

Caracterización de microorganismos de montaña (MM) en biofertilizantes artesanales

María Fernanda Zeballos Heredia

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA EN AMBIENTE Y DESARROLLO

Caracterización de microorganismos de montaña (MM) en biofertilizantes artesanales

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Ambiente y Desarrollo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

María Fernanda Zeballos Heredia

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2017

Caracterización de microorganismos de montaña (MM) en biofertilizantes artesanales

María Fernanda Zeballos Heredia

Resumen. La agricultura es la actividad más importante a nivel mundial, sin embargo el uso excesivo agroquímicos para la producción agrícola trae riesgos para la salud y el ambiente. La agricultura sostenible tiene métodos de producción de menor impacto como abonos orgánicos, biopesticidas y biofertilizantes, los cuales están compuestos de microorganismos eficientes que intervienen en el mejoramiento de suelos, tratamiento de aguas y manejo de residuos agropecuarios. La finca agroecológica de Zamorano utiliza biofertilizantes a base de microorganismos de montaña (MM), los cuales se caracterizaron a nivel de género, para ello se aislaron y purificaron cepas provenientes de cuatro biofertilizantes diferentes. La morfología de las bacterias y hongos aislados se identificaron mediante el método de tinción de Gram y tinción en fresco. Para la identificación de bacterias se utilizaron pruebas bioquímicas diferenciales y la prueba de API 20 NE. A partir de la purificación se obtuvo siete cepas de microorganismos: cuatro cepas de bacterias, dos de levaduras y una de hongos. Las cepas de estos microorganismos se conservaron en discos de papel filtro almacenados en el Laboratorio de Microbiología Ambiental. La baja abundancia y diversidad de microorganismos posiblemente se dio por la presencia de algunos ingredientes de los biofertilizantes que influyen en el medio de crecimiento. Los ingredientes de cada mezcla cambian las propiedades de biofertilizantes a bioplaguicidas.

Palabras clave: agricultura sostenible, agroecología, microorganismos eficientes.

Abstract. Agriculture is the most important activity in the world, however the excessive agrochemical use brings risks to health and the environment. Sustainable agriculture has lower impact production methods such as organic fertilizers, biopesticides and biofertilizers, which are composed of beneficial microorganisms that intervene in soil improvement, water treatment and agricultural residue management. The Zamorano agroecological farm uses biofertilizers based on mountain microorganisms (MM). These were identified to genus level. Strains from four different biofertilizers were isolated and purified. The morphology of the isolated bacteria and fungi were identified by Gram staining and fresh staining methods. For the identification of bacteria, differential biochemical tests and the API 20 NE test were used. From the purification, seven strains of microorganisms were obtained: four strains of bacteria, two of yeasts and one of fungi. The strains of these microorganisms were preserved in filter paper disks stored in the Laboratory of Environmental Microbiology. The low abundance and diversity of microorganisms was possibly due to the presence of some ingredients of the biofertilizers that influence the growth culture. The ingredients in each blend change the properties of biofertilizers to biopesticides.

Key words: agroecology, beneficial microorganisms, sustainable agriculture.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. METODOLOGÍA	4
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
4. CONCLUSIONES.....	20
5. RECOMENDACIONES.....	21
6. LITERATURA CITADA.....	22
7. ANEXOS.....	27

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Códigos, procedencia y ubicación de las muestras de biofertilizantes.....	4
2. Formulación de cada uno de los biofertilizantes estudiados.....	5
3. Tabla de identificación de reacciones API 20 NE.....	8
4. Colonias de MM aislado de los biofertilizantes artesanales.....	10
5. Descripción de morfología colonial y celular de los MM.....	11
6. Resultados de las pruebas bioquímicas.....	17

Figuras	Página
1. Esquema de inoculación de muestra en los diferentes medios de cultivos.....	5
2. Reacciones negativas y positivas de API20 NE.....	9
3. Perfil numérico para la identificación de bacterias.....	9
4. Api 20 NE de la cepa BFL1-1.....	14
5. Reacción Api 20 NE de la cepa BFL2-1.....	15
6. Reacción Api 20 NE de la cepa BFL4-1.....	16
7. Reacción Api 20 NE de la cepa BFL4-2.....	16
8. Colección de cepario de MM.....	18

Anexos	Página
1. Componentes de medio ASHBY.....	27
2. Componentes de medio Agar avena.....	27
3. Componentes de medio Agar nutriente.....	27
4. Componentes de medio PDA.....	27
5. Prueba de catalasa en las cepas BFL1-1, BFL2-1, BFL4-1, BFL4-2.....	28

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura es la actividad más importante del mundo en la que el ser humano aprovecha los recursos que ofrece la naturaleza (Mishra, 2013). Sin embargo, el uso excesivo de agroquímicos utilizados para la producción agrícola a gran escala y de largo plazo, da lugar a riesgos para la salud humana y el ambiente (Melece, 2008). Los plaguicidas y los herbicidas representan un riesgo para la vida de los organismos vivos porque estos alteran los ecosistemas transformándolos en hábitats tóxicos para los animales, insectos, microorganismos benéficos, plantas y el hombre (Aktar, Sengupta, & Chowdhury, 2009).

Existe un interés en la producción de cultivos de altos rendimientos que a la vez conserven el suelo, el agua y ahorren energía (Mishra, 2013). La agricultura sostenible es el manejo integrado de la producción de plantas y animales a largo plazo, que cubre las necesidades alimentarias, manteniendo la calidad ambiental y la viabilidad económica de la explotación agrícola; la agricultura sostenible trabaja con procesos naturales y con técnicas que conserven los recursos y minimicen residuos, generando resiliencia y auto regulación en el agro ecosistema (Velten, Leventon, Jager, & Newig, 2015).

La agricultura orgánica y la agroecología son modelos de agricultura sostenible que muestran métodos de producción con el menor impacto posible en el suelo y agua, tales como el uso de los abonos orgánicos, biopesticidas y biofertilizantes (Morena, 2000). Estos productos cubren las necesidades de las plantas y las protegen, incrementando la productividad y mejorando la rentabilidad de los cultivos. Los biofertilizantes y biopesticidas en su mayoría están compuestos por microorganismos provenientes de los suelos, hojas, residuos biológicos y orgánicos (Higa & James, 1994).

Los microorganismos están en todas partes de la naturaleza cumpliendo roles importantes para el equilibrio ecológico (Mayer, Scheid, Widmer, Fließbach, & Oberholzera, 2010). Un grupo de estos microorganismos son denominados microorganismos patógenos capaces de producir enfermedades en plantas, animales, y contaminación en el entorno. El otro grupo de microorganismos que ejercen funciones muy amigables son denominados microorganismos benéficos o eficientes (Garden City Composting, 2002).

Los microorganismos eficientes, tienen funciones metabólicas benéficas que intervienen en el mejoramiento de suelos, manejo de residuos agropecuarios, tratamiento de aguas residuales, alimentación de animales y mayormente son usados como aditivos en biofertilizantes para optimizar la productividad agrícola (Martinez-Campo, Sánchez-Acosta, Morales-Velasco, & Alonso-Prado, 2014).

