

**Efecto de fermentos microbianos sobre el desarrollo de plántulas de caña de azúcar  
(*Saccharum officinarum* L.)**

**Sharon Badilla Arias**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA  
CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA**

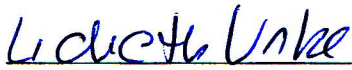
**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**2019**

Efecto de fermentos microbianos sobre el desarrollo de plántulas de caña de azúcar  
(*Saccharum officinarum* L.)

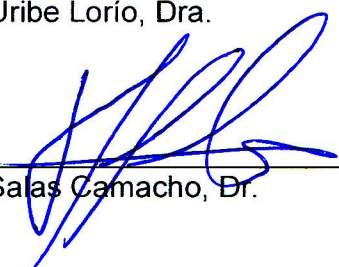
Sharon Badilla Arias

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA  
CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA

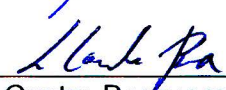


Lidieth Uribe Lorío, Dra.


DIRECTORA DE TESIS PRÁCTICA

  
Rafael Salas Camacho, Dr.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

  
Leida Castro Barquero, Lic.


MIEMBRO DEL TRIBUNAL

  
Stefany Campos Boza, Lic.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

  
Luis Gómez Alpízar, Dr.

DIRECTOR DE ESCUELA

  
Sharon Badilla Arias, Bach.

SUSTENTANTE

2019

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia: Patricia Arias U., Michael Seaward, Stephanie y María José Badilla Arias por sus palabras de apoyo y amor incondicional.

A José González por su apoyo y palabras de aliento.

A Lidieth Uribe por su guía y paciencia.

A Leida Castro por sus comentarios y disposición a ayudar.

A Rafael Salas y Stephany Campos sus comentarios y retroalimentación.

A los miembros del laboratorio de Microbiología de suelos.

A Hacienda Mojica por su colaboración.

A todos los profesores que de una u otra manera me ayudaron y aconsejaron en mi proceso de formación.

A mis colegas de generación que siempre han sido un gran apoyo.

# Índice general

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
Objetivo general: .....	4
Objetivos específicos:.....	4
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
Caña de azúcar.....	5
Producción mundial y Nacional.....	6
Materia orgánica en suelo .....	7
Valorización de residuos.....	8
<b>Fermentos microbianos</b> .....	<b>9</b>
Biofermentos o bioles .....	9
Microorganismos de montaña .....	10
<b>Microorganismos presentes en fermentos microbianos</b> .....	<b>11</b>
Actinomicetes.....	11
Levaduras .....	12
Bacterias.....	12
Lactobacilos.....	13
Solubilizadores de fósforo .....	13
Uso previo de MM.....	14
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>15</b>
Preparación de los fermentos sólidos:.....	15
Preparación de los Biofermentos: .....	18
Establecimiento del ensayo de invernadero .....	19
Variables evaluadas: .....	21
Análisis de datos .....	22
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>23</b>
1. Caracterización de la población microbiana de los biofermentos.....	23
Población microbiana en los insumos .....	23
Poblaciones microbianas en los fermentos sólidos .....	25
Poblaciones microbianas en los biofermentos o bioles.....	27
2. Efecto de los tratamientos sobre las plantas.....	35
3. Efecto de los tratamientos sobre variables del suelo.....	45
3.1 Propiedades químicas .....	45
3.2 Poblaciones microbianas .....	47
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>50</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>51</b>
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>52</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>63</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Recolección de mantillos a. Zona de recolección de mantillo de montaña, b. Mantillo recolectado, c. Zona de recolección de mantillo de bambú, d. Apariencia de mantillo de bambú.....	16
<b>Figura 2.</b> Preparación del biofermento sólido a. Ingredientes de biofermentos sin mezclar, b. ingredientes mezclados c. biofermento apelmazado, d. salida de gas, e. biofermentos almacenados.....	17
<b>Figura 3.</b> Preparación de los fermentos líquidos. a. Insumos y recipientes utilizados, b. Fermentación de biofermentos líquidos. ....	19
<b>Figura 4.</b> Aplicación de fermentos líquidos en macetas sembradas con caña.....	20
<b>Figura 5.</b> Efecto del factor tipo de mantillo sobre la población de lactobacilos presente en los bioles. ....	31
<b>Figura 6.</b> Efecto del factor lote sobre la población de Lactobacilos presentes en los diferentes bioles.....	33
<b>Figura 7.</b> Lactobacilos presentes según tratamiento y lote.....	34
<b>Figura 8.</b> Número de tallos y brotes según tratamiento.....	36
<b>Figura 9.</b> Altura y grosor según tratamiento .....	37
<b>Figura 10.</b> Largo y número de hojas según tratamiento.....	38
<b>Figura 11.</b> Área y ancho de hojas según tratamiento .....	39
<b>Figura 12.</b> Peso aéreo fresco y seco según tratamiento.....	40
<b>Figura 13.</b> Peso radical fresco y seco según tratamiento .....	41
<b>Figura 14.</b> Relación R/T fresco y seco según tratamiento .....	42
<b>Figura 15.</b> Deficiencias nutricionales presentes en todos los tratamientos a la semana 18. ....	65
<b>Figura 16.</b> Crecimiento de <i>Mucor</i> sp. en tratamiento MA.....	65
<b>Figura 17.</b> Altura de plantas de acuerdo a tratamientos a lo largo del ensayo. ....	66
<b>Figura 18.</b> Grosor de tallos de acuerdo a tratamientos a lo largo del ensayo. ....	66
<b>Figura 19.</b> Número de hojas de acuerdo a tratamientos a lo largo del ensayo. ....	67
<b>Figura 20.</b> Número de tallos y brotes de acuerdo a tratamientos a lo largo del ensayo. ....	67

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Poblaciones microbianas presentes en los insumos utilizados en la elaboración de los biofermentos. ....	23
<b>Cuadro 2.</b> Poblaciones microbianas presentes en los diferentes biofermentos sólidos.....	26
<b>Cuadro 3.</b> Poblaciones microbianas presentes en los diferentes biofermentos líquidos. ....	28
<b>Cuadro 4.</b> pH y EC presente en diferentes biofermentos líquidos.....	35
<b>Cuadro 5.</b> Contenido foliar de macronutrientes según tratamiento .....	43
<b>Cuadro 6.</b> Contenido foliar de micronutrientes según tratamiento .....	44
<b>Cuadro 7.</b> Contenidos de macro y micronutrientes, pH, acidez presentes en suelos expuestos a los diferentes tratamientos.....	46
<b>Cuadro 8.</b> Conductividad eléctrica, porcentaje de carbono (C), nitrógeno (N), relación C/N, y porcentaje de materia orgánica presente en suelos expuestos a los diferentes tratamientos. ....	47
<b>Cuadro 9.</b> Poblaciones microbianas presentes en el suelo al concluir el ensayo..	48
<b>Cuadro 10.</b> Medios de cultivo utilizados según el aislamiento de diferentes microorganismos.....	63
<b>Cuadro 11.</b> Contenidos nutricionales, pH, EC y densidad presente en los diferentes biofermentos. ....	63
<b>Cuadro 12.</b> Poblaciones microbianas presentes en los diferentes biofermentos líquidos. ....	64

## RESUMEN

El cultivo de caña de azúcar es de gran importancia en la economía del país, sin embargo la aplicación excesiva e ineficiente de fertilizantes, así como la generación de residuos que permanecen en el campo posterior a las labores de cosecha pueden representar un problema ambiental. En los biofermentos se pueden encontrar microorganismos capaces de descomponer materia orgánica, mineralizar nutrientes, fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fósforo, producir fitohormonas, entre otros. En el presente trabajo se evaluó el efecto de biofermentos elaborados a partir de mantillo de bosque, bambú, residuos de caña y arroz sobre el desarrollo de plántulas de caña de azúcar variedad NA 851601. Los estudios se realizaron a nivel de invernadero utilizando un suelo Inceptisol con propiedades vérticas. Las variables evaluadas fueron altura, grosor y número de tallos, número de brotes y hojas; peso fresco y seco aéreo y radical; contenidos de nutrientes tanto foliares como en suelo presentes a la cosecha 5 meses después de la siembra.

Se observó un mayor peso fresco y seco radicular, y una mayor relación R/T (raíz/tallo) en el tratamiento al que se aplicó MM. El peso fresco radicular aumentó en 68%, el peso seco en 45% y la relación R/T en 58% en comparación con el testigo absoluto.

## INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es una gramínea originaria de Nueva Guinea y actualmente es sembrada en regiones tropicales y subtropicales. En Costa Rica este cultivo tiene gran importancia económica debido a su aporte en el producto interno bruto (PIB), la generación de divisas y de empleo directo e indirecto (MAG, 2007). En el año 2018 se sembraron 60 000 hectáreas de caña de azúcar con una producción y rendimiento promedio de 4 421 210 toneladas métricas y un rendimiento de 73,6 t/ha respectivamente. Del área sembrada en este año 798,8 hectáreas corresponden a caña certificada orgánica (SEPSA, 2019).

De la caña de azúcar cosechada en el campo cerca del 15-20% corresponde a paja, constituida por vainas y hojas no aprovechables por la industria azucarera (León-Martínez *et al.*, 2013). Los residuos pueden ser reincorporados al suelo con el fin de reciclar los nutrientes contenidos en los tejidos; sin embargo, se aconseja retirar parte del material ya que puede retrasar y reducir el número de yemas brotadas y provocar incendios en la etapa de crecimiento del cultivo (Basanta, *et al.*, 2007, García *et al.*, 2014). Por lo tanto, dar un valor o un uso a los residuos no sólo evitaría que estos se acumulen en el campo de manera excesiva, sino que también podría cubrir el costo de su recolección. Los residuos de caña podrían utilizarse en la producción de compost, ensilaje, producción de alcohol (León-Martínez *et al.*, 2013) o para la reproducción de microorganismos de interés agrícola.

Los fermentos microbianos son insumos de producción artesanal, elaborados a partir de materia orgánica en descomposición procedente de bosques o sistemas productivos como café, bambú, entre otros (Morales *et al.*, 2014). En Costa Rica los más utilizados son los Microorganismos de Montaña (MM), los cuáles son elaborados a base de hojarasca de bosque (Garro, 2016); y los elaborados a partir de boñiga o pasto (Pacheco, 2003).



Los fermentos microbianos son usados por si solos o como base para elaborar otros biofermentos o bioles, ya que se pueden enriquecer con minerales, cenizas o harinas complementarias (Restrepo, 2001; Umaña *et al.*, 2017). Son materiales ricos en microorganismos benéficos capaces de incrementar la disponibilidad de nutrientes, aumentar la sobrevivencia de la planta y disminuir la presencia de enfermedades, por medio de la inhibición o competencia con microorganismos patógenos (Morales *et al.*, 2014). La composición microbiana varía con el tipo de fermento, en el caso de los MM se ha reportado la presencia de bacterias fotosintéticas, actinomicetes, levaduras, lactobacilos, hongos filamentosos y solubilizadores de fósforo (Castro *et al.*, 2015).

Durante la producción de fertilizantes se libera una gran cantidad de gases de efecto invernadero debido a que muchos provienen de fuentes fósiles; su uso excesivo puede tener efectos negativos, ya que favorecen la pérdida de materia orgánica y acidifican el suelo en detrimento de la población microbiana y la disponibilidad de nutrientes, además pueden provocar contaminación de cuerpos de agua si no se da un manejo adecuado (Rodríguez, 2018). Es por tanto que los fermentos microbianos constituyen una alternativa interesante debido a la necesidad de implementar prácticas agrícolas que no perjudiquen la calidad y salud del suelo, agua y de los mismos alimentos. Sin embargo, los MM presentan el inconveniente de que han sido poco estudiados y que su composición puede variar de un lugar a otro, además, su uso no es conveniente en sistemas intensivos donde la extracción del mantillo puede representar una amenaza ambiental, especialmente si se realizan múltiples extracciones en los mismos sitios. La sustitución del mantillo de bosque con los residuos de cosecha de caña o arroz permitiría, la reutilización de materiales que constituyen un problema ambiental y evitaría la extracción del mantillo del bosque, lo cual puede ser una práctica insostenible en el tiempo.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

- Analizar el efecto de fermentos microbianos preparados a partir de diferentes residuos sobre el desarrollo de plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en invernadero.

### **Objetivos específicos:**

- Elaborar enmiendas microbianas a partir de mantillo de bosque, hojarasca de bambú, arroz y caña de azúcar.
- Evaluar el desarrollo de plantas de caña de azúcar expuestas a las diferentes enmiendas.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Caña de azúcar

El ciclo vegetativo de este cultivo tiene una duración de 12 a 24 meses desde la siembra hasta la cosecha, dependiendo de la variedad sembrada y las condiciones ambientales. Este periodo se presenta en cuatro estados fenológicos: germinación o emergencia, macollamiento o ahijamiento, rápido crecimiento y maduración. Posterior a la primera cosecha el cultivo rebrota, etapa que recibe el nombre de soca, esta tiene una duración de 11 a 13 meses y se repite hasta que disminuye el rendimiento (usualmente después de 4 cosechas). En la soca ocurren tres etapas: rebrote y macollamiento, rápido crecimiento, y maduración (Ochoa *et al.*, 2010; CONADESUCA, 2015).

La primera etapa fenológica corresponde a la germinación y emergencia, la misma varía entre 7 a 10 días después de la siembra, y se prolonga hasta 35 días, bajo temperaturas óptimas de 24 a 37 °C y con disponibilidad de humedad en el suelo. En la etapa de macollamiento se observa el brote de varios tallos a partir del tallo primario y el desarrollo del sistema radicular adventicio, por lo que constituye una fase determinante en el rendimiento que comienza entre los 35 y 40 días después del trasplante (CONADESUCA, 2015). Entre los factores que determinan el macollamiento se encuentran: variedad, días de larga duración, alta intensidad lumínica y temperaturas cercanas a los 30 °C, además de una adecuada humedad y nivel de nitrógeno en el suelo. En la etapa de rápido crecimiento se da la acumulación de materia seca, el cultivo alcanza su máxima área foliar, esta etapa inicia aproximadamente a los 120 días después de la siembra y se extiende hasta los 180 días; sin embargo, esto va a depender de condiciones como humedad, temperatura y disponibilidad de nutrientes como el nitrógeno (Ochoa *et al.*, 2010).

En la etapa de maduración se da la síntesis y acumulación de sacarosa en los tallos, este periodo se extiende entre 2 a 3 meses, los factores responsables de favorecer dicho almacenamiento son noches frescas con temperaturas cercanas a 18

°C, y días calientes y secos (Ochoa *et al.*, 2010). Es importante mencionar que esta etapa puede verse retrasada por aplicaciones tardías de nitrógeno, debido al papel que cumple dicho elemento como inductor de crecimiento; además, si las aplicaciones se realizan cercanas a la etapa de maduración, se puede perjudicar la calidad del jugo reduciendo la concentración de sacarosa (Chaves, 2017).

Cabe destacar que el corte de la caña se debe realizar a nivel del suelo, ya que la base de la planta es la que contiene la mayor concentración de sacarosa, además los tallos grandes pueden competir e inhibir el crecimiento de nuevos brotes después de la cosecha.

Se reporta que la caña de azúcar es un cultivo altamente demandante de nutrientes, como potasio, seguido por nitrógeno, calcio y fósforo (Rodríguez *et al.*, 2018).

### **Producción mundial y Nacional**

La caña de azúcar es sembrada en zonas tropicales y subtropicales, entre 36.7° de latitud norte y 31.0° al sur del Ecuador (CONADESUCA, 2015). Las principales regiones productoras de caña de azúcar son Asia y América Latina, con un 37% y 34% de la producción, respectivamente. Entre los principales productores en Asia se encuentran India, Tailandia y China; mientras que en América Latina y a nivel mundial Brasil es el principal productor. Actualmente en el mundo se producen 1200 toneladas métricas (Mt) de azúcar (OCDE y FAO, 2017).

El área sembrada de este cultivo en Costa Rica entre 2015 y 2018 fue de 63 602 hectáreas, con una producción de 4 246 909 toneladas métricas y un rendimiento de 75.25 toneladas de azúcar por hectárea (t/ha). En este período, la región Chorotega, conformada por los cantones de Abangares, Bagaces, Cañas, La Cruz, Liberia, Nandayure, Nicoya y Santa Cruz, fue la mayor productora de caña (SEPSA, 2019).

## **Materia orgánica en suelo**

La materia orgánica del suelo (MOS) es un continuo de compuestos heterogéneos con base de carbono, formados por la acumulación de materiales de origen animal y vegetal parcial o completamente descompuestos. En el proceso de descomposición los materiales del suelo son transformados por los macro y microorganismos por procesos de mineralización, en el cual los residuos orgánicos son rápidamente descompuestos y utilizados como fuente de energía, el proceso está acompañado de liberación de  $CO_2$  y de los nutrientes contenidos en los residuos orgánicos (Frioni, 1999; Gliessman, 2002; Meléndez, 2003; Pedraza *et al.*, 2010).

