

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ingeniería

Escuela de Ingeniería de Biosistemas

Proyecto final de graduación para optar por el grado de Licenciatura
en Ingeniería Agrícola

**Ingeniería Ecológica: efecto del uso de
microorganismos de montaña sobre el suelo
con base en dos cultivos agrícolas**

Sede Rodrigo Facio, Costa Rica

Steven Umaña Carmona

2017

**“INGENIERÍA ECOLÓGICA: EFECTO DEL USO DE MICROORGANISMOS DE
MONTAÑA (MM) SOBRE EL SUELO CON BASE A DOS CULTIVOS
AGRÍCOLAS”**

Trabajo Final de Graduación de la Escuela de Ingeniería de Biosistemas,
Facultad de Ingeniería,
Universidad de Costa Rica

Para optar por el grado de:
LICENCIATURA EN INGENIERÍA AGRÍCOLA

Steven Umaña Carmona
Tesario

Ph.D. Carlos Rojas Alvarado
Director

M.Sc Karina Rodríguez Mora
Lectora

Ing. Geovanni Carmona Villalobos
Lector

Ph.D. Ricardo Radulovich Ramírez
Tribunal Examinador

Ing. Ronald Aguilar Álvarez
Tribunal Examinador

Agradecimientos y dedicatoria

Al concluir mis estudios de licenciatura y terminar este trabajo de graduación deseo transmitir mis más sinceros agradecimientos. Primero a Dios y luego a todas aquellas personas que me brindaron su ayuda. A mi familia le debo lo que soy y lo que tengo ya que estuvieron en las malas y en las buenas acompañándome siempre. En especial debo agradecer a dos personas que son mi mamá y mi abuelo. Mi madre es una mujer que me enseñó a luchar por salir adelante y nunca darme por vencido y mi abuelo más que un abuelo ha sido mi amigo, mi confidente y mi apoyo económico y emocional. De igual manera mi padre Giovanni el cual ha sido un ejemplo de cómo debo ser y que debo cambiar, a mi abuelita que estuvo ahí conmigo a su manera y a mis hermanos, tíos, tías por sus consejos. Debo agradecer a Pablo que más que un tío es mi hermano mayor e incondicional conmigo. A Mónica Rodríguez la cual es una bendición en mi vida una de las personas que más me conoce. Agradezco a Carlos Rojas que me dio la oportunidad de realizar este trabajo, a los integrantes del laboratorio de Reforesta entre ellos Pedro, Randall y Karina que fueron atentos en facilitarme las instalaciones y sus conocimientos en cualquier duda que se me presentara. De la misma manera a la profesora Ana Tapia de la Sede del Atlántico de la UCR quien me permitió realizar pruebas en sus laboratorios. Por último, a mis amigos y compañeros de la U que me permitieron ser una mejor persona y disfrutar de una manera más amena.

Resumen

En la actualidad la ingeniería presenta proyectos íntimamente ligados con el manejo de los recursos naturales en base a un contexto presupuestario ajustado. En particular la rama de la ingeniería agrícola ha implementado entre otras estrategias el uso de los microorganismos. El objetivo de esta investigación fue analizar el potencial de los microorganismos de montaña (MM) como sistemas de biofertilización de suelos. Inicialmente se procedió a la reproducción de los microorganismos para luego ser trabajados de acuerdo con tres periodos de incubación (7 días, 15 días, 22 días). Los tratamientos de incubación fueron aplicados en forma de fertirriego a recipientes con volumen de suelo definido, en los cuales se encontraban sembradas las semillas de dos plantas de ciclo de vida corto (culantro y espinaca). Paralelo a lo anterior se generó un cuarto tratamiento control (sin fertirriego) para establecer comparaciones. En todos los casos se realizaron cuatro repeticiones idénticas con variaciones espaciotemporales para minimizar el sesgo. Luego de terminado el proceso de siembra y cosecha, se procedió a extraer las plantas y el suelo para estudiarlos en base a pruebas biológicas, químicas, fisico-estructurales, agronómicas y posteriormente analizar los resultados. Dentro de las pruebas biológicas realizadas se estimó la incidencia de microorganismos en el suelo y se calculó la respiración del mismo. Como parte de las pruebas químicas se determinó pH, acidez, Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , P^{5+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y carbono, así como el porcentaje de materia orgánica del suelo. Las pruebas fisico-estructurales realizadas incluyeron una estimación del grado de retención de agua por gramo de suelo y una determinación de textura del suelo. Finalmente, como parámetro de respuesta para analizar diferencias entre la efectividad de los tratamientos, se determinó pruebas de tamaño de hojas y biomasa seca utilizando las plantas cultivadas tras un periodo

de crecimiento de nueve semanas. Con base en lo realizado, se encontró una mejora en los tratamientos con respecto al control. Esta mejora se observó de forma particularmente significativa en varios casos para el segundo tiempo de incubación (15 días) y se cuantificó con base en la actividad microbiana intensificada. No se encontraron diferencias estructurales en el suelo posiblemente por el poco tiempo de experimentación. Como conclusión general se estableció que los incrementos en las propiedades del suelo estuvieron asociados con un aumento en la complejidad del biosistema de estudio, lo cual fue producto de la introducción de los MM en el patrón de manejo de los cultivos estudiados. Estos aumentos, sin embargo, parecieran estar vinculados con las características del ensamblaje de especies en el biofertilizante producto de los tiempos de incubación del mismo.

Índice General

Índice de abreviaturas.....	vii
Índice de figuras	viii
Índice de tablas.....	ix
Justificación.....	1
1. Introducción	2
2. Objetivos	5
3. Marco teórico	6
4. Materiales y metodología.....	10
Etapa 1 (reproducción de los MM).....	10
Etapa 3 (Tiempos de espera de los MM)	12
Etapa 4 (Aplicación de riego al suelo).....	13
Etapa 5 (Pruebas posteriores al experimento).....	14
Etapa 6 (Pruebas estadísticas y análisis de resultados).....	21
5. Resultados	22
Sección 1. (Pruebas al suelo)	22
Pruebas biológicas.....	22
Pruebas químicas.....	24
Pruebas físico-estructurales.....	26
Sección 2. (Pruebas a la planta)	27

Pruebas agronómicas.....	27
6. Conclusiones	37
7. Recomendaciones.....	38
8. Bibliografía.....	39

Índice de abreviaturas

MM: microorganismos de montaña

T1: tratamiento número 1

T2: tratamiento número 2

T3: tratamiento número 3

T4: tratamiento número 4

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

R^2 : coeficiente de correlación de Pearson

HC: hojas de culantro

HE: hojas de espinaca

BE: biomasa de espinaca

BC: biomasa de culantro

CO: carbono orgánico

RS: respiración de suelos

Ac: actinobacterias

Ho: hongos

PMP: punto de marchitez permanente

Índice de figuras

Figura 1. Distribución de la mezcla en la primera fase de la reproducción de los MM.....	11
Figura 2. Mezclas realizadas en la segunda fase del protocolo para reproducir MM en fase líquida	12
Figura 3. Distribución de parcelas en el experimento llevado a cabo en el presente trabajo según la réplica # 1	13
Figura 4. Acople de la probeta con el embudo y el papel filtro (#4) para la prueba de retención de agua por gramo de suelo con la que se evaluaron los suelos de esta investigación.	17
Figura 5. Preparación de la prueba de textura con la que se evaluaron los suelos analizados	18
Figura 6. Colocación de raíces en la bandeja y en el escáner.....	20
Figura 7. Incidencia de los tres grupos de microorganismos estudiados en el presente proyecto a partir de las muestras de suelo de cada tratamiento.....	23
Figura 8. Respiración de suelo ($CO_2 - C$) obtenida de cada tratamiento a partir de las muestras de suelo, tras la cosecha.	23
Figura 9. Resultados de las dos pruebas de carbono llevadas a cabo con muestras de suelo de cada tratamiento en el presente estudio.	24
Figura 10. Resultado de la medición de pH en suelo a partir de muestras obtenidas de cada tratamiento.....	25
Figura 11. Capacidad de retención de agua en el suelo obtenida para cada tratamiento.	26
Figura 12. Porcentaje de arcilla, limo y arena determinados para cada tratamiento.	27
Figura 13. Diámetro promedio de las raíces de espinaca y culantro para cada tratamiento.	28

Figura 14. Volumen total de las raíces de culantro y espinaca para cada tratamiento.	28
Figura 15. Longitud total de las raíces de culantro y espinaca para cada tratamiento	29
Figura 16. Área total de las raíces de culantro y espinaca para cada tratamiento	30
Figura 17. Ancho y largo de las hojas de culantro y espinaca para cada tratamiento tras la cosecha.....	30
Figura 18. Biomasa determinada tras la cosecha para cada tratamiento según sección estudiada de la planta.....	32
Figura 19. Comportamiento del carbono orgánico vs área de las hojas.	34
Figura 20. Comportamiento del carbono orgánico vs biomasa de las hojas.	35

Índice de tablas

Cuadro 1. Abreviación de cada tratamiento según su tiempo de incubación en la experimentación.....	13
Cuadro 2. Porcentaje de Texturas.....	19
Cuadro 3. Cambio porcentual en la actividad microbiana con respecto al tratamiento control tras el proceso de biofertilización del suelo y cosecha de las plantas estudiadas.....	22
Cuadro 4. Aumento porcentual de la longitud y el ancho de las hojas con respecto a los tratamientos control establecidos en el presente proyecto.....	31
Cuadro 5. Comparación del cambio porcentual en el peso seco promedio de ambas plantas estudiadas con respecto al control respectivo.....	32
Cuadro 6. Comportamiento de correlaciones positivas entre diferentes parámetros de estudio.....	36

Justificación

En la actualidad el uso de fertilizantes y agroquímicos en el sector agrícola es muy amplio. Después de cada ciclo vegetativo el suelo se empobrece, y esto conlleva pérdidas ambientales, monetarias, y reduce la producción al forzar los suelos, que requieren descanso para evitar su empobrecimiento irremediable.

En este sentido, los microorganismos de montaña (MM) han empezado a ser utilizados dentro de estrategias de manejo sostenible agrícola como una opción viable para mejorar suelos empobrecidos. Por lo anterior se ha dicho que el sistema de inóculo microbiano tipo MM favorece sistemas de producción agrícola amigables con el ambiente, de fácil acceso y puede ser usado con sistemas de baja tecnología.

El proceso de biofertilización con MM pretende que mejoren las condiciones del suelo aumentando la cantidad de metabolitos producidos, lo cual genera un aumento de nutrientes disponibles en el suelo. Al tomar en cuenta que un aumento en la complejidad biosistémica está asociado con redes tróficas más intrincadas y plantas más sanas y productivas, se espera que exista un reflejo de esa eficiencia ecológica sobre las características del suelo.

1. Introducción

En la actualidad la ingeniería se enfrenta a retos muy grandes que están íntimamente relacionados con el cotidiano manejo de los recursos naturales. Cuando estos retos se enmarcan en un contexto presupuestario ajustado, la implicación directa es que la innovación se convierte en un aliado directo del desarrollo. Es así que todas las ramas la ingeniería se han abocado a reajustar gastos y a usar tecnologías más económicas y amigables con el ambiente para lograr sus objetivos [1]. En el caso particular de la agronomía y la edafología como elementos de la Ingeniería de Biosistemas, se ha implementado entre otras estrategias, el uso de microorganismos con la finalidad de lograr procesos de regeneración de la matriz edáfica ya que “el logro y el mantenimiento de la sustentabilidad de los agroecosistemas deben ser objetivos permanentes en pos de mantener el recurso suelo en niveles de máxima calidad y salud. La microbiología del suelo brinda la posibilidad de generar nuevos conocimientos, tanto básicos como aplicados, y de hacer valiosos aportes al desarrollo económico respetando el recurso natural” [2].

Actualmente una serie de proyectos de biorremediación y biofertilización de suelo han sido exitosamente ejecutados en diferentes partes del mundo. En la ciudad de Córdoba, Argentina se estudiaron los parámetros microbianos del suelo, donde se realizaron pruebas de sensibilidad de los parámetros químicos (materia orgánica, pH y nitrato) y biológicos (respiración edáfica) entre suelos perturbados y suelos control, logrando establecer porcentajes favorables en la restauración [3]. En la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A) en Bogotá, Colombia se utilizaron los microorganismos *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. para aportar beneficios importantes a las plantas, tanto en la estimulación del crecimiento como en la supresión de enfermedades. Los

investigadores notaron que la utilización de estos microorganismos fue de amplio espectro, en cuanto a las especies vegetales que abarcó y a los patógenos que reguló [4].

Sin embargo, en Costa Rica el tema no ha sido evaluado e implementado tan eficazmente como en otros países debido a la etapa incipiente en la que se encuentra el estado del arte. Esto es interesante tomando en cuenta que se ha visto que el funcionamiento de algunas poblaciones microbianas es útil para aspectos como el control de suelos contaminados con petróleo [5], mercurio [6], cianuro [7] y dinamita (TNT) [8], la metabolización de gases atmosféricos [9], la producción de biocombustibles [10], control de degradación de suelos por erosión y desertificación [11], control y restauración de manglares contaminados [12] y los procesos de biofertilización en sistemas productivos [13]. De esta forma se demuestra un poco que el potencial del uso de microorganismos de suelo dentro del contexto ingenieril biosistémico, está apenas en una fase incipiente de estudio.

