulares, ya que las rizobacterias pueden promover el crecimiento de las plantas a través de una amplia variedad de mecanismos (García-Fraile *et al.*, 2015), pueden sintetizar y liberar auxinas como metabolitos secundarios (Bhattacharyya *et al.*, 2016) que son aprovechados de diferentes maneras por las especies vegetales.

Más del 80 por ciento de las bacterias en la rizósfera del suelo son capaces de producir auxinas, sus efectos sobre el crecimiento de las plantas son notables, afectan principalmente a las raíces de las plantas, aumentando su tamaño y peso, número de ramificación y la superficie en contacto con el suelo mejorando así la nutrición de las plantas y la capacidad de crecimiento (Jha y Saraf, 2015). Entre los reguladores del crecimiento de las plantas, el ácido indol acético (IAA) es la auxina natural más común que se encuentra en las plantas y su efecto es positivo sobre el crecimiento de las raíces, la biosíntesis implica formación de indol - 3 - ácido pirúvico y indol -3- aldehído acético (Gupta *et al.*, 2015).

La biosíntesis microbiana y el mecanismo fundamental de la acción de las auxinas en la planta han sido objeto de intensa investigación, diversas PGPRs poseen rutas diferentes para la síntesis de IAA, se conocen tres vías dependientes de L-triptófano que se secreta en exudados de raíz como un precursor para la producción de IAA (Goswami *et al.*, 2016). La biosíntesis del ácido indol acético es el mecanismo más común en bacterias como *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Citoquininas y giberelinas pueden producir las rizobacterias *Azotobacter* sp., *Rizobium* sp., *Rhodospirillum rubrum*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Paenibacillus polymyxa* (Gupta *et al.*, 2015).

Algunos de los microorganismos beneficiosos utilizados en la agricultura en todo el mundo incluyen *Rizobium*, Micorrizas, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, especies de *Streptomyces* y muchos más (Vadakattu, 2012); microorganismos de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* y *Penicillium* tienen la capacidad de solubilizar el fósforo orgánico en el suelo produciendo ácido fosfatasa, ácido fórmico, acético, propiónico, láctico, glicólico, fumárico y succínico beneficiando la absorción de nutrientes por las plantas (Tan *et al.*, 2009), por lo tanto favorecen el desarrollo de las plantas.

En relación al crecimiento de raíces se determinó diferencias significativas entre tratamientos, las plantas de todos los tratamientos que recibieron inoculación de microorganismos benéficos presentaron mayor desarrollo radicular que las plantas del tratamiento testigo, la mayor longitud de raíces se verificó en el tratamiento T1. Existe correlación entre altura y diámetro de plantas, así como entre altura de plantas y longitud de raíces. Las rizobacterias producen fitohormonas tales como auxinas, citoquininas, giberelinas, el etileno, que puede afectar la proliferación celular en la arquitectura de la raíz por sobreproducción de raíces laterales y pelos radiculares, con un aumento de la absorción

de nutrientes y agua (Gupta *et al.*, 2015), al respecto Sas *et al.* (2011) indica que en la evaluación del efecto de los bio fertilizantes en el crecimiento de la raíz de la fresa y parámetros morfológicos se constata un efecto positivo en comparación con las plantas fertilizadas únicamente con NPK. La fertilización con biopreparaciones intensificó el crecimiento del sistema radicular de las plantas de fresa (Derkowska *et al.*, 2015).

La inoculación de microorganismos benéficos provenientes de especies vegetales de Azuay - Ecuador beneficia el crecimiento de las plantas de fresa. En los diferentes consorcios microbianos de los tres pisos altitudinales se han identificado *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera* spp, *Rhodotorula minuta*, *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus damnosus*, *Streptomyces sanglieri*, *Streptomyces lushanensis*, *Streptomyces griseorubens*, *Streptomyces thermocarboxydus* y *Streptomyces bungoensis* entre otros, cada uno de los cuales presenta una acción diferente sobre el desarrollo vegetativo, en ciertos casos se encuentran dentro de un mismo consorcios mientras que en otros no, por lo que los efectos son diversos.

Los resultados obtenidos son prometedores para mejorar el rendimiento de cultivos, por lo tanto, contribuir a la producción de alimentos y generar ingresos económicos. Es una práctica sencilla al alcance de todos, viable y amigable con el ambiente. Resulta interesante evaluar la incidencia de inoculación de microorganismos benéficos en otros cultivos de interés comercial.

V. CONCLUSIONES

En la presente investigación, a nivel de laboratorio se caracterizaron e identificaron los microorganismos benéficos presentes en cultivos microbianos provenientes de especies vegetales de tres pisos altitudinales de Azuay – Ecuador y mediante pruebas de campo se evaluó la influencia de los consorcios microbianos en el cultivo de fresa; de los resultados obtenidos se establecen las siguientes conclusiones:

1. Las especies vegetales de los tres pisos altitudinales presentan diferente potencial para unidades formadoras de colonias de levaduras, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp. y actinomicetos. Ninguna muestra evidencia UFC de *Pseudomonas* spp.

- La planta de altamisa (*Artemisia vulgaris*) del piso altitudinal tres presenta el más alto potencial para unidades formadoras de colonias de levaduras con una media de $5,43 \times 10^6$ UFC.ml⁻¹.
- La planta de ruda (*Ruta graveolens* L.) ubicada en el piso altitudinal dos, posee el mejor potencial para unidades formadoras de colonias de *Bacillus* spp. con una media de $1,46 \times 10^7$ UFC.ml⁻¹.
- En el piso altitudinal uno se constata el mayor potencial para unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* en las plantas de café (*Coffea arabica* L.) con una media de $2,31 \times 10^{13}$ UFC.ml⁻¹ así como también en la planta de plátano (*Musa paradisiaca* L.) con una media de $1,68 \times 10^{13}$ UFC.ml⁻¹.
- Romero (*Rosmarinus officinalis*) especie vegetal recolectada en el piso altitudinal dos, es la planta que tiene el más alto potencial para unidades formadoras de colonias de actinomicetos con una media de $1,60 \times 10^5$ UFC.ml⁻¹.

2. En los consorcios de microorganismos benéficos provenientes de muestras vegetales de tres pisos altitudinales de Azuay - Ecuador se encuentran levaduras, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., y actinomicetos, no se confirma la presencia de *Pseudomonas* spp. Cada especie vegetal de acuerdo a sus propiedades fitoquímicas presenta una afinidad única para el desarrollo microbiano, en ciertos casos el mismo microorganismo está presente en varias especies vegetales, mientras que en otros casos son exclusivos de una determinada planta.

- La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se presenta únicamente a 2250 ms.n.m. en la planta de cedrón (*Aloysia triphylla*) mientras que en la planta de menta (*Mentha piperita*) se destaca *Kloeckera* spp. A 2550 ms.n.m. en la planta de geranio (*Pelargonium graveolens*) *Rhodotorula minuta* es la levadura predominante.
- En los tres pisos altitudinales se constata la presencia de *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*; a 1950 ms.n.m. se encuentra en la planta de girasol (*Tithonia diversifolia*), a 2250 ms.n.m. está presente en la planta de ruda (*Ruta graveolens* L.) y a 2550 ms.n.m. se ubica en la planta de canayuyo (*Sonchus oleraceus*). En dos pisos altitudinales se confirma la presencia de *Bacillus licheniformis*; a 2250 ms.n.m. en la planta de romero (*Rosmarinus officinalis*) y a 2550 ms.n.m. en las plantas de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.), geranio (*Pelargonium graveolens*) y altamisa (*Artemisia vulgaris*).
- En los tres pisos altitudinales se destaca la presencia de *Lactobacillus delbrueckii* ssp; a 1950 ms.n.m. se encuentra en las plantas de café (*Coffea arabica* L.) y girasol (*Tithonia diversifolia*); a 2250 ms.n.m. se registra en las plantas de romero (*Rosmarinus officinalis*) y cedrón (*Aloysia triphylla*) y a 2550 ms.n.m. se encuentra en las plantas diente de león (*Taraxacum officinale* Weber.) y altamisa (*Artemisia vulgaris*). En dos pisos altitudinales está presente *Lactobacillus plantarum*; a 2250 ms.n.m. se encuentra en la planta de romero (*Rosmarinus officinalis*) y a 2550 ms.n.m. se ubica en la planta de manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.). Los microorganismos *Pediococcus damnosus* únicamente se evidencian a 2550 ms.n.m. en la planta de altamisa (*Artemisia vulgaris*).
- En el piso altitudinal uno se encuentra *Streptomyces sanglieri* en la planta de café (*Coffea arabica* L.) y *Streptomyces lushanensis* en la planta de plátano (*Musa paradisiaca* L.). En el piso altitudinal tres se constata la presencia de *Streptomyces griseorubens* en la

planta altamisas (*Artemisia vulgaris*), así como *Streptomyces thermocarboxydus* y *Streptomyces bungoensis* en la planta canayuyo (*Sonchus oleraceus*).

3. Las propiedades químicas y biológicas del suelo de la rizósfera de las plantas de fresa se modifican de forma indistinta con la inoculación de consorcios microbianos benéficos provenientes de especies vegetales de tres pisos altitudinales de Azuay – Ecuador y cada consorcio microbiano incide de una manera particular.

- La carga microbiana inoculada al suelo incide en el grado de mineralización de la materia orgánica ocasionando reacciones que dan lugar a la formación de ácidos que provocan el aumento de la acidez, ya que en solamente en el 14,29 por ciento de los suelos que recibieron inoculación de consorcios microbianos benéficos, presentan un valor de pH inferior al suelo del tratamiento testigo.
- La actividad de los consorcios microbianos afecta la conductividad eléctrica de los suelos, debido a que en el 85,71 por ciento de los tratamientos que recibieron inoculación de microorganismos benéficos se incrementa la conductividad eléctrica en forma heterogénea, mientras que en el 14,29 por ciento se presenta un leve descenso en el valor. El suelo que no recibió inoculación de microorganismos benéficos presenta un aumento en la CE sin embargo, es menor a los otros tratamientos.
- La carga microbiana inoculada al suelo contribuye a la alteración y mineralización de la materia orgánica y por lo tanto a su descenso, en virtud que en todos los suelos tratados con microorganismos benéficos disminuye el porcentaje de materia orgánica con respecto al tratamiento testigo, inclusive en un 28,57 por ciento se reduce con respecto al contenido inicial de MO.
- En los consorcios microbianos están presentes microorganismos que solubilizan el fósforo a formas aprovechables para las plantas lo cual provoca su disminución en el suelo, debido a que en el 85,71 por ciento de los tratamientos el contenido de fósforo en los suelos es inferior al del tratamiento testigo.
- La variación poblacional de *Lactobacillus* spp, *Pseudomonas* spp, actinomicetos, mohos y *Bacillus* spp. en los suelos inoculados con microorganismos benéficos, sería debido a la capacidad exclusiva para multiplicarse y sobrevivir que cada uno de estos poseen.

4. Los microorganismos benéficos presentes en los consorcios microbianos obtenidos de especies vegetales provenientes de tres pisos altitudinales de Azuay – Ecuador e inoculados en el suelo, inciden de forma diversa favoreciendo el desarrollo de las plantas de fresa (*Fragaria sp.*).

- Los microorganismos del consorcio microbiano procedente de la planta de café (*Coffea arabica* L.), inoculado en el suelo, al 2,5% de concentración beneficia el crecimiento longitudinal y diametral de las plantas de fresa, así como también el crecimiento de sus raíces, ya que acorde a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) existe diferencias significativas entre todos los tratamientos en los cuales T1 se destaca como el mejor.
- Los microorganismos del consorcio microbiano obtenido de la planta de menta (*Mentha piperita*) inoculado en el suelo, al 2,5% de concentración incrementa el número de hojas en las plantas de fresa, puesto que de acuerdo a la prueba LSD de Fisher (Alfa=0,05) se presentan diferencias significativas entre todos los tratamientos, en los cuales T3 se presenta como el mejor.
- No fue posible evaluar la incidencia de los microorganismos benéficos en la producción y calidad de la fruta de fresa (*Fragaria sp.*), ya que probablemente debido a las condiciones climáticas imperantes en la zona de estudio, las plantas no presentaron floración hasta siete meses después de establecido el cultivo.

VI. RECOMENDACIONES

Al concluir la investigación de la caracterización de los microorganismos benéficos provenientes de tres pisos altitudinales de la provincia de Azuay - Ecuador mediante pruebas realizadas a nivel de laboratorio y su influencia en el cultivo de fresa, de las conclusiones obtenidas se establecen las siguientes recomendaciones:

1. Inocular en el suelo consorcios microbianos provenientes de plantas de café para mejorar el desarrollo de especies vegetales cultivadas y las propiedades del suelo.
2. Evaluar la incidencia de los microorganismos benéficos de los tres pisos altitudinales en la producción y calidad de la fruta de fresa, así como en otros cultivos de interés comercial.
3. Realizar estudios comparativos entre los microorganismos aislados de la filósfera de especies vegetales y los microorganismos aislados de la rizósfera.
4. Examinar los microorganismos presentes en cocteles elaborados con mezclas de varias especies vegetales.
5. Evaluar la influencia de los microorganismos benéficos de los tres pisos altitudinales en la solubilidad de fósforo en el suelo.
6. Estudiar el efecto de los consorcios microbianos benéficos ante poblaciones de nematodos fitoparásitos, particularmente *Meloidogyne* spp.
7. Investigar el efecto de *Aspergillus niger* ante poblaciones de nematodos especialmente frente a *Meloidogyne* spp.
8. Probar el efecto antagónico de los microorganismos benéficos ante *Macrophomina* sp. y *Fusarium solani*, identificados como principales agentes causales de enfermedades de las plantas de fresa (*Fragaria* sp.) en la investigación realizada.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, MJ; BEDOYA, LM; APAZA, L; BERMEJO, P. 2012. The *Artemisia* L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils. *Molecules* 17: 2542-2566.

ABALLAY, E; ORDENES, P; MÅRTENSSON, A; PERSSON, P. 2013. Effects of rhizobacteria on parasitism by *Meloidogyne ethiopica* on grapevines. *Eur J Plant Pathol* (2013) 135: 137-145.

ACOSTA, L. 2015. Estudio de desarrollo de *Fusarium* sp. en el cultivo de granadilla. *Revista de dinámica de sistemas* 2015: 18.

ACUÑA, A; AGUILERA, R DEL C; AGUAYO, M; AZÓCAR, G; BARRA, R; FUENTES, D; GONZÁLEZ, P; MENDOZA, R; PAREDES, K; PARRA, O; PRIEGO, C; ROJAS, J; ROMERO, H; SOBARZO, M; VALDOVINOS, C; VALENZUELA, M; VILLALOBOS, A; ZAROR, C; URRUTIA, R. 2003. *Conceptos Básicos Sobre Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable*. Buenos Aires, Overprint Grupo Impresor SRL, 362 p.

ACUÑA, O; PEÑA, W; SERRANO, E; POCASANGRE, L; ROSALES, F; DELGADO, E; TREJOS, J; SEGURA, A. 2006. La Importancia de los Microorganismos en la Calidad y Salud de Suelos. 2006: 222-233.

ADAM, M; HEUER, H; HALLMANN, J. 2014. Bacterial Antagonists of Fungal Pathogens Also Control Root-Knot Nematodes by Induced Systemic Resistance of Tomato Plants. *Plos One* 9(2): 1-8.

AGBOOLA, OO; OYEDEJI, S; OLOWOYO, JO; AJAO, A; AREGBESOLA, O. 2016. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oil Extracted From *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) flower. *Journal of Bioresources and Bioproducts* 1(4): 169-176.

AGRIOS, G. 2009. *Fitopatología*. Quinta Edi México, Editorial Limusa, 838.

- AKHTAR, M; MALIK, A. 2000. Roles of Organic Soil Amendments And Soil Organisms In The Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: A Review. *Bioresource Technology* 74(1): 35-47.
- ALDABA, D. 2013. Transporte Por Difusión De Radionucleidos en Suelos y Arcillas. s.l., Universitat de Barcelona. 220 p.
- ALFONSO, ET; LEYVA, Á; HERNÁNDEZ, A. 2005. Microorganismos Benéficos Como Biofertilizantes Eficientes Para el Cultivo del Tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología* 7(2): 47-54.
- ALVAREZ, P; MORALES, I. 2007. Guía de Cultivo de la Frutilla. Primera Ed Riobamba - Ecuador, Editorial El Agro.
- ÁLVAREZ, C; RIMSKI, H. 2016. Manejo de la fertilidad del suelo en planteos orgánicos. Editorial Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires, 166.
- AMOROCHO, CM. 2011. Caracterización y Potencial Probiótico de Bacterias Lácticas Aisladas de Leche de Oveja Guirra. s.l., Universitat Politècnica de València. 253 p.
- ANANDHAKUMAR, J; ZELLER, W. 2007. Biological Control of Red Stele (*Phytophthora* var. *fragariae*) and crown rot (*P. cactorum*) Disease of Strawberry With Rhizobacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection* 115(2): 49-56.
- ANGULO, R. 2009. Fresa (*Fragaria ananassa*). Bayer Crop Colombia, s.e., 37.
- AQUIAHUATL, M DE LOS A; VOLKE, T; PRADO, L; SHIRAI, K; RAMÍREZ, F; SALAZAR, M. (2012) "Manual de Prácticas de Laboratorio Microbiología General". En División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Págs. 75. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- ARBELÁEZ, G. 2000. Algunos Aspectos de los Hongos del Género *Fusarium* y de la Especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana* 17: 90.
- ARIAS, A. 2010. Microorganismos Eficientes y su Beneficio Para la Agricultura y el Medio Ambiente. *Journal de Ciencia e Ingeniería* 2(2): 42-45.
- ARIAS, P. 2012. Análisis Genómico de la Integridad Celular en *Saccharomyces cerevisiae*. s.l., Universidad Complutense de Madrid. 190 p.

- ARMENDÁRIZ, I; QUIÑA, D; RÍOS, M; LANDÁZURI, P. 2015. Nematodos Fitopatógenos y sus Estrategias de Control. Quito - Ecuador, Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, 90.
- ARÉVALO Z, MORENO V. 2014. Identificación de la Actividad Solubilizadora de Fosfatos en *Bacillus* Pertenecientes al Banco de Cepas del Grupo Ceparium. Tesis Doctoral. Colombia.
- AREX. 2015. Perfil Comercial Fresa. Perú 40 p.
- ASUQUO, EG; UDOBI, CE. 2016. Antibacterial and Toxicity Studies of The ethanol Extract of *Musa paradisiaca* leaf. Asuquo & Udobi, Cogent Biology 2: 1-10.
- AVALOS, M; ORTIZ, MA; CÁRDENAS, C; RUIZ, B; SÁNCHEZ, S. 2015. Caracterización de una Cepa de *Streptomyces* Aislada de Suelo. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería 2015: 1-2.
- AVIS, TJ; GRAVEL, V; ANTOUN, H; TWEDDELL, RJ. 2008. Multifaceted Beneficial Effects of Rhizosphere Microorganisms on Plant Health and Productivity. Soil Biology & Biochemistry 40: 1733-1740.
- BABALOLA, OO. 2010. Beneficial Bacteria of Agricultural Importance. Biotechnology Letters 32: 1559-1570.
- BELTRÁN, M. 2014. La Solubilización de Fosfatos Como Estrategia Microbiana Para Promover el Crecimiento Vegetal. Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu. 15: 101-113.
- BENAVIDES, J; QUINTERO, G; GUEVARA, A; JAIMES, D; GUTIÉRREZ, S; MIRANDA, J. 2006. Bioremediación de Suelos Contaminados con Hidrocarburos Derivados del Petróleo. NOVA-Publicación Científica 4(5): 82-90.
- BERG, G; RYBAKOVA, D; GRUBE, M; KÖBERL, M. 2016. The plant microbiome explored: implications for experimental botany. Journal of Experimental Botany 67(4): 995-1002.
- BERGEY, DH; KRIEG, NR; HOLT, JG. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Eds. DJ Brenner; NR Krieg; JT Staley. Segunda Michigan State University - USA, Springer, 1388.
- BERNARD, EC. 1992. Soil Nematode Biodiversity. Biology and Fertility of Soils 14(2): 99-103.

- BERTHRONG, ST; BUCKLEY, DH; DRINKWATER, LE. 2013. Agricultural Management and Labile Carbon Additions Affect Soil Microbial Community Structure and Interact with Carbon and Nitrogen Cycling. *Microbial Ecology* 66(1): 158-170.
- BERNAL, G; ILLANES, A; CIAMPI, L. 2002. Isolation and Partial Purification of a Metabolite From a Mutant Strain of *Bacillus* sp. With Antibiotic Activity Against Plant Pathogenic Agents. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* 5(1): 1-9.
- BHATTACHARJEE, R; DEY, U. 2014. Biofertilizer, a Way Towards Organic Agriculture: A review. *African Journal of Microbiology Research* 8(24): 2332-2342.
- BHATTACHARYYA, PN; GOSWAMI, MP; BHATTACHARYYA, LH. 2016. Perspective of Beneficial Microbes in Agriculture Under Changing Climatic Scenario: A review. *Journal of Phytology* 8: 26-41.
- BID. 2009. Manual Práctico de Uso de EM. 2009: 33.
- BIOMERIEUX. 2002. Ficha Técnica de Referencia Para Utilizar el Método API 50 CHL. Madrid – España. 2p.
- BIOMÉRIEUX. 2007. api 20 C AUX. 2007: 34.
- BIOMÉRIEUX. 2015. Medios de Cultivo. Madrid – España. 42 p.
- BISWAS, DR; BASAK, BB. 2013. Potassium Solubilizing Microorganisms: Their Mechanisms, Potentialities and Challenges as Potassium Bio fertilizers. *Indian Journal of Fertilizers* 9(12): 102-116.
- BOBADILLA, C; RINCÓN, S. 2008. Aislamiento y Producción de Bacterias Fosfato Solubilizadoras a Partir de Compost Obtenido de Residuos de Plaza. s.l., Pontificia Universidad Javeriana. 87 p.
- BONGERS, T; FERRIS, H. 1999. Nematode Community Structure as a Bioindicator in Environmental Monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* 14(6): 224-228.
- CAMPO, A DEL P; ACOSTA, RLI; MORALES, S; PRADO, FA. 2014. Evaluación de Microorganismos de Montaña (MM) en la Producción de Acelga en la Meseta de Popayán. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 12(1): 79-87.
- CANO, MA. 2011. Interacción de Microorganismos Benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. *Rev. U.D.C.A Act. e Div. Cient.* 14(2): 15-31.