La fracción orgánica del suelo es muy importante en la fertilidad del mismo ya que su relación con la fase mineral y con los diferentes elementos de la solución del suelo controlan en gran medida la disponibilidad de nutrientes para las plantas, lo cual es especialmente importante en suelos tropicales. Esto debido a que las partículas compuestas por arcilla y/o humus llamadas micelas, forman estructuras semejantes a láminas que se encuentran cargadas negativamente, por lo que atraen cationes. La cantidad de sitios en estas láminas corresponde a la capacidad de intercambio catiónico (CIC); entre más alta la CIC mayor será la capacidad del suelo de retener e intercambiar cationes, evitando la lixiviación de nutrientes y aumentando la fertilidad del suelo (Gliessman, 2002; Bronick, 2005).

La MOS está constituida por carbohidratos, aminoácidos, ácidos alifáticos, proteínas, grasas y sustancias húmicas; estas últimas corresponden a compuestos muy estables en el suelo, resultantes de los procesos de mineralización. Entre las sustancias húmicas se encuentran los ácidos húmicos, fúlvicos y huminas, moléculas orgánicas de gran peso molecular que presentan coloraciones marrones o amarillas y que se encuentran unidas a los minerales del suelo. Estas moléculas son consideradas fuente de nutrientes de lenta liberación, ya que son capaces de aportar nitrógeno a la solución del suelo; mejorar el balance nutricional, especialmente en el aprovechamiento de fósforo y micronutrientes, y actúan como reserva de coloides orgánicos responsables de la retención hídrica del suelo. Es por tanto que la materia

orgánica incrementa la retención de agua, mejora la estructura y aporta nutrientes a las plantas y microorganismos del suelo (Gliessman, 2002; Meléndez, 2003, Bronick, 2005; Caballero-Mellado, 2006; Garro, 2016).

La relación C/N define si se da la mineralización o inmovilización del nitrógeno, estos dos elementos determinan la acción de los microorganismos, ya que el punto de equilibrio de la descomposición de los materiales orgánicos corresponde a una relación de 25:1 a 32:1 (C:N). Si la relación es mayor, parte del nitrógeno es inmovilizado, si es menor ocurre la mineralización de cierta porción de la materia orgánica; sin embargo, esta no debe ser demasiado baja ya que el nitrógeno se perdería por falta de estructuras de carbono que lo retengan (Thompson *et al.*, 1988; Frioni, 1999; Soto, 2003). Valores entre 10 y 14 provocan una rápida ruptura de tejidos y mineralización de nutrientes (Rayment y Lyons, 2011; Gamarra *et al.*, 2018). Es posible que los microorganismos compitan con las plantas en presencia de poca disponibilidad de nutrientes (van Der Heijden *et al.*, 2008).

### **Valorización de residuos**

Anterior al proceso de cosecha se realiza una limpieza del cañaveral para facilitar la entrada de la maquinaria, en muchos casos se da una quema controlada del cultivo, en este manejo se incorporan los nutrientes contenidos en las cenizas. No obstante, no se da la incorporación de la materia orgánica como tal, lo cual sumado a las altas temperaturas del incendio pueden tener efectos negativos en las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo (Salgado *et al.*, 2014).

Otra práctica consiste en la separación mecánica de las hojas secas de los tallos (Ochoa *et al.*, 2010), posteriormente se cortan las zonas cercanas a los ápices, ya que los mismos contienen una baja concentración de azúcares (Duarte y González, 2019). Esta actividad genera residuos que permanecen en el campo y representan un problema en las labores de preparación del suelo (Ochoa *et al.*, 2010), además si los mismos no son recogidos pueden afectar el rebrote (Duarte y González, 2019).

Los residuos contienen una gran cantidad de nutrientes que al no ser utilizados podrían volver al suelo, sin embargo es necesario darles un manejo para que los mismos no sean fuente de inóculo de plagas y enfermedades para los posteriores ciclos de cultivo. Algunas opciones son incorporación al suelo, aplicación de microorganismos descomponedores, rotación de cultivo, compostaje, uso en alimentación animal, extracción y quema del material para posteriormente reincorporarlo (Gliessman, 2002; Salgado *et al.*, 2014), en caso de la recolección se debe calcular la cantidad de material para proceder con la logística (Salgado *et al.*, 2014). Por su parte, el bagazo excedente de la industria azucarera está siendo utilizado para la producción de papel y la generación de energía eléctrica, ya que es utilizado como combustible de calderas en muchos ingenios azucareros (CONADESUCA, 2015).

En Cuba desde los años 90 se utilizó la cachaza como vehículo de aplicaciones de bacterias como *Azospirillum brasilense*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia cepacia*, *Pantoea* sp., con aumentos en el rendimiento del cultivo de caña de azúcar; también se ha aplicado *Azospirillum* sp., en aspersión, con la posterior cobertura de paja de arroz, o mediante reincorporación al suelo, también con aumentos significativos en la producción (Rodríguez, 2018).

### **Fermentos microbianos**

En la agricultura tradicional se utilizan enmiendas obtenidas por un proceso de fermentación en una base líquida o sólida.

### **Biofermentos o bioles**

Los biofermentos son enmiendas líquidas con una alta concentración de microorganismos que se reproducen al fermentar, bajo condiciones de anaerobiosis un sustrato colonizado, junto con fuentes de carbono (Ramírez, 2018). Los sustratos utilizados son residuos orgánicos como boñiga, pastos, frutos, etc., a los que se puede adicionar MM, harinas de roca o sales minerales (Restrepo, 2001; Garro, 2016). El proceso de fermentación ocurre en ausencia de oxígeno y consiste en la degradación anaerobia y reducción de los compuestos de carbono, produciendo alcoholes y ácidos

como el ácido láctico (Pedraza *et al.*, 2010, Tortora, *et al.*, 2007a). Los biofermentos pueden ser aplicados al suelo, follaje o semillas (Ramírez, 2018).

Un caso particular de biofermento es el biol de MM el cuál será explicado en el siguiente apartado.

### **Microorganismos de montaña**

La técnica de reproducción de MM fue desarrollada por Teruo Higa (EM), profesor de la Universidad de Ryukus, Okinawa, Japón; la misma consiste en la mezcla de microorganismos que se encuentran presentes en los ecosistemas (MM), lo que genera un consorcio microbiano compuesto de bacterias fotosintéticas, ácido lácticas, actinomicetes, hongos filamentosos y levaduras, que tienen como característica una diversidad funcional más que taxonómica, y que, al ser aplicados pueden incrementar la diversidad microbiológica de los suelos agrícolas. Se ha demostrado que su aplicación puede mejorar la calidad y salud del suelo contribuyendo a su estabilidad y resiliencia, mejorando el crecimiento, rendimiento y calidad de los cultivos (Higa *et al.*, 1994; Daly y Stewart, 1999; Castro *et al.*, 2015; Garro, 2016; Umaña, 2017; Camacho *et al.*, 2018).

Durante la producción de MM se realiza una fermentación sólida seguida de una fermentación líquida o activación. Para ello los materiales orgánicos se fermentan en recipientes que cumplen la función de un bioreactor y que brindan las condiciones de anaerobiosis; el mantillo es el inóculo microbiano y, como fuente de carbono se adicionan semolina y melaza, las cuales brindan la energía necesaria para el metabolismo de los microorganismos, ya que mediante el catabolismo de estos hidratos de carbono los microorganismos pueden producir energía mediante la fermentación (Tortora, *et al.*, 2007a). Posteriormente, el MM se “activa” por medio de una fermentación líquida con la adición de melaza generando el MM líquido, biol de MM o MM activado (Delgado, 2006; Robalino, 2011; Morales *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2015; Garro, 2016; Ramírez, 2017; Umaña, 2017; Camacho *et al.*, 2018).



Los Microorganismos de montaña no son ampliamente aceptados por la comunidad científica ya que se señala que es difícil reproducir sus efectos benéficos, debido a que los microorganismos son sensibles a la humedad, presencia de oxígeno, pH y temperatura, y a que requieren condiciones óptimas para la producción de las sustancias responsables de su efecto positivo (Higa *et al.*, 1994). Por otro lado, tienen como ventaja que son enmiendas de bajo costo, en muchos casos producidos en la finca, y que reproducen y aplican microorganismos provenientes de zonas boscosas cercanas con una mayor posibilidad de establecerse y multiplicarse en el suelo (Armenta *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2015).