En 1980 el Profesor Japonés Teruo Higa de la Universidad de Ryukyus, Japón, buscando métodos alternativos para una agricultura más sostenible, encontró en los microorganismos benéficos características únicas que pueden mejorar la calidad y la salud del suelo (Ndona,

Friedel, Spornberger, Rinnofner, & Karoline, 2011). A estos microorganismos los llamó Microorganismos Eficientes (EM por sus siglas en inglés). En 1982 concluyó sus investigaciones y determinó que la inoculación de EM en el ecosistema del suelo mejora la calidad y salud del mismo, también el crecimiento, producción de cultivos sería de alto rendimiento (Higa & James, 1994).

Los estudios recientes indican que los biofertilizantes que contienen EM pueden suprimir los patógenos en el suelo, acelerar la descomposición de los desechos orgánicos, aumentar la disponibilidad de nutrientes minerales y compuestos orgánicos útiles para el crecimiento de las plantas (Ndona et al., 2011).

Otro tipo de microorganismos eficientes son los de montaña que se encuentran de forma natural en distintos ecosistemas donde nunca o al menos por un período de tres años no se ha utilizado ningún tipo de agroquímicos (Rodríguez, Yohel, Torres, & Lusdina, 2014). Los científicos han investigado los efectos benéficos de los microorganismos de montaña (MM) en la descomposición biológica de la materia orgánica, la mineralización, la nitrificación, el antagonismo y la fermentación (Garden City Composting, 2002). Actividades que intervienen en el mejoramiento de las características físicas, químicas y biológicas de los suelos y cultivos. También en la mejora de asimilación de nutrientes, favoreciendo el crecimiento y protección de los cultivos (Martínez-Campo et al., 2014).

Los MM contienen un promedio de 80 especies de microorganismos de diez géneros pertenecientes a cuatro grupos de microorganismos: Bacterias fotosintéticas, actinomicetos, bacterias productoras de ácido láctico, hongos y levaduras (Higa & Wididana, 2004). Las bacterias fotosintéticas son un grupo de microorganismos que sintetizan aminoácidos, ácidos nucleicos, azúcares de las secreciones provenientes de las raíces y materia orgánica; estas bacterias promueven el desarrollo y crecimiento de la planta (Cóndor-Golec, Pérez, & Chinmay, 2007). Las bacterias lácticas producen ácido láctico a partir de azúcares, este ácido actúa como compuesto esterilizante ayudando a prevenir el crecimiento de microorganismos dañinos en las raíces de las plantas (Higa & James, 1994).

Los hongos de fermentación y levaduras como la *Saccharomyces spp* sintetizan sustancias antimicrobianas, amino ácidos, azúcares, también hormonas y enzimas que promueven la división celular de los tejidos de la raíz de la planta. Los actinomicetos también se benefician de los productos de las levaduras para ejercer sus funciones en los biofertilizantes (Higa & Wididana, 2004).

Otros géneros de bacterias presentes en los biofertilizantes a base de MM son el *Azotobacter* sp, *Azospirillum* sp, y *Rizobium* sp, los cuales interactúan junto a los hongos *Micorrizas*, organismos que ayudan a aumentar la superficie de absorción de las raíces (Garden City Composting, 2002); (Hernández, García, & Ramon, 2001). Otros estudios determinaron que en los biofertilizantes a base de MM también se pueden encontrar microorganismos de los géneros *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp y *Streptomyces* sp, bacterias muy eficientes para la fijación de nitrógeno al suelo y estimuladoras de crecimiento vegetativo (Armenta-Bojórquez, et al., 2010).

Los MM son eficientes bajo condiciones óptimas de sustrato, humedad, ausencia o presencia de oxígeno, pH y temperatura ambiental; los productos de su metabolismo son los componentes vivos del suelo y forman parte de los parámetros útiles para la medición de su fertilidad (Ramos & Zúñiga, 2008). En sí, los cultivos de MM son eficientes después de su inoculación en el suelo donde podemos asegurarnos de la cantidad de sustancias bioactivas que pueden ayudar a definir la estructura y establecimiento de ecosistemas naturales (Higa & James, 1994).

Existen distintas formulaciones de biofertilizantes de MM por lo tanto la cantidad de especies de microorganismos presentes y las funciones que desempeñan varían según los ingredientes que contenga los biofertilizantes (Higa, 2015).

En Honduras distintas organizaciones no gubernamentales (ONG) como Café Orgánico Marcala S.A. (COMSA) Vecinos de Honduras, la Red de Comités de Desarrollo Ambiental (CODEMAS); y productores de café y hortalizas emplean en sus distintos proyectos de desarrollo agrícola MM como fertilizantes o abonos orgánicos (Ramos F. L., 2016). La finca agroecológica de Zamorano utiliza tres formulaciones de biofertilizantes a base de MM, estas formulaciones también han sido usadas por las instituciones ya nombradas, y fueron evaluadas física y biológicamente, sin embargo no se ha realizado una caracterización de los diversos organismos presentes en dichas formulación. Este estudio planteó los siguientes objetivos:

- Caracterizar los microorganismos presentes en los biofertilizantes utilizados en la finca agroecología.
- Comparar la presencia de microorganismos entre cada una de las formulaciones estudiadas.
- Establecer un cepario en el laboratorio de microbiología ambiental para la conservación de las cepas aisladas.

2. METODOLOGÍA

Ubicación del estudio.

El estudio se realizó con muestras procedentes de la finca agroecológica de Zamorano y del organismo no gubernamental (ONG) Vecinos Mundiales de Honduras, localizada en El Departamento de El Paraíso. Las muestras fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de microbiología ambiental de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, donde se les asignó un código (Cuadro1).

Cuadro 1. Códigos, procedencia y ubicación de las muestras de biofertilizantes

Código de muestra ^a	Procedencia	Ubicación
BFL1	Finca agroecológica Zamorano	
BFL2	Finca agroecológica Zamorano	Santa Inés, San Antonio de
BFS3	Finca agroecológica Zamorano	Oriente, Francisco Morazán.
BFL4	ONG Vecinos Mundiales	Claveles N°2, Azabache, Danlí, El Paraíso.

^aBFL: Biofertilizante líquido, BFS: Biofertilizante sólido

Cada uno de estos biofertilizantes está elaborado utilizando diferentes componentes (Cuadro 2).

Aislamiento de microorganismos a partir de biofertilizantes artesanales en medios de cultivo.

De cada biofertilizante líquido y sólido se tomaron muestras de 100 mL y 100 g respectivamente, estas fueron transportadas en beaker estériles hasta el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Departamento de Ambiente y Desarrollo, para su procesamiento.

Posteriormente, cada muestra fue homogenizada y se tomó una alícuota de 10 mL y 10 g, los cuales se diluyeron por separado en 90 mL de agua peptonada (AP) al 0.1%, a partir de este inóculo se realizaron diluciones seriadas 1:10 (10^{-1} hasta 10^{-5}) utilizando siempre AP al 0.1%. De las últimas tres diluciones (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) se inoculó por duplicado 50 μ L en los medios de Agar avena (AVV) y Agar papa dextrosa (PDA), para estimular el crecimiento de hongos y levaduras, Agar nutriente (AN) y Asbhy (ASB) para el crecimiento de bacterias. El método de inoculación utilizado fue el de extensión en superficie. Todos los platos de cultivo se incubaron a una temperatura de 28 °C durante 24 horas en el caso de las bacterias y siete días en el caso de los hongos (Figura 1).