- CÁRDENES, CD. 2000. Levaduras del Género *Candida* de Procedencia Clínica. Evaluación de Métodos de Identificación. s.l., Universidad de la Laguna. 399 p.
- CARR, FJ; CHILL, D; MAIDA, N. 2002. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology* 28(4): 281-370.
- CASTELLANOS, J; RACHE, LY. 2013. Microorganismos, Enzimas, Plásmidos Y Genes Involucrados en la Degradación de Plaguicidas N-Metilcarbamatos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 29: 105-119.
- CASTRO, HF; CLASSEN, T; AUSTIN, EE; NORBY, RJ; SCHADT, CW. 2010. Soil Microbial Community Responses to Multiple Experimental Climate Change Drivers □ †. *Applied and Environmental Microbiology* 76(4): 999-1007.
- CASTRO, L; MURILLO, M; URIBE, L; MATA, R. 2015. Inoculación al Suelo con *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum oryzae*, *Bacillus subtilis* y Microorganismos de Montaña (MM) y su Efecto Sobre un Sistema de Rotación Soya-Tomate bajo Condiciones de Invernadero. *Agronomía Costarricense* 39(3): 21-36.
- CEUPPENS, S; BOON, N; UYTTENDAELE, M. 2013. Diversity of *Bacillus cereus* Group Strains is Reflected in Their Broad Range of Pathogenicity and Diverse Ecological Lifestyles. *FEMS Microbiology Ecology* 84(3): 433-450.
- CHAGAS-PAULA, DA; OLIVEIRA, RB; ROCHA, BA; COSTA, FB DA. 2012. Ethnobotany, Chemistry, and Biological Activities of the Genus *Tithonia* (Asteraceae). *Chemistry & Biodiversity* 9: 210-235.
- CHAMORRO, M; MIRANDA, L; DOMÍNGUEZ, P; MEDINA, JJ; SORIA, C; ROMERO, F; J.M., AL; DE LOS SANTOS, B. 2015. Evaluation of Biosolarization for the Control of Charcoal Rot Disease (*Macrophomina phaseolina*) in Strawberry. *Crop Protection* 67: 279-286.
- CHANTAL, K; SHAO, X; JING, B; YUAN, Y; HOU, M; LIAO, L. 2013. Effects of Effective Microorganisms (EM) and Bio-Organic Fertilizers on Growth Parameters and Yield Quality of Flue-Cured Tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Journal of Food, Agriculture and Environment* 11(2): 1212-1215.
- CHANTAL, K; XIAOHOU, S; WEIMU, W; IRO ONG'OR, BT. 2010. Effects of Effective Microorganisms on Yield and Quality of Vegetable Cabbage Comparatively to Nitrogen and Phosphorus Fertilizers. *Pakistan Journal of Nutrition* 9(11): 1039-1042.

- CHENG, J; JIN, Y-Y; YANG, SH; SUH, J-W. 2013. Isolation and Characterization of Anti-Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*/ Vancomycin- Resistant *Enterococcus* Compound from *Streptomyces bungoensis* MJM 2077. Korean Society for Applied Biological Chemistry 56: 107-11.
- COLLADO, MC. 2004. Caracterización de Cepas del Género *Bifidobacterium* con Carácter Probiótico. s.l., Universidad Politécnica de Valencia. 283 p.
- COMPANT, S; SAIKKONEN, K; MITTER, B; CAMPISANO, A; MERCADO-BLANCO, J. 2016. Editorial special issue: soil, plants and endophytes. Plant and Soil 405: 1-11.
- CORNEJO, A; SERRATO, A; RENDÓN, B; ROCHA, M. 2014. Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos. Primera Ed México D.F., Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 257.
- CORRALES, L; ARÉVALO, Z; MORENO, V. 2014. Solubilización de Fosfatos: una Función Microbiana Importante en el Desarrollo Vegetal. NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas 12(21): 67-79.
- CORRALES, LC; SÁNCHEZ, LC; CUERVO, J; BAUTISTA, D; GONZÁLEZ, LADY; GUEVARA, M. 2011. Evaluación del Efecto Biocontrolador de *Bacillus* spp., Frente a *Fusarium* spp., Bajo Condiciones de Invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. NOVA. Publicación Científica de Ciencias Biomédicas 8(13): 63-75.
- CORRALES, LC; SÁNCHEZ, LC; CUERVO, J; JOYA, A; MARQUEZ, K. 2012. Efecto Biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* sp., Bajo Condiciones de invernadero en Plantas de Tomillo (*Thymus vulgaris* L.). NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas 10(17): 64-82.
- CORTES, VG. 2004. Introducción a la Microbiología. 2a ed. Costa Rica, Editorial Universidad Estatal a Distancia EUED, 256.
- COSTA, B DE O; NAHAS, E. 2012. Growth and Enzymatic Responses of Phytopathogenic Fungi to Glucose in Culture Media and Soil. Brazilian Journal of Microbiology 2012: 332-340.
- COYNE, M. 2000. Microbiología del Suelo: un Enfoque Exploratorio. España, Editorial Paraninfo, 416.

- CRUZ, M; SÁNCHEZ, C; ACOSTA, M; LEIVA, M; HERNÁNDEZ, Y; BERKIS, R; ALVARADO, Y. 2014. Antagonismo in Vitro de Cepas Bacterianas Frente a *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid). *Protección Vegetal* 29(1): 66-69.
- CRUZAT, R; BARRIOS, E; MANCILLA, B. 2010. Bacterias Nativas para Control de Nemátodos Fitoparásitos. Ed. GG Enei. Chile, Ministerio de Agricultura - Gobierno de Chile, 36.
- CUYA, E. 2012. Manejo del Riego y Control de Nematodos en el Cultivo de Granadilla. Lima Perú, s.e., 22.
- CHÁVEZ-DÍAZ, IF; ANGOA-PÉREZ, V; LÓPEZ-DÍAZ, S; VALLE, MG; HERNÁNDEZ-LAUZARDO, AN. 2014. Antagonistic bacteria with potential for biocontrol on *Rhizopus stolonifer* obtained from blackberry fruits. *Fruits* 69(1): 41-46.
- DAESCHEL, MA; ANDERSON, RE; FLEMING, HP. 1987. Microbial Ecology of Fermenting Plant Materials. *FEMS Microbiology Reviews* 46(3): 357-367.
- DAI, Y; SENGE, M; YOSHIYAMA, K; ZHANG, P; ZHANG, F. 2016. Influencing Factors, Effects and Development Prospect of Soil Solarization. *Reviews in Agricultural Science* 4: 21-35.
- DAMODARAN, D; SURESH, G; B, RM. 2011. Bioremediation of Soil by Removing Heavy Metals Using *Saccharomyces cerevisiae*. 6: 1-6.
- DAS, K; MUKHERJEE, AK. 2007. Crude Petroleum-Oil Biodegradation Efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from a Petroleum-Oil Contaminated Soil From North-East India. *Bioresource Technology* 98: 1339-1345.
- DASGAN, HY; AYDONER, G; AKYOL, M. 2012. Use of Some Microorganisms as Bio-Fertilizers in Soilless Grown Squash for Saving Chemical Nutrients. *Acta Ort.* 2012: 155-162.
- DE GRAAFF, MA; CLASSEN, AT; CASTRO, HF; SCHADT, CW. 2010. Labile Soil Carbon Inputs Mediate the Soil Microbial Community Composition and Plant Residue Decomposition Rates. *New Phytologist* 188: 1055-1064.
- DEHGHANI, I; PANAHI, K; MOHAMADINIA, G. 2013. Effect of Effective Microorganisms Activate (EMa) on Growth, Yield and Yield Components of Corn in Firozabad Region. *Annals of Biological Research* 4(4): 126-129.

- DELLAGLIO, F; FELIS, GE; CASTIONI, A; TORRIANI, S; GERMOND, J. 2005. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus* subsp. nov., Isolated from Indian Dairy Products. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 401-404.
- DERKOWSKA, E; PASZT, LS; HARBUZOV, A; SUMOROK, B. 2015. Root Growth, Mycorrhizal Frequency and Soil Microorganisms in Strawberry as Affected by Biopreparations. *Advances in Microbiology* 5: 65-73.
- DESJARDIN, V; BAYARD, R; HUCK, N; MANCEAU, A; GOURDON, R. 2002. Effect of Microbial Activity on the Mobility of Chromium in soils. *Waste Management* 22: 195-200.
- DEVI, M; REBECCA, LJ; SUMATHY, S. 2013. Bactericidal Activity of the Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus delbreukii*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 5(2): 176-180.
- DHAMALE, KS; SONAWANE, PD; JAYBHAYE, AS; AKKIRAJU, PC. 2015. Lactic Acid Bacteria: Antimicrobial Activity and in Vitro, in Vivo Studies of LAB Activity on *Fusarium oxysporum* Infected Tomato Seeds. *International Journal of Advanced Research* 3(5): 954-963.
- DIAS, ACF; COSTA, FEC; ANDREOTE, FD; LACAVA, PT; TEIXEIRA, MA; ASSUMPCAO, LC; ARAUJO, W; AZEVEDO, J; MELO, IS. 2009. Isolation of Micropropagated Strawberry Endophytic Bacteria and Assessment of Their Potential for Plant Growth Promotion. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 189-195.
- DIHINGIA, S; DAS, D; BORA, S. 2017. Effect of Microbial Secretion on Inhibitory Effect of Phytonematode: A Review. *International Journal of Information and Review* 4(7): 4275-4280.
- DIOMANDÉ, SE; NGUYEN-THE, C; GUINEBRETIERE, M-H; BROUSSOLLE, V; BRILLARD, J. 2015. Role of Fatty Acids in Bacillus Environmental Adaptation. *Frontiers in Microbiology* 6: 1-20.
- DIXIT, R; MALAVIYA, D; PANDIYAN, K; SINGH, UB; SAHU, A; SHUKLA, R; SINGH, BP; RAI, JP; SHARMA, PK; LADE, H; PAUL, D. 2015. Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. *Sustainability* 7: 2189-2212.

- DONMEZ, MF; ESITKEN, A; YILDIZ, H; ERCISLI, S. 2011. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on Strawberry Fruit by Plant Growth Promoting Bacteria. *Journal of Animal and Plant Sciences* 21(4): 758-763.
- DE LOS SANTOS, BERTA & CHAMORRO, MANUEL & MEDINA-M'INGUEZ, JUAN & CAPOTE, NIEVES & AGUADO, ANA & ROMERO, FERNANDO. (2016). Emerging Diseases in Strawberry Crop: Charcoal Rot and Fusarium Wilt. A Review. 212-311.
- DZIALO, MC; PARK, R; STEENSELS, J; LIEVENS, B; VERSTREPEN, KJ. 2017. Physiology, Ecology and Industrial Applications of Aroma Formation in Yeast. *FEM Journals Investing in Science* 41(1): 95-128.
- EL-TARABILY, KA; SIVASITHAMPARAM, K. 2006. Potential of Yeasts as Biocontrol Agents of Soil-Borne Fungal Plant Pathogens and as Plant Growth Promoters. *Mycoscience* 47: 25-35.
- ESITKEN, A; YILDIZ, HE; ERCISLI, S; DONMEZ, MF; TURAN, M; GUNES, A. 2010. Effects of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) on Yield, Growth and Nutrient Contents of Organically Grown Strawberry. *Scientia Horticulturae* 124: 62-66.
- ESQUIVEL, M. 2005. Guía Técnica del Cultivo de Fresa. ICAMEX. Estado de México p. 12.
- FANG, X; BARBETTI, MJ. 2014. Differential Protein Accumulations in Isolates of the Strawberry wilt Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* differing in virulence. *Journal of Proteomics* 108: 223-237.
- FATIMA, D; MEBROUK, K. 2013. Characterization and Determination of the Factors Affecting Anti-Listerial Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* Isolated from Dairy Milk Products. *African Journal of Food Science* 7(2): 35-44.
- FENG, H; SUN, Y; ZHI, Y; WEI, X; LUO, Y; MAO, L; ZHOU, P. 2014. Identification and Characterization of the Nitrate Assimilation Genes in the Isolate of *Streptomyces griseorubens* JSD-1. *Microbial Cell Factories* 13(174): 1-9.
- FERNÁNDEZ, MT; RODRÍGUEZ, H. 2005. El Papel de la Solubilización de Fósforo en los Biofertilizantes Microbianos. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar XXXIX* (3): 27-34.

- FINKEL, OM; CASTRILLO, G; PAREDES, SH; GONZÁLEZ, IS; DANGL, JL. 2017. Understanding and exploiting plant beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology* 38: 155-163.
- FLOR, ME. 2013. Uso de Agentes de Control y Protección Biológica Frente a Nemátodos del Género *Meloidogyne* en Cultivos Protegidos bajo Plástico. s.l., Universidad de Granada. 287 p.
- FLORES, D; MARCOS, M; SILVA, LR; MENÉNDEZ, E; MARTÍNEZ, E; MATEOS, PF; VELÁZQUEZ, E; GARCÍA, P; ANDRADE, P; RIVAS, R. 2016. *Rhizobium* as Plant Probiotic for Strawberry Production Under Microcosm Conditions. 67(1-3): 25-32.
- FLORES, Y; LÓPEZ, F; VILLANUEVA, J. 2012. Efecto de los Microorganismos Eficaces (EM) y *Trichoderma* sp Sobre la Incidencia de *Fusarium* y *Sclerotium rolfisii* en Una Siembra Experimental de pimentón. Fundación La Salle de Ciencias Naturales Campus Cojedes 2012: 1689-1699.
- FOLQUER, F. 1986. La Frutilla o Fresa: Estudio de la Planta y su Producción Comercial. Buenos Aires, Hemisferio Sur, 150.
- FU, Y; CHEN, W; HUANG, Q. 2008. Construction of Two Lux-Tagged Hg²⁺ -Specific Biosensors and Their Luminescence Performance. *Appl Microbiol Biotechnol* 79: 363-370.
- FUKUDA, H; NAKAMURA, K; SUKITA, E; OGAWA, T; FUJII, T. 1996. Cytochrome P450_{hm} from *Rhodotorula minuta* Catalyzes of 4-Hydroxylation of Benzoate. *The Journal of Biochemistry* 119(2): 314-318.
- GALLEGOS, G; CEPEDA, M; HERNÁNDEZ, F. 2009. Microorganismos Benéficos Asociados a *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en Guayabo (*Psidium guajava* L.) de Calvillo, Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27(2): 106-112.
- GÁLVEZ, M. 2001. Características Generales de Microorganismos. Centro de Estudios Sta. M^o del Castillo. Madrid.
- GARCÍA, A; BELLO, A. (2004). Diversidad de los Organismos del Suelo y Transformaciones de la Materia Orgánica. Memorias. In I Conferencia Internacional Eco-Biología del Suelo y el Compost. León, España (p. 211).

GARCÍA, E. 2013. Estrategias Para la Recuperación de Suelos Degradados en Ambientales Semiáridos: Adición de Dosis Elevadas de Residuos Orgánicos de Origen Urbano y su Implicación en la Fijación de Carbono. s.l., Universidad de Murcia. 345 p.

GARCÍA-FRAILE, P; MENÉNDEZ, E; RIVAS, R. 2015. Role of Bacterial Biofertilizers in Agriculture and Forestry. *Bioengineering* 2(3): 183-205.

GARCÍA, J. 2012. Técnicas Moleculares Aplicadas a la caracterización y Estudio de la Supervivencia de Bacterias Lácticas del Yogurt. Primera Ed Valencia, Unión de Editoriales Universitarias Españolas, 301.

GARCÍA, JAL; PROBANZA, A; RAMOS, B; PALOMINO, M; MAÑERO, FJG. 2004. Effect of Inoculation of *Bacillus licheniformis* on Tomato and Pepper. *Agronomie, EDP Sciences* 24(4): 169-176.

GHANI, M; ANSARI, A; AMAN, A; ZOHRA, RR; SIDDIQUI, NN; QADER, SAQU. 2013. Isolation and Characterization of Different Strains of *Bacillus licheniformis* for the Production of Commercially Significant Enzymes. The Karachi Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, University of Karachi, Karachi, Pakistan 26(4): 691-697.

GLINICKI, R; SAS-PASZT, L; JADCZUK-TOBJASZ, E. 2011. The Effect of Microbial Inoculation with EM-Farming Inoculum on the Vegetative Growth of Three Strawberry Cultivars. *Horticulture and Landscape Architecture* 14(32): 3-14.

GLUŠAC, J; STIJEPIĆ, M; ĐURĐEVIĆ-MILOŠEVIĆ, D; MILANOVIĆ, S; KANURIĆ, K; VUKIĆ, V. 2015. Growth and Viability of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in Traditional Yogurt Enriched by Honey and Whey Protein Concentrate. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University* 16(3): 249-254.

GOMAA, NH; HASSAN, MO; FAHMY, GM; GONZÁLEZ, L; HAMMOUDA, O; ATTEYA, AM. 2015. Flavonoid Profiling and Nodulation of Some Legumes in Response to the Allelopathic Stress of *Sonchus oleraceus* L. to the Allelopathic Stress of *Sonchus oleraceus* L. *Acta Botanica Brasilica* 29(4): 553-560.

GOMAH, NH; ZOHRI, ANA. 2014. Technology Inhibition of Fungal Growth and *Fusarium* Toxins by Selected Cultures of Lactic Acid Bacteria. *Microbial & Biochemical Technology* 2014: 1-4.

- GÓRSKI, R; KLEIBER, T. 2010. Effect of Effective Microorganisms (EM) on Nutrient Contents in Substrate and Development and Yielding of Rose (*Rosa x hybrida*) and Gerbera (*Gerbera jamesonii*). *Ecological Chemistry and Engineering* 17(4): 505-513.
- GOSWAMI, D; THAKKER, JN; DHANDHUKIA, PC. 2016. Portraying Mechanics of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture* 2: 1-19.
- GOURMELON, V; MAGGIA, L; POWELL, JR; GIGANTE, S; HORTAL, S; GUEUNIER, C; LETELLIER, K; CARRICONDE, F. 2016. Environmental and Geographical Factors Structure Soil Microbial Diversity in New Caledonian Ultramafic Substrates: A Metagenomic Approach. *Plos One* 2016: 1-25.
- GREEN, G; DICKS, LMT; BRUGGEMAN, G; VANDAMME, EJ; CHIKINDAS, ML. 1997. Pediocin PD-1, a Bactericidal Antimicrobial Peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. *Journal of Applied Microbiology* 83: 127-132.
- GREEN, PWC; DAVIS, AP; COSSÉ, AA; VEGA, FE. 2015. Can Coffee Chemical Compounds and Insecticidal Plants be Harnessed for Control of Major Coffee Pests? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2015: 1-27.
- GUERRERO-MOLINA, MF; WINIK., BC; PEDRAZA, RO. 2011. More Than Rhizosphere Colonization of Strawberry Plants by *Azospirillum brasilense*. *Applied Soil Ecology* 2011: 8.
- GUILLÉN, C; HERNÁNDEZ, F; GALLEGOS, G; RODRÍGUEZ, R; AGUILAR, C; PADRÓN, E; REYES, M. 2006. *Bacillus* spp. como Biocontrol en un Suelo Infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su Efecto en el Desarrollo y Rendimiento del Cultivo de Chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 24(2): 105-114.
- GUO, S; LI, X; HE, P; HO, H; WU, Y; HE, Y. 2015. Whole-Genome Sequencing of *Bacillus subtilis* XF - 1 Reveals Mechanisms for Biological Control and Multiple Beneficial Properties in Plants. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 42: 925-937.
- GUPTA, G; PARIHAR, SS; AHIRWAR, NK; SNEHI, SK; SINGH, V. 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. *Microbial & Biochemical Technology* 7(2): 96-102.