De manera general la aplicación de microorganismos tiene repercusiones ambientales positivas. Muchos microorganismos presentes en el suelo son responsables de la mineralización de materia orgánica, liberando nutrientes y promoviendo la estabilización del suelo mediante la formación de humus, lo cual favorece la fertilidad y estructura del suelo, aumentando el espacio poroso e incrementando la infiltración; además pueden producir moléculas como reguladores de crecimiento (Daly y Stewart, 1999; Caballero-Mellado, 2006; Otero, 2011; Garro, 2016; Sharma *et al.*, 2017); antibióticos o sideróforos, estos últimos son pigmentos de bajo peso molecular (500-1000 Da) capaces de solubilizar y quelatar hierro del suelo. La producción de estas sustancias puede tener implicaciones en la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, en la resistencia sistémica adquirida y en la competencia con patógenos (Caballero-Mellado, 2006; Otero, 2011; Sarode *et al.*, 2013; Garro, 2016).

## **Microorganismos presentes en fermentos microbianos**

### **Actinomicetes**

Los actinomicetes son microorganismos habitantes del suelo entre los que se encuentran cepas capaces de producir fitohormonas como el ácido indol acético (AIA), promotor del crecimiento radical que favorece la proliferación de pelos radicales (Caballero-Mellado, 2006). Además pueden contribuir con la producción de

antibióticos. Estos mecanismos pueden ayudar a las plantas a sobrellevar eventos de estrés abiótico y biótico (Subramanian, *et al.*, 2016).

Otero (2011) reportó que algunas especies de actinomicetes son capaces de solubilizar fosfato de calcio, permitiendo la utilización de este nutriente por parte de las plantas, ya que se da una transformación de fosfatos insolubles a través de procesos de acidificación, mediante la producción de ácidos orgánicos como el ácido glucónico; quelatación y reacciones de intercambio (Sousa *et al.*, 2008; Otero, 2011). Los actinomicetes secretan enzimas como lignocelulasa, celulasa, xilanasas y hemicelulasas que actúan sobre la materia orgánica, liberando nutrientes contenidos en la misma, además, producen catalasas, amilasas y lipasas, las cuales pueden colaborar con el crecimiento de las plantas (Otero, 2011; Saini, *et al.*, 2015).

### **Levaduras**

Las levaduras sintetizan compuestos antimicrobianos y moléculas útiles para el crecimiento de las plantas a partir de aminoácidos y azúcares secretados por bacterias y exudados radicales. Sustancias bioactivas como hormonas y enzimas promueven la actividad celular y la división radical, además secretan compuestos útiles para otros microorganismos como bacterias, lactobacilos y actinomicetes (Golec *et al.*, 2007). Las levaduras pueden ser encontradas en materiales frescos poco descompuestos y en mantillos (Frioni, 1999).

### **Bacterias**

Las bacterias son un grupo muy amplio de microorganismos, las cuales llevan a cabo muchos procesos de importancia ecológica y agrícola. Por ejemplo, las bacterias promotoras de crecimiento vegetal, conocidas como PGPR por sus siglas en inglés, se asocian a las raíces de las plantas haciendo uso de los exudados radicales (Sharma *et al.*, 2017). Tienen incidencia directa en el crecimiento de las plantas, ya que pueden fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fósforo inorgánico, producir reguladores de crecimiento como auxinas y ácido salicílico, ácido cianhídrico, entre otros compuestos (Pedraza *et al.*, 2010). Estas bacterias favorecen la estructura del

suelo, la descomposición de la materia orgánica, el reciclaje y la solubilización de nutrientes (Sharma *et al.*, 2017).

### **Lactobacilos**

Los lactobacilos o BAL son bacterias anaeróbicas facultativas, productoras de ácido láctico y otros compuestos a partir de azúcares simples como glucosa y lactosa (Frioni, 1999; Otero, 2011; Golec *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2011). Tienen efectos inhibitorios en el desarrollo de bacterias y hongos patógenos de plantas; por otro lado, también pueden tener efecto en la promoción del crecimiento de plantas (Yépez, 2016). Se reporta que algunas cepas son capaces de solubilizar fósforo (Otero, 2011).

Están ampliamente distribuidas y pueden ser encontradas en el suelo, plantas verdes, diversos alimentos y en el tracto digestivo de algunos animales. Pueden crecer muy bien en harinas de cereales, forrajes, vegetales y carnes; y son utilizadas en la industria para la conserva de alimento animal y humano, como en el caso de las conservas o los ensilados, en este último se reproducen las BAL nativas o pueden ser adicionadas (Ramírez *et al.*, 2011).

### **Solubilizadores de fósforo**

El fósforo en el suelo forma complejos insolubles, en suelos ácidos se le encuentra como fosfato de hierro, aluminio y manganeso y en suelos alcalinos como fosfatos de calcio y magnesio (Torriani–Gorini, 1994). En el ciclo del fósforo los microorganismos tienen un papel crucial, ya que participan en la solubilización de fosfato inorgánico y en la mineralización del fosfato orgánico (Richardson, 2001), especialmente debido a la producción de ácidos orgánicos, entre los cuales se encuentran el ácido oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, glicónico, fumárico, adípico, indolacético y 2-cetoglucónico. La acción solubilizadora de estos organismos se atribuye a que disminuyen el pH y forman compuestos estables con el  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  (Paredes y Espinosa, 2010). Otros mecanismos de solubilización son la producción de protones (Patiño, *et al.*, 2014), fosfatasas (Xiao *et al.*, 2009) y fitasas (Rathore, 2005), enzimas que liberan los microorganismos al medio y que se clasifican según el pH de este, ya que pueden ser

ácidas o básicas (Xiao *et al.*, 2009). Las fosfatasas son las enzimas que mineralizan compuestos orgánicos como fosfolípidos, ácidos nucleicos, entre otros (Rathore, 2005). Entre los microorganismos capaces de solubilizar fósforo del suelo se encuentran *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Agrobacterium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., y otros.

### **Uso previo de MM**

En estudios realizados por Umaña (2017) se encontró un efecto positivo en el tamaño de hojas (largo y ancho) y biomasa de plantas de culantro y espinaca, al aplicar fermentos elaborados a partir de mantillo de montaña. El autor determinó el tiempo de retención en el bioreactor y concluyó que a los 15 días se obtuvo un mayor tamaño de hoja y biomasa seca. Asimismo, Castro *et al.*, (2015) observaron un mayor desarrollo en plantas de soya y tomate, mayor peso foliar y contenidos foliares superiores al testigo y a los demás tratamientos utilizando MM, en comparación con inoculaciones de *Azospirillum oryzae*, *Pseudomonas flourencens*, *Bacillus subtilis* aplicados de manera individual y en mezclas.

En un estudio en el que se evaluó el rendimiento de acelga cuando se aplicaron fermentos en los que se colectó hojarasca en diferentes ecosistemas: potrero, cafetal y bosque, se observó un mejor rendimiento en las plantas expuestas a los fermentos elaborados con materiales provenientes de potrero y café. Los autores observaron un mayor contenido de materia orgánica, incremento en el pH y mayores contenidos de nitrógeno en dichos tratamientos (Morales *et al.*, 2014).

Camacho *et al.*, (2018) reportó un mayor crecimiento relativo radicular en plantas de pepino sembradas con compost tratado previamente con MM a una proporción 33% compost y 67% suelo. De igual manera Ramírez (2017) observó aumentos en la biomasa de plantas de soya, aplicadas con compost elaborado a partir de excretas ovinas previamente tratadas con MM.

No se encontraron estudios en donde evaluaran el uso de MM en el cultivo de la caña.

## **METODOLOGÍA**

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio e invernadero del Área de Microbiología Agrícola, en el Centro de investigaciones agronómicas (CIA), ubicado en San Pedro, Montes de Oca.

Para estudiar el efecto de diferentes fermentos microbianos sobre el crecimiento de plantas de caña de azúcar se prepararon 4 diferentes biofermentos a partir del mantillo de los siguientes sistemas: bosque, bambú, caña de azúcar y arroz, todos ubicados en Hacienda Mojica, Cañas, Guanacaste.

### **Preparación de los fermentos sólidos:**

Se prepararon los siguientes fermentos sólidos: MMS (fermento de mantillo de montaña); MBS (fermento de mantillo de bambú); MCS (fermento de rastrojo de caña); MAS (fermento de rastrojo de arroz). Para la recolección del material se visitó un parche de bosque y un bambusal en la hacienda Mojica (Figura 1). Se removieron las hojas y materiales que se encontraban en la superficie del suelo, dejando al descubierto una pequeña capa de residuos en descomposición, esta capa llamada mantillo fue recolectada y usada posteriormente en la elaboración del fermento sólido. Los residuos de arroz y caña fueron recolectados y enviados al CIA por el Ingeniero de la Hacienda.