Cuadro 2. Formulación de cada uno de los biofertilizantes estudiados.

BFL-1	BFL-2	BFS-3	BFL-4
Ajo	Ajo	Ajo	Ajo
Cebolla	Cebolla	Cebolla	Cebolla
Jengibre	Jengibre	Jengibre	Jengibre
Canela en raja	Canela en raja	Canela en raja	Canela en raja
Clavo de olor	Clavo de olor	Clavo de olor	Clavo de olor
Pimienta olorosa	Pimienta olorosa	Pimienta olorosa	Pimienta olorosa
Plantas aromáticas	Plantas aromáticas	Plantas aromáticas	Plantas aromáticas
Agua ardiente	Agua ardiente	Agua ardiente	
Yuscarán 45° alcohol	Yuscarán 45° alcohol	Yuscarán 45° alcohol	Agua ardiente
Vinagre	Vinagre	Vinagre	Vinagre
Chile verde picante	Chile verde picante	Chile verde picante	Chile verde picante
MMA ^a	MMA	MMA	Jugo de limón
Melaza	Ceniza de madera	Melaza	MMA
Agua sin cloro	Potasa (KOH)	Cal viva	Melaza
	Melaza	Harina de roca	Agua sin cloro
		Suero de leche	
		Agua sin cloro	

^a Microorganismos de montaña activados.

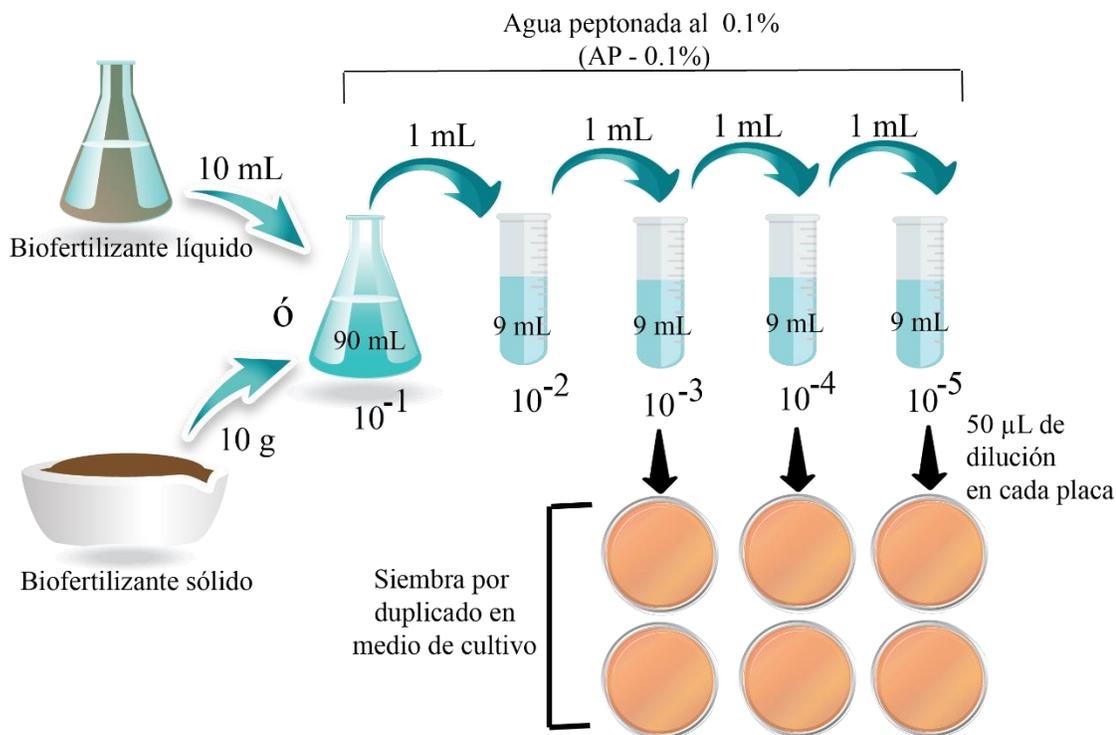


Figura 1. Esquema de inoculación de muestra en los diferentes medios de cultivos.

Purificación, descripción de morfología colonial y celular de microorganismos.

Una vez obtenido el crecimiento en cada medio de cultivo, se observó la morfología colonial y se tomó una colonia de los diversos microorganismos los cuales se subcultivaron para su purificación en medio PDA y AN para el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias respectivamente. Al tener los cultivos puros se procedió a describir la morfología colonial de cada uno de ellos. Y en el caso de las bacterias se realizó la tinción de Gram y la prueba de KOH. Las levaduras fueron observadas en preparaciones en fresco utilizando azul de lactofenol. Para la prueba de tinción de Gram y KOH se siguió el procedimiento descrito en el manual de Laboratorio de Microbiología General de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras (Madrid & Arias, s.f).

Pruebas bioquímicas diferenciales para identificación de bacterias.

Únicamente a los cultivos bacterianos puros se les realizó las siguientes pruebas bioquímicas las cuales se describen a continuación:

- Prueba de oxidasa. Se añadió sobre un trozo de papel filtro estéril una gota del reactivo de oxidasa (dimetil o tetrametil p-fenilendiamina) y luego se depositó sobre el reactivo una colonia bacteriana utilizando un palillo de madera. La prueba es positiva si se observa la aparición de color azul o violeta en el papel impregnado al momento de colocar la colonia bacteriana en contacto con el reactivo (Enriquez, Viera, & Mendoza, 2010).
- Prueba de catalasa. Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre un porta objetos y posteriormente con un palillo de madera se mezcló por separado cada una de las colonias bacterianas de no más de 24 horas de crecimiento. La prueba es positiva cuando se producen burbujas de oxígeno al realizar la mezcla (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2013).
- Prueba agar hierro triple azúcares (TSI). Se inoculó una colonia de bacterias en TSI aplicando la técnica de siembra en picadura y superficie, es decir introduciendo el asa de punta hasta el fondo del agar y estriando sobre la superficie del medio. Si existe un viraje a color rojo después de 24 horas de incubación, la reacción de fermentación es alcalina (k) y ácida si el cambio de color es amarillo (a) de lo contrario el agar se mantendrá sin cambio (sc) (Caffer, Terragno, & Binsztein, 2008). Si existe la formación de gas o ácido sulfhídrico, este reaccionará con hierro como indicador, dando un color negro debido al sulfuro de hierro formado (Blanco, Castillo, & Díaz, 2016).
- Prueba Agar hierro y lisina (LIA). En esta prueba se extrajo una colonia de bacterias y se inoculó introduciendo el asa de aguja en el fondo y haciendo un estriado en la superficie del medio. Después de 24 horas de incubación si la reacción es ácida el medio cambia de color morado a amarillo; si se da la producción de lisina descarboxilasa la reacción es alcalina y el medio mantiene color morado (Caffer, Terragno, & Binsztein, 2008).