En el caso del uso de MM para mejoramiento del suelo y productividad agrícola, se ha logrado ejecutar efectivamente un proyecto con un sistema de soya-tomate bajo condiciones de invernadero [14]. En la meseta de Popayán, Colombia, los MM se han usado para la producción de acelgas [15], en Cuba han sido aplicados en ecosistemas de pastizales [16], en Perú. la Universidad Peruana Unión de Lima los utilizó en mejoras de producción y control de plagas en cultivos como chile y pimientos [17]. Con esto se demuestra un poco el potencial de estos microorganismos en un sector agroindustrial.

En el presente proyecto, el principal objetivo fue analizar la capacidad de los MM como biofertilizadores de la matriz edáfica utilizando dos plantas comerciales con ciclos de vida cortos. Con este proyecto se espera que los resultados sean útiles para el sector productivo y

que permitan favorecer técnicas de manejo edáfico que mejoran la economía al minimizar el uso de agroquímicos. La idea de este proyecto ha sido apoyar los procesos de recuperación ambiental y la promoción del vínculo entre la ingeniería ecológica, en su faceta agrícola y de biosistemas, con el desarrollo local.

2. Objetivos

Objetivo general

- Analizar el potencial de los MM como sistemas de biofertilización de suelos a partir de un experimento con dos plantas de ciclo de vida corto.

Objetivos específicos

- Realizar el proceso de reproducción de los MM en escenarios aeróbicos y anaeróbicos, considerando mezclas en diferentes periodos de incubación de los inóculos (4-10 días, 11-15 días, 16 días o más).
- Estudiar los potenciales cambios en el suelo a partir del uso de los MM dentro del experimento ejecutado.
- Evaluar algunas propiedades agronómicas de rendimiento de los productos evaluados en presencia y ausencia de un tratamiento con MM.

3. Marco teórico

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación la biorremediación es una tecnología que aprovecha el potencial de degradación que tienen los microorganismos para eliminar sustancias tóxicas de medios y sustratos contaminados [18]. De forma similar, a través de rutas bioquímicas particulares, la biofertilización se ha definido como una técnica que utiliza productos obtenidos del metabolismo trófico de la materia orgánica para favorecer a través de una serie de vías el crecimiento saludable de plantas.

En este proceso, muchos microorganismos se descomponen y dejan su materia orgánica disponible para los biosistemas de la matriz edáfica. La biofertilización se puede aplicar a cultivos con un impacto económico bajo, utilizando residuos, excrementos de animales y otro material vegetal, como tallos o hojas de plátanos, hojas de leguminosas y hierbas verdes. Este tipo de técnicas reduce la dependencia de productos químicos artificiales, y de la forma más relevante, mejora la estructura física (tierra más suelta y suave), química (aumento nutrientes), y biológica (alta población de beneficiosos microorganismos) del suelo [19].

Para poder generar fertilizantes con actividad biológica, se necesita de un proceso ingenieril de producción, muchas veces sencillo y de bajo costo, que involucra lo que se conoce como un biorreactor. Es a partir de estos biorreactores que se puede acelerar el proceso natural de crecimiento y reproducción de los microorganismos para la efectiva aplicación agrícola. Los biorreactores se definen como sistemas que mantienen un ambiente biológicamente activo [20]. En algunos casos, un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas

de dichos organismos. Este proceso puede ser aeróbico o anaeróbico. Incluso un biorreactor puede ser también un dispositivo o sistema empleado para hacer crecer células o tejidos en operaciones de cultivo [20].

Dentro de las funciones básicas de un biorreactor se encuentra el mantenimiento de condiciones ambientales propicias (pH, temperatura, concentración de oxígeno, etcétera) para que el organismo o sustancia química que se cultiva desarrolle la función que se busca. Las condiciones ambientales de un biorreactor tales como flujo de gases (oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, etc.), temperatura, pH, oxígeno disuelto y velocidad de agitación o circulación, deben ser cuidadosamente monitoreadas y controladas [20].

Una vez reproducidos los microorganismos en el biorreactor, éstos son utilizados de diversas maneras, como por ejemplo en actividades de biofertilización o de biorremediación de suelo. El caso clásico de la última función se da con los derrames de petróleo que recientemente han sido tratados con métodos innovadores que usan microorganismos [21]. Sin embargo, diversas instituciones académicas y empresas privadas se han centrado en el uso de microorganismos para muchas otras funciones dentro del campo de la Ingeniería de Biosistemas.

En particular, la biorremediación de suelo es útil para tratar contaminación con metales pesados (Cu^{2+} , Cd^{2+}) y en un estudio reciente se observó que el hongo *Clitocybe maxima* es eficaz en la promoción de la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados [22]. De forma similar, se ha observado que en términos de biofertilización algunos grupos de microorganismos muestran gran utilidad para lograr que los sistemas productivos puedan lograr buenos rendimientos a un costo ambiental bajo.

Los microorganismos de montaña (MM) son considerados consorcios microbianos ya que su composición y las posibles relaciones que generan son múltiples e incluyen bacterias fotosintéticas, bacterias productoras de ácido láctico, actinobacterias, hongos filamentosos y levaduras. Los MM, en su fase de utilización, son un producto de fabricación artesanal de bajo costo, que no requiere medios de crecimiento sofisticados para el escalamiento ya que lo que se pretende es aprovechar la diversidad microbiana, tanto taxonómica como funcional de las comunidades de microorganismos nativos de zonas boscosas, para luego incorporarlos en las unidades de producción agrícola. Entre los usuarios de este tipo de tecnología se acepta que la mejor fuente de inóculo son los bosques cercanos a los sitios de producción agrícola, ya que presentan microorganismos adaptados a las condiciones de la zona [14].

Los MM se utilizan en la preparación de biofertilizantes con el fin de acelerar el proceso de metabolismo de materia orgánica, aumentando la productividad de los cultivos, así como la calidad de los productos, estimulando la germinación de semillas y crecimiento de las raíces. Los MM además, aumentan el grado de protección natural de los cultivos hacia organismos causantes de enfermedades. Se utilizan en la preparación de Bokashi, Bio-fermentos y repelentes Bio-cultivo [19].

La gran cantidad de energía que se encuentra en los residuos orgánicos puede ser utilizada como un conductor de procesos de remediación, al utilizar los microorganismos indígenas en el suelo. La capacidad intrínseca de las comunidades microbianas del suelo para iniciar y acelerar la degradación de los residuos favorece la composición del suelo [23]. Los estudios de biofertilización y de biorremediación representan estrategias alternativas innovadoras en contextos socioeconómicos de países en desarrollo. Un ejemplo de esto son los beneficios

del crecimiento vegetal con rizobacterias para la mejora de la producción de cultivos, lo cual mejora las perspectivas económicas de países en desarrollo [24].

El principal problema de las regiones en desarrollo según la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) en su informe titulado “La agricultura mundial: hacia 2015/30” es la dependencia de la agricultura, como un factor que determina el progreso o el fracaso. Las variables socioeconómicas, políticas, culturales y ambientales mal planteadas son los principales obstáculos contra el desarrollo agrícola en muchas economías en desarrollo. Para mejorar la productividad agrícola, en muchos casos se recomienda el uso de sistemas biológicos de costo bajo, que integran inoculantes microbianos en el sistema y logran una alta productividad de los cultivos y la sostenibilidad agrícola [24].

Dentro de este marco de trabajo la ingeniería ecológica, la ingeniería agrícola y la ingeniería de biosistemas se traslapan en interés para liderar la vía hacia alternativas de bajo costo, altamente efectivas y con potencial alto de sostenibilidad [25]. De esta forma, su intersección ha sido propuesta como un marco de trabajo para diseñar ecosistemas sostenibles que integran la sociedad humana con su medio natural para el beneficio de ambos. En este sentido, a pesar de que la biofertilización es generalmente considerada como una práctica de la ingeniería ecológica, es importante recordar que engloba uno de los principales fundamentos de la ingeniería agrícola que es la regeneración de suelos para cultivar productos [23].

4. Materiales y metodología

La metodología de producción de un biofertilizante a partir de MM usada en esta investigación se basó en el manual de Abonos Orgánicos y Bio-fermentos del Instituto Agro Eco Louis Bolk (ALBI por sus siglas en inglés) en África Oriental [19]. Con base en este manual, el proyecto se dividió en una serie de etapas con el cual se logró conservar un orden cronológico. Estas etapas se respetan acá para explicar la metodología utilizada.

Etapa 1 (reproducción de los MM)

La primera etapa consistió en reproducir los MM a niveles de uso viable. Para ello, se realizó una recolecta de hojas y suelo superficial (mantillo de bosque) proveniente de parches riparios en la zona de Paraíso en la provincia de Cartago, Costa Rica. El suelo se mezcló con los siguientes materiales en la proporción que se muestra a continuación:

- 1/4 saco de hojas de material del bosque
- 3 litros de agua no contaminada (limpia)
- 10 kg de mezcla granza de arroz y semolina
- 1 litro de melaza

La forma adecuada de realizar la mezcla se observa en la Figura 1. Una vez obtenida la mezcla, el material resultante se fraccionó en dos secciones correspondientes a $2/3$ y $1/3$ del volumen total. La primera sección se mantuvo en condiciones aeróbicas, mientras que la segunda se acondicionó para condiciones anaeróbicas en un recipiente sellado.

En el caso del proceso aeróbico la mezcla se cubrió con un paño para protegerla del frío, y del calor del sol y de los animales por la primera noche. Los primeros ocho días la mezcla se revolvió para disipar el exceso de calor que se produjo y luego sencillamente se mantuvo

en un sitio fijo con monitoreo ocasional. En el caso del proceso anaeróbico, la mezcla se colocó en un recipiente sellado por 30 días, que no fue abierto sino al finalizar este periodo para continuar con la siguiente fase.

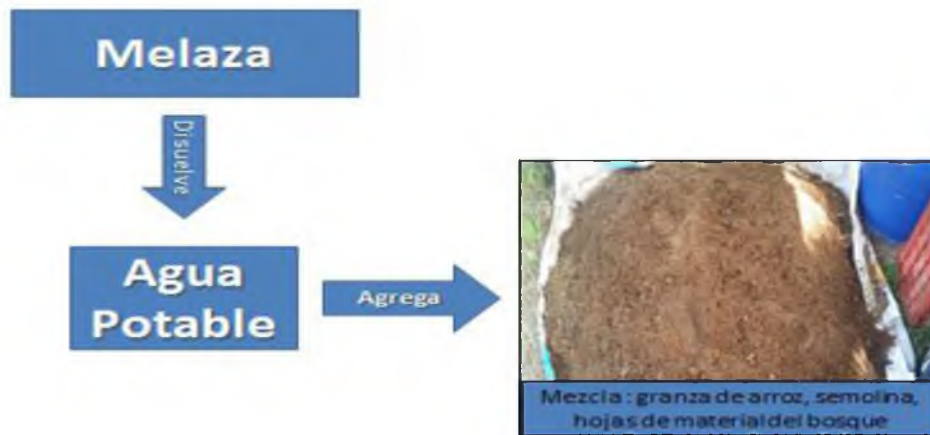


Figura 1. Distribución de la mezcla en la primera fase de la reproducción de los MM

Etapa 2 (Mezcla de organismos aeróbicos y anaeróbicos)

Una vez pasado los 30 días necesarios para la reproducción de los MM en cada ambiente de oxigenación y en fase seca, ambas mezclas se incorporaron en un saco y posteriormente en un contenedor de 200 litros para la reproducción de los microorganismos en un ambiente líquido. A este tipo de sistema se le conoce con el nombre de biorreactor y al líquido fertilizante que se produce se le conoce como biofertilizante o biol. Para la fusión de las mezclas secas se utilizó la siguiente relación:

- 2 kg de material anaeróbico
- 20 litros de agua potable (limpia)
- 1 kg de material aeróbico
- 1 litro de melaza

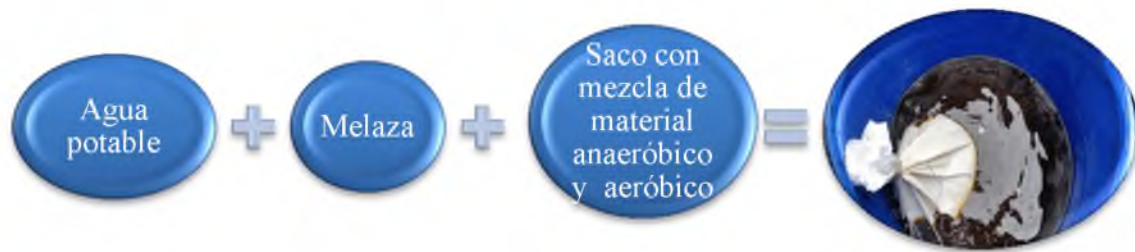


Figura 2. Mezclas realizadas en la segunda fase del protocolo para reproducir MM en fase líquida

Etapa 3 (Tiempos de espera de los MM)

Una vez que las condiciones en el biorreactor permitieron la reproducción eficaz de los MM, el líquido resultante se utilizó en los cultivos para analizar su efecto. Sin embargo, debido a que los tiempos de retención en el biorreactor están relacionados con el potencial de las diferentes comunidades de microorganismos para llegar a su pico poblacional, en este proyecto se ha decidido utilizar tres tiempos de incubación de espera documentados en la literatura.