- HADDOUCHI, F; MOHAMMED, T; ZAOUALI, Y; KSOURI, R; ATTOU, A; BENMANSOUR, A. 2013. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from Four Ruta Species Growing in Algeria. *Food Chemistry* 141(1): 253-258.
- HAGHPARVAR, R; SHOJAIAN, K; ROWGHANI, E; PARSAEI, S; YOUSEF ELLAHI, M. 2012. The Effects of *Lactobacillus plantarum* on Chemical Composition, Rumen Degradability, in Vitro Gas Production and Energy Content of Whole-Plant Corn Ensiled at Different Stages of Maturity. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University* 13(1): 8-15.
- HAMED, H.; MOUSTAFA, Y.; ABDEL-AZIZ, S. 2011. In Vivo Efficacy of Lactic Acid Bacteria in Biological Control Against *Fusarium oxysporum* for Protection of Tomato plant. *Life Science Journal* 8(4): 462-468.
- HAMEED, IH; IBRAHEAM, IA; KADHIM, HJ. 2015. Gas Chromatography Mass Spectrum and Fourier- Transform Infrared Spectroscopy Analysis of Methanolic Extract of *Rosmarinus officinalis* Leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* 7(6): 90-106.
- HAMZA, AA; ALI, HA; CLARK, BR; MURPHY, CD; ELOBAID, EA. 2013. Isolation and Characterisation of Actinomycin D producing *Streptomyces* spp. from Sudanese soil. *African Journal of Biotechnology* 12(19): 2624-2632.
- HARRIS, J. 2009. Soil Microbial Communities and Restoration Ecology: Facilitators or Followers? *Science* 325: 573-574.
- HASSAN, MO; GOMAA, NH; FAHMY, GM; GONZA, L; HAMMOUDA, O; ATTEYA, AM. 2014. Interactions Between *Sonchus oleraceus* L. and Some Weeds in Agroecosystems in Egypt. *Annals of Agricultural Science* 59(2): 221-228.
- HCINI, K; SOTOMAYOR, JA; JORDAN, MJ; BOUZID, S. 2013. Chemical Composition of the Essential Oil of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) of Tunisian Origin. *Asian Journal of Chemistry* 25(5): 2601-2603.
- HERNÁNDEZ, A; SIERRA, A; CARR, A. 2006. Evaluación in Vitro del Antagonismo de Especies de *Trichoderma* Sobre Hongos Fitopatógenos que Afectan las Vitroplantas de Piña (*Ananas comosus* L. Merr.). *Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal* 10(2): 105-108.
- HIGA, T; PARR, JF. 1994. Beneficial and Effective Microorganisms for a Sustainable Agriculture and Environment. *International Nature Farming Research Center* no.808: 1-16.

- HOORMAN, JJ. 2011. The Role of Soil Protozoa and Nematodes. Fact Sheet Agriculture and Natural Resources 2011: 1-5.
- HYMA, KE; SAERENS, SM; VERSTREPEN, KJ; FAY, JC. 2011. Divergence in Wine Characteristics Produced by Wild and Domesticated Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Levadura Research 11(7): 540-551.
- IBRAHIM, F; M., MH; EL-AZIM., A; MOHAMED., A; KOLLAB, WA. 2015. Chemical and Biological Evaluation of the Diethyl Ether Extract of Wild *Sonchus asper* and *Sonchus oleraceus* Growing in Libya. International Journal of Pharmacy 5(3): 693-701.
- IMAM, MZ; AKTER, S. 2011. *Musa paradisiaca* L. and *Musa sapientum* L.: A Phytochemical and Pharmacological Review. Journal of Applied Pharmaceutical Science 1(5): 14-20.
- ISLAM, F; YASMEEN, T; ARIF, MS; ALI, S; ALI, B; HAMEED, S; ZHOU, W. 2016. Plant Growth Promoting Bacteria Confer Salt Tolerance in *Vigna radiata* by Up-Regulating Antioxidant Defense and Biological Soil Fertility. Plant Growth Regulation 80(1): 23-36.
- ITURRI, L. 2015. Evidencias de Acidificación de Suelos Loésicos Agrícolas de Argentina. s.l., Universidad Nacional del Sur. 104 p.
- IZAH, SC; BASSEY, SE; OHIMAIN, EI. 2017. Removal of Heavy Metals in Cassava Mill Effluents With *Saccharomyces cerevisiae* Isolated From Palm Wine. MOJ Toxicology 3(4): 1-6.
- JHA, CK; SARAF, M. 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. Journal of Agricultural Research and Development Vol. 5(2): 108-119.
- JUBER, KS; AL-JUBOORY, HH; JUBOORY, SBA-. 2014. Fusarium wilt Disease Of strawberry caused by *Fusarium oxysporum* F. Sp. *Fragariae* In Iraq and Its control. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences 2(24): 419-427.
- JAN, AK; REHMAN, N; MEHMOOD, N; RAUF, A; FAROOQ, U; KHAN, A; KHAN, H. 2017. Chemical Composition and Biological Profile of Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L. Science, Technology and Development 36(1): 1-5.
- JIMOH, FO; ADEDAPO, AA; AFOLAYAN, AJ. 2011. Comparison of the Nutritive Value, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Sonchus asper* and *Sonchus oleraceus*. Rec. Nat. Prod. 5(1): 29-42.

JULCA, A; MENESES, L; BLAS, R; BELLO, S. 2006. La Materia Orgánica, Importancia y Experiencias de su Uso en la Agricultura. IDESIA 24(1): 49-61.

KACHHAWA, D. 2017. Microorganisms as a Biopesticides. Journal of Entomology and Zoology Studies 5(3): 468-473.

KADAIKUNNAN, S; REJINIEMON, TS; KHALED, JM; ALHARBI, NS; MOTHANA, R. 2015. In-vitro Antibacterial, Antifungal, Antioxidant and Functional Properties of *Bacillus amyloliquefaciens*. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 14(9): 1-11.

KANDLER, N. 1992. Regular Non-Sporing, Gram-Positive rods. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore.

KANZY, HM; NASR, NF; EL-SHAZLY, HAM; BARAKAT, OS. 2015. Optimization of Carotenoids Production by Yeast Strains of *Rhodotorula* Using Salted Cheese Whey. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 4(1): 456-469.

KARAM, MÁ; RAMÍREZ, G; BUSTAMANTE, P; GALVÁN, JM. 2004. Plaguicidas y Salud de la Población. Ciencia Ergo Sum 11(3): 246-254.

KAWURI, R; SUPRAPTA, DN; NITTA, Y. 2011. Antagonistic Activity of *Streptomyces thermocarboxydus* to *Fusarium oxysporum*: The Cause of Leaf Rot Disease on Aloe Vera (*Aloe barbadensis* Mill.) in Bali, Indonesia. Malaysian Journal of Microbiology xxx(xx): xxx-xxx.

KENNEDY, AC; SMITH, KL. 1995. Soil Microbial Diversity and the Sustainability of Agricultural Soils. The Significance and Regulation of Soil Biodiversity 63: 75-86.

KHAN, Z; KIM, YH. 2007. A Review on the Role of Predatory soil Nematodes in the Biological Control of Plant Parasitic Nematodes. Applied Soil Ecology 35(2): 370-379.

KNUDSEN, GR; DANDURAND, L-MC. 2014. Ecological Complexity and the Success of Fungal Biological Control Agents. Hindawi Publishing Corporation 2014: 1-11.

KOTLAR, C; PONCE, A; ROURA, S. 2015. Characterization of a Novel Protease from *Bacillus Cereus* and Evaluation of an Eco-Friendly Hydrolysis of a Brewery Byproduct. Journal of the Institute of Brewing 121: 558-565.

KUZYAKOV, Y; XU, X. 2013. Competition Between Roots and Microorganisms for Nitrogen: Mechanisms and Ecological Relevance. New Phytologist 198: 656-669.

- LAVANYA, K; ABI BEAULAH, G; VANI, G. 2016. *Musa paradisiaca* - A Review on Phytochemistry and Pharmacology. World Journal of Pharmaceutical and Medical Research 2(6): 163-173.
- LAITILA, H-L; ALAKOMI, L; RAASKA, T; MATTILA-SANDHOLM, T; HAIKARA, A. 2002. Antifungal Activities of Two *Lactobacillus plantarum* Strains Against *Fusarium moulds* in Vitro and in Malting of Barley. Journal of Applied Microbiology 93: 566-576.
- LARTEY, RT. 2006. Hongos del suelo. Plant Pathology Journal 5(2): 125-142.
- ŁEBKOWSKA, M; ZBOROWSKAA, E; KARWOWSKAA, E; MIASKIEWICZ, E; MUSZYNSKIA, A; TABERNACKA, A; NAUMCZYKB, J; JECZALIKC, M. 2011. Bioremediation of Soil Polluted with Fuels by Sequential Multiple Injection of Native Microorganisms: Field-Scale Processes in Poland. Ecological Engineering 37: 1895-1900.
- LIMANSKA, N; IVANYTSIA, T; BASIUL, O; KRYLOVA, K; BISCOLA, V; CHOBERT, J-M; IVANYTSIA, V; HAERTLE, T. 2013. Effect of *Lactobacillus plantarum* on Germination and Growth of Tomato Seedlings. Acta Physiologiae Plantarum 35(5): 1587-1595.
- LINDOW, SE; BRANDL, MT. 2003. Microbiology of the Phyllosphere. Microbiology of the Phyllosphere 69(4): 1875-1883.
- LIU, P; CHENG, Y; YANG, M; LIU, Y; CHEN, K; LONG, C; DENG, X. 2014. Mechanisms of Action for 2-Phenylethanol Isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium molds* of Citrus Fruits. BMC Microbiology 14(242): 1-14.
- LIU, T; WHALEN, JK; SHEN, Q; LI, H. 2016. Increase in Soil Nematode Abundance Due to Fertilization was Consistent Across Moisture Regimes in a Paddy Rice e Upland Wheat System. European Journal of Soil Biology 72: 21-26.
- LUXTON, M. 1982. General Ecological Influence of the Soil Fauna on Decomposition and Nutrient Circulation. Oikos: 39: 355-357.
- MADIGAN, MT; MARTINKO, JM; PARKER, J. 2004. Brock Biología de los Microorganismos. Décima Ed. Madrid, Pearson Educación, 1089.
- MALFANOVA, N V. 2013. Endophytic Bacteria With Plant Growth Promoting and Biocontrol Abilities Natalia V. Malfanova. s.l., Leiden University. 166 p.

- MARIE-MAGDELEINE, C; UDINO, L; PHILIBERT, L; BOCAGE, B; ARCHIMEDE, H. 2014. In vitro Effects of *Musa x paradisiaca* Extracts on Four Developmental Stages of *Haemonchus contortus*. Research in Veterinary Science 96: 127-132.
- MAROTO, JV. 2008. Elementos de Horticultura General. Mundi Prensa. Madrid España. 481 p.
- MARTÍNEZ, E; FUENTES, J; ACEVEDO, E. 2008. Carbono Orgánico y Propiedades del Suelo. J. Soil Sc. Plan Nutr 8(1): 68-96.
- MAUCH, A; DAL BELLO, F; COFFEY, A; ARENDT, EK. 2010. The Use of *Lactobacillus brevis* PS1 to in Vitro Inhibit the Outgrowth of *Fusarium culmorum* and Other Common *Fusarium* Species Found on Barley. International Journal of Food Microbiology 141(1-2): 116-121.
- MAYA, K; SINGH, RS; UPADHYAY, SN; DUBEY, SK. 2011. Kinetic Analysis Reveals Bacterial Efficacy for Biodegradation of Chlorpyrifos and its Hydrolyzing Metabolite TCP. Process Biochemistry 46: 2130-2136.
- MCDOWELL, A; THOMPSON, S; STARK, M; OU, Z-Q; GOULD, KS. 2011. Antioxidant Activity of Puha (*Sonchus oleraceus* L.) as Assessed by the Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay. Phytotherapy research 25: 1876-1882.
- MEGALI, L; GLAUSER, G; RASMANN, S. 2014. Fertilization With Beneficial Microorganisms Decreases Tomato Defenses Against Insect Pests. Agronomy for Sustainable Development 34(3): 649-656.
- MEJRI, J; ABDERRABBA, M; MEJRI, M. 2010. Chemical Composition of the Essential oil of *Ruta chalepensis* L: Influence of Drying, Hydro-Distillation Duration and Plant Parts. Industrial Crops & Products 32: 671-673.
- MEENA, VS; MAURYA, BR; VERMA, JP. 2014. Does a Rhizospheric Microorganism Enhance K⁺ Availability in Agricultural Soils? Microbiological Research 169(5-6): 337-347.
- MEENA, VS; BAHADUR, I; MAURYA, BR; KUMAR, A; MEENA, RK; MEENA, SK; VERMA, JP. 2016. Potassium-Solubilizing Microorganism in Evergreen Agriculture: An Overview. ResearchGate 2016.

- MEENA, VS; MEENA, RS; VERMA, JP; MAURYA, BR. 2016. Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture. Eds. VS Meena; RS Meena; JP Verma; BR Maurya. Primera s.l., Springer, 352.
- MELNYK, M V; GRYTSYK, AR; STALYUS, L V. 2015. Research of Component Composition of *Ruta graveolens* L. Herb Essential oil. The Pharma Innovation Journal 4(2): 36-38.
- MENDOZA, J; PEREA, Y; SALVADOR, J; MORALES, J; PÉREZ, G. 2011. Biodegradación Bacteriana de Plaguicidas Permetrina y Cipermetrina en Cultivo Lote. Avances en Ciencias e Ingeniería 2(3): 45-55.
- MERCHÁN, JB; FERRUCHO, RL; ÁLVAREZ, JG. 2014. Efecto de dos Cepas de *Trichoderma* en el Control de *Botrytis cinerea* y la Calidad del Fruto en Fresa (*Fragaria* sp.). Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 8(1): 44-56.
- MERKEL, A. 2017. Datos climatológicos mundiales. Consultado 9 nov. 2017. Disponible en <https://es.climate-data.org/location/765441/> (Climate-Data.Org).
- MEZA, V. 2009. Doctorado en Ingeniería y Ciencias Ambientales. Curso de Biotecnología Ambiental Avanzada. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima –Peru.42 p
- MILOSEVIC, TM; MILOSEVIC, NT; GLISIC, IP. 2009. Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) Yield as Affected by the Soil pH. Anais da Academia Brasileira de Ciências 81(2): 265-269.
- MIRMAJLESSI, SM; DESTEFANIS, M; GOTTSBERGER, RA; MÄND, M; LOIT, E. 2015. PCR-Based Specific Techniques Used for Detecting the Most Important Pathogens on strawberry: a systematic review. Systematic Reviews 4(1): 1-11.
- MOGHADDAM, M; POURBAIGE, M; TABAR, HK; FARHADI, N; HOSSEINI, SMA. 2013. Composition and Antifungal Activity of Peppermint (*Mentha piperita*) Essential Oil from Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants 16(4): 506-512.
- MOHAMMAD, P; MEHDI, N; MAJID, M. 2017. Chemical Compositions of the Essential Oils from Stems, Leaves and Fruits of *Artemisia tschernieviana* and Exploring Quantitative Structure-Retention Relationships (QSRRs) for Prediction of Corresponding Retention Indices. Journal of Essential Oil Bearing Plants ISSN: 2017.

- MOHAMED, ZK; EL-SAYED, SA; RADWAN, TEE; EL-WAHAB, GSA. 2009. Potency Evaluation of *Serratia marcescens* and *Pseudomonas Fluorescens* as Biocontrol Agents for Root-knot Nematodes in Egypt. *Journal of Applied Sciences Research* 4(1): 93-102.
- MULDER, C; SCHOUTEN, AJ; HUND-RINKE, K; BREURE, AM. 2005. The use of Nematodes in Ecological Soil Classification and Assessment Concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 278-289.
- MUCCILLI, S; RESTUCCIA, C. 2015. Bioprotective Role of Yeasts. *Microorganisms* 3: 588-611.
- NANDAL, M; HOODA, R. 2013. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Review Article. *International Journal of Current Research* 5(12): 3863-3871.
- NANNIPIERI, P; ASCHER, J; CECCHERINI, M; LANDI, L; PIETRAMELLARA, G; RENELLA, G. 2017. Microbial Diversity and Soil Functions. *European Journal of Soil Science* 68(1): 12-26.
- NAVARRO, SN Y G. 2003. *Química agrícola*. Segunda Ed Madrid, Ediciones Mundi-Prensa.
- NGUYEN, TM; KIM, J. 2015. Antifungal and Antibacterial Activities of *Streptomyces polymachus* sp. nov. Isolated From soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 2385-2390.
- NIHORIMBERE, V; ONGENA, M; SMARGIASSI, M; THONART, P. 2011. Beneficial effect of the Rhizosphere Microbial Community for Plant Growth and Health. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(2): 327-337.
- ORTÍZ-CASTRO, R; CONTRERAS-CORNEJO, HA; MACÍAS-RODRÍGUEZ, LM; LÓPEZ-BUCIO, J. 2009. The Role of Microbial Signals in Plant Growth and Development. *Plant Signaling & Behavior* 4(8): 701-712.
- ORTÍZ, R; CONTRERAS, HA; MACÍAS, L; LÓPEZ, J. 2009. The Role of Microbial Signals in Plant Growth and Development. *Plant Signaling & Behavior* 4(8): 701-712.
- PACHECO, V; GARCÍA, J; NÚÑEZ, MT; (2006). Aislamiento y Caracterización de Bacterias Fotótrofas de la Familia Rhodospirillaceae a Partir de Muestras de Agua Obtenidas del Golfo de México. *Universidad Autónoma Metropolitana*, 44.

- PACKIALAKSHMI, N; YASOTHA, C. 2014. Role of Effective Microorganism in Unfertile soil. *International Journal of Phytopharmacy* 4(1): 25-27.
- PALOMINO, EJ. 1995. *Introducción a la Microbiología Ambiental*. Lima - Perú, s.e., 49.
- PANDEY, AK; SINGH, P. 2017. The Genus *Artemisia*: A 2012 – 2017 Literature Review on Chemical Composition, Antimicrobial, Insecticidal and Antioxidant Activities of Essential Oils. *Medicines* 4(68): 15.
- PAPAGIANNI, M; ANASTASIADOU, S. 2009. Pediocins: The Bacteriocins of *Pediococci*. Sources, Production, Properties and Applications. *BioMed Central* 8(3): 1-16.
- PARRA, RA. 2010. Bacterias Ácido Lácticas: Papel Funcional en los Alimentos. *Rev. Bio. Agro. Facultad de Ciencias Agropecuarias* 8(1): 93-105.
- PATAY, EB; BENCSIK, T; PAPP, N. 2016. Phytochemical Overview and Medicinal Importance of Coffea Species From the Past Until Now. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 9(12): 1127-1135.
- PATIL, GB; LAKSHMAN, HC; MIRDHE, RM; AGADI, BS. 2013. Effect of co-inoculation of AM Fungi and Two Beneficial Microorganisms on Growth and Nutrient Uptake of *Eleusine coracana* Gaertn. (Finger millet). *Asian Journal of Plant Science and Research* 3(1): 26-30.
- PATIÑO-NAVARRETE, R; SANCHIS, V. 2017. Evolutionary Processes and Environmental Factors Underlying the Genetic Diversity and Lifestyles of *Bacillus cereus* Group Bacteria. *Research in Microbiology* 168(4): 309-318.
- PATIÑO-VERA, M; JIMÉNEZ, B; BALDERAS, K; ORTIZ, M; ALLENDE, R; CARRILLO, A; GALINDO, E. 2005. Pilot-Scale Production and Liquid Formulation of *Rhodotorula minuta*, a Potential Biocontrol Agent of Mango *anthracnose*. *Journal of Applied Microbiology* 99: 540-550.
- PAVELA, R; DALL'ACQUA, S; SUT, S; BALDAN, V; KAMTE, SLN; NYA, PCB; CAPPELLACCI, L; PETRELLI, R; NICOLETTI, M; CANALE, A; MAGGI, F. 2016. Oviposition Inhibitory Activity of the Mexican Sun fl Ower *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) Polar Extracts Against the Two-Spotted Spider mite *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 2016: 1-8.

- PEDRAZA, RO; TEIXEIRA, KRS; FERNÁNDEZ, A; GARCÍA DE SALOMÉ, I; BACA, BE; AZCÓN, R; BALDANI, VLD; BONILLA, R. 2010. Microorganismos que Mejoran el Crecimiento de las Plantas y la Calidad de los Suelos. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 11(2): 155-164.
- PENTON, CR; GUPTA, VVSR; TIEDJE, JM; NEATE, SM; OPHEL-KELLER, K; GILLINGS, M; HARVEY, P; PHAM, A; ROGET, DK. 2014. Fungal Community Structure in Disease Suppressive Soils Assessed by 28S LSU Gene Sequencing. *Plos One* 9(4): 1-12.
- PEREG, L; MCMILLAN, M. 2015. Scoping the Potential Uses of Beneficial Microorganisms for Increasing Productivity in Cotton Cropping Systems. *Soil Biology and Biochemistry* 80: 349-358.
- PÉREZ DE CASTRO, AM. 2011. Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). 2011: 10.
- PEŠAKOVIĆ, M; KARAKLAJIĆ-STAJIĆ, Ž; MILENKOVIĆ, S; MITROVIĆ, O. 2013. Biofertilizer Affecting Yield Related Characteristics of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) and Soil Micro-Organisms. *Scientia Horticulturae* 150(0):238-243.
- PINEDA, A; DICKE, M; PIETERSE, CM.; POZO, MJ. 2013. Beneficial Microbes in a Changing Environment: Are They Always Helping Plants to Deal With Insects? *Functional Ecology* 27: 574-586.
- PIRLAK, L; KÖSE, M. 2009. Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Yield and Some Fruit Properties of Strawberry. *Journal of Plant Nutrition* 32(7): 1173-1184.
- PITT, TL; MCCLURE, J; PARKER, M.; AMÉZQUITA, A; MCCLURE, P. 2015. *Bacillus cereus* in Personal Care Products: Risk to Consumers. *International Journal of Cosmetic Science* 37: 165-174.
- PORRAS-ALFARO, A; BAYMAN, P. 2011. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annu. Rev. Phytopathol* 49: 291-315.
- PORTA, J; LÓPEZ - ACEVEDO, M. 2003. *Edafología Para la Agricultura y el Medio Ambiente*. Tercera Ed Madrid, Mundi Prensa, 928.
- POSADA, LF; ALVAREZ, JC; HU, C-H; DE BASHAN, L; BASHAN, Y. 2016. Construction of Probe of the Plant Growth-Promoting Bacteria *Bacillus Subtilis* Useful for Fluorescence in situ Hybridization. *Journal of Microbiological Methods* 128: 125-129.