- Prueba de ureasa. La prueba se realizó tomando una colonia de bacterias y se inoculó en caldo urea dejando incubar durante 24 horas. La prueba es positiva si se observa el cambio de color en el medio de amarillo a rojo cereza, si no presenta cambio de color la prueba es negativa.
- Prueba API 20 NE. Para esta prueba solo se utilizó colonias de bacterias con 24 horas de crecimiento como lo indican las instrucciones del fabricante. Con un asa se tomó una cantidad de colonia y se inoculó en 2 mL de solución salina al 0.85% hasta obtener una suspensión de turbidez de 0.5 en la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL (Gliosca, 2010)). Luego se rellenó los tubos de los ensayos desde el NO₃ hasta el PNPG con la suspensión salina apoyando la punta de la pipeta en la pared de la cúpula para evitar la formación de burbujas.

Posteriormente se transfirió 200 µL de inóculo con la turbidez antes mencionada a la ampolla del medio API AUX homogenizando con la pipeta sin formar burbujas. Con este se inoculó los tubos y las cúpulas desde la celda GLU hasta la celda PAC. Las cúpulas GLU, ADH, URE se rellenaron de parafina formando un menisco convexo. Después de 24 horas de incubación se hizo la lectura de las reacciones, añadiendo reactivos NIT 1 y NIT 2 en la cúpula NO₃, dejando actuar por cinco minutos. En la cúpula TRP se añadió el reactivo JAMES. Los resultados positivos y negativos de cada pocillo de reacción se describen en el cuadro 3 y esquema las reacciones se aprecian en la figura 3.

La identificación de bacterias se obtuvo a partir del perfil numérico de siete cifras. Los cuales se determinaron por las reacciones de los test separados en grupos de tres, a cada test se le asignó valores de 1, 2 y 4 respectivamente según las instrucciones del fabricante. De cada agrupación se obtuvo una cifra a partir de la sumatoria de las reacciones positivas y se registraron en las hojas de resultados (Figura 4). Después de obtener las siete cifras del perfil numérico se introdujeron en la base de datos del software **apiweb**TM para obtener la identificación de bacterias.

Establecimiento de Cepario.

Preparación de inóculo para el cepario. De cada MM aislado se realizó una suspensión equivalente al patrón número 10 de la escala de McFarland (3×10^9 UFC/mL). Luego se sumergió 10 discos de papel filtro en 5 mL de suspensión durante 3 minutos. Después de ese tiempo se dejaron secar los discos a 30 °C durante 10 minutos. Una vez secos los discos se depositaron dentro de sobres de papel cebolla y se almacenaron a temperatura ambiente (Suarez, 2010).

Cuadro 3. Tabla de identificación de reacciones API 20 NE

Test	Componente activo	Reacción de enzimas	Resultados	
			Negativo	Positivo
NO3	Nitrato de potasio	reducción de nitratos en nitritos reducción de nitratos a nitrógeno	<u>NIT1 + NIT2/ 5min</u> incoloro rosa	rosa-rojo <u>Zn/ 5min</u> incoloro
TRP	L-triptofano	formación de índole (triptofano)	<u>JAMES/ inmediato</u> incoloro, verde pálido/amarillo	rosa-rojo
<u>GLU</u>	D-glucosa	formación de índole (glucosa)	azul a verde	amarillo
<u>ADH</u>	L-arginina	Arginina Dihidrolasa	amarillo	naranja/rosa/rojo
<u>URE</u>	Urea	Ureasa	amarillo	naranja/rosa/rojo
ESC	Esculina citrato férrico	hidrólisis (β -glucosamina)(Esculina)	amarillo	gris/marrón/negro
GEL	Gelatina (origen bovino)	hidrólisis (proteasa) (gelatina)	sin difusión del pigmento	difusión del pigmento negro
PNPG	4-nitrofenil- β D-galactopiranosida	β -galactosidasa(Para-NitroFenil- β D-Galactopiranosidasa)	incoloro	amarillo
GLU	D-glucosa	Asimilación (glucosa)	transparencia	turbio
ARA	L-arabinosa	Asimilación (arabinosa)	transparencia	turbio
MNE	D-manosa	Asimilación (manosa)	transparencia	turbio
MAN	D-manitol	Asimilación (manitol)	transparencia	turbio
NAG	N-acetil-glucosamina	Asimilación (N-Acetil-Glucosamina)	transparencia	turbio
MAL	D-maltosa	Asimilación (maltosa)	transparencia	turbio
GNT	Gluconato potásico	Asimilación (gluconato potásico)	transparencia	turbio
CAP	Ácido cáprico	Asimilación (ácido cáprico)	transparencia	turbio
ASI	Ácido adípico	Asimilación (ácido adípico)	transparencia	turbio
MLT	Ácido málico	Asimilación (malata)	transparencia	turbio
CIT	Citrato sólido	Asimilación (citrato trisólido)	transparencia	turbio
PAC	Ácido fenilacético	Asimilación (ácido fenilacético)	transparencia	turbio

Fuente: BIOMÉRIEUX, 2009



Figura 2. Reacciones negativas y positivas de API20 NE. Fuente: BIOMÉRIEUX, 2009

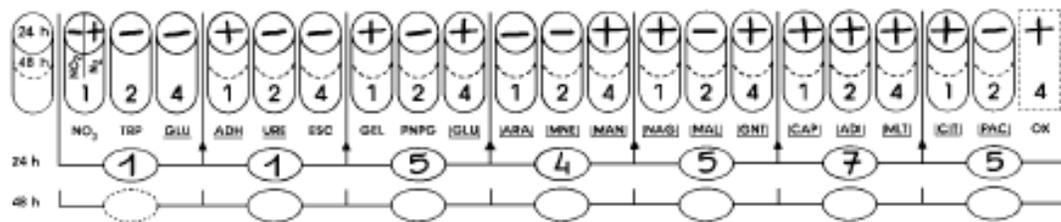


Figura 3. Perfil numérico para la identificación de bacterias. Fuente: BIOMÉRIEUX, 2009

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de microorganismos a partir de biofertilizantes artesanales.

A partir de los diferentes biofertilizantes se obtuvo un total de siete colonias de MM, que solamente se desarrollaron en el medio de crecimiento agar nutriente y PDA. De estos medios de crecimiento se aislaron cuatro colonias de bacterias, dos colonias de levaduras, y una colonia de hongos a las cuales se les asignó una nomenclatura (Cuadro 4). En el medio AAV creció la en el PDA. El medio Ashby fue incluido ya que es un medio específico para el crecimiento misma colonia de hongo que creció de bacterias fijadoras de nitrógenos sin embargo no se obtuvo crecimiento en dicho medio de cultivo.

Cuadro 4. Colonias de MM aislado de los biofertilizantes artesanales.

Muestra de biofertilizante	Nº total de colonias aisladas	Colonias de bacterias	Colonias de levaduras	Colonias de hongos
BFL1	1	BFL1-1 ^a		
BFL2	2	BFL2-1		BFL2-2
BFS3	1		BFS3-1 ^b	
BFL4	3	BFL4-1 BFL4-2	BFL4-3	

^a BFL, biofertilizante líquido, muestra de biofertilizante 1, aislado 1 .

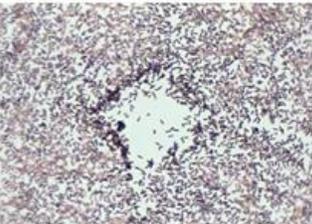
^b BFS, biofertilizante sólido, muestra de biofertilizante 3, aislado 1.