El primer tiempo por trabajar fue de una semana (documentado entre 4-10 días). Alrededor de una semana en el biorreactor, los hongos son los elementos predominantes en el biofermento. Tras este tiempo, las bacterias empiezan a dominar en el biofermento y desplazan a los hongos (documentado entre 11-15 días). Por esta razón, el segundo tiempo de espera a utilizar en este trabajo fue de dos semanas. Finalmente, aproximadamente a partir del día 16 se ha documentado que las levaduras son los elementos dominantes y por ello, en el caso del presente trabajo se aplicó un tercer tiempo de espera de tres semanas [19]. En el Cuadro 1 se muestra la forma de nomenclatura a trabajar en el proceso de experimentación.

Cuadro 1. Abreviación de cada tratamiento según su tiempo de incubación en la experimentación

Tratamiento	Tiempo de incubación
T1	7 días
T2	15 días
T3	22 días
Control	Tratamiento Control

Etapa 4 (Aplicación de riego al suelo)

En todos los casos el biofermento resultante fue utilizado como líquido de riego en un experimento que consistió en la creación de cuatro recipientes en forma de mini-parcelas con un área de $0,32 \text{ m}^2$ donde $0,16 \text{ m}^2$ estuvo dedicado al cultivo de culantro y $0,16 \text{ m}^2$ al cultivo de espinaca. El tratamiento con los MM se aplicó al inicio de la siembra hasta llevar el suelo a capacidad de campo [26]. Como se muestra en la Figura 3 se evaluó una parcela para cada tiempo de espera en el biorreactor y se utilizó una muestra testigo como control que se regó, igual a capacidad de campo, únicamente con agua. Este diseño se repitió cuatro veces, con protocolo idéntico pero con cambios espaciotemporales en las miniparcels para evitar sesgo previo por efecto de sitio.

Distribucion de parcelas



Caso 1: Riego con tiempo de incubación de 4-10 días

Caso 1: Riego con tiempo de incubación de 11-15 días

Caso 1: Riego con tiempo de incubación de 16 días

Figura 3. Distribución de parcelas en el experimento llevado a cabo en el presente trabajo según la réplica # 1

La cantidad de riego en cada parcela se determinó con base a la demanda requerida para capacidad de campo, tomando en cuenta el tipo de suelo, la infiltración y punto de marchitez permanente. Estas pruebas se llevaron a cabo antes del experimento [27]. En todos los casos se mantuvo el suelo en capacidad de campo. Los cultivos se mantuvieron por el tiempo asociado a su ciclo vegetativo, alrededor de 3 meses.

Etapa 5 (Pruebas posteriores al experimento)

Debido a que el objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de MM como estrategia de biofertilización del suelo, tras la cosecha, se realizaron una serie de pruebas experimentales a la matriz edáfica y a los cultivos realizados según el siguiente esquema.

1. Pruebas al suelo

1.1. Pruebas biológicas:

- A) Se realizaron pruebas microbiológicas de incidencia de microorganismos en el laboratorio de Microbiología de suelos de la Sede del Atlántico de la Universidad de Costa Rica. Estas pruebas se llevaron a cabo con base en la metodología establecida en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) y la Tesis de grado de Agronomía en el área de Fitotecnia de la estudiante Jeannette Aguilar Salón [28].
- B) Se realizaron pruebas de respiración de suelos en la Unidad de Recursos Forestales de la Universidad de Costa Rica con base en la metodología de Anderson (1982) aplicando cada prueba por triplicado. Para ello se pesaron 30 g de suelo, que se colocaron en un recipiente con tapa, dentro del cual se colocó un beaker con 10 mL de NaOH a concentración conocida. Se cerró el envase por 2 horas y se colocó en una incubadora a 28°C. Posteriormente se trasvasó cuantitativamente el contenido del beaker a un

Erlenmeyer, se adicionó 2 mL de $BaCl_2$ al 10% y 3 gotas de timolftaleína 0,1% con un gotero. Finalmente, se procedió a realizar una valoración del exceso de NaOH adicionada con HCl de concentración conocida[29]

Para obtener la cantidad de CO_2 se utilizó la ecuación de Stotzky (1965)

$$\text{Miligramos de } C - CO_2 = (B - V) * NE \quad (1)$$

Dónde:

B: volumen en mililitros de HCl necesarios para valorar el NaOH sin ser expuesto al suelo.

V: volumen en mililitros de HCl necesarios para valorar el NaOH siendo expuesto al suelo.

N: normalidad del HCl

E: peso específico del carbono (E=12) y peso específico del CO_2 (44)

$$E = \frac{44}{2} - \frac{12}{2}$$

$$E = 16$$

1.2. Pruebas químicas:

- A) Se realizaron una serie de análisis químicos completos de muestras de cada suelo en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica. Estos análisis se llevaron a cabo con base en las metodologías de análisis químico completo KCl-OLSEN (pH, acidez, Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , P^{5+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}) en este centro de investigación.
- B) Se realizó un análisis de carbono por prueba de calcinación en la Unidad de Recursos Forestales de la Universidad de Costa Rica. Para ello se procedió a realizar un secado de los crisoles por 2 horas en el horno a $100^{\circ}C$ para garantizar que no ocurriera pérdida

por humedad en estos. Luego se le agregó a cada crisol 2 g con exactitud de 0,0001g de suelo aproximadamente (el suelo se encontraba en base seca) y se registró su peso. Se introdujo cada crisol en la mufla y se aumentó la temperatura en 100°C cada 30 minutos y en el último aumento 125°C hasta llegar a 525°C. Posteriormente, se dio un tiempo de espera de 3 h para garantizar su calcinación. Terminado el proceso de calcinado se colocó en el desecador por una hora para ser pesado de nuevo en la balanza analítica [30].

Para obtener el porcentaje de carbono y materia orgánica se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ materia orgánica} = \frac{A - B}{A} * 100 \quad (2)$$

$$\% \text{ carbono orgánico} = \% M.O * 1.724$$

Donde

A: peso de la muestra

B: peso de la muestra calcinada a 525°C

M.O: materia orgánica

C) La determinación del pH se desarrolló según la metodología de Henriquez, Bertsch y Salas (1995), con la cual se midió 10 ml de suelo de cada muestra en un vaso de agitación y se agregaron 25 ml de agua destilada (relación 1:2:5). Se agitó la solución por un periodo de 15 minutos para luego dejar reposarla por 5 minutos. Tras lo anterior se procedió a calibrar el pHmetro con dos buffer de 4 y 7 a temperatura ambiente. Se realizaron las mediciones introduciendo el electrodo en la solución y tomando el dato brindado con el cuidado de lavar y secar el electrodo al tomar cada medición [31].

1.3. Pruebas físico-estructurales

Se realizaron con base en la metodología de la Unidad de Recursos Forestales de la Universidad de Costa Rica.

A) Pruebas de retención de agua: Se tomó una muestra de suelo de 100 g la cual fue tamizada con el fin de evitar granulometría de tamaño no deseado. Se colocó la muestra en un sobre de papel el cual se secó en un horno por 48 horas a una temperatura de 60°C. Posteriormente, se tomó un papel de filtro y se acopló a una probeta de 100 ml según se observa la Figura 4. Dentro del filtro se depositó una muestra de 20 g de suelo seco, a la cual se le aplicó lentamente 100 ml de agua limpia. Al terminar de agregar el líquido, se tomó un tiempo de espera de cinco minutos, tras lo cual se midió la cantidad de agua en la probeta. Para obtener la relación de retención de agua por gramo de suelo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{96 \text{ ml} - \text{cantidad de agua en probeta}(5 \text{ min})}{20 \text{ g suelo}} = \frac{\text{ml agua}}{\text{g suelo}} \quad (3)$$



Figura 4. Acople de la probeta con el embudo y el papel filtro (#4) para la prueba de retención de agua por gramo de suelo con la que se evaluaron los suelos de esta investigación.

B) Pruebas de textura de suelos: Se tomó suelo de las muestras el cual se tamizó y secó en papel periódico. Luego se procedió a llenar una serie de recipientes de 500 ml con suelo a $\frac{1}{4}$ parte del volumen del mismo. Tras lo anterior se agregaron 350 ml de agua y una cucharadita de detergente que no generara espuma (para lavadora automática de platos y cristalería, ver Figura 5). Posteriormente, la solución se agitó por 15 minutos y se tomaron las medidas respetando los tiempos de espera a continuación:

- Tras un minuto en reposo, se marcó el nivel de la arena
- En dos horas en reposo, se marcó el nivel del limo
- En tres días de reposo, se marcó el nivel de arcilla



Figura 5. Preparación de la prueba de textura con la que se evaluaron los suelos analizados

Por último, se calcularon los porcentajes de cada uno de los tipos de partículas con respecto al nivel de todos los sedimentos y con el uso de la cuadro 1 se determinó el tipo de suelo.

$$\text{Porcentaje de Arcilla} = \frac{\text{grosor de capa de arcillas}}{\text{grosor de capa de sedimentos}} \quad (4)$$

$$\text{Porcentaje de Limo} = \frac{\text{grosor de capa de limos}}{\text{grosor de capa de sedimentos}} \quad (5)$$

$$\text{Porcentaje de Arenas} = \frac{\text{grosor de capa de arenas}}{\text{grosor de capa de sedimentos}} \quad (6)$$

Cuadro 2. Porcentaje de Texturas

Fuente: [32]

CLASIFICACION TEXTURAL	% ARENAS	% LIMO	% ARCILLA	TIPO
ARENAS	85-100	0-18	0-10	LIGERO
ARENA MIGAJON	70-90	0-30	0-15	LIGERO
MIGAJON ARENOSO	52-82	0-48	0-20	LIGERO
MIGAJON ARCILLO ARENOSO	45-80	0-28	20-35	MEDIO
MIGAJON ARCILLO LIMOSO	0-20	20-72	28-40	MEDIO
FRANCO	24-52	28-50	8-28	MEDIO
MIGAJON LIMOSO	0-50	50-80	0-28	MEDIO
MIGAJON ARCILLOSO	20-45	15-52	28-40	MEDIO
LIMO	0-20	80-100	0-12	MEDIO
ARCILLA ARENOSA	45-65	0-20	35-55	PESADO
ARCILLA	0-45	0-40	40-100	PESADO
ARCILLA LIMOSA	0-20	40-60	40-60	PESADO

2. Pruebas a la planta

2.1. Pruebas agronómicas:

A) Se realizaron una serie de pruebas cuantitativas de raíz en el laboratorio de microbiología de suelos de la Sede del Atlántico de la Universidad de Costa de Rica. Inicialmente se realizó la separación de la raíz del resto de la planta en muestras recolectadas de forma aleatoria de cada uno de los tratamientos establecidos

originalmente. Se procedió al lavado de las raíces con agua destilada para eliminar el suelo de estas y las raíces lavadas se colocaron sobre una bandeja para digitalización como se muestra en la Figura 6. Tras la digitalización se realizó el análisis de una serie de indicadores morfológicos de raíz como el diámetro, largo y volumen usando el programa WinRHIZO [28].



Figura 6. Colocación de raíces en la bandeja y en el escáner

- B) Se llevaron a cabo mediciones del tamaño de hojas en base a la metodología de la Unidad de Recursos Forestales de la Universidad de Costa Rica. Para ello se tomaron 56 hojas de cada tratamiento (26 hojas de culantro y 26 hojas de espinaca) a las cuales se les midieron el ancho y el largo con un vernier digital.
- C) Se llevaron a cabo determinaciones de la biomasa de plantas según la metodología de la Unidad de Recursos Forestales de la Universidad de Costa Rica. Para lo anterior se procedió a escoger cuatro plantas de culantro y cuatro plantas de espinaca por cada uno de los tratamientos. Luego se cortó el tallo de la raíz y cada parte fue pasada antes de

ser colocada en un sobre por separado para ser secadas, en un horno a 60 grados por cinco días. Tras este periodo, se pesaron de nuevo el tallo y la raíz de cada planta.

Para obtener el porcentaje la biomasa de la planta se utilizó la siguiente ecuación:

$$Biomasa Raiz = \frac{A}{B} * 100 \quad (7)$$

$$Biomasa Tallo = \frac{C}{D} * 100 \quad (8)$$

Dónde:

A: peso húmedo de la raíz

B: peso seco de la raíz

C: peso húmedo del tallo

D: peso seco del tallo

Etapa 6 (Pruebas estadísticas y análisis de resultados)

Tras la obtención de resultados se realizaron pruebas estadísticas (pruebas ANOVA, Tukey, análisis multivariado) entre los diversos tratamientos para analizar los procesos a nivel de biosistema que se llevaron a cabo durante la experimentación. Las pruebas escogidas se hicieron respetando la normalidad y características de los datos. En todos los casos, los tratamientos experimentales se compararon con el control, de modo que las hipótesis nulas de trabajo se diseñaron en forma de no diferencias con el control. Se usó un valor de corte de rechazo de la hipótesis nula de 0,05 y el análisis se llevó cabo en JMP, v.10 y en Past v.3.12.