- POYRAZ, IE; ÖZTÜRK, N; KIYAN, HT; DEMIRCI, B. 2016. Volatile Compounds of *Coffea arabica* L. Green and Roasted Beans. *Anadolu University Journal of Science and Technology C - Life Sciences and Biotechnology* 2016 5(1): 31-35.
- PRATS, G. 2006. *Microbiología Clínica*. Editorial médica. España. p. 366.
- PRAT, L. 1981. *Importancia de la Reacción del Suelo*. Salamanca, Centro de Edafología y Biología aplicada EXCMA.
- PRESCOTT, M; HARLEY, JP; KLEIN, DA. 2002. *Microbiología*. Quinta edi España, McGraw Hill.
- PU, L; JINGFAN, F; KAI, C; CHAO-AN, L; YUNJIANG, C. 2014. Phenylethanol Promotes Adhesion and Biofilm Formation of the Antagonistic yeast *Kloeckera apiculata* for the Control of Blue Mold on Citrus. *FEMS Yeast Research* 14(4): 536-546.
- PUSZTAHELYI, T; HOLB, IJ; PÓCSI, I. 2015. Secondary Metabolites in Fungus-Plant Interactions. *Front Plant Sci* 6(573): 1-23.
- QUIROGA, A; BONO, A. 2012. *Manual de Fertilidad y Evaluación de Suelos*. La Pampa, Argentina, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- QUISHPE, JP. 2013. *Evaluación de la Respuesta de la Frutilla (*Fragaria dioica*.) al Sistema de Cultivo Semihidropónico en el Quinche - Pichincha 2012*. Quito - Ecuador, Universidad Politécnica Salesiana. 103 p.
- RENUKA, R; PARAMESWARI, B. 2012. Effective Microbes (EM) - An Organic Agricultural Technology. *Research News For U* 9: 102-105.
- RAO, NM; PRASAD, SHKR; JYOTHIRMAYI, N. 2012. Efficacy of Ripened and Unripened Fruit Extracts of *Musa x paradisiaca* L. (Bontha cultivar) Against Human Pathogens. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4(1): 455-460.
- REDDY, DN; AL-RAJAB, AJ. 2016. Chemical Composition, Antibacterial and Antifungal Activities of *Ruta graveolens* L. Volatile Oils. *Cogent Chemistry* 2: 1-11.
- REY, MW; RAMAIYA, P; NELSON, BA; BRODY-KARPIN, SD; ZARETSKY, EJ; TANG, M; LEON, AL DE; XIANG, H; GUSTI, V; CLAUSEN, IG; OLSEN, PB; RASMUSSEN, MD; ANDERSEN, JT; JØRGENSEN, PL; LARSEN, TS; SOROKIN, A; BOLOTIN, A; LAPIDUS, A; GALLERON, N; EHRLICH, SD; BERKA, RM. 2004.

Complete Genome Sequence of the Industrial Bacterium *Bacillus licheniformis* and Comparisons With Closely Related *Bacillus* Species. *Genome Biology* 2004, 5(10): 1-12.

REYES, A; RUIZ, E; YAM, C; DZUL, M. 2011. Selección de *Bacillus* spp. con Actividad Antagónica in vitro contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en Diferentes Medios de Cultivo. *Fitosanidad* 15(2): 117-121.

RODRÍGUEZ, H; FRAGA, R. 1999. Phosphate Solubilizing Bacteria and their Role in Plant Growth promotion. *Biotechnology Advances* 17(4-5): 319-339.

ROJAS, A. 2011. Conceptos y Prácticas de Microbiología General. Editorial Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Colombia 161 p.

ROJAS, LB; VELASCO, J. 2010. Chemical Composition and Antibacterial Effects of the Essential oil of *Aloysia triphylla* Against Genito-Urinary Pathogens *Aloysia triphylla* (L' Hér.) Britton Contra Patógenos Genito-Urinarios. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 9(1): 56-62.

ROSADO-ÁLVAREZ, C; MOLINERO-RUIZ, L; RODRÍGUEZ-ARCOS, R; BASALLOTE-UREBA, MJ. 2014. Antifungal Activity of Asparagus Extracts Against Phytopathogenic *Fusarium oxysporum*. *Scientia Horticulturae* 171: 51-57.

ROSAS, I; CRAVIOTO, A; EZCURRA, E. 2004. *Microbiología Ambiental*. Primera ed México D.F., Instituto Nacional de Ecología.

SCHLAEPPI, K; BULGARELLI, D. 2015. The Plant Microbiome at Work. *APS Journals* 28(3): 212-217.

SIDDIQUI, ZA; MAHMOOD, I. 1996. Biological Control of Plant Parasitic Nematodes by Fungi: A review. *Bioresource Technology* 58(1996): 229-239.

SAINTPIERRE-BONACCIO, D; AMIR, H; PINEAU, R; LEMRISS, S; GOODFELLOW, M. 2004. *Streptomyces ferralitis* sp. nov., a Novel *Streptomycete* Isolated From a New-Caledonian Ultramafic Soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2061-2065.

SALAMA, ASM; EL-SAYED, O; EL GAMMAL, OHM. 2014. Effect of Effective Microorganisms (EM) and Potassium Sulphate on Productivity and Fruit Quality of «Hayany» Date Palm Grown Under Salinity Stress. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science* 7(6): 90-99.

SAMPAIO, BL; EDRADA-EBEL, R; COSTA, FB DA. 2016. Effect of the Environment on the Secondary Metabolic Profile of *Tithonia diversifolia*: a Model for Environmental Metabolomics of Plants. Scientific Reports 2016: 1-11.

SÁNCHEZ, B; RUIZ, M; RÍOS, MM. 2005. Materia Orgánica y Actividad Biológica del Suelo en Relación con la Altitud, en la Cuenca del río Maracay, Estado Aragua. Agronomía Tropical 55(4): 507-534.

SÁNCHEZ, L; TROMPS, J. 2014. Caracterización in Vitro de Bacterias Ácido Lácticas con Potencial Probiótico. Revista Salud Animal 36(2): 124-129.

SAS, L; SUMOROK, B; MALUSÁ, E; GLUSZEK, S; DERKOWSKA, E. 2011. The Influence of Bioproducts on Root Growth and Mycorrhizal Occurrence in the Rhizosphere of Strawberry Plants 'Elsanta'. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research 19(1): 13-34.

SANTOS, B. M., & OBREGÓN, H. A. (2009). Prácticas Culturales Para la Producción Comercial de Fresas en Florida. Depto. Horticultural Sci., Servicio de Extensión Cooperativa de la Florida. U. de Florida. 15p.

SIPILÄ, TP; YRJÄLÄ, K; ALAKUKKU, L; PALOJÄRVI, A. 2012. Cross-Site Soil Microbial Communities under Tillage Regimes: Fungistasis and Microbial Biomarkers. Journals ASM.org 78(23): 8191-8201.

SINDHU, SS; PARMAR, P; PHOUR, M; SEHRAWAT, A. 2016. Potassium-Solubilizing Microorganisms (KSMs) and Its Effect on Plant Growth Improvement. 2016: 171-185.

SINGH, HB. 2014. Management of Plant Pathogens with Microorganisms. Proc. Indian Natn Sci Acad 80(2): 443-454.

SINGH, JS; PANDEY, VC; SINGH, DP. 2011. Efficient Soil Microorganisms: A New Dimension for Sustainable Agriculture and Environmental Development. Agriculture, Ecosystems and Environment 140(3-4): 339-353.

SUBBOTIN, SA; RAGSDALE, EJ; MULLENS, T; ROBERTS, PA; MUNDO-OCAMPO, M; BALDWIN, JG. 2008. A Phylogenetic Framework for Root Lesion Nematodes of the Genus *Pratylenchus* (Nematoda): Evidence from 18S and D2 – D3 Expansion Segments of 28S Ribosomal RNA Genes and Morphological Characters. Molecular Phylogenetics and Evolution 48: 491-505.

- SCHLEGEL, HG. 1997. Microbiología General. Nueva Edic Barcelona - Spain, Ediciones Omega, S.A., 654.
- SCHMIDT, D; CARON, BO; PROCHNOW, D; COCCO, C; ELLI, EF; STOLZLE, J; ALTISSIMO, B; HEINZMANN, BM. 2016. Effect of Frost on Yield and Composition of *Aloysia triphylla* essential oil. Journal of Medicinal Plants Research 10(7): 88-92.
- SHALABY, ME-S; EL-NADY, MF. 2008. Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a Biocontrol Agent Against *Fusarium* infection of Sugar Beet Plants. Acta Biologica Szegediensis 52(2): 271-275.
- SHAO, J; XU, Z; ZHANG, N; SHEN, Q; ZHANG, R. 2014. Contribution of Indole-3-Acetic Acid in the Plant Growth Promotion by the Rhizospheric Strain *Bacillus amyloliquefaciens*. Biology and Fertility of Soils 51(3): 321-330.
- SHARMA, S. 2017. Review on Phytochemicals With Their Biological Roles? International Journal of Advanced Research in Biological Sciences 4(1): 69-77.
- SHRESTHA, A. SEOK, B. & HWAN, D. 2014. Biological Control of Bacterial Spot Disease and Plant Growth-Promoting Effects of Lactic Acid Bacteria on Pepper. Biocontrol Science and Technology. República de Corea. 24 (7): 763 – 779.
- SNAUWAERT, I; STRAGIER, P; VUYST, L DE; VANDAMME, P. 2015. Comparative Genome Analysis of *Pediococcus damnosus* LMG 28219, a Strain Well-Adapted to The Beer Environment. BMC Genomics 16(267): 1-12.
- SPAEPEN, S. 2015. Plant Hormones Produced by Microbes. Principles of Plant-Microbe Interactions. Germany, Springer International Publishing Switzerland, p.247-256.
- SPAEPEN, S; VANDERLEYDEN, J. 2011. Auxin and Plant-Microbe Interactions. s.l., Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.1-13.
- SRIPREECHASAK, P; SUWANBORIRUX, K; TANASUPAWAT, S. 2014. Characterization and Antimicrobial Activity of *Streptomyces* Strains From soils in Southern Thailand. Journal of Applied Pharmaceutical Science 4(10): 24-31.
- SRIVASTAVA, R; ROSETI, D; SHARMA, AK. 2007. The Evaluation of Microbial Diversity in a Vegetable Based Cropping System Under Organic Farming Practices. Applied Soil Ecology 36(2-3): 116-123.

- STEIN T. 2005. *Bacillus subtilis* Antibiotics: Structures, Syntheses and Specific Functions. Mol. Microbiol. 56: 845–857.
- SUN, G-D; XU, Y; JIN, J-H; ZHONG, Z-P; LIU, Y; LUO, M; LIU, Z-P. 2012. Pilot Scale Ex-Situ Bioremediation of Heavily PAHs-Contaminated Soil by Indigenous Microorganisms and Bioaugmentation by ... Journal of Hazardous Materials 233-234: 72-78.
- SWAMY, MK; AKHTAR, MS; SINNIAH, UR. 2016. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2016: 1-21.
- TAKAYAMA, C; DE-FARIA, FM; ALMEIDA, ACA DE; DUNDER, RJ; MANZO, LP; SOCCA, EAR; BATISTA, LM; SALVADOR, MJ; SOUZA-BRITO, ARM; LUIZ-FERREIRA, A. 2016. Chemical Composition of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil and Antioxidant Action Against Gastric Damage Induced by Absolute Ethanol in the Rat. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 6(8): 677-681.
- TAN, GH; NORDIN, MS; KERT, TL; NAPSIAH, A. 2009. Isolation of Beneficial Microbes from Biofertilizer Products. J. Trop. Agric. and Fd. Sc. 37(1): 103-109.
- TIAN, B; YANG, J; ZHANG, K-Q. 2007. Bacteria Used in the Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Populations, Mechanisms of Action, and Future Prospects. FEMS Microbiology Ecology 2007: 197-213.
- TKÁČOVÁ, J; FURDÍKOVÁ, K; KLEMPPOVÁ, T; ĎURČANSKÁ, K; ČERTÍK, M. 2015. Screening of Carotenoid-Producing Rhodotorula strains Isolated From Natural Sources. The Journal of Slovak University of Technology in Bratislava 8(1): 34-38.
- TEJERA, B; ROJAS, M; HEYDRICH, M. 2011. Potencialidades del Género *Bacillus* en la Promoción del Crecimiento Vegetal y el Control biológico de Hongos Fitopatógenos. Revista CENIC. Ciencias Biológicas 42(3): 131-138.
- TEMITOPE, FP; OLUCHI, UE. 2015. Studies on the Antifungal Activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* on Spoilage Fungi of Tomato Fruit. Journal of Microbiology Research 5(3): 95-100.
- TIPISMANA, C; ASTUDILLO, L; GUILLERMO, J. 2005. Hongos de Importancia Agrícola Presentes en Moscas de la Fruta del Valle de Ica, Perú. Revista Peruana de Biología 12(3): 449-456.

- TOLBA, HI; MORSY, EM; AHMED, SM; EL-SAYED, GA. 2016. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and Humate Substances Application on maize (zea mays) Productivity Under Different Levels of Mineral Fertilization. N. Egypt. J. Microbiol 43: 83-98.
- TOMÁS, RAC. 2010. Mecanismos moleculares y Bioquímicos Implicados en la Adaptación de *Saccharomyces cerevisiae* a las Bajas Temperaturas de Fermentación. s.l., Universitat Rovira I Virgili. 225 p.
- TORTORA, GJ; FUNKE, BR; CASE, CL. 2007. Introducción a la Microbiología. Novena Edi Buenos Aires - Argentina, Editorial Médica Panamericana, 988.
- TORTORA, ML; DÍAZ-RICCI, JC; PEDRAZA, RO. 2012. Protection of Strawberry Plants (*Fragaria ananassa* Duch.) Against Anthracnose Disease Induced by *Azospirillum brasilense*. Plant and Soil 356(1-2): 279-290.
- TRABELSI, D; MHAMDI, R. 2013. Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review. BioMed Research International 2013: 1-11.
- TREJO, D; FERRERA-CERRATO, R; GARCÍA, R; VARELA, L; LARA, L; ALARCÓN, A. 2011. Efectividad de Siete Consorcios Nativos de Hongos Micorrízicos Arbusculares en Plantas de Café en Condiciones de Invernadero y Campo. Revista Chilena de Historia Natural 84(1): 23-31.
- VADAKATTU, G. 2012. Beneficial Microorganisms for Sustainable Agriculture. Oficial Journal of the Australian Society for Microbiology INC 33(3): 113-115.
- VELÁZQUEZ, A; RAMOS, A. 2015. Beneficios de Microorganismos Solubilizadores de P y K en la Recuperación y Mantenimiento de Suelos Agrícolas. VIII Congreso Mundial de la Palta 2015: 3.
- VESTBERG, M; KUKKONEN, S; SAARI, K; PARIKKA, P; HUTTUNEN, J; TAINIO, L; DEVOS, N; WEEKERS, F; KEVERS, C; THONART, P; LEMOINE, M; CORDIER, C; ALABOUVETTE, C; GIANINAZZI, S. 2004. Microbial Inoculation for Improving the Growth and Health of Micropropagated Strawberry. Applied Soil Ecology 27: 243-258.
- WANI, SH; KUMAR, V; SHRIRAM, V; KUMAR, S. 2016. Phytohormones and Their Metabolic Engineering for Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. Science Direct 4: 162-176.

- WANG, H; YANG, L; PING, Y; BAI, Y; LUO, H; HUANG, H; YAO, B. 2016. Engineering of a *Bacillus amyloliquefaciens* Strain with High Neutral Protease Producing Capacity and Optimization of Its Fermentation Conditions. Plos One 2016: 1-14.
- WANZALA, W; OSUNDWA, EM; ALWALA, OJ; GAKUUBI, MM. 2016. Chemical Composition of Essential oil of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray from the Southern slopes of Mount Elgon in Eestern Kenya. Indian Journal of Ethnoohytopharmaceuticals 2(2): 72/83.
- WATANABE, M; VEEN, S VAN DER; NAKAJIMA, H; ABEE, T. 2012. Effect of Respiration and Manganese on Oxidative Stress Resistance of *Lactobacillus plantarum*. Microbiology (2012), 158: 293-300.
- WEI, L; SHAO, Y; WAN, J; FENG, H; ZHU, H; HUANG, H; ZHOU, Y. 2014. Isolation and Characterization of a Rhizobacterial Antagonist of Root-Knot Nematodes. Plos One 9(1): 1-7.
- WHIPPS, JM; HAND, P; PINK, D; BENDING, GD. 2008. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. Journal of Applied Microbiology 105(6): 1744-1755.
- WONG, WS; TAN, LG; CHEN, X; YONG, JWH. 2015. The Importance of Phytohormones and Microbes in Biofertilizers. Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem. D.K. Mahes s.l., Springer International Publishing Switzerland, p.105-158.
- WONG, WS; TAN, SN; GE, L; CHEN, X; LETHAM, DS; YONG, WH. 2016. The Importance of Phytohormones and Microbes in Biostimulants: Mass Spectrometric Evidence and Their Positive Effects on Plant Growth. Acta Horticulturae 2016.
- WILKINSON, KM. 2009. Nursery Manual for Native Plants: A guide for Tribal Nurseries. Nursery Management. Agriculture Handbook 730. Washington, D.C., Forest Service, v.1, p.247-261.
- XIANG, W; ZHAO, L; XU, X; QIN, Y; YU, G. 2012. Mutual Information Flow Between Beneficial Microorganisms and the Roots of Host Plants Determined the Bio-Functions of Biofertilizers. American Journal of Plant Sciences 3: 1115-1120.
- XU, Z; SHAO, J; LI, B; YAN, X; SHEN, Q; ZHANG, R. 2012. Bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 Contributes to Antifungal Activity and Biofilm Formation. Journal. ASM.org 79(3): 808-815.

- YADAV, AN; VERMA, P; KOUR, D; RANA, KL; KUMAR, V; SINGH, B; CHAUAHAN, VS; SUGITHA, T; SAXENA, AK; DHALIWAL, HS. 2017. Plant Microbiomes and Its Beneficial Multifunctional Plant Growth Promoting Attributes. *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources* 3(1): 01-08.
- YADAV, KS; PRABHA, R. 2017. Production of Intracellular Carotenoid Pigment from Wild Strains of *Rhodotorula*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(5): 679-683.
- YAMADA, K; Xu, H. 2001. Properties and Applications of an Organic Fertilizer Inoculated with Effective Microorganisms. *Journal of Crop Production* 3(1): 255-268.
- YAN, N; MARSCHNER, P; CAO, W; ZUO, C; QIN, W. 2015. Influence of Salinity and Water Content on Soil Microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research* 3(4): 316-323.
- YIN, J; KWON, G-J; WANG, M. 2007. The Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Sonchus oleraceus* L. extracts *. 1(3): 189-194.
- ZAGHLOUL, R; NEWEIGY, N; ABOU-ALY, H; EL-SAYED, S; BAHLOUL, A. 2015. Nematicidal Activity of Some Biocontrol Agents against Root-Knot. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 6(1): 429-438.
- ZAMORANO-PONCE, E; MORALES, C; RAMOS, D; SEPÚLVEDA, C; CARES, S; RIVERA, P; FERNÁNDEZ, J; CARBALLO, MA. 2006. Anti-Genotoxic Effect of *Aloysia triphylla* Infusion Against Acrylamide-Induced DNA Damage as Shown by the Comet Assay Technique. 603: 145-150.
- ZHANG, B-H; CHENG, J; CHEN, W; LI, H-Q; YANG, J-Y; PARK, D-J; KIM, C-J; SHEN, R; DUAN, Y-Q; LI, W-J. 2015. *Streptomyces lushanensis* sp. nov., a Novel Actinomycete With Anti-Cyanobacterial Activity. *The Journal of Antibiotics* 68(1): 5-8.
- ZHANG, X; ALEMANY, LB; FIEDLER, H; GOODFELLOW, M; PARRY, RJ. 2008. Biosynthetic Investigations of Lactonamycin and Lactonamycin Z: Cloning of the Biosynthetic Gene Clusters and Discovery of an Unusual Starter Unit. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(2): 574-585.
- ZHAO, P; QUAN, C; WANG, Y; WANG, J; FAN, S. 2013. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a Potential Biocontrol Agent Against *Fusarium oxysporum* f. sp. spinaciae. *Journal of Basic Microbiology* 2013: 1-9.

ZYDLIK, P; ZYDLIK, Z. 2008. Impact of Biological Effective Microorganisms (EM) Preparations on Some Physico-Chemical Properties of Soil and the Vegetative Growth of Apple - Tree Rootstocks. *Nauka Przyr. Technol.* 2(1): 8.