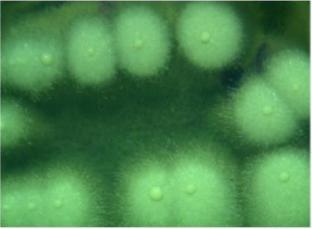
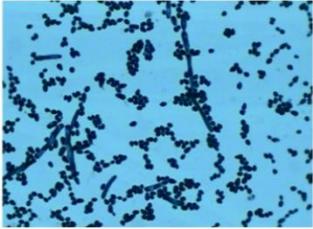
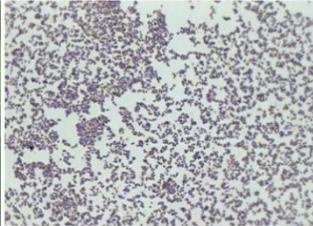
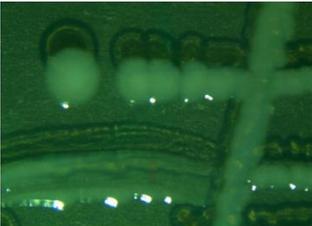
En los biofertilizantes BFL1, BFL2 y BFL4 se destacó la presencia de bacterias, mientras que en el biofertilizante BFS3 solo se aisló colonias de levaduras. En todos los biofertilizantes la diversidad de microorganismos fue baja.

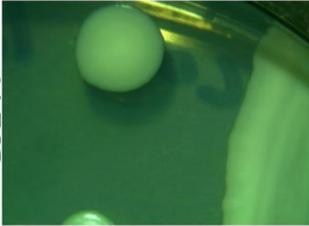
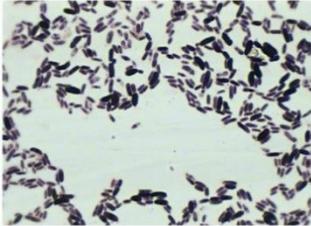
Purificación, descripción de morfología colonial y celular de Microorganismos.

La descripción morfológica colonial y celular de las cepas aisladas se describen en el cuadro 5.

Cuadro 5. Descripción de morfología colonial y celular de los MM

A ^a	B ^b	Morfología Colonial	Morfología Celular
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">BFL 1</p> 		<p>Bacteria Color: blanco Forma: rizoide Elevación: plana Textura: cremosa Borde: lobulado Superficie: lisa</p>	<p>Gram: positivo Forma: bacilos esporulados</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">BFL 2-1</p> 		<p>Bacteria Color: amarillo Forma: circular Elevación: convexa Textura: cremosa Borde: liso Superficie: lisa, brillante</p>	<p>Gram: positivo Forma: bacilos no esporulados</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">BFL 2-2</p> 		<p>Hongo Color: verde Forma: filamentosa Elevación: umbilicada Textura: pulverulenta Borde: desflecado Superficie: surcos radiales</p>	<p>Formación de Vesículas y conidióforos</p>

A ^a	B ^b	Morfología Colonial	Morfología Celular
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">BFL 3</p> 		<p>Levadura Color: blanco Forma: irregular Elevación: umbeliforme Textura: aterciopelada, esponjosa Borde: lobado Superficie: surcos radiales</p>	<p>Forma: Blastoconidio piriforme.</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">BFL 4-1</p> 		<p>Bacteria Color: amarillo pálido Forma: irregular Elevación: convexa Textura: cremosa Borde: ondulado Superficie: lisa, brillante</p>	<p>Gram: positivo Forma: cocos</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">BFL 4-2</p> 		<p>Bacteria Color: translúcido Forma: circular Elevación: plana Textura: cremosa Borde: liso Superficie: lisa brillante.</p>	<p>Gram: positivo Forma: cocos</p>

A ^a	B ^b	Morfología Colonial	Morfología Celular
		Levadura	Forma:
		Color: crema	Blastoconidio
		Forma: circular	ovoide
		Elevación: plana y extendida	alargado.
		Textura: cremosa	
		Borde: liso	
		Superficie: lisa	

^a Morfología colonial.

^b Morfología celular

El posible género de las levaduras se determinó por la morfología colonial y celular observadas. Las características de las cepas BFS3-1 y BFL4-3 corresponden al género *Saccharomyces* sp y *Candida* sp respectivamente (Cuadro 5) (Mesa, Arcaya, Cañas, Machado, & Calbo, 2004; Barnett, 1992). Estos microorganismos cumplen funciones importantes en suelo, aumentando principalmente el contenido de nitrógeno y fósforo en la rizósfera (Lonhienne, et al., 2014). Según reportes de literatura estos géneros de levadura pertenecen al grupo de los microorganismos benéficos presentes en los biofertilizantes y abonos orgánicos (Szymanski & Patterson, 2003). En el caso de las levaduras del género *Candida* sp. se ha reportado que cumple funciones antagónicas en el suelo, ya que reducen la marchitez causada por *Fusarium* sp. a través de la producción de metabolitos anti fúngicos difusibles (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006).

Pruebas bioquímicas diferenciales para identificación de bacterias.

Los resultados de las pruebas bioquímicas diferenciales realizadas a las colonias de bacterias purificadas se muestran en el cuadro 6.

Prueba de la oxidasa. Esta prueba determina la presencia de la enzima citocromo C o indofenol oxidasa en las células bacterianas (Enriquez, Viera, & Mendoza, 2010). Las cepas BFL1-1, BFL4-1 y BFL4-2 resultaron oxidasa positiva y la cepa BFL2-1 oxidasa negativa.

Prueba de la catalasa. Permite determinar si las bacterias son capaces de decomponer peróxido de hidrógeno al 3% (H₂O₂) en agua y oxígeno molecular (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2013). En esta prueba las cuatro cepas de bacterias aisladas son catalasa positiva.

Prueba agar hierro triple azúcares (TSD). Este medio indica si las bacterias son capaces de fermentar tres carbohidratos: glucosa, lactosa y sacarosa. También es posible detectar la producción de gas por la formación de burbujas dentro del medio y la producción de ácido sulfhídrico (Blanco, Castillo, & Díaz, 2016). El resultado de esta prueba determinó que el aislado BFL4-2 fermentó glucosa provocando la reacción alcalina (k) en la superficie y ácida (a) en el fondo del medio. La cepa BFL1-1 hizo uso de la peptona aeróbicamente provocando una reacción alcalina (k) en la superficie y sin cambio de color en el fondo del medio. Las cepas BFL2-1 y BFL4-1 utilizaron la peptona del medio de forma anaeróbica provocando una reacción alcalina en la superficie y en el fondo.

Prueba Agar hierro y lisina (LIA). Determina si las bacterias producen lisina descarboxilasa, el cual se puede identificar por el cambio de pH en el medio (Blanco, Castillo, & Díaz, 2016). En esta prueba se determinó que la colonia BFL4-2 no produce lisina provocando la acidez y el viraje a color amarillo en el fondo del medio. Las cepas BFL1-1, BL2-1 y BFL4-1 tuvieron una reacción alcalina por lo tanto si se dio la producción de lisina descarboxilasa

Prueba de ureasa. La prueba determina la capacidad de los microorganismos para hidrolizar la urea en dos moléculas de amoníaco, agua y dióxido de carbono por la acción de la enzima ureasa (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2013). Únicamente la colonia BFL4-1 tuvo una reacción positiva en esta prueba.