5. Resultados

Resultados y discusión

Los resultados y discusiones obtenidas en la investigación se presentan a continuación, las pruebas fueron tratadas en orden cronológico de la metodología con la finalidad de mejorar la comprensión del mismo, siendo dividido en dos secciones de trabajo para evitar confusiones al lector.

Sección 1. (Pruebas al suelo)

Pruebas biológicas

Como se muestra en la Figura 7 las pruebas microbiológicas de suelo mostraron diferencias significativas entre tratamientos en términos del porcentaje de los tres grupos de microorganismos que se documentaron; siendo el T2 el que presentó los valores más altos de incidencia de hongos, bacterias y actinobacterias. El mismo patrón se documentó para respiración del suelo según se observa en la Figura 8. Con respecto al control, que no fue inoculado con el biofertilizante, se observó un aumento en la actividad microbiana en casi todos los tratamientos (ver cuadro 3).

Cuadro 3. Cambio porcentual en la actividad microbiana con respecto al tratamiento control tras el proceso de biofertilización del suelo y cosecha de las plantas estudiadas.

	Hongos (%)	Bacterias (%)	Actinobacterias (%)
T1	-13,1	2,9	1,3
T2	15,5	7,3	79,7
T3	1,1	-14,8	47,2

La respiración del suelo mostró un amplio aumento con relación a los valores obtenidos para el control. En el caso del T2 el incremento fue de un 128%, mientras que para T3 y T1, los valores aumentaron un 76% y un 6 %, respectivamente. Lo anterior es interesante ya

que muestra que los valores más altos de incremento en la respiración de suelo, así como en la actividad microbiológica del mismo estuvieron asociados con T2 más que con los otros dos tratamientos.

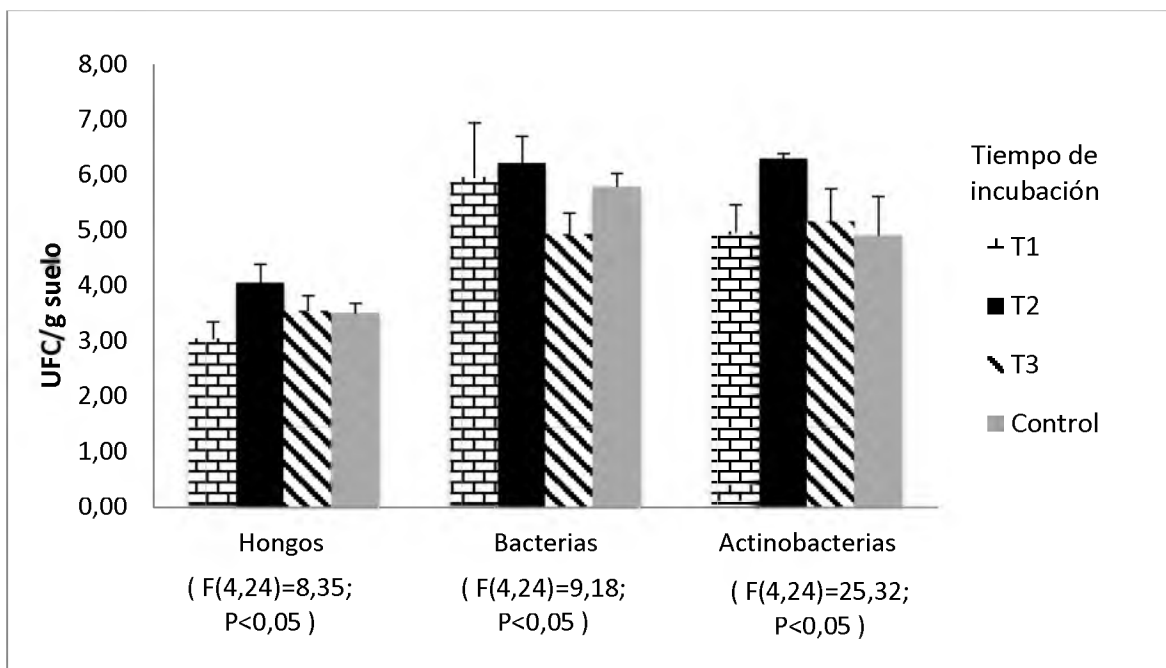


Figura 7. Incidencia de los tres grupos de microorganismos estudiados en el presente proyecto a partir de las muestras de suelo de cada tratamiento.

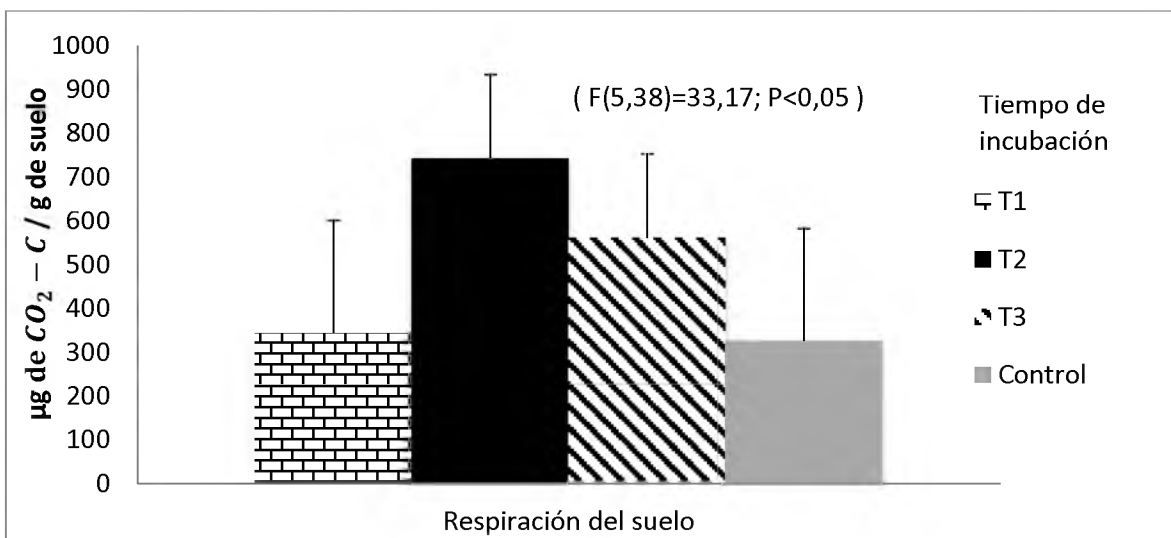


Figura 8. Respiración de suelo ($CO_2 - C$) obtenida de cada tratamiento a partir de las muestras de suelo, tras la cosecha.

Pruebas químicas

En la Figura 9 se muestran los resultados de la determinación de carbono en las muestras de cada tratamiento. Es evidente que T2 fue el tratamiento que presentó los valores más altos tanto para la cantidad de carbono orgánico como en términos de materia orgánica. A pesar de lo anterior, para todos los tratamientos se observó un aumento de estos dos estimadores de carbono con respecto al control.

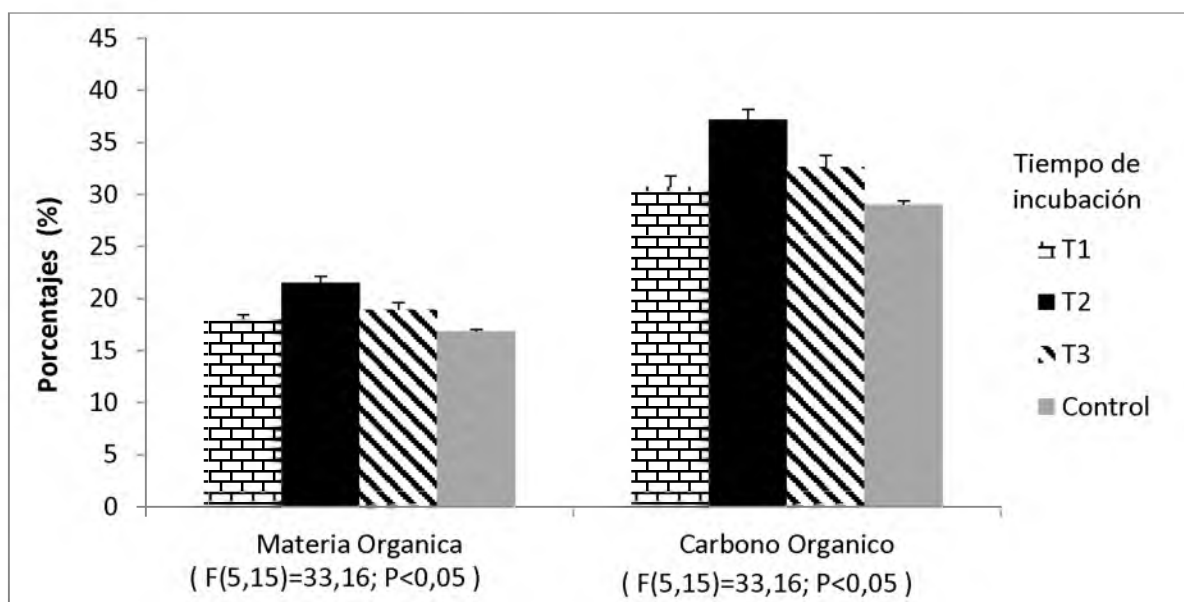


Figura 9. Resultados de las dos pruebas de carbono llevadas a cabo con muestras de suelo de cada tratamiento en el presente estudio.

El nivel de Ca^{2+} aumentó significativamente en T2 con respecto a los otros tratamientos y al control ($t=-33,03$, $P<0,05$). De forma similar, la Capacidad de Intercambio de Cationes Efectiva (CICE) mostró niveles significativamente mayores asociados a T2 ($t=-53,81$, $P<0,05$). Los niveles de P^{5+} , Fe^{3+} y Zn^{2+} fueron significativamente más bajos en el control que en cualquier de los tratamientos ($t=-39.12$, $P<0,05$), a pesar de que T3 fue el que mostró los valores más altos. De forma interesante, los niveles de K^{+} y Mg^{2+} no variaron significativamente entre el control y los tratamientos. En la Figura 10 se observa un patrón

similar al anterior en el sentido de que los valores más altos de pH estuvieron asociados con T2. Estos resultados fueron consecuentes con la literatura en el sentido que los índices biológicos y químicos son representativos de la dinámica, balance y detección de procesos de restauración del suelo.

El aumento en las colonias microbianas permitió aumentar los porcentajes de materia orgánica y respiración de suelos [3], de la misma manera sucedió en invernaderos tomate-soya en el cual se observaron aumentos en la cantidad de carbono orgánico y respiración de suelos al utilizar MM [14]. Sin embargo, los pH de los tratamientos T1 y T3 fueron menores que el control. Es interesante en todo caso observar que las diferencias son significativas y que efectivamente T2 moduló de forma positiva el grado de acidez del suelo, acercándolo a un pH neutro. Lo cual era de esperarse ya que en la literatura se dice que el tratamiento aplicado con MM, tiende a mantener su neutralidad o equilibrio [14], los niveles esperados con el uso de MM ondulan entre 5,7 y 6,02 [15].

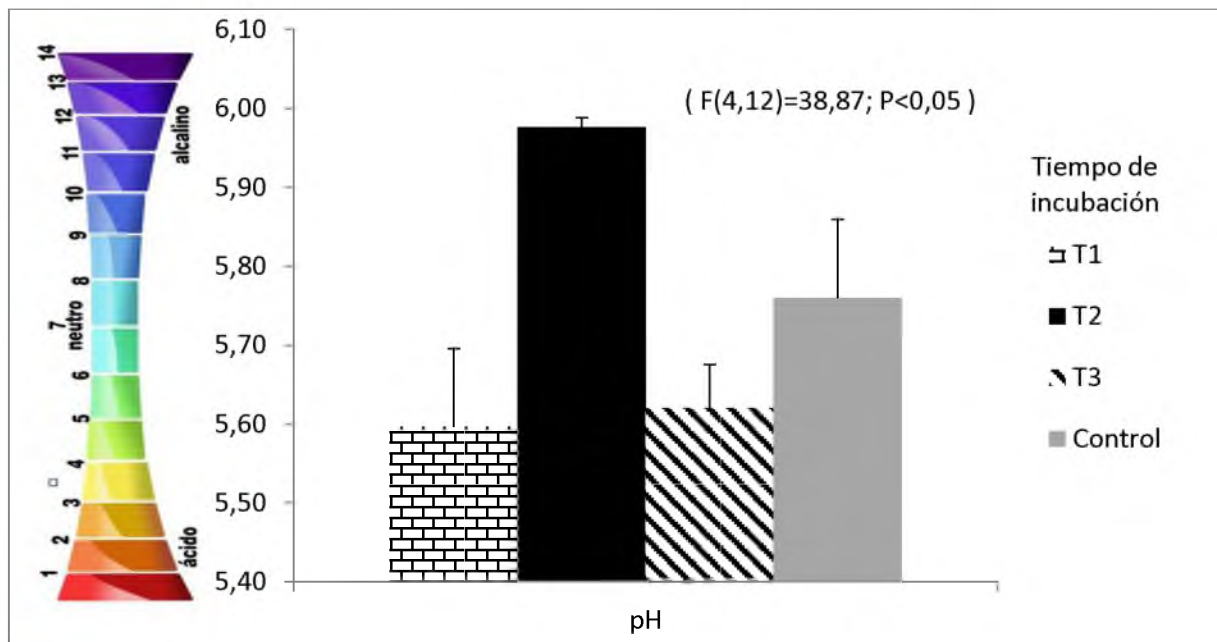


Figura 10. Resultado de la medición de pH en suelo a partir de muestras obtenidas de cada tratamiento.