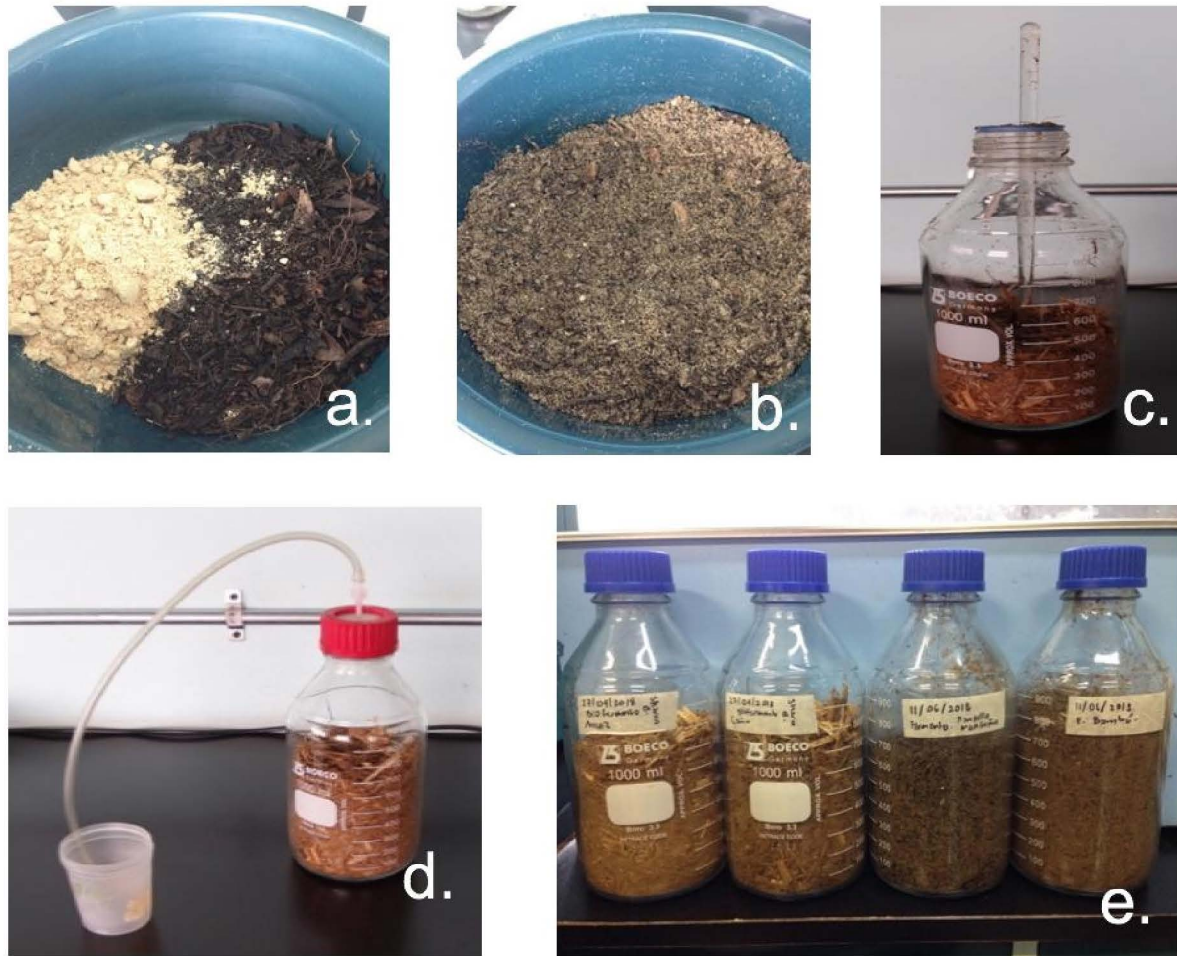
Se determinó el número de UFC de lactobacilos, bacterias, actinomicetes, levaduras y NMP (número más probable) de solubilizadores de fósforo presentes en los insumos utilizados para la elaboración de los fermentos sólidos. Esta determinación se hizo en una única muestra por insumo.



**Figura 1.** Recolección de mantillos a. Zona de recolección de mantillo de montaña, b. Mantillo recolectado, c. Zona de recolección de mantillo de bambú, d. Apariencia de mantillo de bambú.

En un recipiente limpio y desinfectado, se mezclaron 1000 mL de los diferentes mantillos con 500 mL de semolina y 40 mL de melaza, disueltos en un volumen de agua que dependió de la humedad de la materia prima (Figura 2a y 2b); para el biofermento de caña y de arroz se utilizaron 100mL de agua, mientras que en el de bosque se usaron 80mL y para el de bambú 40mL de agua.

Cada una de las mezclas se colocó en dos botellas de un litro con cierre hermético, el material se comprimió utilizando una varilla de vidrio (Figura 2c), las botellas se taparon con una tapa que permitía la salida de aire pero no su ingreso (Figura 2d).



**Figura 2.** Preparación del biofermento sólido a. Ingredientes de biofermentos sin mezclar, b. ingredientes mezclados c. biofermento apelmazado, d. salida de gas, e. biofermentos almacenados.

Las botellas fueron incubadas durante un mes a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) y se cubrieron con un papel kraft, para evitar la incidencia directa de la radiación solar. Un mes después de la incubación, se les colocó una tapa

sin salida de gas (Figura e) y se almacenaron en la oscuridad y a temperatura ambiente hasta el momento de su uso.

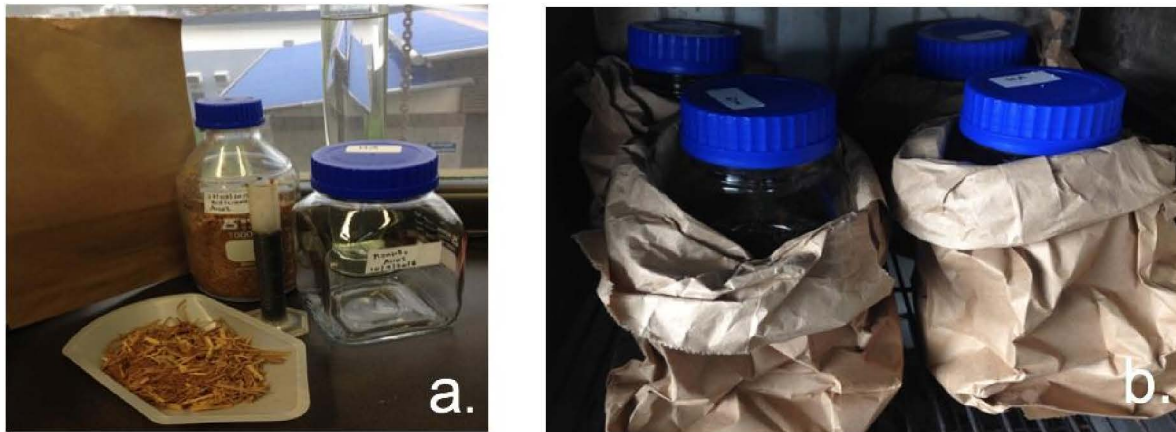
Se determinó mediante recuento en placa petri, el número de UFC de lactobacilos, bacterias, actinomicetes, levaduras y NMP de solubilizadores de fósforo en los fermentos sólidos. Para la determinación de las bacterias y actinomicetes se utilizó el medio Albuminato de sodio, las levaduras se determinaron en el medio Extracto de Malta y los lactobacilos en el medio MRS (Wollum 1982; Lorch *et al.* 1995; Rodríguez *et al.* 2005), en el caso de los solubilizadores de P se hizo el Número Más Probable siguiendo la metodología de Osorio y Habte (2001) y Vargas-Barrantes y Castro-Barquero (2019).

#### **Preparación de los Biofermentos:**

Se prepararon los siguientes biofermentos: MM (biofermento de mantillo de montaña); MB (biofermento de mantillo de bambú); MC (biofermento de rastrojo de caña); MA (biofermento de rastrojo de arroz).

Se realizó la activación de los biofermentos en botellas cuadradas de 500mL de tapa ancha, en las mismas se agregó fermento sólido, melaza y agua en las proporciones 1:1:25 respectivamente (Figura 3a). Las botellas se colocaron en bolsas de papel kraft, para evitar la incidencia de luz, y la tapa se dejó abierta para favorecer el intercambio gaseoso (Figura 3b); además, con este mismo propósito los fermentos se agitaron manualmente durante 15 segundos 5 días a la semana con 2 días sin agitación. Este procedimiento se repitió en 7 ocasiones.