ZYDLIK, Z; ZYDLIK, P. 2013. The Effect of Microbiological Products on Soil Properties in the Conditions of Replant Disease. *Zemdirbyste - Agricultures* 100(1): 19-24.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Valores registrados de unidades formadoras de colonias de levaduras en las especies vegetales de tres pisos altitudinales

Piso Altitudinal	Planta	Respuesta (UFC/ml)
P1	Café	110000
P1	Café	113000
P1	Café	112000
P1	Plátano	340000
P1	Plátano	290000
P1	Plátano	310000
P1	Girasol	320000
P1	Girasol	250000
P1	Girasol	280000
P2	Ruda	53000
P2	Ruda	57000
P2	Ruda	55000
P2	Romero	600000
P2	Romero	520000
P2	Romero	560000
P2	Cedrón	1850000
P2	Cedrón	2100000
P2	Cedrón	1950000
P2	Menta	820000
P2	Menta	710000
P2	Menta	760000
P3	Diente de león	860000
P3	Diente de león	1010000
P3	Diente de león	940000
P3	Manzanilla	330000
P3	Manzanilla	390000
P3	Manzanilla	360000
P3	Geranio	360000
P3	Geranio	260000
P3	Geranio	310000
P3	Altamisa	5800000
P3	Altamisa	5100000
P3	Altamisa	5400000
P3	Canayuyo	950000
P3	Canayuyo	1340000
P3	Canayuyo	1140000

ANEXO 2: Valores registrados de unidades formadoras de colonias de *Bacillus* en las especies vegetales de tres pisos altitudinales

Piso altitudinal	Planta	Respuesta (UFC/ml)
P1	Café	1000000
P1	Café	1160000
P1	Café	1080000
P1	Plátano	10700
P1	Plátano	12300
P1	Plátano	11500
P1	Girasol	1120000
P1	Girasol	920000
P1	Girasol	1020000
P2	Ruda	11900000
P2	Ruda	17200000
P2	Ruda	14600000
P2	Romero	240000
P2	Romero	330000
P2	Romero	290000
P2	Cedrón	5100
P2	Cedrón	2300
P2	Cedrón	3700
P2	Menta	53000
P2	Menta	62000
P2	Menta	58000
P3	Diente de león	9400
P3	Diente de león	13400
P3	Diente de león	11400
P3	Manzanilla	3000
P3	Manzanilla	4000
P3	Manzanilla	3500
P3	Geranio	169000
P3	Geranio	131000
P3	Geranio	150000
P3	Altamisa	35000
P3	Altamisa	22000
P3	Altamisa	29000
P3	Canayuyo	2300
P3	Canayuyo	3600
P3	Canayuyo	3000

ANEXO 3: Valores registrados de unidades formadoras de colonias de *Lactobacillus* en las especies vegetales de tres pisos altitudinales

Piso altitudinal	Planta	Respuesta (UFC/ml)
P1	Café	2750000000000
P1	Café	1860000000000
P1	Café	2310000000000
P1	Plátano	2320000000000
P1	Plátano	1040000000000
P1	Plátano	1680000000000
P1	Girasol	3300000000000
P1	Girasol	3200000000000
P1	Girasol	3100000000000
P2	Ruda	6200000000000
P2	Ruda	6700000000000
P2	Ruda	6400000000000
P2	Romero	4500000000000
P2	Romero	2400000000000
P2	Romero	3500000000000
P2	Cedrón	8000000000000
P2	Cedrón	6200000000000
P2	Cedrón	7100000000000
P2	Menta	4500000000000
P2	Menta	4100000000000
P2	Menta	4300000000000
P3	Diente de león	5000000000000
P3	Diente de león	6100000000000
P3	Diente de león	5600000000000
P3	Manzanilla	4800000000000
P3	Manzanilla	2900000000000
P3	Manzanilla	3900000000000
P3	Geranio	4500000000000
P3	Geranio	3600000000000
P3	Geranio	4100000000000
P3	Altamisa	5400000000000
P3	Altamisa	3500000000000
P3	Altamisa	4500000000000
P3	Canayuyo	3400000000000
P3	Canayuyo	2200000000000
P3	Canayuyo	2800000000000

ANEXO 4: Valores registrados de unidades formadoras de colonias de actinomicetos en las especies vegetales de tres pisos altitudinales

Piso altitudinal	Planta	Respuesta (UFC/ml)
P1	Café	8000
P1	Café	7000
P1	Café	6000
P1	Plátano	15000
P1	Plátano	10000
P1	Plátano	13000
P1	Girasol	6000
P1	Girasol	5000
P1	Girasol	6000
P2	Ruda	10000
P2	Ruda	7000
P2	Ruda	9000
P2	Romero	170000
P2	Romero	150000
P2	Romero	160000
P2	Cedrón	70000
P2	Cedrón	60000
P2	Cedrón	70000
P2	Menta	13000
P2	Menta	5000
P2	Menta	9000
P3	Diente de león	150000
P3	Diente de león	110000
P3	Diente de león	130000
P3	Manzanilla	90000
P3	Manzanilla	30000
P3	Manzanilla	60000
P3	Geranio	120000
P3	Geranio	90000
P3	Geranio	100000
P3	Altamisa	23000
P3	Altamisa	10000
P3	Altamisa	12000
P3	Canayuyo	140000
P3	Canayuyo	90000
P3	Canayuyo	120000

ANEXO 5: Resultados del análisis de suelos: caracterización



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
 FACULTAD DE AGRONOMIA - DEPARTAMENTO DE SUELOS
 LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



ANALISIS DE SUELOS : CARACTERIZACION

Solicitante : MANUEL ALVAREZ VERA

Departamento : LIMA
 Distrito : LA MOLINA
 Referencia : H.R. 56135-148C-16

Bolt : 13606

Provincia : LIMA
 Predio :
 Fecha : 11/10/16

Número de Muestra Lab Claves	pH (1:1)	CE (1:1) dS/m	CaCO ₃ %	M.O. %	P ppm	K ppm	Análisis Mecánico			Clase Textural	CIC	Cationes Cambiables					Suma de Cationes	Suma de Bases	% Sat. De Bases
							Arena %	Limo %	Arcilla %			Ca ²⁺ meq/100g	Mg ²⁺ K ⁺ Na ⁺	Al ³⁺ + H ⁺					
13129	8.18	1.10	1.80	1.67	18.8	466	53	24	23	Fr.Ar.A.	11.52	8.60	1.60	1.05	0.27	0.00	11.52	11.52	100

A = Arena ; A.Fr = Arena Franca ; Fr.A = Franco Arenoso ; Fr. = Franco ; Fr.L = Franco Limoso ; L = Limoso ; Fr.Ar.A. = Franco Arcillo Arenoso ; Fr.Ar. = Franco Arcilloso ; Fr.Ar.L = Franco Arcillo Limoso ; Ar.A = Arcillo Arenoso ; Ar.L = Arcillo Limoso ; Ar. = Arcilloso

Número de Muestra Lab Claves	B ppm	Cu ppm	Fe ppm	Mn ppm	Zn ppm

Edy García Bendezu
 Jefe del Laboratorio

Av. La Molina s/n Campus UNALM - Telf.: 614-7800 Anexo 222 Teléfono Directo: 349-5622 e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe

METODOS SEGUIDOS EN EL ANALISIS DE SUELOS

1. Textura de suelo: % de arena, limo y arcilla; método del hidrómetro.
2. Salinidad: medida de la conductividad eléctrica (CE) del extracto acuoso en la relación suelo: agua 1:1 o en el extracto de la pasta de saturación(es).
3. PH: medida en el potenciómetro de la suspensión suelo: agua relación 1:1 ó en suspensión suelo: KCl N, relación 1:2.5.
4. Calcareo total (CaCO₃): método gaso-volumétrico utilizando un calcímetro.
5. Materia orgánica: método de Walkley y Black, oxidación del carbono orgánico con dicromato de potasio: %M.O. = %C x 1.724.
6. Nitrogeno total: método del micro-Kjeldahl.
7. Fósforo disponible: método del Olsen modificado, extracción con NaHCO₃-0.5M, pH 8.5.
8. Potasio disponible: extracción con acetato de amonio (CH₃ - COONH₄)N, pH 7.0.
9. Capacidad de intercambio catiónico (CIC): saturación con acetato de amonio (CH₃ - COONH₄)N, pH 7.0.
10. Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺ cambiables: reemplazamiento con acetato de amonio (CH₃ - COONH₄)N, pH 7.0 cuantificación por fotometría de llama y/o absorción atómica.
11. Al³⁺ + H⁺: método de Yuan. Extracción con KCl, N.
12. Iones solubles:
 - a) Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺ solubles: fotometría de llama y/o absorción atómica.
 - b) Cl, Co₃, HCO₃, NO₃ solubles: volumetría y colorimetría, SO₄ turbidimetría con cloruro de Bario.
 - c) Boro soluble: extracción con agua, cuantificación con curcumina.
 - d) Yeso soluble: solubilización con agua y precipitación con acetona.

Equivalencias:
 1 ppm = 1 mg/kilogramo
 1 milimho (mmho/cm) = 1 deciSiemens/metro
 1 miliequivalente / 100 g = 1 cmol(+)/kg
 Sales solubles totales (TDS) en ppm ó mg/kg = 640 x CEes
 CE (1 : 1) mmho/cm x 2 = CE(es) mmho/cm

TABLA DE INTERPRETACION

Salinidad		Materia Orgánica	Fósforo disponible	Potasio disponible	Relaciones Catiónicas			
Clasificación del Suelo	CE(es)	CLASIFICACIÓN	%	ppm P	ppm K	Clasificación	K/Mg	Ca/Mg
*muy ligeramente salino	<2	*bajo	<2.0	<7.0	<100	*Normal	0.2 - 0.3	5 - 9
*ligeramente salino	2 - 4	*medio	2 - 4	7.0 - 14.0	100 - 240	*defc. Mg	>0.5	
*moderadamente salino	4 - 8	*alto	>4.0	>14.0	>240	*defc. K	>0.2	
*fuertemente salino	>8					*defc. Mg		>10

Reacción o pH		CLASES TEXTURALES				Distribución de Cationes %		
Clasificación del Suelo	pH	A	arena	Fr.Ar.A	= franco arcillo arenoso	Ca ²⁺	=	60 - 75
*fuertemente ácido	<5.5	A.Fr	arena franca	Fr.Ar	= franco arcilloso	Mg ²⁺	=	15 - 20
*moderadamente ácido	5.6 - 6.0	Fr.A	franco arenoso	Fr.Ar.L	= franco arcilloso limoso	K ⁺	=	3 - 7
*ligeramente ácido	6.1 - 6.5	Fr.	franco	Ar.A	= arcilloso arenoso	Na ⁺	=	<15
*neutro	6.6 - 7.0	Fr.L	franco limoso	Ar.L	= arcilloso limoso			
*ligeramente alcalino	7.1 - 7.8	L	limoso	Ar.	= arcilloso			
*moderadamente alcalino	7.9 - 8.4							
*fuertemente alcalino	>8.5							



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



INFORME DE ANALISIS ESPECIAL EN SUELO

SOLICITANTE : MANUEL ALVAREZ VERA
PROCEDENCIA : LIMA/ LIMA/ LA MOLINA
REFERENCIA : H.R. 56683
BOLETA : 13748
FECHA : 09/12/2016

Lab	Número Muestra	N %
	Claves	
4159		0.10



Dr. Sady García Bendejú
Jefe del Laboratorio

ANEXO 6: Resultados del análisis fitopatológico del suelo antes de establecer el cultivo



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología

Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12

Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023

e-mail: clinica@lamolina.edu.pe



La Molina, 14 de febrero de 2017
FI-AF 033-2017 LMC 005
JFT 033

Sres.
MANUEL ALVAREZ VERA (Tesis de Doctorado de Ciencias Ambientales)
Lima
Presente.

De nuestra consideración:

El resultado del análisis fitopatológico de una muestra de suelo, procedente de Campo de Biología-Genética, Universidad Nacional Agraria La Molina, La Molina; Lima Metropolitana, es el siguiente:

1. METODO.

Siembra de diluciones seriadas de suelo (10^{-1} hasta 10^{-3}) en el medio de cultivo PDAA (hongos) y PARB (pseudohongos). La temperatura de incubación fue de 24°C por 5 días

2. RESULTADO.

HONGOS	UFC*/ gr de suelo
<i>Rhizopus sp.</i>	0.5×10^3
<i>Aspergillus niger</i>	2.0×10^3

*UFC=unidad formadora de colonia

3. DIAGNOSTICO.

Realizado el análisis fitopatológico de una muestra de suelo, se detectó la presencia de hongos contaminantes caso *Rhizopus sp.* y *Aspergillus niger*.

4. RECOMENDACIONES.

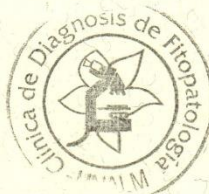
No hay problema en sembrar Fresa, pero conviene enriquecer el suelo con materia orgánica antes de la siembra.

Nos despedimos de ustedes recordándoles que la Clínica de Diagnóstico está a su disposición para cualquier consulta.

Atentamente,

Mg. Sc Walter Apaza Tapia
COORDINADOR
CLINICA DE DIAGNOSIS

WAT /hmg
c.c. Archivo



ANEXO 7: Resultados del análisis nematológico del suelo antes de establecer el cultivo



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología

Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12

Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023

e-mail: clinica@lamolina.edu.pe



La Molina, 08 de Marzo de 2017
FI-NEMA-021bio-2017

Señores:
Manuel Álvarez Vera
La Molina
Presente.

De mi consideración:

El resultado del análisis Nematológico de una muestra de suelo sin cultivo para la siembra de fresa, procedente de Campo Biología Genética – La Molina, enviadas por ustedes a nuestra Clínica de Diagnóstico, fue:

<u>Nematodos en el suelo</u>	<u>Nº. Indv/100 cc. de suelo</u>	<u>Nematodos en las raíces</u>	<u>Nº. Indv/gr. de raíces</u>	<u>Bioensayo para <i>Meloidogyne</i></u>
<i>Aphelenchus</i>	10	No se detectaron	--	0
<i>Dorylaimidos</i>	10			
<i>Rhabditidos</i>	10			

Los resultados han detectado la presencia de *Aphelenchus*, el cual es un nematodo asociado a fresa y es de menor importancia, además las poblaciones son muy bajas.

Los *Dorylaimidos* y *Rhabditidos* son habitantes comunes del suelo y no afectan a los cultivos.

Estamos esperando los resultados del Bioensayo para *Meloidogyne*, el cual es un nematodo muy importante en fresa. Esta es una prueba de infectividad y suele detectar estados de conservación de este nematodo los cuales no pueden ser detectados por los métodos convencionales de análisis. Esta prueba demora alrededor de 30 días y determinará si este nematodo está ausente.

Resultados del Bioensayo para *Meloidogyne*
Los resultados del bioensayo no han detectado este nematodo.

Si va a sembrar fresa, no debería tener problemas con nematodos. Preventivamente, le sugerimos analizar el material vegetal que va a trasplantar, ya que al ser material vegetativo puede servir de agente de diseminación de varios fitopatógenos.

Nos despedimos de ustedes recordándoles que la Clínica de Diagnóstico está a su disposición para cualquier consulta.

Muy atentamente,

Ing. Alfonso Palomo Herrera
Jefe, Laboratorio de Nematología
Facultad Agronomía



Archivo
APH/hmg

ANEXO 8: Resultados del análisis microbiológico del suelo antes de establecer el cultivo



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
Teléfono: 6147800 anexo 274



INFORME DE ENSAYO N° 1703109 - LMT

SOLICITANTE : MANUEL ALVAREZ VERA

DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO

MUESTRA : SUELO
1703109)

PROCEDENCIA : UNALM
TIPO DE ENVASE : Bolsa de plástica
CANTIDAD DE MUESTRA : 01 muestra x 01 und. x 1 000 g. aprox.
ESTADO Y CONDICIÓN : En buen estado y cerrado
FECHA DE MUESTREO : 2017 - 03 - 10
FECHA DE RECEPCIÓN : 2017 - 03 - 10
FECHA DE INICIO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 10
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 17

RESULTADOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Análisis Microbiológico	Muestra 1703109
¹ Recuento de <i>Lactobacillus</i> sp. (UFC/g)	10 x 10 ³
¹ Recuento de <i>Bacillus</i> sp. (UFC/g)	17 x 10 ⁵
¹ Recuento de mohos (UFC/g)	10
² Enumeración de <i>Pseudomonas</i> sp. (NMP/g)	< 3
² Recuento de actinomicetos (UFC/g)	93 x 10 ⁴

NOTA: El valor < 10² indica ausencia de microorganismos en ensayo.

Métodos:

¹International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1983. 2da Ed. Vol 1 Part II, (Trad. 1988) Reimp. 2000. Editorial Acriba.

²American Public Health Association. 1992. Compendium of methods for the Microbiological Examination of foods, 3^{ra} Ed. Chapter 13.

³Zapater J. 1975. Evaluación en el maíz del coeficiente rizósfera-suelo (R/S) referidos a bacterias libres fijadoras de N₂. Anales científicos de la UNALM 13:45-57.

⁴Anderson J. 1982. Soil respiration. En: Page A., Miller R., Kenney D. (Eds.) Methods of Soil Analysis Part II. Chemical and Microbiological

Observaciones:

Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.

Validez del documento:

Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.

La Molina, 17 de marzo de 2017

DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana
y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina

Teléfono: 6147800 anexo 274

E-mail: imt@lamolina.edu.pe



LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGÍA "MARINO TABUSSO"

☐ (511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: imt@lamolina.edu.pe
Apartado Postal 456 - Lima 12 - PERU

ANEXO 9: Resultados de la caracterización del agua utilizada para regar las plantas de fresa.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRÍCOLA
DEPARTAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS DRH
LABORATORIO DE AGUA, SUELO, MEDIO AMBIENTE Y FERTIRRIEGO



Av. La Molina s/n. Telefax: 6147800 Anexo 226 Lima. E-mail: las-fia@lamolina.edu.pe **Nº 007771**

ANÁLISIS DE AGUA - RUTINA

SOLICITANTE : MANUEL ALVAREZ VERA
PROYECTO : Caracterización de microorganismos eficientes de tres pisos altitudinales de Azuay Ecuador y su influencia en el cultivo de fresa.
PROCEDENCIA : Agua de riego Unalm
RESPONSABLE ANALISIS : Ing. Nore Arévalo Flores
FECHA DE ANALISIS : La Molina, 09 de marzo del 2017

Nº LABORATORIO	7771
Nº DE CAMPO	Agua
CE dS/m	0.43
pH	8.02
Calcio meq/l	1.77
Magnesio meq/l	0.48
Sodio meq/l	1.86
Potasio meq/l	0.11
SUMA DE CATIONES	4.22
Cloruro meq/l	0.93
Sulfato meq/l	1.58
Bicarbonato meq/l	1.91
Nitratos meq/l	0.01
Carbonatos meq/l	0.00
SUMA DE ANIONES	4.44
SAR	1.75
CLASIFICACION	C2-S1
Boro ppm	0.31
Dureza total mgCaCO3/L	112.61
Alcalinidad total mgCaCO3/L	95.70
Sólidos suspendidos mg/L	22.50
Turbidez NTU	43.70

LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUA Y SUELO

 Ing. Msc. Teresa Velásquez Bejarano
 JEFE DE LABORATORIO



ANEXO 10: Resultados análisis microbiológico de agua para riego de fresas.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
Teléfono: 6147800 anexo 274 - 968811831



INFORME DE ENSAYO N° 1703108 LMT

SOLICITANTE : MANUEL ALVAREZ VERA

DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO

MUESTRA : AGUA DE RIEGO UNALM
1703108)

PROCEDENCIA : UNALM
TIPO DE ENVASE : Botella de plástico
CANTIDAD DE MUESTRA : 01 muestra x 01 und. x 600 mL aprox.
ESTADO Y CONDICIÓN : En buen estado y cerrado
FECHA DE MUESTREO : 2017 - 03 - 09
FECHA DE RECEPCIÓN : 2017 - 03 - 09
FECHA DE INICIO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 09
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 16

RESULTADOS DE ANALISIS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Análisis Microbiológico	Muestra 1703108
¹ Enumeración de coliformes totales (NMP/100 ml)	28 x 10 ²
¹ Enumeración de coliformes fecales (NMP/100 ml)	11 x 10 ²
¹ Enumeración de <i>Escherichia coli</i> (NMP/100 ml)	49 x 10
² Enumeración de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NMP/100 ml)	49 x 10

Nota: El valor <1.8 indica ausencia de microorganismos en ensayo.

Métodos:

¹SMEWW 21st Ed. 2005, Part 9221. APHA-AWWA-WEF.

²SMEWW 21st Ed. 2005, Part 9213. APHA-AWWA-WEF.

Observaciones:

Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.

Validez del documento:

Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.

La Molina, 17 de marzo de 2017

DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana
y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina

Teléfono: 614 7800 anexo 274

E-mail: lmt@lamolina.edu.pe



LABORATORIO DE ECOLOGIA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGIA "MARINO TABUSSO"

□ (511) 614-7800 anexo 274 - Fax (511) 349-2805 - E-mail: lmt@lamolina.edu.pe
Apartado Postal 456 - Lima 12 - PERU

ANEXO 11: Resultados de análisis de vermicompost



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



INFORME DE ANALISIS DE MATERIA ORGANICA

SOLICITANTE : UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA
PROCEDENCIA : LIMA
MUESTRA DE : HUMUS DE LOMBRIZ
REFERENCIA : H.R. 58118
FECHA : 19/04/17

N° LAB	CLAVES	pH	C.E. dS/m	M.O. %	N %	P ₂ O ₅ %	K ₂ O %
205	Manuel Alvarez	6.79	5.07	34.62	1.79	2.26	0.49

N° LAB	CLAVES	CaO %	MgO %	Hd %	Na %
205	Manuel Alvarez	9.80	1.60	52.74	0.17



Sady García Bendejú
Jefe de Laboratorio

ANEXO 12: Resultados del análisis fitopatológico de una muestra de planta de fresa, tratamiento T1



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología

Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12

Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023

e-mail: clinica@lamolina.edu.pe



La Molina, 24 de marzo de 2017
FI-AF 105-2017 MHZ 010
JFT 105

Sres.
MANUEL ALVAREZ VERA
La Molina
Presente.-

Tesista de Doctorado de Ciencias Ambientales

De nuestra consideración:

El resultado del análisis fitopatológico de una muestra de plantas en desarrollo de fresa var. San Andreas, con síntomas de flacidez foliar, necrosis de hojas inferiores y pudrición seca de corona, procedente del Campo de Biología-Genética, Universidad Nacional Agraria La Molina, La Molina - Lima Metropolitana, es el siguiente:

1. ANÁLISIS DEL TEJIDO VEGETAL.

MUESTRA	METODO corona	RESULTADO
(Tratamiento 1)	Examen Microscópico	Negativo
	Medio PDAA	<i>Macrophomina sp.</i>
	Medio PARB	Negativo

2. DIAGNOSTICO.

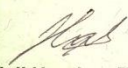
De las muestras de plantas de fresa que usted envió al laboratorio. Se ha detectado la presencia de *Macrophomina sp.* como agente causal de la sintomatología.