Pruebas físico-estructurales

Una de las hipótesis de partida era que a partir de un proceso de biofertilización, al aumentar la complejidad de la microbiota en la matriz edáfica, se aumentaría el grado de partícula en el suelo. Los hongos endomicorrícicos tienen la capacidad de producir glomalina y por medio de procesos cohesivos aumentar al tamaño de las partículas en el suelo [33] y con ello aumentar el grado de retención de agua [34].

Sin embargo, como se muestra en la Figuras 11 y 12 ni la capacidad de retención de agua, ni la textura general del suelo en sus componentes granulométricos fueron diferentes entre tratamientos. Lo anterior es interesante desde el punto de vista del tiempo que se necesita para poder observar estas diferencias, pero en el caso del presente estudio, muestra que con los sistemas estudiados, el corto tiempo de cultivo fue una limitante para poder documentar los mencionados procesos.

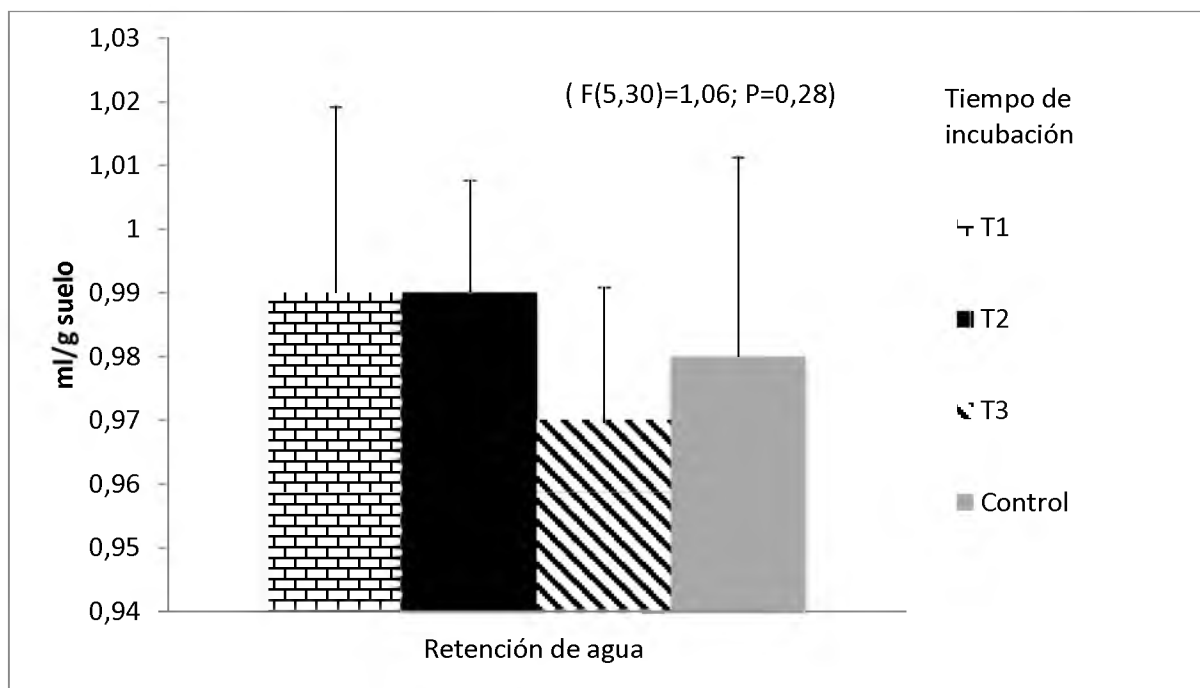


Figura 11. Capacidad de retención de agua en el suelo obtenida para cada tratamiento.

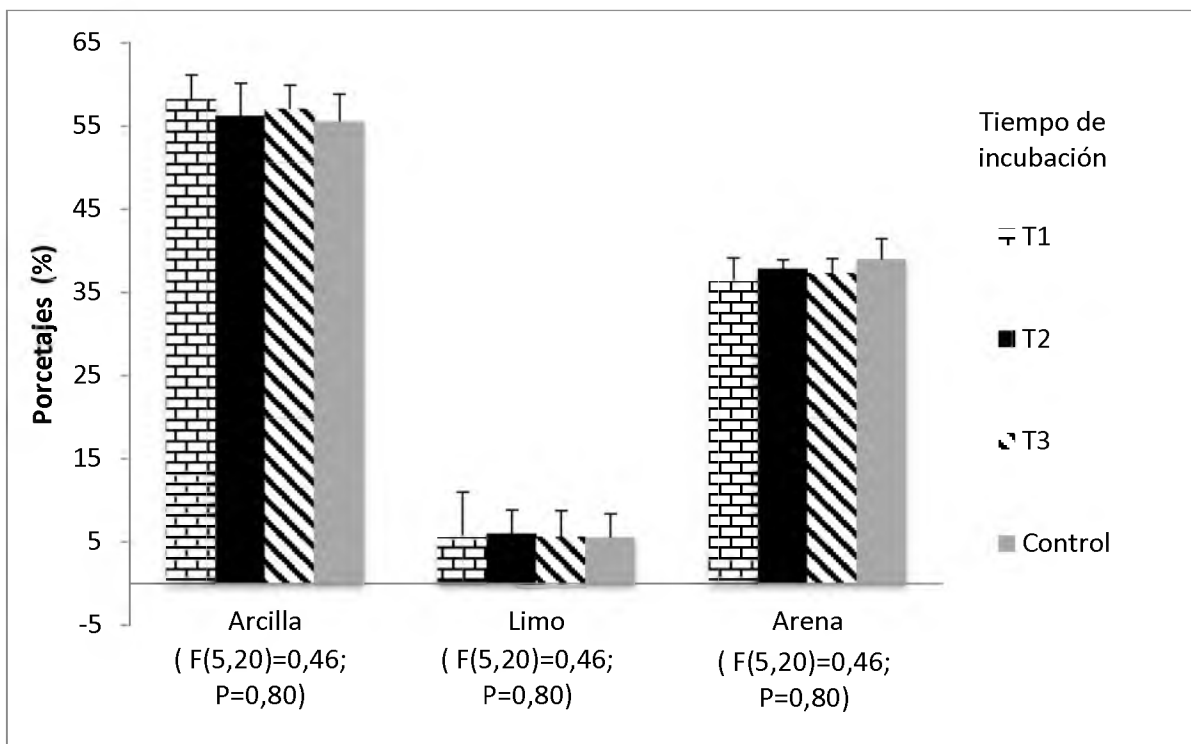


Figura 12. Porcentaje de arcilla, limo y arena determinados para cada tratamiento.

Sección 2. (Pruebas a la planta)

Pruebas agronómicas

Como se muestra en las Figuras 13 y 14 el diámetro promedio de raíz y el volumen total de raíces no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguno de los dos tipos de planta estudiados en este trabajo. La literatura muestra que el diámetro y estructura de algunas plantas depende del tipo de textura de suelo, frecuencia y tiempo de riego [35], por lo cual al no existir cambios en la parte físico estructural del suelo no se deberían mostrar cambios representativos en el diámetro y volumen de raíces. A pesar de ello, se observó una tendencia en T2 y T3 a desarrollar raíces con diámetros más grandes con respecto a los controles respectivos para ambos cultivos. En algunos casos, las comparaciones puntuales entre tratamientos y control fueron significativas, pero no se muestran en esta sección.

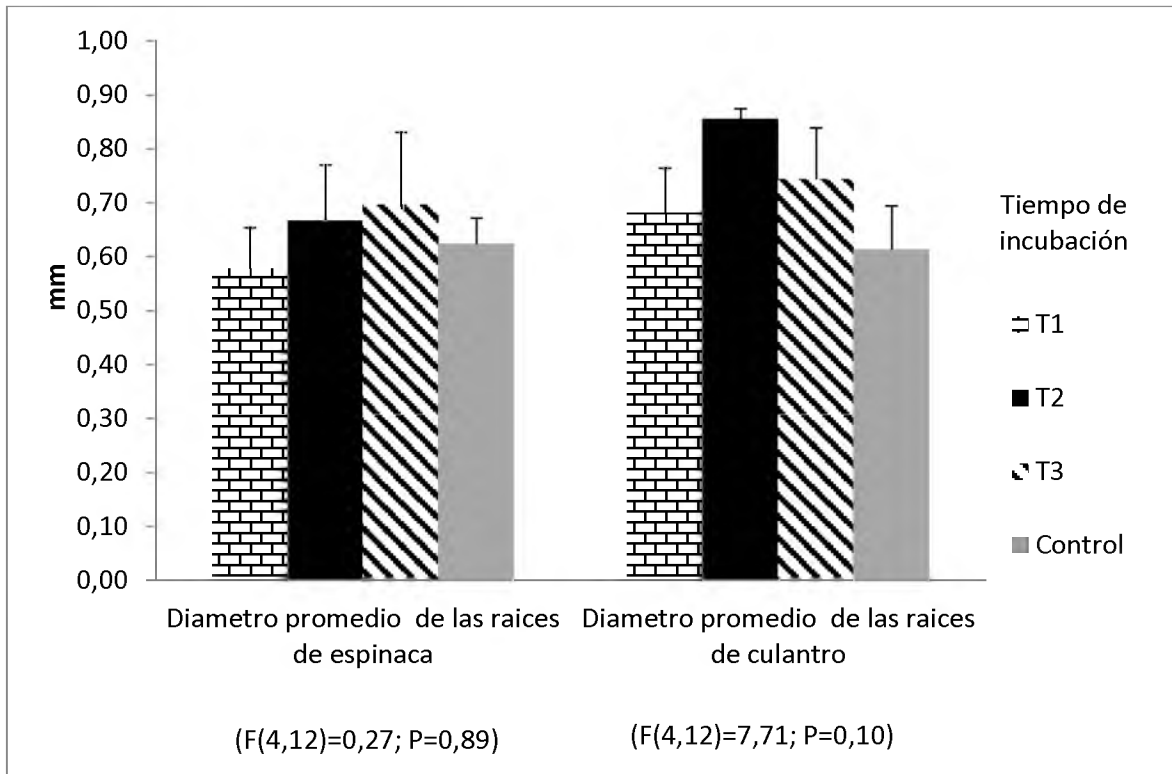


Figura 13. Diámetro promedio de las raíces de espinaca y culantro para cada tratamiento.

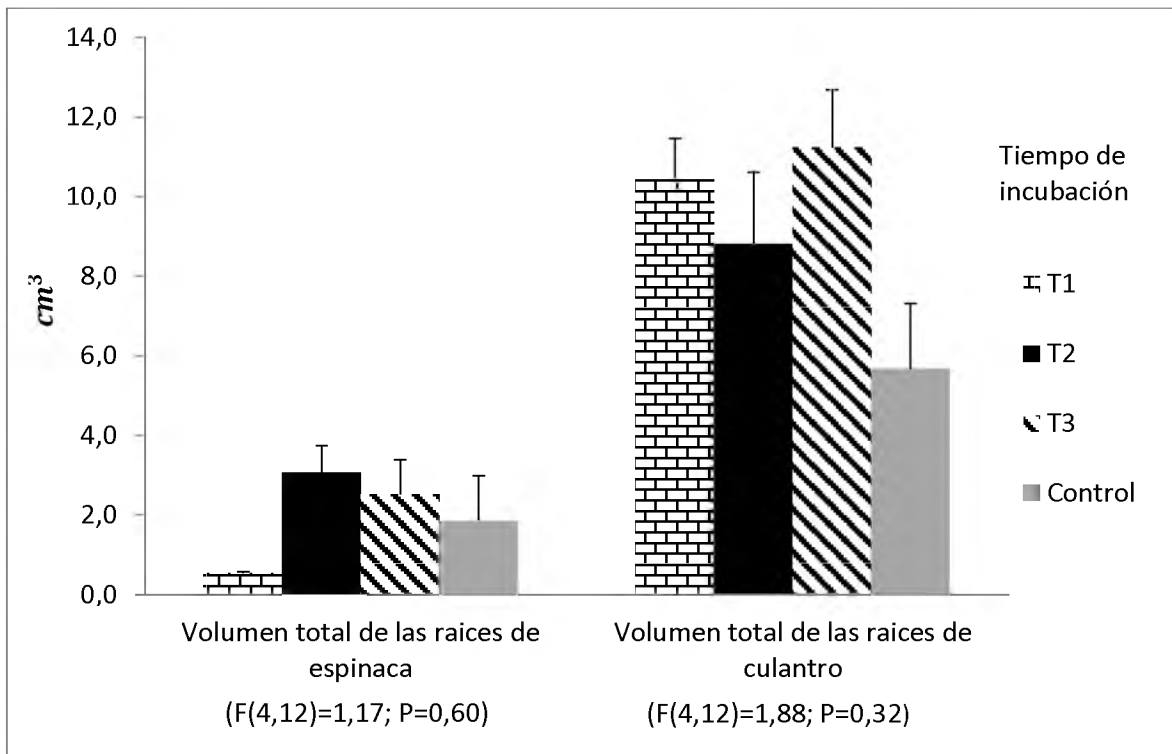


Figura 14. Volumen total de las raíces de culantro y espinaca para cada tratamiento.