**Figura 3.** Preparación de los fermentos líquidos. a. Insumos y recipientes utilizados, b. Fermentación.

### **Establecimiento del ensayo de invernadero**

Se utilizó un suelo procedente de la Hacienda Mojica clasificado como un Inceptisol con características vérticas, al que se le determinó el número de UFC de lactobacilos, bacterias, actinomicetes, hongos y NMP de solubilizadores de fósforo.

Antes del establecimiento del ensayo se determinó el contenido de macro y micronutrientes en suelo: Ca, Mg, K, P, Zn, Cu, Fe y Mn. Además del pH, el EC extraído con solución extractora KCl-Olsen modificado; así como el N y C determinado con el autoanalizador de C/N por combustión seca.

El suelo se dispuso en macetas de 15 L de capacidad que se colocaron sobre una palangana con agua, con el objetivo de mantener los potes a capacidad de campo por medio de la hidratación por capilaridad. En cada maceta se sembró una planta de caña de la variedad NA 851601 y se cosecharon 5 meses después de la siembra. Las plantas fueron proporcionadas por DIECA y se obtuvieron mediante técnicas de cultivo *in vitro*.

Al tratamiento control comercial (TC) se le realizó dos aplicaciones de fertilizantes, la primera al momento de la siembra y la segunda una vez establecido el ensayo. En cada evento se adicionó 250 mL de solución por cada maceta, para un total de 3.63 g de fosfato mono amónico ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ), 2.91 g de nitrato de amonio

( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) y 1.79 g de KCl en y 5.04 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ . Estas dosis representan un aporte de 136,2 Kg/ha de N; 132,6 Kg/ha de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , 215,4 Kg/ha de  $\text{K}_2\text{O}$  y 25,8 Kg/ha de S.

Los tratamientos a los que se adicionó bioles fueron tratados con 7 aplicaciones, a los 10, 25, 39, 53, 67, 81 y 95 DDS (días después de la siembra), mediante el vertido de 250mL de biofermento líquido, diluido al 10%, alrededor de las plantas (Figura 4). Posteriormente, se tomó una muestra de esta dilución y se realizaron recuentos en placa Petri, para determinar las poblaciones de lactobacilos, bacterias, levaduras y solubilizadores de fósforo en la forma previamente descrita.



**Figura 4.** Aplicación de biofermentos líquidos en macetas sembradas con caña

### **Variables evaluadas:**

A los 15, 49, 77, 106, 137 y 161 DDS se midieron las siguientes variables:

- Altura de planta. Esta medición se realizó con ayuda de una cinta métrica, desde la base de las plantas a la hoja más larga.
- Ancho del tallo. Medido con ayuda de un caliper, se midió la parte más gruesa de la base del tallo.
- Número de hojas completamente expandidas, es decir con presencia de lígula.
- Número de tallos presentes por maceta.
- Número de UFC lactobacilos, bacterias, levaduras y NMP de solubilizadores de fósforo. Este análisis se realizó por triplicado al biofermento activado por tratamiento.

Al final del ensayo se evaluaron las siguientes variables:

- Número de tallos y brotes. Estos se diferenciaron en que los tallos cuentan con al menos una hoja verdadera y los brotes no.
- Biomasa foliar y radical (fresca y seca).
- Contenido foliar de N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Mn, B, Zn: El N fue analizado por combustión seca en autoanalizador por el principio de Dumas. El P, Ca, Mg, K, S, Na, Fe, Cu, Zn, Mn, B y Al por digestión húmeda con HNO<sub>3</sub> y determinado por Espectrometría de Emisión atómica en plasma (ICP).
- Contenido de macro y micronutrientes en suelo: Ca, Mg, K, P, Zn, Cu, Fe y Mn; pH, EC extraído con solución extractora KCl-Olsen Modificado; N y C determinado con el autoanalizador de C/N por combustión seca por el principio de Dumas.
- Número de UFC de lactobacilos, bacterias, actinomicetes, hongos y NMP de solubilizadores de fósforo en el suelo. Este análisis se realizó a tres unidades experimentales por tratamiento.

## **Análisis de datos**

Los datos fueron procesados con ayuda del programa Infostat (versión: 2018p). Las poblaciones microbianas evaluadas en los fermentos y en el suelo, así como las variables evaluadas en las plantas al final del ensayo, fueron sometidas a las pruebas de homogeneidad de varianza: Levin (variables continuas y discretas) y Lewis (variables discretas). Los resultados de las mismas indicaron si las variables debían evaluarse mediante estadística paramétrica o no paramétrica. En el primer caso se realizaron ANOVAS mediante el uso de la prueba de comparaciones múltiples DGC (Di Rienzo, Guzmán, Casanoves), con un valor de confianza de 0.05%; mientras que las no paramétricas se evaluaron mediante la prueba de Kruskal Wallis, con un valor de confianza de 0.05%. Los recuentos microbianos fueron transformados con  $\log_{10}$  antes de realizar el análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de las variables evaluadas al final del ensayo no se tomó en cuenta el testigo comercial, debido a que este podía alterar el supuesto de homogeneidad de varianza. No obstante, este tratamiento fue graficado junto a los demás tratamientos utilizados en este trabajo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Caracterización de la población microbiana de los biofermentos

#### Población microbiana en los insumos

En el Cuadro 1 se observan las poblaciones de los microorganismos presentes en los insumos utilizados para la elaboración de los bioles. En términos generales los mantillos fueron los insumos que presentaron la mayor cantidad de microorganismos mientras que la menor concentración se encontró en la semolina y en la melaza.

**Cuadro 1.** Poblaciones microbianas presentes en los insumos utilizados en la elaboración de los fermentos sólidos.

Insumos	Lactobacilos	Bacterias	Actinomicetes	Levaduras	Solubilizadores de fósforo (NMP)
Melaza	<2*	<4*	<4*	<3*	<3*
Semolina	<2*	4.2	5.3	4.7	4.3
Mantillo de bosque	>9	7.2	6.7	6.5	5.3
Mantillo de Bambú	>9	7.5	7.5	6.2	4.4
Mantillo de caña	4.0	7.4	5.9	5.0	7.0
Mantillo de arroz	5.2	7.6	7.0	5.4	7.0

Nota: \* Representa la menor dilución evaluada.

Los mantillos son materiales en descomposición ricos en nutrientes y vitaminas, cuya concentración y composición va a depender de las especies vegetales presentes (Frioni, 1999; Garro, 2016), los mantillos están en contacto directo con el suelo, debido a esto y a su composición están asociados a una alta cantidad de organismos como bacterias, hongos y actinomicetes (Thompson *et al.*, 1988). Por su parte, la semolina es una harina rica en almidón, no estéril que puede funcionar como sustrato de

crecimiento para algunos microorganismos, los cuales a través de procesos enzimáticos desdoblan los azúcares que lo conforman (Frioni, 1999; Ramírez *et al.*, 2011). En la melaza no se encontraron microorganismos en las diluciones evaluadas, lo que se atribuye a que este sustrato contiene entre un 68 y 75% de sólidos disueltos, principalmente glucosa (Fajardo y Sarmiento, 2007), esta alta concentración de solutos inhibe el crecimiento de muchos microorganismos, ya que puede tener efecto hipertónico (Frioni, 1999; González-Hernández y Peña 2002). Sin embargo, se han encontrado poblaciones de levaduras en melaza (Fajardo y Sarmiento, 2007), ya que estos organismos pueden sobrevivir bajo altas concentraciones de azúcares realizando fermentación alcohólica (Frioni, 1999). No obstante, en el presente trabajo no se encontraron levaduras en la dilución más baja utilizada ( $10^3$ ).

La presencia de lactobacilos fue superior en los mantillos de bosque y bambú, en comparación con los mantillos de caña y arroz, mientras que en la melaza y en la semolina no se observaron. Esto pudo deberse a que los mantillos de bosques cuentan con una mayor diversidad de sustratos provenientes de las diferentes plantas presentes (Thompson *et al.*, 1988), por lo que pueden ser colonizados por una gran diversidad de microorganismos que cumplen diferentes funciones en el ecosistema (Bautista y Delgado, 2005). A su vez los bambusales son sistemas donde los residuos ricos en celulosa son colonizados y degradados por una flora diversa (Alvarado-Capó *et al.*, 2011). En ambos casos, esta flora es responsable de pre-digerir las moléculas más complejas en azúcares más simples permitiendo su uso por los lactobacilos.

Por su parte, la ausencia o bajo número de estas bacterias en la semolina sugiere que la misma está conformada por carbohidratos complejos que no pueden ser utilizados por la flora láctica (Frioni, 1999).