3. RECOMENDACIONES.

- Evite sembrar en campos altamente infestados o donde anteriormente se sembró fresa.
- Evitar estresar a la planta por falta o exceso de agua, falta de algún nutriente, entre otros.
- Rotación de cultivos, evitar sembrar fresa consecutivamente para evitar el incremento del inóculo.
- Aplicación de fungicida de manera preventiva antes de trasplantar a campo definitivo, considerando los siguientes Ingredientes activos: Carbendazim, Methil Thiophanato+ thiram, Tebuconazole. Realizarlas a las dosis y frecuencias indicadas en la etiqueta de los productos. Respete los tiempos de carencia de su comprador.

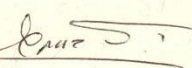
Nos despedimos de ustedes recordándoles que la Clínica de Diagnóstico está a su disposición para cualquier consulta.

Atentamente,


Ing. Medali Huarhua Zaquinaula
ESPECIALISTA
CLINICA DE DIAGNOSIS

MHZ /hmg
c.c. Archivo




Mg. Sc Walter Apaza Tapia
COORDINADOR
CLINICA DE DIAGNOSIS

ANEXO 13: Resultados del análisis fitopatológico de una muestra de planta de fresa, tratamiento T4



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Clinica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología

Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12

Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023

e-mail: clinica@lamolina.edu.pe



La Molina, 17 de Marzo de 2017
FI-AF 091-2017 LMC 016
JFT 091

Sr.
MANUEL ALVAREZ VERA
La Molina
Presente.-

Tesista de Doctorado de Ciencias Ambientales

De nuestra consideración:

El resultado del análisis fitopatológico de una muestra de plantas en desarrollo de fresa var. San Andreas, con síntomas de flacidez foliar y pudrición seca de corona, procedente del Campo de Biología-Genética, Universidad Nacional Agraria La Molina, La Molina - Lima Metropolitana, es el siguiente:

1. ANÁLISIS DEL TEJIDO VEGETAL.

MUESTRA	METODO	RESULTADO
T4	Examen Microscópico	Negativo
	Medio PDAA	<i>Macrophomina</i> sp. <i>Fusarium solani</i>
	Medio PARB	Negativo

2. DIAGNOSTICO.


Realizado el análisis fitopatológico de una muestra de plantas en desarrollo de fresa var. San Andreas, con síntomas de flacidez foliar y pudrición seca de corona, se detectó la presencia de *Macrophomina* sp. y *Fusarium solani*.

3. RECOMENDACIONES.

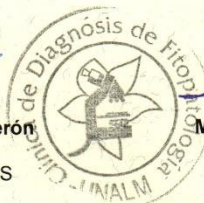
- Evite usar suelos contaminados
- Siembre plantones sanos procedentes de plantas madres sanas.
- En épocas calurosas evite el estrés en las plantas
- Maneje adecuadamente el riego
- Aplicar biocontrolador en el suelo donde se tendrá el cultivo de fresa e igualmente a la base del plantón al momento del trasplante.
- Elimine todo material enfermo
- Desinfecte las herramientas de trabajo


Nos despedimos de ustedes recordándoles que la Clínica de Diagnóstico está a su disposición para cualquier consulta.

Atentamente,


Dra. Leonor Mattos Calderón
ESPECIALISTA
CLINICA DE DIAGNOSIS

LMC/hmg
c.c. Archivo




Mg. Sc Walter Apaza Tapia
COORDINADOR
CLINICA DE DIAGNOSIS

ANEXO 14: Resultados del análisis fitopatológico de una muestra de planta de fresa, tratamiento T4



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología

Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12

Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023

e-mail: clinica@lamolina.edu.pe



La Molina, 24 de marzo de 2017
FI-AF 108-2017 MHZ 011
JFT 108

Sres.
MANUEL ALVAREZ VERA
La Molina
Presente.-

Tesista de Doctorado de Ciencias Ambientales

De nuestra consideración:

El resultado del análisis fitopatológico de una muestra de plantas en desarrollo de fresa var. San Andreas, con síntomas de flacidez foliar y pudrición seca de corona, procedente del Campo de Biología-Genética, Universidad Nacional Agraria La Molina, La Molina - Lima Metropolitana, es el siguiente:

1. ANÁLISIS DEL TEJIDO VEGETAL.

MUESTRA	METODO corona	RESULTADO
(Tratamiento 4)	Examen Microscópico	Negativo
	Medio PDAA	<i>Macrophomina</i> sp.
	Medio PARB	Negativo

2. DIAGNOSTICO.


De las muestras de plantas de fresa que usted envió al laboratorio. Se ha detectado la presencia de *Macrophomina* sp. como agente causal de la sintomatología.

3. RECOMENDACIONES.


- Evite sembrar en campos altamente infestados o donde anteriormente se sembró fresa.
- Evitar estresar a la planta por falta o exceso de agua, falta de algún nutriente, entre otros.
- Rotación de cultivos, evitar sembrar fresa consecutivamente para evitar el incremento del inóculo.
- Aplicación de fungicida de manera preventiva antes de trasplantar a campo definitivo, considerando los siguientes Ingredientes activos: Carbendazim, Methil Thiophanato+ thiram, Tebuconazole. Realizarlas a las dosis y frecuencias indicadas en la etiqueta de los productos. Respete los tiempos de carencia de su comprador.

Nos despedimos de ustedes recordándoles que la Clínica de Diagnóstico está a su disposición para cualquier consulta.

Atentamente,


Ing. Medali Huarhua Zaquinaula
ESPECIALISTA
CLINICA DE DIAGNOSIS

MHZ /hmg
c.c. Archivo


Mg. Sc Walter Apaza Tapia
COORDINADOR
CLINICA DE DIAGNOSIS



ANEXO 15: Resultados del análisis fitopatológico de muestras de plantas de fresa de los tratamientos T7 y T8.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología

Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12

Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023

e-mail: clinica@lamolina.edu.pe



La Molina, 18 de abril de 2017
FI-AF 130-2017 MHZ 014
JFT 130

Sres.
MANUEL ALVAREZ VERA
La Molina
Presente.-

Tesista de Doctorado de Ciencias Ambientales

De nuestra consideración:

El resultado del análisis fitopatológico de dos muestras de plantas en desarrollo de fresa var. San Andreas (Tratamiento 7, Tratamiento 8), procedente de campo de Biología-Genética, Universidad Nacional Agraria La Molina, La Molina - Lima Metropolitana, es el siguiente:

1. ANÁLISIS DEL TEJIDO VEGETAL.

MUESTRA Plantas	SINTOMAS	METODO corona	RESULTADO
TRATAMIENTO 7	Necrosis moderada del sistema foliar; pudrición moderada de coronas	Examen Microscópico	Negativo
		Medio PDAA	<i>Macrophomina</i> sp. <i>Fusarium solani</i>
		Medio PARB	Negativo
TRATAMIENTO 8	Necrosis casi total de hojas; pudrición avanzada de coronas	Examen Microscópico	Negativo
		Medio PDAA	<i>Macrophomina</i> sp. <i>Fusarium solani</i>
		Medio PARB	Negativo

2. DIAGNOSTICO.


En ambas muestras de plantas de fresa (Tratamiento 7 y Tratamiento 8) que usted envió al laboratorio. Se ha detectado la presencia de *Macrophomina* sp. como agente causal de la sintomatología. *Fusarium solani* se encuentra como organismo secundario.

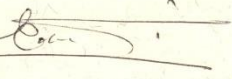
3. RECOMENDACIONES.

- Evite sembrar en campos altamente infestados o donde anteriormente se sembró fresa.
- Evite siembra en altas temperaturas que no son favorables para la fresa.
- Evitar estresar a la planta por falta o exceso de agua, falta de algún nutriente, entre otros.
- Rotación de cultivos, evitar sembrar fresa consecutivamente para evitar el incremento del inóculo.
- Aplicación de fungicida de manera preventiva antes de trasplantar a campo definitivo, considerando los siguientes Ingredientes activos: Carbendazim, Methil Thiophanato+ thiram, Tebuconazole. Realizarlas a las dosis y frecuencias indicadas en la etiqueta de los productos. Respete los tiempos de carencia de su comprador.

Nos despedimos de ustedes recordándoles que la Clínica de Diagnóstico está a su disposición para cualquier consulta.

Atentamente,


Ing. Medali Huarhua Zaquinaula
ESPECIALISTA
CLINICA DE DIAGNOSIS


Mg. Sc Walter Apaza Tapia
COORDINADOR
CLINICA DE DIAGNOSIS

MHZ /hmg
c.c. Archivo

ANEXO 16: Resultados de la caracterización del suelo 120 días después de establecido el cultivo



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
 FACULTAD DE AGRONOMIA - DEPARTAMENTO DE SUELOS
 LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



ANALISIS DE SUELOS : CARACTERIZACION

Solicitante : UNIVERSIDAD CATOLICA DE CUENCA

Departamento : LIMA
 Distrito : LA MOLINA
 Referencia : H.R. 57982-043C-17

Fact.: 385

Provincia : LIMA
 Predio :
 Fecha : 28/03/17

Lab	Número de Muestra		C.E. (1:1) dS/m	pH (1:1)	CaCO ₃ %	M.O. %	P ppm	K ppm	Análisis Mecánico			Clase Textural			CIC	Cationes Cambiables meq/100g					Suma de Cationes	Suma de Bases	% Sat. De Bases
	Claves								Arena	Limo	Arcilla	%	%	%		Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ³⁺ + H ⁺			
2580	T1		7.27	2.93	1.80	2.76	385.3	678	60	22	18	Fr.A.	17.60	12.83	3.33	1.07	0.37	0.00	17.60	17.60	100		
2581	T2		7.66	1.99	1.90	3.18	176.6	594	62	20	18	Fr.A.	16.32	12.01	2.92	1.09	0.30	0.00	16.32	16.32	100		
2582	T3		7.86	1.75	1.90	2.07	131.1	628	56	24	20	Fr.Ar.A.	15.68	12.09	2.32	1.00	0.28	0.00	15.68	15.68	100		
2583	T4		7.90	1.89	2.00	1.15	68.4	577	56	24	20	Fr.Ar.A.	14.40	10.74	2.28	1.10	0.28	0.00	14.40	14.40	100		

A = Arena ; A.Fr. = Arena Franca ; Fr.A. = Franco Arenoso ; Fr. = Franco ; Fr.L. = Franco Limoso ; L = Limoso ; Fr.Ar.A. = Franco Arcilloso ; Fr.Ar.L. = Franco Arcillo Limoso ; Ar.A. = Arcillo Arenoso ; Ar.L. = Arcillo Limoso ; Ar. = Arcilloso

Número de Muestra		N
Lab.	Claves	
2580	T1	0.25
2581	T2	0.24
2582	T3	0.18
2583	T4	0.17

LABORATORIO DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES
 LA MOLINA
 LIMA
 Jefe del Laboratorio



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
 FACULTAD DE AGRONOMIA - DEPARTAMENTO DE SUELOS
 LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



ANALISIS DE SUELOS : CARACTERIZACION

Solicitante : UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Departamento : LIMA
 Distrito : LA MOLINA
 Referencia : H.R. 57982-043C-17

Provincia : LIMA
 Predio :
 Fecha : 28/03/17

Fact.: 385

Lab	Número de Muestra Claves	pH (1:1)	C.E. (1:1) dS/m	CaCO ₃ %	M.O. %	P ppm	K ppm	Análisis Mecánico			CIC	Cationes Cambiables meq/100g			Suma de Cationes	Suma de Bases	% Sat. De Bases			
								Arena %	Limo %	Arcilla %		Ca ²⁺ Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺ + Al ³⁺ + H ⁺						
2584	T5	7.70	1.79	2.00	2.63	175.8	634	56	24	20	Fr.Ar.A.	13.12	9.30	2.58	0.96	0.27	0.00	13.12	13.12	100
2585	T6	7.73	1.65	1.90	3.51	208.8	622	56	24	20	Fr.Ar.A.	16.32	11.69	3.08	1.25	0.30	0.00	16.32	16.32	100
2586	T7	7.95	1.09	1.90	1.25	77.8	584	56	24	20	Fr.Ar.A.	13.60	10.01	2.27	1.07	0.26	0.00	13.60	13.60	100
2587	T8	7.56	1.42	1.80	4.37	273.9	646	60	22	18	Fr.A.	18.08	13.37	3.17	1.23	0.32	0.00	18.08	18.08	100

A = Arena ; A.Fr. = Arena Franca ; Fr.A. = Franco Arenoso ; Fr. = Franco ; Fr.L. = Franco Limoso ; L = Limoso ; Fr.Ar.A. = Franco Arcillo Arenoso ; Fr.Ar. = Franco Arcilloso ;
 Fr.Ar.L. = Franco Arcillo Limoso ; Ar.A. = Arcillo Arenoso ; Ar.L. = Arcillo Limoso ; Ar. = Arcilloso

Número de Muestra		N
Lab.	Claves	%
2584	T5	0.18
2585	T6	0.21
2586	T7	0.17
2587	T8	0.30

Dra. Saúl García Bendezu,
 Jefe del Laboratorio

ANEXO 17: Resultados del análisis fitopatológico del suelo de 8 tratamientos 120 días después de establecido el cultivo.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología

Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12

Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023

e-mail: clinica@lamolina.edu.pe



La Molina, 18 de abril de 2017
FI-AF 131-2017 LMC 021
JFT 131

Sres.
MANUEL ALVAREZ VERA
La Molina
Presente.-

Tesista de Doctorado de Ciencias Ambientales

De nuestra consideración:

El resultado del análisis fitopatológico de ocho muestras de Suelo de fresa var. Andreas, procedente de Campo de Biología-Genética, Universidad Nacional Agraria La Molina, La Molina; Lima Metropolitana, es el siguiente:

- METODO.**
Siembra de diluciones seriadas de suelo (10^{-1} hasta 10^{-3}) en el medio de cultivo PDAA (hongos) y PARB (pseudohongos). La temperatura de incubación fue de 24°C por 5 días
- RESULTADO.**

MUESTRA	HONGOS	UFC*/ gr de suelo
TRATAMIENTO 1	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus</i> sp. <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Cladosporium</i> sp.	1.5×10^2 1.0×10^3 0.5×10^2 5.0×10^4
TRATAMIENTO 2	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp.	2.0×10^2 1.0×10^3 5.0×10^4
TRATAMIENTO 3	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.	0.5×10^4 2.0×10^3 0.5×10^4
TRATAMIENTO 4	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.	1.5×10^2 5.0×10^3 0.5×10^4
TRATAMIENTO 5	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp.	1.0×10^2 1.0×10^3 1.0×10^3
TRATAMIENTO 6	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Fusarium solani</i>	4.0×10^2 0.5×10^2 0.5×10^4 0.5×10^4
TRATAMIENTO 7	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.	0.5×10^3 0.5×10^3 0.5×10^3
TRATAMIENTO 8	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp.	0.5×10^4 0.5×10^3 0.5×10^3

*UFC=unidad formadora de colonia



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Clinica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología

Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12

Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023

e-mail: clinica@lamolina.edu.pe



3. DIAGNOSTICO.

Realizando el análisis fitopatológico de ocho muestras de Suelo de fresa var. Andreas se detectó en su gran mayoría hongos secundarios contaminantes como la presencia de *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp. y *Cladosporium* sp., variando sus UFC*/gr de suelo de 10^2 a 10^4 . Como hongos que eventualmente pueden causar daño en plantas de fresa se tienen a *Fusarium oxysporum* (Tratamiento 1) y *Fusarium solani* (Tratamiento 6).

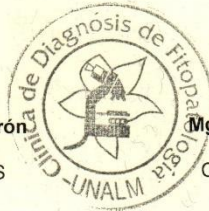
Estos resultados están en función a la muestra enviada a nuestro laboratorio.

Nos despedimos de ustedes recordándoles que la Clínica de Diagnóstico está a su disposición para cualquier consulta.

Atentamente,

Dra. Leonor Mattos Calderón
ESPECIALISTA
CLINICA DE DIAGNOSIS

LMC/hmg
c.c. Archivo



Mg. Sc Walter Apaza Tapia
COORDINADOR
CLINICA DE DIAGNOSIS

ANEXO 18: Resultados del análisis nematológico del suelo de 8 tratamientos 120 días después de establecido el cultivo.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Clinica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología

Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12

Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023

e-mail: clinica@lamolina.edu.pe



La Molina, 17 de mayo de 2017
FI-NEMA-040bio-2017

Señores:
Manuel Álvarez Vera
La Molina
Presente.

De mi consideración:

El resultado del análisis Nematológico de ocho muestras de suelo de fresa, procedente de Campo Biología Genética – La Molina, enviadas por ustedes a nuestra Clínica de Diagnóstico, fue:

MUESTRA	Nemátodos en el suelo	Nº. Indv/100 cc. de suelo	Bioensayo para <i>Meloidogyne</i>
T1	<i>Pratylenchus</i>	10	0
	<i>Aphelenchus</i>	20	
	<i>Dorylaimidos</i>	60	
	<i>Rhabditidos</i>	260	
T2	<i>Pratylenchus</i>	20	0
	<i>Aphelenchus</i>	80	
	<i>Dorylaimidos</i>	100	
	<i>Rhabditidos</i>	320	
T3	<i>Pratylenchus</i>	40	1
	<i>Aphelenchus</i>	80	
	<i>Dorylaimidos</i>	50	
	<i>Rhabditidos</i>	260	
T4	<i>Pratylenchus</i>	20	0
	<i>Aphelenchus</i>	160	
	<i>Dorylaimidos</i>	120	
	<i>Rhabditidos</i>	280	
T5	<i>Pratylenchus</i>	20	0
	<i>Aphelenchus</i>	40	
	<i>Dorylaimidos</i>	50	
	<i>Rhabditidos</i>	140	
T6	<i>Pratylenchus</i>	20	0
	<i>Aphelenchus</i>	60	
	<i>Dorylaimidos</i>	70	
	<i>Rhabditidos</i>	360	
T7	<i>Pratylenchus</i>	10	0
	<i>Aphelenchus</i>	60	
	<i>Dorylaimidos</i>	100	
	<i>Rhabditidos</i>	380	
T8	<i>Pratylenchus</i>	0	0
	<i>Aphelenchus</i>	240	
	<i>Dorylaimidos</i>	70	
	<i>Rhabditidos</i>	340	



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología

Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12
Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023
e-mail: clinica@lamolina.edu.pe



Los resultados han detectado la presencia de *Pratylenchus* y *Aphelenchus* como fitopatógenos de fresa

Pratylenchus es un nematodo importante en muchos cultivos, además, las poblaciones detectadas pueden considerarse medias a bajas.

Aphelenchus es un nematodo asociado de menor importancia, sin embargo, las poblaciones detectadas podemos considerarlas como bajas, medias y elevadas en algunos lotes.

Los *Dorylaimidos* y *Rhabditidos* son habitantes comunes del suelo y no afectan a los cultivos.

Las altas poblaciones detectadas sugieren el uso de enmiendas en esos campos.


Considere el uso de productos para el control de nematodos sobre todo al momento del trasplante para evitar el establecimiento de estos fitopatógenos en las raíces durante los primeros 60 días.

Resultados del bioensayo para *Meloidogyne*

Los resultados han detectado la presencia de *Meloidogyne* en la muestra T3, ocasionando niveles de modulación bajos (nivel 1, escala del 0 al 5). En las otras muestras no se ha detectado este nematodo.

Nos despedimos de ustedes recordándoles que la Clínica de Diagnóstico está a su disposición para cualquier consulta.

Muy atentamente,


Ing. Alfonso Palomo Herrera
Jefe, Laboratorio de Nematología
Facultad Agronomía



Archivo
APH/hmg

ANEXO 19: Resultados del análisis microbiológico del suelo 120 días después de establecido el cultivo



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
Teléfono: 6147800 anexo 274



INFORME DE ENSAYO N° 1703145 - LMT

SOLICITANTE : MANUEL ALVAREZ VERA

DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO

MUESTRA : SUELO
1703145) T1

PROCEDENCIA : UNALM
TIPO DE ENVASE : Bolsa de plástica
CANTIDAD DE MUESTRA : 01 muestra x 01 und. x 1 000 g. aprox.
ESTADO Y CONDICIÓN : En buen estado y cerrado
FECHA DE MUESTREO : 2017 - 03 - 22
FECHA DE RECEPCIÓN : 2017 - 03 - 22
FECHA DE INICIO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 22
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 30

RESULTADOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Análisis Microbiológico	Muestra 1703145
¹ Recuento de <i>Lactobacillus</i> sp. (UFC/g)	24 x 10 ⁴
¹ Recuento de <i>Bacillus</i> sp. (UFC/g)	21 x 10 ⁵
¹ Recuento de mohos (UFC/g)	51 x 10 ³
² Enumeración de <i>Pseudomonas</i> sp. (NMP/g)	53 x 10 ²
² Recuento de actinomicetos (UFC/g)	51 x 10 ⁵

NOTA: El valor < 10² indica ausencia de microorganismos en ensayo.