Prueba API 20 NE. No se utilizó la base de datos de Bioremiux de esta prueba para la identificación, ya que todas las bacterias aisladas son gram positivas y no existen registros de bacterias de estas características dentro de esta base de datos. Sin embargo los sustratos de API 20 NE entran dentro de las pruebas de identificación de bacterias gram positivas como de gram negativas (MacFaddin, 2000).

La cepa BFL1-1 presentó una reacción negativa en la reducción de nitratos en nitritos y de nitratos en nitrógeno. No formó índole, tampoco fermentó glucosa, ni produjo la enzima arginina dihidrolasa pero si la enzima ureasa. No se produjo la hidrólisis de enzimas. Sin embargo esta cepa si asimiló glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-Acetil-glucosamina, gluconato potásico, ácido cáprico, ácido málico y citrato trisódico (Cuadro 6). Las reacciones se pueden observar en la figura 4.



Figura 4. Reacción Api 20 NE de la cepa BFL1-1

La cepa BFL2-1 fue capaz de reducir nitratos a nitritos y nitratos a nitrógeno, no fermentó glucosa ni produjo las enzimas arginina dihidrolasa y ureasa (Figura 5). Si presentó la asimilación de glucosa, de arabinosa, de manosa, de manitol, de N-Acetil-glucosamina, de maltosa, gluconato potásico, ácido cáprico, ácido málico y citrato trisódico, de ácido málico (Cuadro 6).



Figura 5. Reacción Api 20 NE de la cepa BFL2-1.

Las características morfológicas y bioquímicas de las cepas BFL1 y BFL2 determinaron que estos microorganismos pertenecen al género de *Bacillus* sp. (Bergey's Manual of Determinate Bacteriology, 1994). Las diferencias en reacción en las pruebas bioquímicas pueden ser un indicador de que las cepas BFL1-1 y BFL2-1 pertenecen a distintas especies de *Bacillus* sp (Logan & De Vos, 2009). Los *Bacillus* sp son microorganismos anaeróbicos o aeróbicos facultativos, se encuentran en los suelos y plantas donde tienen un papel importante en el ciclo del carbono y nitrógeno (Cuervo, 2010).

Este género se caracteriza por solubilizar fosfatos beneficiando el desarrollo de las plantas, algunas especies se los conoce como agentes patógenos de insectos, provocando la muerte de muchos de ellos, por lo que algunas especies de este género son utilizadas para elaborar bioplaguicidas (Stahly, Robert, Andrews, & Yousten, 2006). El *Bacillus* sp. pertenece al grupo de microorganismos benéficos, presente en abonos orgánicos y biofertilizantes (Higa & James, 1994, Logan & De Vos, 2009).

La cepa BFL4-1 (Figura 6) no redujo nitratos, ni fermentó glucosa, tampoco presentó la producción de enzimas. Solo presentó asimilación de arabinosa, de gluconato potásico, ácido cáprico, ácido málico y citrato trisódico (cuadro 6). Estas características se asemejan a las del género de *Micrococcus* sp (Bergey's Manual of Determinate Bacteriology, 1994; Cohn, et al., 2012).



Figura 6. Reacción Api 20 NE de la cepa BFL4-1

Este género de microorganismos se encuentra en el aire, el suelo, en la piel de animales y humanos, agua dulce y en algunas plantas (Kocur, Kloos, & Schileifer, 2006). Se encarga de solubilizar los fosfatos presente en el suelo, pero la función más importante que desempeña es producir sideróforos que facilitan la conducción de hierro para las plantas y para otros microorganismos benéficos (Bhardwaj, Ansari, Sahoo, & Tuteja, 2014). Algunas especies de *Micrococcus* sp son utilizados para la degradación de hidrocarburos en el suelo (Santhini, Myla, Sajani, & Usharani, 2009).

La cepa BFL4-2 (Figura 7) presentó reducción de nitratos a nitritos y de nitratos a nitrógeno, también fermentó glucosa e hidrolizó las enzimas β -glucosidasa. La bacteria asimiló glucosa, arabinosa, manosa, maltosa, ácido málico y citrato trisódico (cuadro 6). Estas características son similares a las del género *Streptococcus* sp (Holt, Krieg, Sneath, Stley, & Williams, 1994).



Figura 7. Reacción Api 20 NE de la cepa BFL4-2.

Según Whiley & Hardie (2009), este género es un microorganismos quimiorganótrofo con metabolismo fermentativo, fermenta carbohidratos como la glucosa, los requerimientos nutricionales son complejos y variables. Son capaces de asimilar N- Acetil-glucosamina, glucosa, lactosa, manosa, arabinosa, manitol, ácido cáprico, ácido málico.

Algunas especies del genero *Streptococcus* sp producen sustancias bioactivas ácidas como el ácido láctico, que ayudan a controlar las enfermedades del suelo causadas por otros microorganismos y además acelerar la descomposición de la lignina presente en el suelo (Javaid, 2011). Mayormente se puede encontrar *Streptococcus* sp junto con otros géneros

como *Lactobacillus* sp, y *Bacillus* sp con quienes su actividad antagónica es más eficiente (Husen, Simanungkalit, Saraswati, & Irawan, 2007).

La colonia de hongos pertenece a la cepa BFL2-2 la cual no se identificó debido a que su estructura de reproducción no es una estructura que comúnmente se encuentre en atlas de identificación de hongos, por lo que para su identificación se necesita realizar pruebas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación. Las características de la colonia de la cepa BFL2-2 son: hongo verde, con formación de esporas y conidios (Cuadro 5).

Cuadro 6. Resultados de las pruebas bioquímicas

Test	Colonias aisladas			
	BFL1	BFL2-1	BFL4-1	BFL4-2
Gram	+	+	+	+
KOH (0.3%)	-	-	-	-
Oxidasa	+	-	+	+
Catalasa	+	+	+	+
TSI	k/sc	k/k	k/k	k/a
LIA	k/k	k/k	k/k	k/a
Ureasa	-	-	+	-
NO3	-	+	-	+
TRP	-	-	-	-
<u>GLU</u>	-	-	-	+
<u>ADH</u>	-	-	-	+
<u>URE</u>	+	-	-	-
ESC	-	-	-	+
GEL	-	-	-	-
PNPG	-	+	-	+
GLU	+	+	-	+
ARA	+	+	+	+
MNE	+	+	-	+
MAN	+	+	-	+
NAG	+	+	-	+
MAL	-	+	-	+
GNT	+	+	+	+
CAP	+	+	+	-
ADI	-	-	+	-
MLT	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+
PAC	-	+	-	+

Fuente: BIOMÉRIEUX, 2009

Establecimiento de Cepario.

Se obtuvo como resultado de 5 a 10 discos de papel filtro con cepas por cada microorganismo purificado, además las siete cepas se conservaron en frascos con medio de crecimiento sembrados por duplicado y almacenados en el laboratorio de microbiología ambiental.



Figura 8. Colección de cepario de MM

Es importante destacar la poca diversidad de microorganismos en los biofertilizantes analizados. Esto posiblemente se debió a la presencia de algunos ingredientes como las plantas aromáticas, que forman metabolitos secundarios conocidos como aceites esenciales. Estos metabolitos poseen propiedades antisépticas (Bakkali, Averbek, Averbek, & Idaomar, 2008). Los compuestos que forman los aceites esenciales identificados como antibacterianos eficaces son: Carvacrol, timol, eugenol, perilaldehído, cinamaldehído y ácido cinámico (Burt, 2004).