En lo que respecta a la población de bacterias, estas presentaron concentraciones mayores a  $7,2 \log_{10}$  de UFC/g, lo que se traduce en una población mayor a  $1,6 \times 10^6$  bacterias/g, en los diferentes mantillos, mientras que en la semolina la población fue 1000 veces menor. Cabe destacar que los mantillos consisten en

materiales ricos en nutrientes que pueden ser utilizados por las poblaciones de bacterias (Thompson *et al.*, 1988; Sharma *et al.*, 2017).

Por su parte, los actinomicetes presentaron poblaciones mayores a  $6,7 \log_{10}$  UFC/g ( $5,5 \times 10^6$  UFC/g) en el mantillo de bambú, arroz y montaña; en el orden de 5 en los mantillos de caña y en la semolina. Los actinomicetes son bacterias capaces de degradar lignina, celulosa, hemicelulosa, amilosa, xilosa, lípidos, entre otros compuestos (Otero, 2011; Saini, *et al.*, 2015), por lo que se pueden encontrar en estos materiales y en menor número en la semolina.

La población de levaduras fue superior en los mantillos de montaña y bambú, y en menor contenido en la semolina. Esto pudo deberse a que los mantillos ricos en azúcares brindan mejores condiciones para el crecimiento de las levaduras en comparación con la semolina. Los solubilizadores de fósforo (NMP) fueron superiores en el mantillo de caña y arroz, esto pudo deberse a que estos materiales son ricos en fósforo orgánico en forma de fitatos, los cuales pueden ser asimilados por bacterias solubilizadoras de fósforo capaces de producir fitasas (Rathore, 2005).

### **Poblaciones microbianas en los fermentos sólidos**

Cuando se estudiaron las poblaciones microbianas presentes en los fermentos sólidos (Cuadro 2); se encontró una cantidad significativamente mayor de lactobacilos en el fermento a base de mantillo de montaña que en el de caña y arroz. Este resultado se debe probablemente al mayor número de lactobacilos presente en el mantillo del bosque que el encontrado en ambos residuos, y refleja la importancia que tiene el tipo de mantillo como fuente de lactobacilos (Cuadro 1).

**Cuadro 2.** Poblaciones microbianas presentes en los diferentes fermentos sólidos.

Fermento sólido	Lactobacilos	Bacterias	Actinomicetes	Levaduras	Solubilizadores
					de fósforo (NMP)
MMS	8.5 C	6.2 B	4.7 ± 0.2	<3*	<3*
MBS	7.6 BC	6.3 B	<4*	<3*	<3*
MCS	4.9 A	6.1 B	<4*	<3*	<3*
MAS	6.1 AB	5.1 A	<4*	<3*	<3*

Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) N=3

Nota: \* Representa la menor dilución evaluada

En lo que respecta a las poblaciones de bacterias estas se encontraron en una población  $> 5.1 \log_{10}$  UFC/g ( $> 1.3 \times 10^5$  UFC/g), conteniendo una cantidad significativamente menor de bacterias en el MAS en comparación a los demás tratamientos. Esto se pudo deber a que las bacterias presentes en el mantillo originalmente no estuvieran habituadas a las condiciones de anaerobiosis, por lo que se observa una disminución significativa al cambiar las condiciones (Ilyas y Bano, 2012).

En cuanto a la población de actinomicetes estos sólo se observaron en la muestra de MMS en la menor dilución empleada ( $10^4$ ); presentándose una disminución de más de 100 veces con respecto a la población presente en los residuos. Este resultado se debe posiblemente a que los actinomicetes son microorganismos aerobios (Saini, *et al.*, 2015) que bajo condiciones anaerobias reducen su población. El mayor contenido en el MMS con respecto a los otros fermentos podría deberse a la mayor diversidad de actinomicetes esperable en un mantillo compuesto por diferentes especies de plantas, en comparación con los demás compuestos por una sola especie. Por otro parte, no se observó la presencia de solubilizadores de fósforo en ninguna muestra en las diluciones evaluadas ( $10^3$ ) a pesar de que estos se encontraban presentes en los mantillos empleados.



Los cambios observados en las poblaciones de microorganismos obedecen al cambio en las condiciones ambientales de un sistema aerobio a un sistema anaerobio debido al inicio de la fermentación. Esto favoreció en la mayoría de los fermentos la proliferación de los lactobacilos (Frioni, 1999).

### **Poblaciones microbianas en los biofermentos o bioles**

En el Cuadro 3 se muestran las poblaciones microbianas presentes en los diferentes biofermentos: MM, MB, MC, MA. Se puede observar que la población de Lactobacilos fue significativamente menor en MM en comparación a MC y MA. Durante el proceso de fermentación líquida hubo un incremento en la población de lactobacilos en los fermentos a base de bambú, arroz y caña, mientras que en el MM se redujeron. Cabe destacar que los microorganismos que se encontraron en mayor cantidad en los bioles, independientemente del residuo, utilizado fueron los lactobacilos.

En los fermentos estudiados se encontraron bacterias que variaron de  $10^3$  a  $10^6$  fueron significativamente mayores en MB en comparación a MM y MC, lo que sugiere la presencia de bacterias anaerobias facultativas en este ecosistema, dado a que el sitio de extracción es recorrido por un riachuelo que provoca condiciones de alta humedad. Lo anterior se evidenció al no observarse un descenso significativo de las poblaciones contenidas en el mantillo, al pasar a medio sólido y líquido (MBS y MB), lo cual indica que el cambio de condiciones no afectó el número de bacterias.

**Cuadro 3.** Poblaciones microbianas presentes en los diferentes biofermentos.

Biofermentos	Lactobacilos	Bacterias (log <sub>10</sub> UFC/g)	Levaduras	Solubilizadores de fósforo (NMP)
MM	7.4 A	3.2 A	3.8 AB	3.2 A
MB	8.0 B	6.4 B	4.1 AB	6.0 C
MC	8.3 B	3.8 A	2.5 A	3.9 AB
MA	8.2 B	5.9 AB	5.9 B	5.4 BC

Letras diferentes en la misma fila representan diferencias significativas (p>0,05) N=3

En los cuatro fermentos se encontraron poblaciones de levaduras que oscilaron de 10<sup>2</sup> a 10<sup>6</sup>, con una cantidad significativamente mayor de levaduras en MA que en MC. Las levaduras están asociadas a sustratos poco transformados contribuyendo al proceso de fermentación (Frioni, 1999), sintetizan compuestos aprovechables por bacterias ácido lácticas, fotosintéticas o actinomicetes, además sintetizan hormonas y enzimas que pueden ser usadas por plantas (Hussain *et al.*, 2002).

En lo que respecta a los solubilizadores de P estos se encontraron en poblaciones de 10<sup>3</sup> a 10<sup>6</sup> en los fermentos líquidos (Cuadro 3), a pesar de su baja concentración en los fermentos sólidos < 10<sup>3</sup>UFC/g. Al parecer el cambio en las condiciones ambientales (anaerobiosis, adición de melaza, presencia de otros compuestos producto de la fermentación) favoreció la proliferación de estos microorganismos. Las bacterias pueden solubilizar fósforo a través de la liberación de protones o de aniones orgánicos ácidos como citrato, oxalato y gluconato que acidifican el medio y forman complejos con el Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Al<sup>+3</sup>, Fe<sup>+3</sup> además mediante la liberación de enzimas como fosfatasa y fitasa (Paredes y Espinosa, 2010; Patiño, *et al.*, 2014).

Los solubilizadores de fósforo podrían adicionarse al programa de fertilización con la intención de aumentar la eficiencia del fertilizante fosfatado, lo que permitiría

reducir su aplicación con mejores o iguales rendimientos como es el caso de ensayos realizados en arroz, garbanzo, tomate, maíz, entre otros. Esta práctica permitiría reducir los costos de producción debido al alto precio de los fertilizante fosfatado (Khan *et al.*, 2013).

El NMP de solubilizadores de fósforo presentes en los biofermentos resultó ser mayor en MB y MA (Cuadro 3), en este último se identificó un hongo del género *Mucor* sp., el cual fue observado durante todas las evaluaciones (Anexo 5). Las especies de *Mucor* sp. son capaces de producir fosfatasas ácidas (Xiao *et al.*, 2009), enzimas que descomponen compuestos orgánicos como fosfolípidos y ácidos nucleicos (Rathore, 2005), por otro lado, otras especies son capaces de solubilizar fosfato de calcio, hierro y aluminio; apatitas; harinas de hueso y roca fosfórica (Paredes y Espinosa, 2010).