De forma interesante, tanto la longitud total como el área total de las raíces fueron significativamente diferentes en las plantas de culantro pero no en las de espinaca con respecto a los controles (Figuras 15 y 16). En estos casos, fueron precisamente T1 para la longitud total y T1/T3 para el área total, los dos tratamientos que presentaron los valores más altos. Sin embargo, para el caso de espinaca, aunque no fue significativa la comparación, se observó que fue T2 el tratamiento que mostró la tendencia más pronunciada a aumentar ambos indicadores.

Estos resultados se encuentran dentro de los parámetros esperados ya que la presencia de microorganismos benéficos alrededor de la raíz establece y acelera procesos bioquímicos que influyen sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas [36]. Con respecto, al culantro la literatura referencia que al aumentar los microorganismos existe mayor desarrollo de raíces laterales y secundarias [37], por lo cual a la hora de realizar la metodología de las pruebas es difícil de cuantificar el material perdido tanto en extracción como en lavado de las raíces.

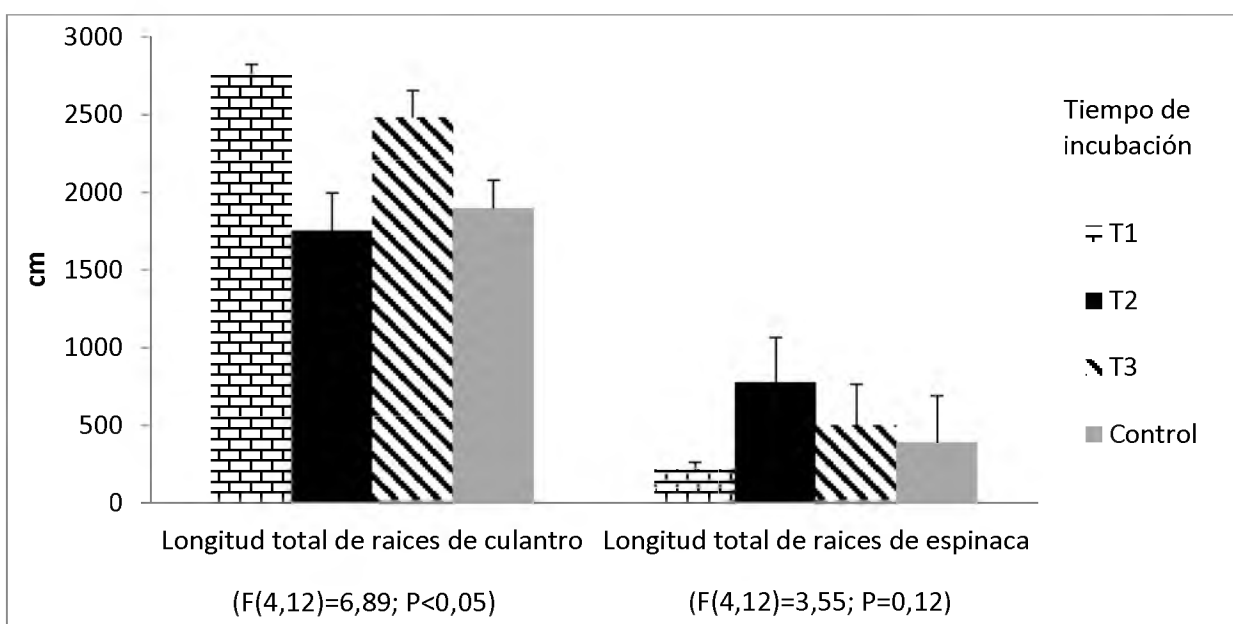
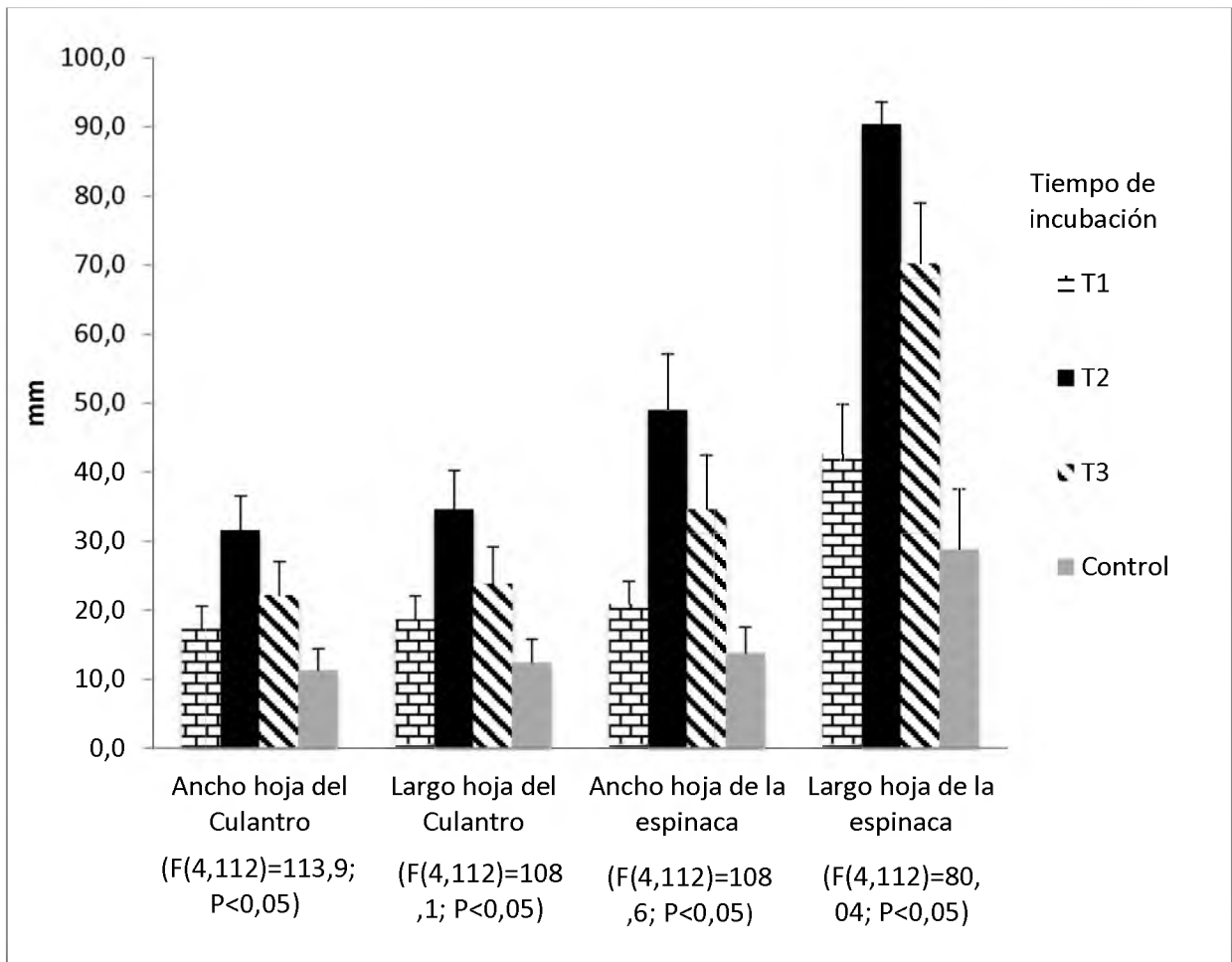
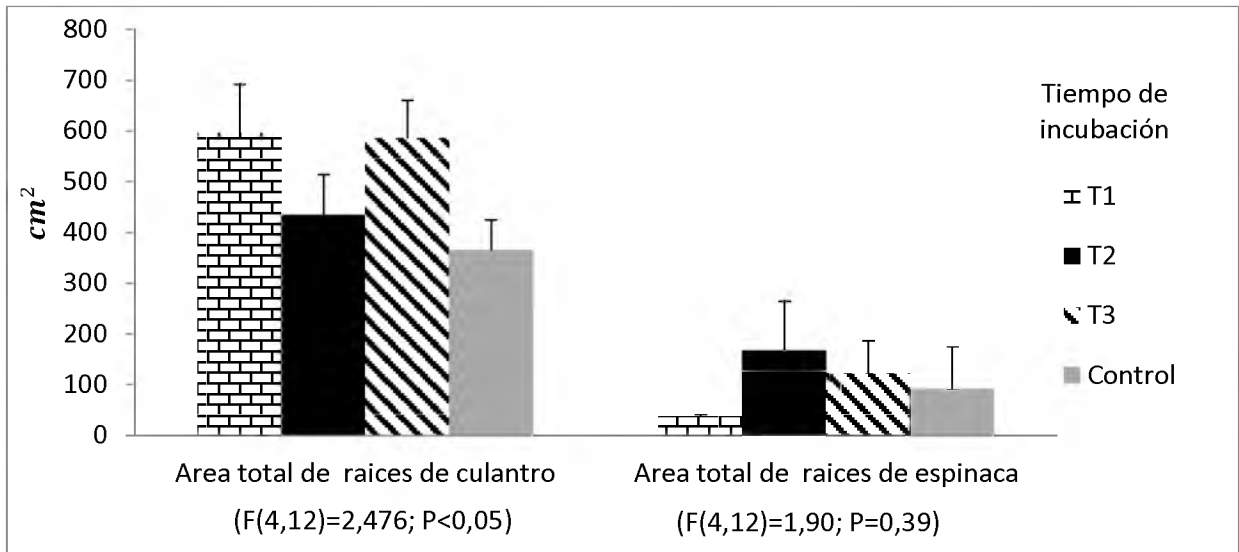


Figura 15. Longitud total de las raíces de culantro y espinaca para cada tratamiento



Por su parte, el ancho y el largo promedio de las hojas de culantro y espinaca mostraron diferencias significativas muy obvias entre los diferentes tratamientos y los controles (Figura 17). Con respecto a estos indicadores, T2 fue el tratamiento que presentó los valores más altos de crecimiento foliar mostrando hasta un 200 % de aumento en las hojas de espinaca y un 150% en las hojas de culantro con respecto a los controles. A pesar de lo anterior, para todos los tratamientos se observó un aumento de tamaño considerable con respecto a los controles (ver Cuadro 4).

Cuadro 4. Aumento porcentual de la longitud y el ancho de las hojas con respecto a los tratamientos control establecidos en el presente proyecto

#	Culantro		Espinaca	
	Ancho (%)	Largo (%)	Ancho (%)	Largo (%)
T1	53,18	50,62	51,75	48,12
T2	180,49	179,43	256,44	214,03
T3	96,46	92,56	151,93	144,07

Estos comportamientos pueden verse relacionados a efectos positivos suelo/planta. Al inducir los MM, el desarrollo poblacional fue mayor, acelerando la mineralización del suelo y suministrando nutrientes suficientes en cantidad y calidad para aumentar el crecimiento de las plantas, transformando y controlando estos materiales sin causar influencias negativas en el proceso [15]. De manera análoga a este experimento, se presentaron resultados parecidos en invernaderos de tomate [14], plantaciones de acelgas [15] y sistemas agroforestales [11].

La biomasa promedio del tallo y de la raíz (las dos secciones de la planta estudiadas) en los dos tipos de plantas estudiados mostraron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 18). Para ambas plantas T2 fue el tratamiento que presentó los valores más bajos de biomasa, lo cual estuvo principalmente asociado con la mayor pérdida de fluidos tras el

proceso de secado. El peso seco promedio para ambas plantas mostró aumentos considerables de hasta un 1000% para T2 en espinaca y hasta un 350% para T2 en culantro con respecto a los controles respectivos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Comparación del cambio porcentual en el peso seco promedio de ambas plantas estudiadas con respecto al control respectivo.