Entre los ingredientes de dichos biofertilizantes se encuentran los cítricos cuyos aceites esenciales se ha reportado tienen capacidad inhibidora contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. La mayoría de los aceites esenciales cítricos están formados por monoterpenos, alcoholes, aldehídos y ésteres los cuales en su mayoría actúan como bactericidas o repelentes (Fisher & Phillips, 2008). A este grupo de formadores de aceites esenciales también pertenecen el clavo de olor y la canela que también forman parte de los biofertilizantes analizados (Burt, 2004).

El chile (*Capsicum annum*) contiene antioxidantes que cumplen funciones antimicrobianas y repelente de insectos (Moreno-Limón, Salcedo-Martínez, Cárdenas-Ávila, Hernández-Piñero, & Núñez-González, 2012). El extracto de hojas y semillas de chile, es utilizado en la medicina tradicional para combatir infecciones, y en la agricultura para inhibir el crecimiento de microorganismos (Cichewicz & Thorpe, 1996).

Se ha demostrado que un amplio grupo de bacterias, hongos, protozoos y virus son sensibles al extracto de ajo. El ajo contiene de 1 a 3% de compuestos azufrados (Ankri & Mirelman, 1999). El agente antimicrobiano que contiene el ajo es la alicina (dialil tiosulfonato), enzima que se forma cuando los dientes de ajo se trituran. Cuando se rompe el diente de ajo, el contacto entre la enzima alil-alquilsulfonato-liasa y alilina (un aminoácido no proteico S-

alicisteína S-óxido) induce a la formación de alicina en el extracto. Esta molécula volátil es poco soluble en agua y da al ajo recién triturado su olor característico. Las soluciones diluidas de alicina inhiben el crecimiento de Gram negativas como de Gram positivas (Marchese, et al., 2016).

Las formulaciones de los biofertilizantes contienen ingredientes como la cebolla, ajo, chile; que también cumplen la función de repelentes, mientras que el alcohol, agua ardiente, el jengibre y la canela cumplen una función antiséptica (Londoño, 2006). Estos ingredientes reducen el crecimiento de MM y cambia la función de los biofertilizantes a repelentes de insectos (Garden City Composting, 2002).

En la mayoría de las formulaciones de biofertilizantes a base de microorganismos eficientes, únicamente tienen como ingredientes melaza, agua sin cloro o sin tratamiento y los microorganismos activados (Martinez-Campo, Sánchez-Acosta, Morales-Velasco, & Alonso-Prado, 2014). Según Ul Hassan & Bano, (2016) es necesario agregar fuentes de carbohidratos como casulla de arroz, melaza, cascarilla de caña para el crecimiento microbiano.

4. CONCLUSIONES

- La mayoría de los microorganismos aislados fueron de tipo Gram positivos, los cuales han sido reportados en la literatura como componentes comunes de biofertilizantes agrícolas.
- Todos los biofertilizantes analizados presentan baja diversidad de MM. Debido a las propiedades de los ingredientes de cada formulación, que modifican el ambiente óptimo para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos.
- Los ingredientes utilizados en la formulación de las mezclas analizadas los convierten en bioplaguicidas y no pueden ser considerados como biofertilizantes.

5. RECOMENDACIONES

- En un estudio posterior reformular los biofertilizantes para obtener una mayor presencia de MM y que estos tengan una función como fertilizante.
- Para futuras investigaciones reconfirmar los géneros e identificar especies de MM mediante pruebas moleculares, para conocer más a fondo las actividades antagónicas de los MM.
- Difundir las funciones e importancia de cada ingrediente antes de ser adicionado a los biofertilizantes, ya que muchos de estos cumplen funciones bactericidas y modifican la presencia de MM.
- Educar a los productores y darles a conocer la diferencia entre un bio-pesticida y un bio-fertilizante.

6. LITERATURA CITADA

- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture : their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), pp. 1-12. doi:10.2478/v10102-009-0001-7
- Ankri, D., & Mirelman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*, 2, pp. 125-132.
- Armenta-Bojórquez, García-Gutiérrez, Camacho-Báez, Apodaca-Sánchez, Montoya, G., & Nava-Pérez. (2010, enero-abril). Biofertilizantes en el Desarrollo Agrícola de México. *Ra Ximhai*, 6(1), pp. 51-56.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, pp. 446-475.
- Barnett, A. J. (1992). The Taxonomy of the genus *Saccharomyces meyeri* ex Rees: A short review for non-taxonomists. *Yeast*, 8, pp. 1-23. doi: 10.1002/yea.320080102
- Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, 13(66), pp. 1-10. doi:10.1186/1475-2859-13-66
- BIOMÉRIEUX. (2009). API 20 NE. In BIOMÉRIEUX, *Manual de instrucciones* (pp. 1-4). Francia.
- Blanco, D., Castillo, G., & Díaz, B. (2016). *Pruebas bioquímicas para la identificación de enterobacterias*. Veracruz, México: Universidad Veracruzana. Obtenido de: https://issuu.com/hazelcastillo7/docs/revista_de_pruebas_bioqu_micas
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, pp. 223-253.
- Caffer, M., Terragno, R., & Binsztein, N. (2008). *Manual de procedimientos diagnóstico y caracterización de Salmonella spp.* Argentina: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas.
- Cichewicz, R., & Thorpe, P. (1996). The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 52, pp .61-70.

- Cohn, Stackebrandt, Koch, Gvozdiak, Schumann, WieserDenner, Busse. (2012). *Micrococcus*. John Wiley & Sons, Inc. doi: 10.1002/9781118960608.gbm00121.
- Cóndor-Golec, Pérez, G., & Chinmay, L. (2007). Effective microorganisms: myth or reality? *Revista Peruana de Biología*, 14(2), pp. 315-319.
- Cuervo, L. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales*. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- El-Tarabily, K., & Sivasithamparam, K. (2006). Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*, 47, pp. 25-35. doi:10.1007/s10267-005-0268-2
- Enriquez, J., Viera, J., & Mendoza, F. (2010). *Caracterización preliminar de aislamiento de microorganismos*. Ecuador: Facultad de la Ingeniería Mécanica y Ciencias de la Producción, Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. (2013). *Manual de prácticas de laboratorio de bacteriología y micología*. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia del estado de Toluca, México.
- Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science & Technology*, 19, pp. 156-164.
- Garden City Composting. (2002). *A guide to effective micro-organisms (EM)*.
- Gliosca, L. (2010, octubre). *Prueba de sensibilidad a los antimicrobianos en específico: Antibiogramas*. Buenos Aires, Argentina: Facultad de Odontología de Buenos Aires. Obtenido de: Faculta de Odontología, Buenos Aires.
- Hernández, Y., García, O., & Ramon, M. (2001). Utilización de algunos microorganismos del suelo en cultivos de interés para la ganadería. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 35, No. 2, 2001.*, 35(2), pp. 85-97.
- Higa, T., & James, P. (1994). *Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment*. Atami, Japón: International Nature Farming Research Center.
- Higa, T., & Wididana, G. N. (2004). *The concept and theories of effective microorganisms*. Centro Internacional de Investigación de la Agricultura de la Naturaleza. Japón: Okinawa University of Rykyus.
- Higa, Teruo. (2015). Little big garden: Extraordinary Results after 10 years of EM. (P. Mau, Ed.) *EM Journals*(51), pp. 4-7.