Métodos:

¹International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1983. 2da Ed. Vol 1 Part II, (Trad. 1988) Reimp. 2000. Editorial Acribia.

²American Public Health Association. 1992. Compendium of methods for the Microbiological Examination of foods. 3^{ra} Ed. Chapter 13.

³Zapater J. 1975. Evaluación en el maíz del coeficiente rizósfera-suelo (R/S) referidos a bacterias libres fijadoras de N₂. Anales científicos de la UNALM 13:45-57.

⁴Anderson J. 1982. Soil respiration. En: Page A., Miller R., Kenney D. (Eds.) Methods of Soil Analysis Part II. Chemical and Microbiological

Observaciones:

Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.

Validez del documento:

Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.

La Molina, 04 de abril de 2017

DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana
y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina

Teléfono: 6147800 anexo 274

E-mail: imt@lamolina.edu.pe



LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGÍA "MARINO TABUSSO"

☐ (511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: imt@lamolina.edu.pe



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
Teléfono: 6147800 anexo 274



INFORME DE ENSAYO N° 1703146 - LMT

SOLICITANTE : MANUEL ALVAREZ VERA

DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO

MUESTRA : SUELO
1703146) T2

PROCEDENCIA : UNALM
TIPO DE ENVASE : Bolsa de plástica
CANTIDAD DE MUESTRA : 01 muestra x 01 und. x 1 000 g. aprox.
ESTADO Y CONDICIÓN : En buen estado y cerrado
FECHA DE MUESTREO : 2017 - 03 - 22
FECHA DE RECEPCIÓN : 2017 - 03 - 22
FECHA DE INICIO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 22
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 30

RESULTADOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Análisis Microbiológico	Muestra 1703146
¹ Recuento de <i>Lactobacillus</i> sp. (UFC/g)	13 x 10 ⁵
¹ Recuento de <i>Bacillus</i> sp. (UFC/g)	97 x 10 ⁴
¹ Recuento de mohos (UFC/g)	51 x 10 ³
² Enumeración de <i>Pseudomonas</i> sp. (NMP/g)	11 x 10 ³
² Recuento de actinomicetos (UFC/g)	18 x 10 ⁶

NOTA: El valor < 10² indica ausencia de microorganismos en ensayo.

Métodos:

¹International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1983. 2da Ed. Vol 1 Part II, (Trad. 1988) Reimp. 2000. Editorial Acribia.

²American Public Health Association. 1992. Compendium of methods for the Microbiological Examination of foods. 3^{ra} Ed. Chapter 13.

³Zapater J. 1975. Evaluación en el maíz del coeficiente rizósfera-suelo (R/S) referidos a bacterias libres fijadoras de N₂. Anales científicos de la UNALM 13:45-57.

⁴Anderson J. 1982. Soil respiration. En: Page A., Miller R., Kenney D. (Eds.) Methods of Soil Analysis Part II. Chemical and Microbiological

Observaciones:

Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.

Validez del documento:

Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.

La Molina, 04 de abril de 2017

DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana
y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina

Teléfono: 6147800 anexo 274

E-mail: lmt@lamolina.edu.pe



LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGÍA "MARINO TABUSSO"

☐ (511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: lmt@lamolina.edu.pe



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
Teléfono: 6147800 anexo 274



INFORME DE ENSAYO Nº 1703147 - LMT

SOLICITANTE : MANUEL ALVAREZ VERA

DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO

MUESTRA : SUELO
1703147) T3

PROCEDENCIA : UNALM
TIPO DE ENVASE : Bolsa de plástica
CANTIDAD DE MUESTRA : 01 muestra x 01 und. x 1 000 g. aprox.
ESTADO Y CONDICIÓN : En buen estado y cerrado
FECHA DE MUESTREO : 2017 - 03 - 22
FECHA DE RECEPCIÓN : 2017 - 03 - 22
FECHA DE INICIO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 22
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 30

RESULTADOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Análisis Microbiológico	Muestra 1703147
¹ Recuento de <i>Lactobacillus sp.</i> (UFC/g)	59 x 10 ⁴
¹ Recuento de <i>Bacillus sp.</i> (UFC/g)	14 x 10 ⁵
¹ Recuento de mohos (UFC/g)	78 x 10 ³
² Enumeración de <i>Pseudomonas sp.</i> (NMP/g)	16 x 10 ²
² Recuento de actinomicetos (UFC/g)	19 x 10 ⁵

NOTA: El valor < 10² indica ausencia de microorganismos en ensayo.

Métodos:

¹International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1983. 2da Ed. Vol 1 Part II, (Trad. 1988) Reimp. 2000. Editorial Acribia.

²American Public Health Association. 1992. Compendium of methods for the Microbiological Examination of foods. 3rd Ed. Chapter 13.

³Zapater J. 1975. Evaluación en el maíz del coeficiente rizósfera-suelo (R/S) referidos a bacterias libres fijadoras de N₂. Anales científicos de la UNALM 13:45-57.

⁴Anderson J. 1982. Soil respiration. En: Page A., Miller R., Kenney D. (Eds.) Methods of Soil Analysis Part II. Chemical and Microbiological

Observaciones:

Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.

Validez del documento:

Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.

La Molina, 04 de abril de 2017

DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana
y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina

Teléfono: 6147800 anexo 274

E-mail: lmt@lamolina.edu.pe



LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGÍA "MARINO TABUSSO"

☐ (511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: lmt@lamolina.edu.pe



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
Teléfono: 6147800 anexo 274



INFORME DE ENSAYO N° 1703148 - LMT

SOLICITANTE : MANUEL ALVAREZ VERA

DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO

MUESTRA : SUELO
1703148) T4

PROCEDENCIA : UNALM
TIPO DE ENVASE : Bolsa de plástica
CANTIDAD DE MUESTRA : 01 muestra x 01 und. x 1 000 g. aprox.
ESTADO Y CONDICIÓN : En buen estado y cerrado
FECHA DE MUESTREO : 2017 - 03 - 22
FECHA DE RECEPCIÓN : 2017 - 03 - 22
FECHA DE INICIO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 22
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 30

RESULTADOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Análisis Microbiológico	Muestra 1703148
¹ Recuento de <i>Lactobacillus</i> sp. (UFC/g)	54 x 10 ⁴
¹ Recuento de <i>Bacillus</i> sp. (UFC/g)	42 x 10 ⁵
¹ Recuento de mohos (UFC/g)	79 x 10 ³
² Enumeración de <i>Pseudomonas</i> sp. (NMP/g)	18 x 10 ²
² Recuento de actinomicetos (UFC/g)	10 x 10 ⁵

NOTA: El valor < 10² indica ausencia de microorganismos en ensayo.

Métodos:

¹International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1983. 2da Ed. Vol 1 Part II, (Trad. 1988) Reimp. 2000. Editorial Acribia.

²American Public Health Association. 1992. Compendium of methods for the Microbiological Examination of foods. 3rd Ed. Chapter 13.

³Zapater J. 1975. Evaluación en el maíz del coeficiente rizósfera-suelo (R/S) referidos a bacterias libres fijadoras de N₂. Anales científicos de la UNALM 13:45-57.

⁴Anderson J. 1982. Soil respiration. En: Page A., Miller R., Kenney D. (Eds.) Methods of Soil Analysis Part II. Chemical and Microbiological

Observaciones:

Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.

Validez del documento:

Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.

La Molina, 04 de abril de 2017



Doris Zúñiga Dávila

DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana
y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina

Teléfono: 6147800 anexo 274

E-mail: imt@lamolina.edu.pe

LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGÍA "MARINO TABUSSO"

□ (511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: imt@lamolina.edu.pe



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
Teléfono: 6147800 anexo 274



INFORME DE ENSAYO N° 1703149 - LMT

SOLICITANTE : MANUEL ALVAREZ VERA

DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO

MUESTRA : SUELO
1703149) T5

PROCEDENCIA : UNALM
TIPO DE ENVASE : Bolsa de plástica
CANTIDAD DE MUESTRA : 01 muestra x 01 und. x 1 000 g. aprox.
ESTADO Y CONDICIÓN : En buen estado y cerrado
FECHA DE MUESTREO : 2017 - 03 - 22
FECHA DE RECEPCIÓN : 2017 - 03 - 22
FECHA DE INICIO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 22
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 30

RESULTADOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Análisis Microbiológico	Muestra 1703149
¹ Recuento de <i>Lactobacillus</i> sp. (UFC/g)	51 x 10 ⁴
¹ Recuento de <i>Bacillus</i> sp. (UFC/g)	27 x 10 ⁵
¹ Recuento de mohos (UFC/g)	51 x 10 ³
² Enumeración de <i>Pseudomonas</i> sp. (NMP/g)	27 x 10 ³
² Recuento de actinomicetos (UFC/g)	49 x 10 ⁵

NOTA: El valor < 10² indica ausencia de microorganismos en ensayo.

Métodos:

¹International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1983. 2da Ed. Vol 1 Part II, (Trad. 1988) Reimp. 2000. Editorial Acribia.

²American Public Health Association. 1992. Compendium of methods for the Microbiological Examination of foods. 3rd Ed. Chapter 13.

³Zapater J. 1975. Evaluación en el maíz del coeficiente rizósfera-suelo (R/S) referidos a bacterias libres fijadoras de N₂. Anales científicos de la UNALM 13:45-57.

⁴Anderson J. 1982. Soil respiration. En: Page A., Miller R., Kenney D. (Eds.) Methods of Soil Analysis Part II. Chemical and Microbiological

Observaciones:

Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.

Validez del documento:

Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.

La Molina, 04 de abril de 2017




DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana
y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina

Teléfono: 6147800 anexo 274
E-mail: imt@lamolina.edu.pe

LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGÍA "MARINO TABUSSO"

☐ (511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: imt@lamolina.edu.pe



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
Teléfono: 6147800 anexo 274



INFORME DE ENSAYO Nº 1703150 - LMT

SOLICITANTE : MANUEL ALVAREZ VERA

DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO

MUESTRA : SUELO
1703150) T6

PROCEDENCIA : UNALM
TIPO DE ENVASE : Bolsa de plástica
CANTIDAD DE MUESTRA : 01 muestra x 01 und. x 1 000 g. aprox.
ESTADO Y CONDICIÓN : En buen estado y cerrado
FECHA DE MUESTREO : 2017 - 03 - 22
FECHA DE RECEPCIÓN : 2017 - 03 - 22
FECHA DE INICIO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 22
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 30

RESULTADOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Análisis Microbiológico	Muestra 1703150
¹ Recuento de <i>Lactobacillus</i> sp. (UFC/g)	56 x 10 ⁴
¹ Recuento de <i>Bacillus</i> sp. (UFC/g)	37 x 10 ⁵
¹ Recuento de mohos (UFC/g)	81 x 10 ³
² Enumeración de <i>Pseudomonas</i> sp. (NMP/g)	11 x 10 ²
² Recuento de actinomicetos (UFC/g)	31 x 10 ⁵

NOTA: El valor < 10² indica ausencia de microorganismos en ensayo.

Métodos:

¹International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1983. 2da Ed. Vol 1 Part II, (Trad. 1988) Reimp. 2000. Editorial Acribia.

²American Public Health Association. 1992. Compendium of methods for the Microbiological Examination of foods. 3rd Ed. Chapter 13.

³Zapater J. 1975. Evaluación en el maíz del coeficiente rizósfera-suelo (R/S) referidos a bacterias libres fijadoras de N₂. Anales científicos de la UNALM 13:45-57.

⁴Anderson J. 1982. Soil respiration. En: Page A., Miller R., Kenney D. (Eds.) Methods of Soil Analysis Part II. Chemical and Microbiological

Observaciones:

Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.

Validez del documento:

Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.

La Molina, 04 de abril de 2017

DRA. DORIS ZÚNIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana
y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina

Teléfono: 6147800 anexo 274

E-mail: imt@lamolina.edu.pe



LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGÍA "MARINO TABUSSO"

☐ (511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: imt@lamolina.edu.pe



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
Teléfono: 6147800 anexo 274



INFORME DE ENSAYO N° 1703151 - LMT

SOLICITANTE : MANUEL ALVAREZ VERA

DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO

MUESTRA : SUELO
1703151) T7

PROCEDENCIA : UNALM
TIPO DE ENVASE : Bolsa de plástica
CANTIDAD DE MUESTRA : 01 muestra x 01 und. x 1 000 g. aprox.
ESTADO Y CONDICIÓN : En buen estado y cerrado
FECHA DE MUESTREO : 2017 - 03 - 22
FECHA DE RECEPCIÓN : 2017 - 03 - 22
FECHA DE INICIO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 22
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 30

RESULTADOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Análisis Microbiológico	Muestra 1703151
¹ Recuento de <i>Lactobacillus</i> sp. (UFC/g)	33 x 10 ⁴
¹ Recuento de <i>Bacillus</i> sp. (UFC/g)	16 x 10 ⁵
¹ Recuento de mohos (UFC/g)	32 x 10 ³
² Enumeración de <i>Pseudomonas</i> sp. (NMP/g)	18 x 10 ²
² Recuento de actinomicetos (UFC/g)	23 x 10 ⁵

NOTA: El valor < 10² indica ausencia de microorganismos en ensayo.

Métodos:

¹International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1983. 2da Ed. Vol 1 Part II, (Trad. 1988) Reimp. 2000. Editorial Acribia.

²American Public Health Association. 1992. Compendium of methods for the Microbiological Examination of foods. 3^{ra} Ed. Chapter 13.

³Zapater J. 1975. Evaluación en el maíz del coeficiente rizósfera-suelo (R/S) referidos a bacterias libres fijadoras de N₂. Anales científicos de la UNALM 13:45-57.

⁴Anderson J. 1982. Soil respiration. En: Page A., Miller R., Kenney D. (Eds.) Methods of Soil Analysis Part II. Chemical and Microbiological

Observaciones:

Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.

Validez del documento:

Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.

La Molina, 04 de abril de 2017

DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana
y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina

Teléfono: 6147800 anexo 274

E-mail: imt@lamolina.edu.pe



LABORATORIO DE ECOLOGIA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGIA "MARINO TABUSSO"

☐ (511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: imt@lamolina.edu.pe



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
Teléfono: 6147800 anexo 274



INFORME DE ENSAYO N° 1703152 - LMT

SOLICITANTE : MANUEL ALVAREZ VERA

DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO

MUESTRA : SUELO
1703152) T8

PROCEDENCIA : UNALM
TIPO DE ENVASE : Bolsa de plástica
CANTIDAD DE MUESTRA : 01 muestra x 01 und. x 1 000 g. aprox.
ESTADO Y CONDICIÓN : En buen estado y cerrado
FECHA DE MUESTREO : 2017 - 03 - 22
FECHA DE RECEPCIÓN : 2017 - 03 - 22
FECHA DE INICIO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 22
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO : 2017 - 03 - 30

RESULTADOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Análisis Microbiológico	Muestra 1703152
¹ Recuento de <i>Lactobacillus</i> sp. (UFC/g)	10 x 10 ⁴
¹ Recuento de <i>Bacillus</i> sp. (UFC/g)	40 x 10 ⁵
¹ Recuento de mohos (UFC/g)	36 x 10 ³
² Enumeración de <i>Pseudomonas</i> sp. (NMP/g)	54 x 10 ²
² Recuento de actinomicetos (UFC/g)	57 x 10 ⁴

NOTA: El valor < 10² indica ausencia de microorganismos en ensayo.

Métodos:

¹International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1983. 2da Ed. Vol 1 Part II, (Trad. 1988) Reimp. 2000. Editorial Acribia.

²American Public Health Association. 1992. Compendium of methods for the Microbiological Examination of foods. 3^{ra} Ed. Chapter 13.

³Zapater J. 1975. Evaluación en el maíz del coeficiente rizósfera-suelo (R/S) referidos a bacterias libres fijadoras de N₂. Anales científicos de la UNALM 13:45-57.

⁴Anderson J. 1982. Soil respiration. En: Page A., Miller R., Kenney D. (Eds.) Methods of Soil Analysis Part II. Chemical and Microbiological

Observaciones:

Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.

Validez del documento:

Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.

La Molina, 04 de abril de 2017

DRA. DORIS ZÚNIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana
y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina

Teléfono: 6147800 anexo 274

E-mail: imt@lamolina.edu.pe



LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGÍA "MARINO TABUSSO"

☐ (511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: imt@lamolina.edu.pe

ANEXO 20: Resultados del análisis de los medios API 20 AUX V5.0 para levaduras

QUIMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERU - LIMA



API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FECHA
 COMENTARIO

PERFIL INACEPTABLE

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	2 0 3 1 2 3 1
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Candida thermophila			GLY 84%	INO 0%	SOR 90%	CEL 20%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Rhodotorula mucilaginosa 1			INO 0%	CEL 0%	MLZ 1%	RAF 87%

QUIMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERU - LIMA



API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FECHA
 COMENTARIO

PERFIL INACEPTABLE

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 6 2 6 7 3 0
Nota	POSIBILIDAD DE Candida tropicalis

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Candida famata			2KG 98%	ADO 98%	GAL 99%	TRE 96%
			MLZ 78%	RAF 75%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Trichosporon asahii			GLY 20%	2KG 100%	XLT 5%	GAL 100%
			SOR 1%	HYPH 95%		

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FECHA

COMENTARIO

PERFIL INACEPTABLE

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	2 0 6 0 5 0 1
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Candida spherica 2			GLY 88%	SOR 99%	NAG 1%	MAL 80%
			SAC 99%			

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Candida kefyr			XLT 25%	NAG 0%	SAC 100%	MLZ 1%
			RAF 96%	HYPH 75%		

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FECHA

COMENTARIO

GALERIA ININTERPRETABLE

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	0 0 0 0 0 0 0
Nota	

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FECHA

COMENTARIO

PERFIL DUDOSO

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	2 1 4 0 0 1 0
Nota	Rhodotorula: PIGMENTO ROSA ROJIZO O NARANJA ID.NO VALIDA ANTES 72H/POSIBILIDAD DE C.colliculosa ¡ID.NO VALIDA ANTES DE 72 H DE INCUBACION !

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Candida albicans 2	44.9	0.27	XYL 90%	XLT 75%	NAG 90%	HYPH 99%
Saccharomyces cerevisiae 1	40.8	0.31	2KG 0%	SAC 90%		
Candida magnoliae	8.1	0.23	GAL 10%	MAL 2%	SAC 97%	RAF 75%
Rhodotorula glutinis	5.5	0.19	SOR 84%	SAC 100%	MLZ 84%	RAF 96%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Candida dubliniensis	0.1	0.0	GLY 96%	ADO 99%	SOR 99%	HYPH 99%

Pruebas complementarias(s)	NITRATOas	MANITOLas	GLN	ACTIDIONA
Candida albicans	-	100%	98%	98%
Candida colliculosa	-	86%	0%	9%
Candida magnoliae	+	100%	0%	0%
Rhodotorula glutinis	+	54%	0%	8%
Saccharomyces cerevisiae	-	0%	2%	0%

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FECHA

COMENTARIO

BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	2 0 4 4 0 7 2
Nota	¡ID.NO VALIDA ANTES DE 72 H DE INCUBACION !

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Saccharomyces cerevisiae 2	97.7	0.81	MLZ 85%			

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Saccharomyces cerevisiae 1	2.1	0.59	MDG 13%	TRE 2%		

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA	FECHA
<input type="text"/>	5/10/16
COMENTARIO	
<input type="text"/>	

BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	2 0 4 4 0 3 2
Nota	¡ID.NO VALIDA ANTES DE 72 H DE INCUBACION !