#	Aumento en el peso seco promedio de la planta de espinaca (%)	Aumento en el peso seco promedio de la planta de culantro (%)
T1	138,8	28,1
T2	1086,5	345,4
T3	186,2	194,3

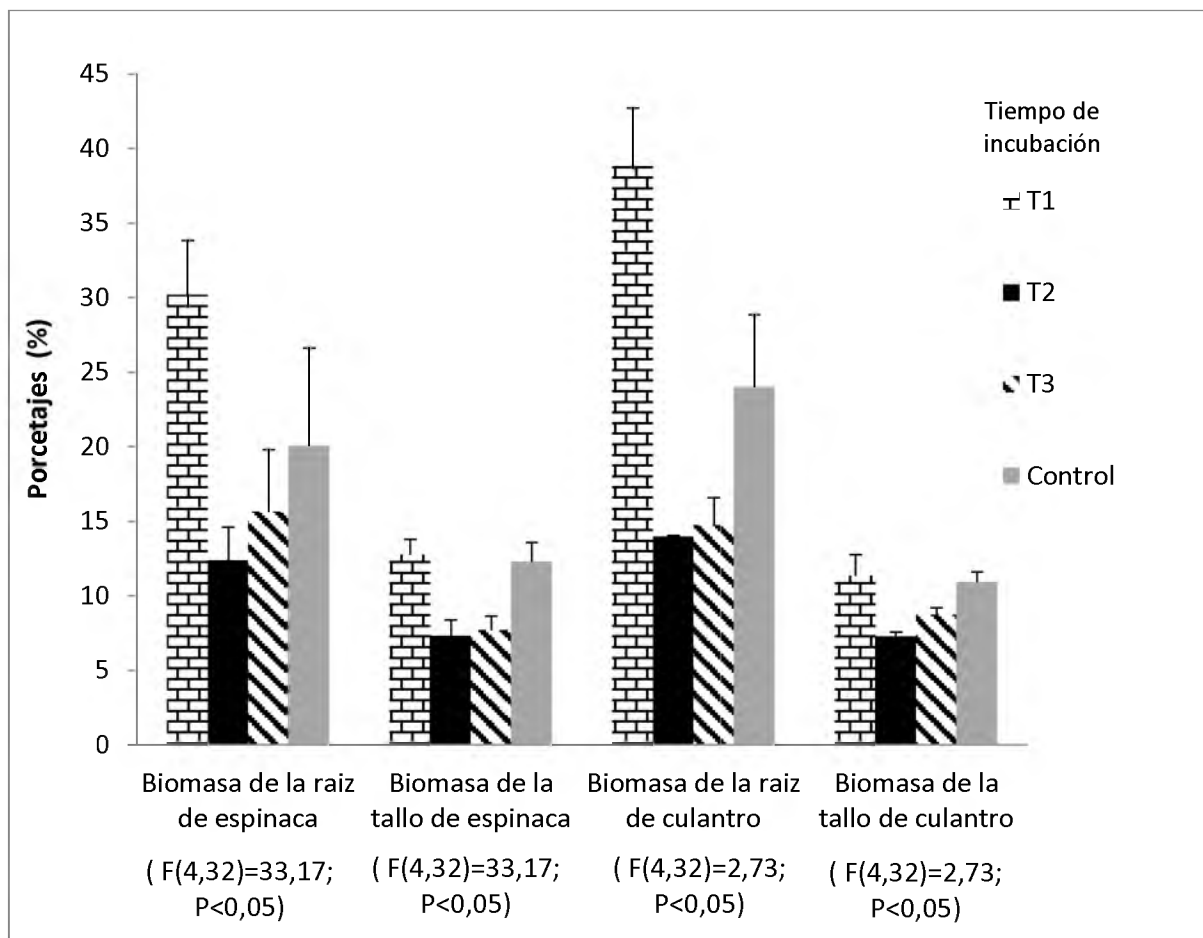


Figura 18. Biomasa determinada tras la cosecha para cada tratamiento según sección estudiada de la planta.

La implicación de lo anterior, es que T2 fue el tratamiento que tuvo el impacto más grande sobre el desarrollo de las plantas al favorecer un aumento en el peso seco total y en la cantidad de agua en las plantas. En el caso de la biomasa de la planta, es valor tiende a aumentar al incrementar la presencia de bacterias, hongos y actinobacterias, estas últimos son las principales responsables del referido ciclaje de nutrientes en el suelo [38], los cuales son utilizados de manera directa en el desarrollo de la planta siendo un recurso clave a nivel de biotecnología agrícola [39], un caso concreto fue en los invernaderos de tomate-soya los cuales presentaron un aumento en la producción de biomasa (64% en soya, 179% en tomate) [14].

Después de estudiar los resultados individuales mostrados hasta ahora, al utilizar técnicas multivariadas de análisis se logró determinar el peso de interacción entre las diferentes variables estudiadas. A partir de un análisis de componentes principales (PCA) se encontró que la incidencia de actinobacterias fue el principal determinante en la dirección y magnitud de los cambios con respecto a los controles. Este comportamiento es debidamente fundamentado ya que las actinobacterias poseen un amplio margen de beneficios entre los cuales se encuentran el mejoramiento de la estructura del suelo, la promoción del crecimiento vegetal y por último la producción de compuestos bioactivos con actividad antagonista contra microorganismos patógenos, siendo estos los principales productores de antibióticos [39]. Este comportamiento fue un parámetro que se observó en la experimentación al mismo tiempo que se registró la disminución en la presencia de plagas. Por ejemplo, el gusano cortador de hojas, el cual se presentó en las plantas experimentales, no llegó en los primeros 45 días, lo cual conlleva además una potencial disminución en el uso regular de plaguicidas [17], logrando aportes al ambiente y la economía agrícola [40].

De forma similar, la retención de agua y el porcentaje de arcillas fueron factores determinantes en este análisis, estos dos parámetros son fundamentales en el desarrollo de la planta al generar sostén y alimento. Debido a que estos son además un medio fundamental para la reproducción y crecimiento de actinobacterias [41], se observa que el sistema en general se vio beneficiado con los MM. Los tres factores (incidencia de actinobacterias, retención de agua y porcentaje de arcillas) acumularon alrededor de un 99% de la variación total del set de datos completo obtenido en el estudio.

La cantidad de carbono orgánico mostró una relación positiva fuerte con el área de las hojas para ambos tipos de planta ($R^2= 0.998$ para culantro y 0.991 para espinaca; Figura 19). Lo anterior también se observó cuando se hizo la relación entre el carbono orgánico y la biomasa ($R^2= 0.98$ para culantro y 0.96 para espinaca, Figura 20).

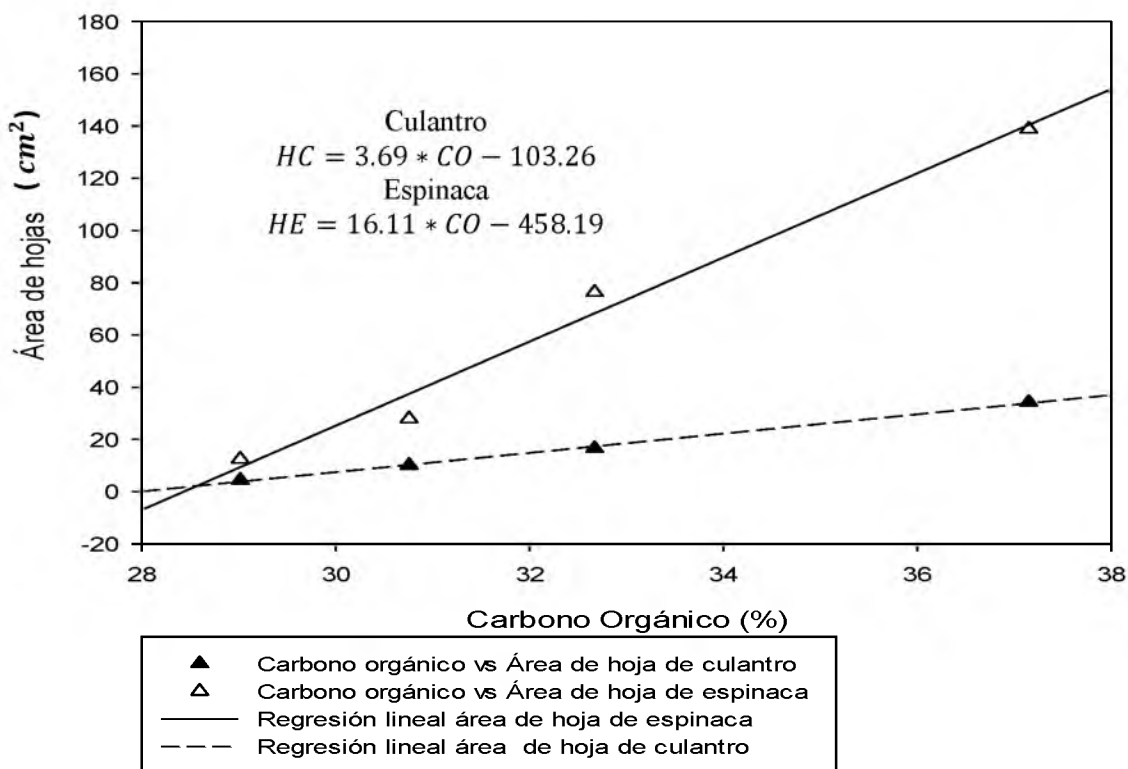


Figura 19. Comportamiento del carbono orgánico vs área de las hojas.

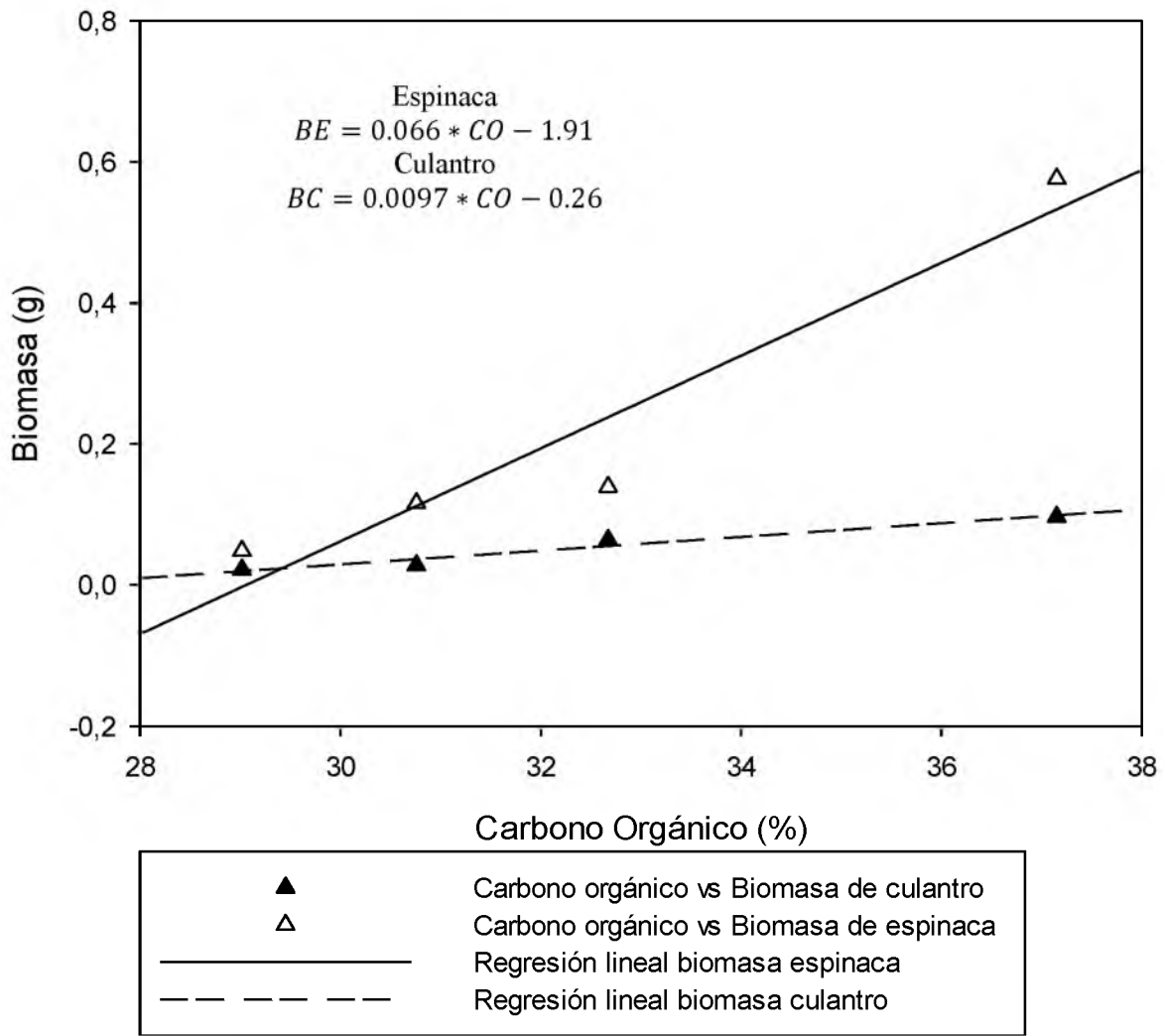


Figura 20. Comportamiento del carbono orgánico vs biomasa de las hojas.

Estas relaciones positivas con el carbono orgánico se deben a que la materia orgánica del suelo proporciona coloides de alta capacidad de intercambio catiónico (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{1+} , Na^{+} , H^{+}) [42], favoreciendo el crecimiento las plantas [43]. Todas estas relaciones positivas fueron permitidas debido al aumento de la actividad microbiana en el suelo generada por los MM.

Tanto la incidencia de actinobacterias, medida en unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo, como la respiración del suelo mostraron una serie de correlaciones positivas con el tamaño de hojas y la biomasa de las plantas estudiadas (ver Cuadro 6).

Esto no es sorprendente dado el hecho de que la actividad microbiana en el suelo tiene un efecto directo sobre las plantas (documentado a lo largo de este trabajo). Sin embargo, estos resultados proveen apoyo a esta extensa documentación del fenómeno antes explicado y ayudan a determinar los pasos futuros de este tipo de investigaciones en el país.

Cuadro 6. Comportamiento de correlaciones positivas entre diferentes parámetros de estudio.