- Holguín, G., & Bashan, Y. (1996). Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). *Soil Biology and Biochemistry*, 28(1), pp. 1651-1660. doi:[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00251-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00251-9)
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Stley, J., & Williams, S. (1994). *Bergey's manual of determinate bacteriology* .
- Husen, E., Simanungkalit, R., Saraswati, R., & Irawan. (2007). Characterization and quality assessment of indonesian commercial biofertilizers. *Indonesian Journal of agriculture Science*, 8(1), pp. 31-38.
- Javaid, A. (2011). Effects of biofertilizers combined with different soil amendments on potted rice plants. *Chilean journal of agricultural research*, 71(1), pp.157-163.
- Kocur, M., Kloos, W., & Schileifer, K.-H. (2006). The genus *Micrococcus*. In *Prokaryotes* 3, pp. 961-971. Springer.
- Logan, N., & De Vos, P. (2009). *Bacillus*. In N. Logan, & P. De Vos, *Bergey's manual of systematics of archeas and bacteria* (pp. 1-164). John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust. doi:10.1002/9781118960608.gbm00530
- Londoño, G. (2006). *Insecticidas botánicos*. México: Cooperative Coffees.
- Lonhienne, T., Mason, M., Ragan, M., Hugenholtz, P., Schmidt, S., & Paungfoo-Lonhienne, S. (2014). Yeast as a biofertilizer alters plant growth and morphology. *Crop Science*, 54, pp. 785–790. doi:10.2135/cropsci2013.07.0488
- MacFaddin, J. (2000). *Biochemical test for identification of medical bacteria*. Estados Unidos: Lippicott Willians & Willkins. Obtenido de: https://books.google.hn/books?id=FYWSzy7EjR0C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Marchese, A., Barbieri, R., Sanches-Silva, Daglia, M., Fazel-Nabavi, Jonaidi-Jafari, . . . Mohammad-Nabavi. (2016). Antifungal and antibacterial activities of allicin: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 5, pp. 49-56.
- Martinez-Campo, Sánchez-Acosta, Morales-Velasco, & Alonso-Prado. (2014). Evaluación de microorganismos de montaña (MM) en la producción de acelga en la meseta de Popayán. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(1), pp. 79-87.
- Mayer, J., Scheid, S., Widmer, F., Fließbachb, A., & Oberholzera, H. R. (2010). How effective are "Effective microorganisms (EM)®"? Results from a field study in temperate climate. *Applied Soil Ecology*, 46(2), pp. 230-239. doi:10.1016/j.apsoil.2010.08007

- Melece, L. (2008). Environmentally friendly agriculture: Development Issues in Latvia. *Socialiniai tyrimai*, 2(19), pp. 37-46.
- Mesa, L., Arcaya, N., Cañas, O., Machado, Y., & Calbo, B. (2004). Evaluación de los caracteres fenotípicos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21, pp.135-138.
- Mishra, A. (2013). Role of eco-friendly agricultural practices in Indian agriculture development. *International Journal of Agriculture and Food Science Technology (IJAFST)*, 4(2), pp. 11-15.
- Morena, J. (2000). Agricultura, Recursos, medio ambiente y desarrollo sostenible en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 11(1), pp. 179-185.
- Moreno-Limón, Salcedo-Martínez, Cárdenas-Ávila, Hernández-Piñero, & Núñez-González. (2012). Efecto Antifúngico de Capsaicina y extractos de Chile Piquín (*Capsicum Annuum* L. Var. *Aviculare*) Sobre el crecimiento in vitro de *Aspergillus flavus*. 34, pp. 191-204.
- Ndonga, R., Friedel, J., Spornberger, A., Rinnofer, T., & Karoline, J. (2011). 'Effective micro-organisms' (EM): an effective plant strengthening agent for tomatoes in protected. *Biological Agriculture and Horticulture*, 27(2), pp. 189-204. doi:0.1080/01448765.2011.9756647
- Ramos, E., & Zúñiga, D. (2008). Efecto de la humedad, temperatura y pH en el suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecología Aplicada*, 7(1 y 2), pp. 123-130.
- Ramos, F. L. (2016). *Caracterización físico química del biofertilizante microorganismos de montaña (MM) para la Finca Agroecológica, Zamorano, Honduras*. Honduras: EAP Zamorano.
- Rodríguez, C., Yohel, N., Torres, T., & Lusdina, K. (2014). *Producción de microorganismos de montaña para el desarrollo de una agricultura orgánica*. Universidad Peruana Unión, Ingeniería Ambiental. Perú: CONACIN: Congreso Nacional de Investigación.
- Santhini, Myla, J., Sajani, S., & Usharani, G. (2009). Screening of *Micrococcus* Sp from oil contaminated soil with reference to bioremediation. *Botany Research International*, 2(4), pp.248-252.
- Stahly, D., Robert, S., Andrews, R., & Yousten, A. (2006). The Genus *Bacillus*—insect pathogens. In *The Prokaryotes* (3^o ed., Vol. 4, pp. 563-608). Springer. doi:10.1007/0-387-30744-3_17

- Suarez, B. (2010). *Comparación de dos métodos de conservación de cepas de levadura Candida guilliermondii : Liofilización y discos de papel filtro*. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Szymanski, N., & Patterson, R. (2003). *Effective microorganisms (EM) and wastewater systems*. Australia: Lanfax Laboratories Armidale.
- Ul Hassan, T., & Bano, A. (2016). Biofertilizer: a novel formulation for improving wheat growth, physiology and yield. *Pakistan Journal of Botany*, 48(6), pp. 2233-2241.
- Velten, S., Leventon, J., Jager, N., & Newig, J. (2015, junio 18). What is sustainable agriculture?. A Systematic Review. (M. A. Rosen, Ed.) *Sustainability*, 7(6), pp. 7833-7865. doi:10.3390/su7067833
- Whiley, R., & Hardie, J. (2009). Streptococcus. In R. Whiley, & J. Hardie, *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria* (pp. 1-86). John Wiley & Sons, Inc. doi:0.1002/9781118960608.gbm00612.

7. ANEXOS

Anexo 1. Componentes de medio ASHBY

Reactivo	Cantidad para 1000 mL de medio
Sacarosa	20 g
KH ₂ PO ₄	1 g
FeSO ₄ + 7H ₂ O	0.005 g
MgSO ₄	0.2 g
NaCl	0.2 g
CaCl ₂ +2H ₂ O	0.2 g
Agar	15 g

Anexo 2. Componentes de medio Agar avena

Reactivo	Cantidad para 1000 mL de medio
Avena	30 g
Agar	15 g

Anexo 3. Componentes de medio Agar nutriente

Reactivo	Cantidad para 1000 mL de medio
Agar nutritivo	23 g

Anexo 4. Componentes de medio PDA

Reactivo	Cantidad para 1000mL de medio
Papa dextrosa agar	19 g

Anexo 5. Prueba de catalasa en las cepas BFL1-1, BFL2-1, BFL4-1, BFL4-2