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Saccharomyces cerevisiae 1	97.9	0.86	MDG	13%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Saccharomyces cerevisiae 2	1.9	0.53	TRE	99%	MLZ	85%

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA	FECHA
<input type="text"/>	5/10/16
COMENTARIO	
<input type="text"/>	

PERFIL INACEPTABLE

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	7 3 3 0 0 1 0
Nota	Rhodo:PIGMENTATION/POSIBILIDAD DE R.glutinis

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra							
Rhodotorula mucilaginosa 1			0	0%	GLY	5%	2KG	4%	ARA	15%
			SAC	100%	RAF	87%				

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA	FECHA
<input type="text"/>	5/10/16
COMENTARIO	
<input type="text"/>	

GALERIA ININTERPRETABLE

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	0 0 0 0 0 0
Nota	

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#)

[Exportar](#)

[Nuevo test](#)

[Modificar](#)

REFERENCIA

FECHA

COMENTARIO

BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	2 1 0 0 0 0
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Kloeckera spp	94.5	0.79	CEL	96%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Candida magnoliae	4.3	0.66	SAC	97%	RAF	75%

Pruebas complementarias(s)	37°C	TIAMINA		
Kloeckera apis	+	-		
Kloeckera apiculata	-	v		
Kloeckera japonica	-	+		

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#)

[Exportar](#)

[Nuevo test](#)

[Modificar](#)

REFERENCIA

FECHA

COMENTARIO

BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 7 0 0 1 0 0
Nota	Rhodotorula: PIGMENTO ROSA ROJIZO O NARANJA

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Rhodotorula minuta	99.6	0.37	SAC	95%	TRE	95%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Candida krusei/inconspicua	0.2	0.0	2KG	1%	ARA	1%

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FECHA

COMENTARIO

PERFIL INACEPTABLE

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	0 5 0 6 0 3 3
Nota	Rhodotorula: PIGMENTO ROSA ROJIZO O NARANJA POSIBILIDAD DE Cryptococcus gattii

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Cryptococcus albidus			GLU 100%	ARA 80%	CEL 99%	TRE 82%
Cryptococcus neoformans			GLU 100%	GAL 93%	INO 97%	NAG 88%
			TRE 75%			
Rhodotorula glutinis			GLU 100%	XYL 0%	MDG 3%	

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Cryptococcus uniguttulatus			GLU 100%	ARA 99%	INO 99%	NAG 100%
			TRE 75%	RAF 7%		

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FECHA

COMENTARIO

PERFIL INACEPTABLE

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 3 3 4 0 1 0
Nota	Rhodo:PIGMENTATION/POSIBILIDAD DE R.glutinis

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Rhodotorula mucilaginosa 1			GLY 5%	2KG 4%	ARA 15%	MDG 0%
			SAC 100%	RAF 87%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Candida thermophila			2KG 0%	ARA 1%	SOR 90%	MDG 1%
			SAC 90%	MLZ 97%		

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#)[Exportar](#)[Nuevo test](#)[Modificar](#)

REFERENCIA	FECHA
<input type="text"/>	<input type="text" value="5/10/16"/>
COMENTARIO	
<input type="text"/>	

PERFIL INACEPTABLE

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 1 0 7 4 1 1
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra							
Candida spherica 2			2KG	1%	GAL	94%	INO	0%	SAC	99%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra							
Cryptococcus albidus			GLY	0%	ARA	80%	XYL	81%	CEL	99%
			LAC	10%	SAC	100%	TRE	82%		

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#)[Exportar](#)[Nuevo test](#)[Modificar](#)

REFERENCIA	FECHA
<input type="text"/>	<input type="text" value="5/10/16"/>
COMENTARIO	
<input type="text"/>	

PERFIL INACEPTABLE

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 7 3 0 1 0 0
Nota	Rhodotorula: PIGMENTO ROSA ROJIZO O NARANJA

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra							
Rhodotorula minuta			ADO	3%	XLT	1%	SAC	95%	TRE	95%
			MLZ	95%						
Candida boidinii			2KG	1%	ARA	1%	SOR	95%	HYPH	99%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra							
Rhodotorula mucilaginosa 1			GLY	5%	2KG	4%	ARA	15%	NAG	0%
			SAC	100%	RAF	87%				

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FECHA

COMENTARIO

BAJA DISCRIMINACION

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 3 0 0 1 0 0
Nota	POSIBILIDAD DE C.lambica O C.lipolytica Rhodotorula: PIGMENTO ROSA ROJIZO O NARANJA

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra					
Candida krusei/inconspicua	69.2	0.26	2KG	1%	ARA	1%	HYPH	79%
Rhodotorula minuta	23.5	0.17	XYL	95%	SAC	95%	TRE	95% MLZ 95%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Candida zeylanoides	7.2	0.07	ARA	0%	SOR	99% HYPH 75%

Pruebas complementarias(s)	GLUCOSAac	ERYas	GLN	GRTas
Candida krusei	+	0%	6%	0%
Candida inconspicua	-	0%	83%	0%
Candida lambica	+	0%	89%	0%
Candida lipolytica	-	100%	3%	0%
Rhodotorula minuta	-	0%	0%	98%

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FECHA

COMENTARIO

BAJA DISCRIMINACION

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 0 0 0 0 0 0
Nota	POSIBILIDAD DE C.lambica O C.lipolytica POSIBILIDAD DE Geotrichum candidum

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Candida krusei/inconspicua	33.2	0.87	HYPH	79%		
Candida norvegensis	32.0	0.82	HYPH	93%		
Saprochaete capitata	22.2	0.8	HYPH	95%		
Candida glabrata	8.8	0.71	GLY	20%	TRE	94%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Prototheca wickerhamii	2.9	0.65	TRE	100%		

Pruebas complementarias(s)	ACTIDIONA	GLN	TIAMINA	GLUCOSAac
Candida glabrata	0%	0%	-	+
Candida krusei	3%	6%	+	+
Candida inconspicua	0%	83%	-	-
Candida lambica	0%	89%	-	+
Candida lipolytica	100%	3%	-	-
Candida norvegensis	0%	100%	-	v
Saprochaete capitata	92%	0%	-	-
Geotrichum candidum	100%	0%	+	v

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#)

[Exportar](#)

[Nuevo test](#)

[Modificar](#)

REFERENCIA

FECHA

COMENTARIO

PERFIL INACEPTABLE

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 6 2 7 3 7 2
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Cryptococcus laurentii			GLY 6%	2KG 92%	GAL 99%	LAC 99%
			MLZ 96%			
Candida ciferrii			2KG 80%	GAL 100%	MDG 0%	HYPH 99%
Trichosporon mucoides			2KG 99%	GAL 100%	LAC 100%	MLZ 82%
			HYPH 95%			
Candida guilliermondii			2KG 97%	ADO 97%	GAL 99%	INO 0%
			MLZ 90%			
Cryptococcus humicola			2KG 100%	GAL 100%	LAC 100%	MLZ 95%
			HYPH 99%			

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#)

[Exportar](#)

[Nuevo test](#)

[Modificar](#)

REFERENCIA

FECHA

COMENTARIO

BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	2 1 0 0 0 0 0
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Kloeckera spp	94.5	0.79	CEL 96%			

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Candida magnoliae	4.3	0.66	SAC 97%	RAF 75%		

Pruebas complementarias(s)	37°C	TIAMINA		
Kloeckera apis	+	-		
Kloeckera apiculata	-	v		
Kloeckera japonica	-	+		

API 20 C AUX V5.0

[Impresora](#)

[Exportar](#)

[Nuevo test](#)

[Modificar](#)

REFERENCIA

FECHA

COMENTARIO


PERFIL INACEPTABLE

Galería	API 20 C AUX V5.0
Perfil	6 6 2 7 3 7 2
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
			GLY 6%	2KG 92%	GAL 99%	LAC 99%
Cryptococcus laurentii			MLZ 96%			
Candida ciferrii			2KG 80%	GAL 100%	MDG 0%	HYPH 99%
Trichosporon mucoides			2KG 99%	GAL 100%	LAC 100%	MLZ 82%
			HYPH 95%			
Candida guilliermondii			2KG 97%	ADO 97%	GAL 99%	INO 0%
			MLZ 90%			
Cryptococcus humicola			2KG 100%	GAL 100%	LAC 100%	MLZ 95%
			HYPH 99%			

ANEXO 21: Resultados del análisis de los medios API 50 CHB V4.1 para *Bacillus*

CHB:

QUIMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERU - LIMA 

API 50 CHB V4.1 [Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FECHA

COMENTARIO

MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO

Galería	API 50 CHB V4.1		
Perfil	-----++-----+--+-----+-----		
Nota	POSIBILIDAD DE <i>Bacillus thuringiensis</i>		

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Bacillus cereus</i> 2	90.8	0.89	RIB 77%			
<i>Bacillus mycoides</i>	8.7	0.78	RIB 98%	SAL 80%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Bacillus anthracis</i>	0.2	0.62	RIB 99%	SAC 99%		

QUIMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERU - LIMA 

API 50 CHB V4.1 [Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FECHA

COMENTARIO

MUY BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 50 CHB V4.1		
Perfil	-+-----+-----+-----+-----+-----		
Nota			

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Bacillus subtilis/amyloliquefaciens</i>	99.6	0.84	AMD 78%	GLYG 79%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	0.1	0.58	MEL 10%	RAF 10%		

API 50 CHB V4.1

[Impresora](#)

[Exportar](#)

[Nuevo test](#)

[Modificar](#)

REFERENCIA FECHA

COMENTARIO

MUY BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 50 CHB V4.1
Perfil	- + - + + - - - + + - - + + - + - + + + + - - + + - + - + - - - - -
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Bacillus subtilis/amyloliquefaciens	99.8	0.87	AMD 78%	GLYG 79%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Bacillus licheniformis	0.1	0.51	GAL 75%	AMD 99%	GLYG 87%	TAG 91%

API 50 CHB V4.1

[Impresora](#)

[Exportar](#)

[Nuevo test](#)

[Modificar](#)

REFERENCIA FECHA

COMENTARIO

MUY BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 50 CHB V4.1
Perfil	- + - + + - - - + + - - + + - + - + + + + - - + + - + - + - - - - -
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Bacillus licheniformis	99.1	0.81	DXYL 87%	GAL 75%	TUR 75%	

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Bacillus subtilis/amyloliquefaciens	0.8	0.67	TAG 0%			

API 50 CHB V4.1

[Impresora](#)

[Exportar](#)

[Nuevo test](#)

[Modificar](#)

REFERENCIA <input type="text"/>	FECHA 4/12/16
COMENTARIO <input type="text"/>	

PERFIL DUDOSO

Galería	API 50 CHB V4.1						
Perfil	++-+++-----++++-+----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----						
Nota							

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Bacillus licheniformis	97.7	0.49	0	0%	TUR 75%	TAG 91%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Bacillus subtilis/amyloliquefaciens	2.2	0.4	0	0%	GAL 12%	RHA 1%

API 50 CHB V4.1

[Impresora](#)

[Exportar](#)

[Nuevo test](#)

[Modificar](#)

REFERENCIA <input type="text"/>	FECHA 4/12/16
COMENTARIO <input type="text"/>	

BUENA IDENTIFICACION


Galería	API 50 CHB V4.1						
Perfil	-+++-----++++-+----+-----+-----+-----+-----+-----+-----						
Nota							

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Bacillus licheniformis	98.8	0.74	GAL 75%	AMD 99%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Bacillus subtilis/amyloliquefaciens	1.1	0.62	AMD 78%	TAG 0%		

ANEXO 22: Resultados del análisis de los medios API 50 CHL V5.2 para *Lactobacillus*

CHL:

QUIMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERU - LIMA 

API 50 CHL V5.2 [Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FECHA


COMENTARIO

EXCELENTE IDENTIFICACION EN EL GENERO

Galería	API 50 CHL V5.2						
Perfil	-----+++-----+-----+-----						
Nota							

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii	96.8	0.9	ESC 24%	MAL 75%		
Lactobacillus acidophilus 3	3.1	0.78	NAG 75%	MAL 75%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Pediococcus damnosus 1	0.1	0.42	GAL 75%	NAG 99%	SAC 1%	TRE 99%

QUIMICA SUIZA INDUSTRIAL DEL PERU - LIMA 

API 50 CHL V5.2 [Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA FECHA

COMENTARIO

EXCELENTE IDENTIFICACION EN EL GENERO

Galería	API 50 CHL V5.2						
Perfil	-----+++-----+-----+-----						
Nota							

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii	96.8	0.9	ESC 24%	MAL 75%		
Lactobacillus acidophilus 3	3.1	0.78	NAG 75%	MAL 75%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Pediococcus damnosus 1	0.1	0.42	GAL 75%	NAG 99%	SAC 1%	TRE 99%

API 50 CHL V5.2

[Impresora](#)[Exportar](#)[Nuevo test](#)[Modificar](#)

REFERENCIA

FECHA

2/12/16

COMENTARIO

EXCELENTE IDENTIFICACION EN EL GENERO

Galería	API 50 CHL V5.2
Perfil	-----+-----+-----+-----+-----
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii	96.8	0.9	ESC 24%	MAL 75%		
Lactobacillus acidophilus 3	3.1	0.78	NAG 75%	MAL 75%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Pediococcus damnosus 1	0.1	0.42	GAL 75%	NAG 99%	SAC 1%	TRE 99%

API 50 CHL V5.2

[Impresora](#)[Exportar](#)[Nuevo test](#)[Modificar](#)

REFERENCIA

FECHA

2/12/16

COMENTARIO

PERFIL DUDOSO

Galería	API 50 CHL V5.2
Perfil	-----+-----+-----+-----+-----
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii	54.1	0.54	MNE 81%	MAN 0%	ESC 24%	MAL 75%
Lactobacillus acidophilus 3	45.7	0.56	MAN 1%	NAG 75%	MAL 75%	

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Streptococcus salivarius ssp thermophilus	0.1	0.2	MAN 0%	ESC 0%	LAC 100%	

API 50 CHL V5.2

[Impresora](#)[Exportar](#)[Nuevo test](#)[Modificar](#)

REFERENCIA

FECHA

2/12/16

COMENTARIO

EXCELENTE IDENTIFICACION EN EL GENERO

Galería	API 50 CHL V5.2
Perfil	-----+++-----+-----+-----
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii	96.8	0.9	ESC 24%	MAL 75%		
Lactobacillus acidophilus 3	3.1	0.78	NAG 75%	MAL 75%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Pediococcus damnosus 1	0.1	0.42	GAL 75%	NAG 99%	SAC 1%	TRE 99%

API 50 CHL V5.2

[Impresora](#)[Exportar](#)[Nuevo test](#)[Modificar](#)

REFERENCIA

FECHA

2/12/16

COMENTARIO

BAJA DISCRIMINACION

Galería	API 50 CHL V5.2
Perfil	-----+++-----+-----+-----
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Pediococcus damnosus 1	51.4	0.76	GAL 75%	SAC 1%		
Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii	36.8	0.84	ESC 24%	MAL 75%	TRE 20%	
Lactobacillus acidophilus 3	9.3	0.82	MAL 75%			

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactococcus lactis ssp hordniae	2.0	0.6	ARB 100%	SAL 100%		

Pruebas complementarias(s)	45°C	COCOS	
Lactobacillus acidophilus	+	-	
Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii	+	-	
Pediococcus damnosus	-	+	

API 50 CHL V5.2

[Impresora](#)

[Exportar](#)

[Nuevo test](#)

[Modificar](#)

REFERENCIA

FECHA

COMENTARIO

IDENTIFICACION ACEPTABLE

Galería	API 50 CHL V5.2
Perfil	-----+-----+++-----++-+-----+-----+-----
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactobacillus plantarum 2	80.6	0.23	RIB 83%	DXYL 1%	GAL 75%	MAN 80%
			LAC 75%	SAC 17%	GLYG 1%	

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactobacillus acidophilus 1	8.4	0.13	DXYL 0%	GAL 75%	SAL 85%	CEL 96%
			TRE 77%	GLYG 1%		

API 50 CHL V5.2

[Impresora](#)

[Exportar](#)

[Nuevo test](#)

[Modificar](#)

REFERENCIA

FECHA

COMENTARIO

PERFIL INACEPTABLE

Galería	API 50 CHL V5.2
Perfil	-----+-----+++-----++-+-----+-----+-----
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactobacillus plantarum 2			LARA 1%	RIB 83%	DXYL 1%	GAL 75%
			RHA 1%	AMY 83%	LAC 75%	SAC 17%
Lactobacillus acidophilus 2			LARA 1%	DXYL 0%	GAL 99%	RHA 0%
			LAC 99%	RAF 80%	GLYG 20%	

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactococcus lactis ssp lactis 1			RIB 95%	GAL 90%	RHA 0%	AMY 75%
			ARB 85%	SAL 85%	LAC 90%	TRE 90%

API 50 CHL V5.2

[Impresora](#)[Exportar](#)[Nuevo test](#)[Modificar](#)

REFERENCIA

FECHA

4/12/16

COMENTARIO

EXCELENTE IDENTIFICACION EN EL GENERO

Galería	API 50 CHL V5.2
Perfil	-----+++-----+-----
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii	96.8	0.9	ESC 24%	MAL 75%		
Lactobacillus acidophilus 3	3.1	0.78	NAG 75%	MAL 75%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Pediococcus damnosus 1	0.1	0.42	GAL 75%	NAG 99%	SAC 1%	TRE 99%

API 50 CHL V5.2

[Impresora](#)[Exportar](#)[Nuevo test](#)[Modificar](#)

REFERENCIA

FECHA

4/12/16

COMENTARIO

MUY BUENA IDENTIFICACION EN EL GENERO

Galería	API 50 CHL V5.2
Perfil	-----++-----+-----
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii	92.8	0.84	MNE 81%	ESC 24%	MAL 75%	
Lactobacillus acidophilus 3	7.0	0.76	NAG 75%	MAL 75%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Streptococcus salivarius ssp thermophilus	0.1	0.5	ESC 0%	LAC 100%		

ANEXO 23: Resultados de la identificación de actinomicetos



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n La Molina - Lima - Perú
Teléfono: 6147800 anexo 274



INFORME DE ENSAYO N° 1705263 - 1705274- LMT

SOLICITANTE : MANUEL ALVAREZ

DESCRIPCIÓN DEL OBJETO ENSAYADO

MUESTRA : BIOL PARA AISLAMIENTO DE CEPAS DE ACTINOS

1705263) M1P1	1705264) M2P1	1705265) M3P1
1705266) M1P2	1705267) M2P2	1705268) M3P2
1705269) M4P2	1705270) M1P3	1705271) M2P3
1705272) M3P3	1705273) M4P3	1705274) M5P3

PROCEDENCIA : UNALM
TIPO DE ENVASE : Botella de plástico de 500 mL
ESTADO Y CONDICIÓN : En buen estado y cerrado
FECHA DE MUESTREO : 2016 - 11
FECHA DE RECEPCIÓN : 2017 - 05 - 11
FECHA DE INICIO DE ENSAYO : 2017 - 05 - 15
FECHA DE TÉRMINO DE ENSAYO : 2017 - 10 - 13

RESULTADOS DE ANÁLISIS DE LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Caracterización molecular y clasificación filogenética de las cepas ensayadas

Código de Laboratorio	Código de Cliente	Identificación molecular por secuenciamiento del gen ribosomal 16s	Número de Accesoión	Porcentaje de Similitud
263/-4	M1-P1-1	<i>Streptomyces sanglieri</i>	AB249945	99.93
269/-4B	M4-P2-1	<i>Micromonospora echinospora</i>	U58532	99.71
274/-5B	M5-P3-2	<i>Bacillus altitudinis</i>	ASJC01000029	100
273/-4	M4-P3-1	<i>Streptomyces griseorubens</i>	AB184139	100
264/-3A	M2-P1-1	<i>Streptomyces lushanensis</i>	MAUD01000416	99.36
274/-3	M5-P3-1	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	U94490	99.93
268/-3	M3-P2-1	<i>Paenibacillus taichungensis</i>	EU179327	99.86
274/-5A	M5-P3-3	<i>Streptomyces bungoensis</i>	KQ948892	99.36
264/-3B	M2-P1-2	<i>Kribbella aluminosa</i>	EF126967	99.36

Nota: La columna correspondiente a la caracterización molecular por secuenciamiento del gen 16s, señala el nombre de la especie y cepa tipo más cercanamente relacionada a la cepa en ensayo. La columna con el número de accesoión refiere a la cepa tipo señalada en la columna anterior. El porcentaje de similitud muestra la semejanza de la cepa en ensayo con la cepa tipo; un 100% de similitud, señala que la cepa ha sido identificada; porcentajes de similitud entre 99.50- 99.99% se encuentran altamente relacionadas a la cepa tipo y porcentajes de similitud menores a 99.50% refieren que la cepa en estudio se encuentra relacionada a la cepa tipo indicada. Finalmente, la columna consignada como nt diferentes/ nt totales, muestra el número de nucleótidos divergentes en la cepa en estudio, respecto de la longitud total de la secuencia obtenida por secuenciación.

LABORATORIO DE ECOLOGIA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGIA "MARINO TABUSSO"

(511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: lmt@lamolina.edu.pe
Apartado Postal 456 - Lima 12 - PERU



METODOLOGÍA

Se realizó la amplificación 16S-PCR de los lisados de ADN de las cepas en estudio (Versalovic et al., 1991); se emplearon los primers fd1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'). Los productos de PCR obtenidos y purificados fueron secuenciados (Macro Gen Inc., Seúl- Korea). Las secuencias de cada primer se limpiaron mediante el empleo del programa BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999) y el banco de datos de la "National Center for Biotechnology Information" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), obteniéndose las secuencias del gen ribosomal 16S de las posibles especies tipo a las que se asociaba. Dichas secuencias fueron comparadas con las presentes en la base de datos del GenBank, usando el programa BLASTN (Altschul et al., 1990) y el EzTaxon server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim et al., 2012).

Referencias Bibliográficas:

- Altschul, S.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E; Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215: 403-410.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Kim, O.; Cho, Y.; Lee, K.; Yoon, S.; Kim, M.; Na, H.; Park, S.; Jeon, Y., Lee, J., Yi, H.; Won, S.; Chun, J. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 62: 716-721.
- Technelysium Pty Ltd. 1998. Chromas Lite 2.01. <http://technelysium.com.au>.
- Versalovic J., Scheider M., De Bruijn F.J., Lupski J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol.* 1994;5:25-40

Observaciones:

Informe de ensayo emitido sobre la base de resultados de nuestro laboratorio en muestras proporcionadas por el solicitante.

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin nuestra autorización escrita.

Validez del documento:

Este documento tiene validez sólo para la muestra descrita.

La Molina, 13 de octubre de 2017

DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA

Jefe del Laboratorio de Ecología Microbiana
y Biotecnología "Marino Tabusso"
Universidad Nacional Agraria La Molina

Teléfono: 6147800 anexo 274

E-mail: imt@lamolina.edu.pe

LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGÍA "MARINO TABUSSO"

(511) 614-7800 anexo 274 - E-mail: imt@lamolina.edu.pe
Apartado Postal 456 - Lima 12 - PERU