Correlación	Coefficiente de correlación R^2	Ecuación de ajuste lineal
Actinobacterias Vs Tamaño hojas culantro	0,928	HC = 12,83*Ac - 46,99
Actinobacterias Vs Tamaño hojas espinaca	0,886	HE = 29,41*Ac - 113,09
Actinobacterias Vs Biomasa hojas culantro	0,920	BC = 0,049*Ac - 0,211
Actinobacterias Vs Biomasa hojas espinaca	0,996	BE = 0,37*Ac - 1,75
Respiración de suelos Vs Tamaño de hojas de culantro	0,964	HC = 0,044*RS - 0,21
Respiración de suelos Vs Tamaño de hojas de espinaca	0,986	HE = 0,11*RS - 9,39
Respiración de suelos Vs Biomasa de hojas de espinaca	0,894	BE = 0,0011*RS - 0,32
Hongos Vs Biomasa de hojas de espinaca	0,804	BE = 0,47*Ho - 1,45
Hongos Vs Biomasa de hojas de culantro	0,840	BC = 0,071*Ho - 0,20

6. Conclusiones

- Se puede concluir con las pruebas realizadas que los MM aumentan la complejidad del sistema agrícola de una manera eficiente, alcanzando mejoras en cantidad y calidad de producción.
- La mezcla de escenarios aeróbicos y anaeróbicos fue exitosa en las proporciones usadas por lo que se reafirma que el protocolo utilizado funciona de forma correcta.
- Se estableció que el periodo de incubación idóneo para los inóculos es de 15 días (T2) debido a que fue cuando se presentaron las mejores condiciones suelo/planta.
- Se observó un aumento en las colonias microbiológicas del suelo en todos los tratamientos, lo cual generó un aporte nutricional extra y permitió definir los parámetros de biofertilización favorables, que a su vez fueron los promotores de crecimiento de plantas.
- Los MM impactaron fuertemente las variables evaluadas, lo cual permito aumentar la biomasa y tamaño de hojas en ambos tipos de plantas. Lo anterior tiene un potencial grande de repercutir en la economía de una posible industria agrícola.
- Se observó que los dos tipos de plantas presentaron una relación favorable con los MM provistos por la biodiversidad de bosques nativos de la zona, lo cual ha permitido una incorporación exitosa de los elementos naturales en la producción agrícola.
- Se puede definir que el suelo fue impactado en la parte biológica y química no así en la fisico-estructural, lo cual es atribuido en este estudio a los periodos de ciclo corto de las plantas con los que no fue posible cuantificar los cambios fisicos, pero sí los de nutrientes y crecimiento microbiano.

- Se comprobó que las actinobacterias, hongos y bacterias son componentes fundamentales para efectos de biofertilización de suelos generando estructura y nutrientes. El potencial de estos datos es que pueden permitir eliminar tiempos de recuperación de suelos, esto debido a que al terminar la producción los suelos se encuentran en adecuadas condiciones para su uso.
- Se observó que al aplicar los MM al suelo se generó algún tipo de agente antipatógeno que evita la presencia de plagas, esto último tiene un potencial de generar un aporte económico en la industria agrícola, evitando el excesivo uso de químicos que a su vez perjudican al cambio climático.
- Se observaron correlaciones positivas entre diversos componentes, generando áreas de investigación para lograr comprender de una mejor manera estas nuevas técnicas, las técnicas proactivas con el ambiente son una necesidad de cambio en la actualidad, lo cual permite abrir nuevas áreas laborales para el sector agrícola.

7. Recomendaciones

- Se recomienda la integración de estas tecnologías en procesos de desarrollo rural para mejorar la biofertilización y la productividad, estas técnicas permiten disminuir la carga de fertilizantes ayudando en la problemática del cambio climático.
- En la etapa de reproducción de los MM es recomendable tomar en cuenta la visita de insectos y animales que puedan interferir con los procesos de reproducción microbiana que se llevan a cabo.
- Se recomienda la realización de pruebas fitopatológicas para lograr explicar la mejora en el control de plagas.

- En la etapa de preparación es preferible utilizar un porcentaje más alto de semolina por la facilidad que tienen los microorganismos de consumirla. En el caso del uso de fertirriego se aconseja realizar más secciones para mejorar la eficiencia del sistema.

8. Bibliografía

1. Martínez Trujillo M, Garcia Rivero M. Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Rev Mex Ing Química*. 2012; 11(1):55–73.
2. Garcia de Salamone IE. Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. *Rev Argent Microbiol*. 2011; 43:1–3.
3. Abril A. ¿ Son los microorganismos edáficos buenos indicadores de impacto productivo en los ecosistemas ? *Ecología Austral*. 2003 Dec; 13:195–204.
4. Cano MA. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. *Actual Divulg Científica*. 2011; 14(2):15–31.
5. Shahi A, Aydin S, Ince B, Ince O. Evaluation of microbial population and functional genes during the bioremediation of petroleum-contaminated soil as an effective monitoring approach. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2016; 125:153–60.
6. Negishi A, Maeda T, Takeuchi F, Kamimura K, Sugio T. A new bench scale restoration method for a mercury-polluted soil with a mercury resistant *Acidithiobacillus Ferrooxidans* strain SUG 2-2. In: “Biohydrometallurgy: a

sustainable technology in evolution.” Zurich, Switzerland: 15th International Biohydrometallurgy Symposium; 2003. p. 444–55.

7. Brandl H, Stagars M, Faramarzi MA. A novel type of microbial metal mobilization: cyanogenic bacteria and fungi solubilize metals as cyanide complexes. In: “Biohydrometallurgy: a sustainable technology in evolution.” Zurich, Switzerland: 15th International Biohydrometallurgy Symposium; 2003. p. 457–64.
8. Anasonye F, Winqvist E, Räsänen M, Kontro J, Björklöf K, Vasilyeva G, et al. Bioremediation of TNT contaminated soil with fungi under laboratory and pilot scale conditions. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2015; 105:7–12.
9. Conrad R. Soil Microorganisms as Controllers of Atmospheric Trace Gases (H_2 , CO , CH_4 , OCS , N_2O , and NO). *Microbiol Rev.* 1996; 60(4):609–40.
10. Liang C, Jesus E da C, Duncan DS, Jackson RD, Tiedje JM, Balser TC. Soil microbial communities under model biofuel cropping systems in southern Wisconsin, USA: Impact of crop species and soil properties. *Appl Soil Ecol.* 2012; 54:24–31.
11. Bolaños Angulo A, Azero A M, Morales E. Evaluación de la influencia de tres especies: tunal (*Opuntia ficus-indica* L.), chacatea (*Dodonea viscosa* Jacq) y molle (*Schinus molle* L.) sobre las propiedades edáficas de un sistema agroforestal sucesional en Combujo – Vinto. *Dep Cienc Exact Ing.* 2014; 6(4):395–414.
12. Ohimain EI. Available options for the bioremediation and restoration of abandoned pyritic dredge spoils causing the death of fringing mangroves in the Niger Delta. In:

“Biohydrometallurgy: a sustainable technology in evolution.” Delta State, Nigeria: 15th International Biohydrometallurgy Symposium; 2003. p. 475–82.

13. Pereg L, MacMillan M. Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. *Soil Biol Biochem.* 2013; 80:349–58.
14. Castro Barquero L, Murillo Roos M, Uribe Lorío L, Mata Chinchilla R. 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. *Agron Costarric.* 2015; 39(3):21–36.
15. Campo Martínez A del pilar, Acosta Sanchez RL, Morales Velasco S, Prado FA. Evaluación de Microorganismos de Montaña (MM) en la producción de acelga en la Meseta de Popayán. *Biotechnol Sect Agropecu Agroind.* 2014; 12(1):79–87.
16. Cabrera G, Crespo G. Influencia de la biota edáfica en la fertilidad de los suelos en ecosistemas de pastizales. *Rev Cuban Cien Agríc.* 2001; 35(1):3–9.
17. Rodríguez Calampa NY, Tafur Torres ZKL. Producción de Microorganismos de Montaña para el Desarrollo de una Agricultura Orgánica. San Martin, Perú: IV Congreso Nacional de Investigación (CONACIN) “Producción y visibilidad científica.” 2014. p. 1–2.
18. FAO. Biodegradación de Plaguicidas en Semillas Contaminadas. Vol. 3. Asunción Paraguay; 2010.

19. Kalema J, Chacón M. Organic Fertilizers and Bio-ferments. Uganda, Africa Occidental. 2010; 1(1):1–30.
20. Facultad de Ciencias Químicas, Veracruzana U. Biorreactores y su aplicación [Internet]. 2016. p. 4. Disponible en: <https://sites.google.com/site/bioingenieriauv15/unidad-2-biorreactores-y-su-aplicacion>
21. Rahman, K. Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy P& B. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. Bioresour Technol. 2002; 85(3):257–61.
22. Liu H, Guo S, Jiao K, Hou J, Xie H, Xu H. Bioremediation of soils co-contaminated with heavy metals and 2,4,5-trichlorophenol by fruiting body of *Clitocybe maxima*. J Hazard Mater. 2015; 294(1):121–7.
23. Jonsson A, Haller H. Sustainability Aspects of In-Situ Bioremediation of Polluted Soil in Developing Countries and Remote Regions. Inst Investig Biotecnológicas. 2014; 1:1–30.
24. Altier N, Beyhaut E, Pérez C. Beneficial effects of plant growth-promoting Rhizobacteria on improved crop production: prospects for developing economies. Bact Agrobiol Crop Product. 2013; 1:167–84.
25. Godoy Faúndez A, Reyez Bozo L, Montecinos Bustamente W, Quiroz Valenzuela S. Sustainable bioremediation, industrial ecology and public policies: new challenges

- for Chile. *Bioremediation Biotechnol Eng Environ Manag.* 2014; 14(76):1–30.
26. Zúniga Martínez É. *Diseño y evaluación del riego a presión.* 1st ed. San Jose, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica; 2004. 255 p.
 27. Keller J, Bliesner R. *Sprinkle and trickle irrigation.* 1st ed. New York: Van Nostrand Reinhold; 1990. 652 p.
 28. Aguilar J. *Identificación de los factores bióticos (Hongos, Nematodos) y abióticos (Nutrición) que producen el deterioro radical en el cultivar Gros Michel (Musa AAA) en asocio con café en el cantón de Turrialba, Costa Rica.* Universidad de Costa Rica; 2014.
 29. Anderson JPE. *Soil Respiration.* In: Page A., editor. *Methods of soil analysis.* 2nd ed. Madison, Wisconsin (USA): American Society of Agronomy and Soil Science of America; 1982. p. 831–52.
 30. Rudolph A, Franco C, Becerra J, Barros A, Ahumada R. *Evaluación de materia orgánica e hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos superficiales, Bahía Concepción-Chile.* *Boletín la Soc Chil Química.* 2002 Dec; 47(4):1–12.
 31. Briceño J, Pacheco R. *Métodos analíticos para el estudio de suelos y plantas.* San Jose: Universidad de Costa Rica; 1984. 1-137 p.
 32. Cisneros R. *Apuntes de Riego y drenaje.* Facultad de Ingeniería, editor. Mexico: Universidad Autónoma de San Luis Potosí; 2003. 1-163 p.

33. Haddad M, Sarkar D. Glomalin , a newly discovered component of soil organic matter : Part I - Environmental significance Glomalin , a newly discovered component of soil organic matter : Part I — Environmental significance. Environ Geosci. 2012; 10(3):91–8.
34. Augé RM, Stodola AJ., Tims JE, Saxton AM. Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. Plant-Soil Relationships. 2001; 230(1):87–97.
35. Callejas Rodríguez R, Rojo Torres E, Benavidez Zabala C, Kania Kuhl E. Crecimiento y distribución de raíces y su relación con el potencial productivo de parrales de vides de mesa. Agrociencia. 2012; 23–35.
36. Reyes I, Valery A. Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento Del maíz (zea mays l.) Con azotobacter sppitle. Bioagro. 2007; 19(3):117–26.
37. Carrillo Becerra K, Colmenares A, Ramírez Caicedo L, Moreno Rozo L, Cardenas Caro D. Inoculación de Cilantro (Coriandrum sativum L .) con Rizobacterias en Villa del Rosario , Norte de Santander. 2015; 68(12):7459–70.
38. Nuñez Ravelo F. Efectos de la costra microbiótica en algunas propiedades del suelo en el sur de la quebrada Los Barrancos , Valle de Quíbor , Venezuela. Boletín Inst Geogr. 2014; 84(1):5–19.
39. Franco Correa M. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización Use of actinomycetes in processes biofertilization. Rev Peru Biol. 2010; 16(2):239–

42.

40. Julca Otiniano A, Meneses Florián L, Blas Sevillano R, Bello Amez S. La materia orgánica , importancia y experiencias de su uso en la agricultura. IDESIA. 2006; 24(1):49–61.
41. Ramos Agüero D, Terry Alfonso E. Revisión bibliográfica. Generalidades de los abonos orgánicos : importancia del bocashi como alternativa nutricional para suelos y plantas. Cultiv Trop. 2014; 35(4):52–9.
42. Martínez E, Fuente JP, Acevedo E. Carbono orgánico y propiedades del suelo. Rev Cienc suelo Nutr Veg. 2008; 8(1):68–96.
43. Díaz Barragán OA, Montero Robayo DM, Lagos Caballero JA. Acción de microorganismos eficientes sobre la actividad de intercambio catiónico en plántulas de acacia (*Acacia Melanoxylon*) para la recuperación de un suelo del Municipio de Mondoñedo, Cundinamarca. Rev Colomb For. 2009; 12(1):141–60.