Durante el proceso de elaboración de los bioles ocurre una sucesión en la población de microorganismos, debido a los cambios que sufren en las condiciones ambientales, pasando de un medio aerobio, el mantillo, a un medio anaerobio en las fermentaciones sólida y líquida. Las poblaciones microbianas responden a modificaciones en el suministro de alimento, temperatura, humedad, suministro de oxígeno, entre otros; esto se traduce en la capacidad de algunos microorganismos de proliferar bajo dichas condiciones, donde ocurre una selección y disminución en la diversidad microbiana (Ilyas y Bano, 2012). Asimismo, los microorganismos presentes transforman las condiciones del medio, por tanto pueden regular de manera indirecta la presencia de otros, del mismo o de diferentes grupos; además de manera directa pueden competir por espacio y nutrientes (van Der Heijden *et al.*, 2008).

Las poblaciones en los mantillos fueron diferentes de las presentes en los fermentos sólido y líquido. Se observó la disminución de bacterias, solubilizadores de fósforo, actinomicetes y levaduras; así como la proliferación de grupos como los lactobacilos (Cuadro 1, 2 y 3). Estos resultados concuerdan con lo observado por Uribe (2019); cuando evaluó la población de bacterias presentes en mantillo, MM sólido y bioles de MM.

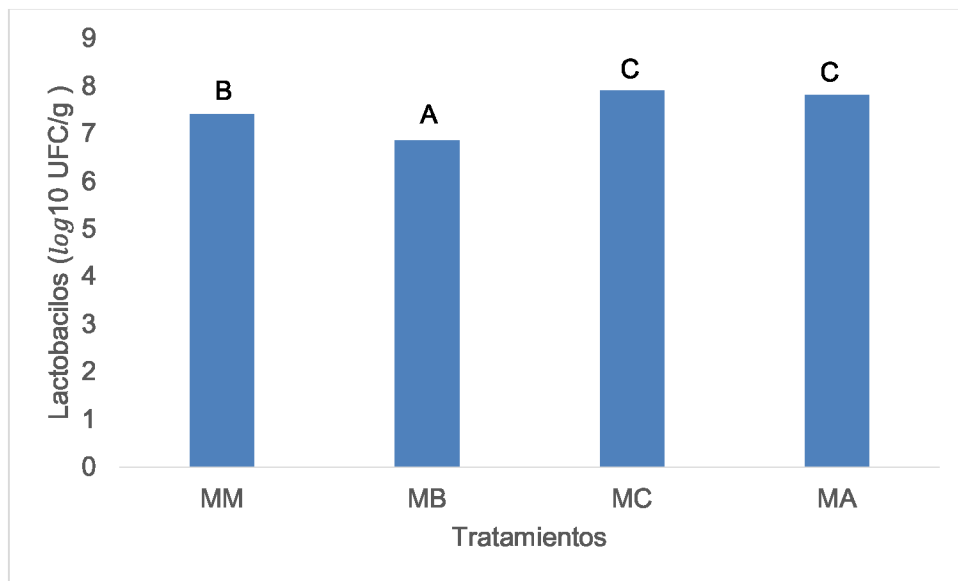
Las diferencias observadas en las poblaciones microbianas durante el proceso, pueden deberse a los cambios en la concentración de oxígeno y pH del medio durante la producción de los biofermentos; ya que muchos microorganismos presentes en los mantillos son anaerobios facultativos, es decir son capaces de sobrevivir en medios aerobios y anaerobios; sin embargo, se desarrollan mejor en presencia de oxígeno dado que su eficiencia energética es mayor (Frioni, 1999). La disminución del pH también podría ser responsable de la reducción de los grupos mencionados, ya que a pesar de que se reporta que en los cocteles microbianos proliferan y coexisten microorganismos a pH de hasta 3.5 (Otero, 2011), la diversidad microbiana de los bioles fue menor que la encontrada en el mantillo y el MM. Algunos microorganismos no sobreviven en ausencia de oxígeno y bajo pH, mientras que otros como los lactobacilos se ven favorecidos por estas condiciones (Kielak *et al.*, 2016, Uribe, 2019).

A pesar de que se evaluaron varios grupos funcionales en el MM y en los bioles, estos únicamente representan los microorganismos capaces de crecer en un medio artificial, que se estiman constituyen menos de un 2% de todas las especies presentes (Costa *et al.*, 2018). Al respecto Uribe (2019) reportó que a nivel molecular en los bioles se observan microorganismos pertenecientes a los Filos: Firmicutes, Acidobacterias, Actinobacterias y Verrucomicrobia; y a las clases: Bacilli, Alphaproteobacteria, Actinobacteria, Nitrospira, Clostridia. En cuanto a las Acidobacterias estas pertenecen a un filo muy abundante y diverso, pero poco estudiado, ya que no crecen en medio de cultivo; su funcionamiento fisiológico podría tener implicaciones importantes debido al uso que le dan al carbono, asimilación de nitrógeno, metabolismo del hierro, actividad antimicrobiana y abundancia de transportadores (Kielak *et al.*, 2016).

Las clases Bacilli y Clostridium pertenecen al Filo Firmicutes; y los lactobacilos se encuentran dentro de los Bacilli. Los miembros del género *Clostridium* son anaerobios estrictos, mientras que los lactobacilos son anaerobios facultativos (Tortora, *et al.*, 2007b). Por su parte Aguirre-von-Wobeser (2018) reportó la presencia de los filios Acidobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Nitrospirae y Firmicutes

asociados a la rizósfera de plantas de maíz. Mientras que la Clase Nitrospira se presenta en el suelo como una bacteria capaz de oxidar amonio, así como las pertenecientes al género Nitrosoma (Lücker *et al.*, 2010). Al igual que Uribe *et al.*, (2019) se encontró que la población dominante en los bioles fueron los lactobacilos.

Cuando se estudió el efecto del factor tipo de mantillo sobre el log de UFC de la población de lactobacilos (Figura 5), se encontró que las poblaciones en MC y MA fueron significativamente mayores que MM y MB. Dicho resultado difiere de lo observado en los insumos (Cuadro 1), ya que los rastrojos montaña y bambú presentaron más lactobacilos en comparación a los rastrojos de arroz y caña. Esto pudo deberse a que en el mantillo de bambú y bosque ya los lactobacilos estaban en una alta concentración, cercana a la capacidad de carga del sistema, mientras que en el arroz y la caña el proceso de fermentación favoreció el incremento de los lactobacilos.

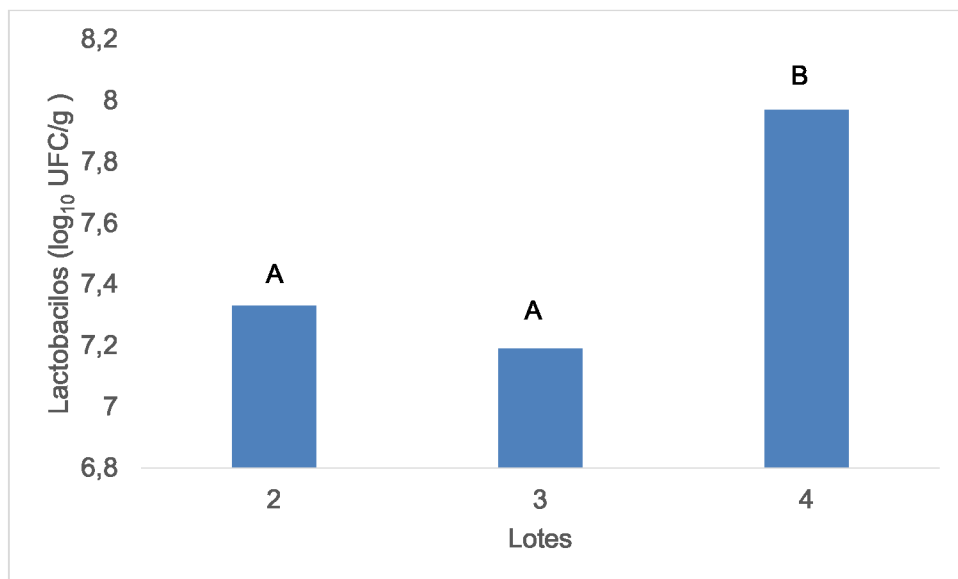


**Figura 5.** Efecto del factor tipo de mantillo sobre la población de Lactobacilos presente en los bioles. Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ )  $N=9$ .

Algunos microorganismos son capaces de sobrevivir a condiciones de bajo pH, debido a que poseen mecanismos de control de entrada y salida de protones y cationes en sus membranas. En ambientes de pH bajo dominan bacterias fermentativas, como las bacterias ácido lácticas, excluyendo competitivamente a otros microorganismos (Frioni, 1999; Tortora, *et al.*, 2007b).

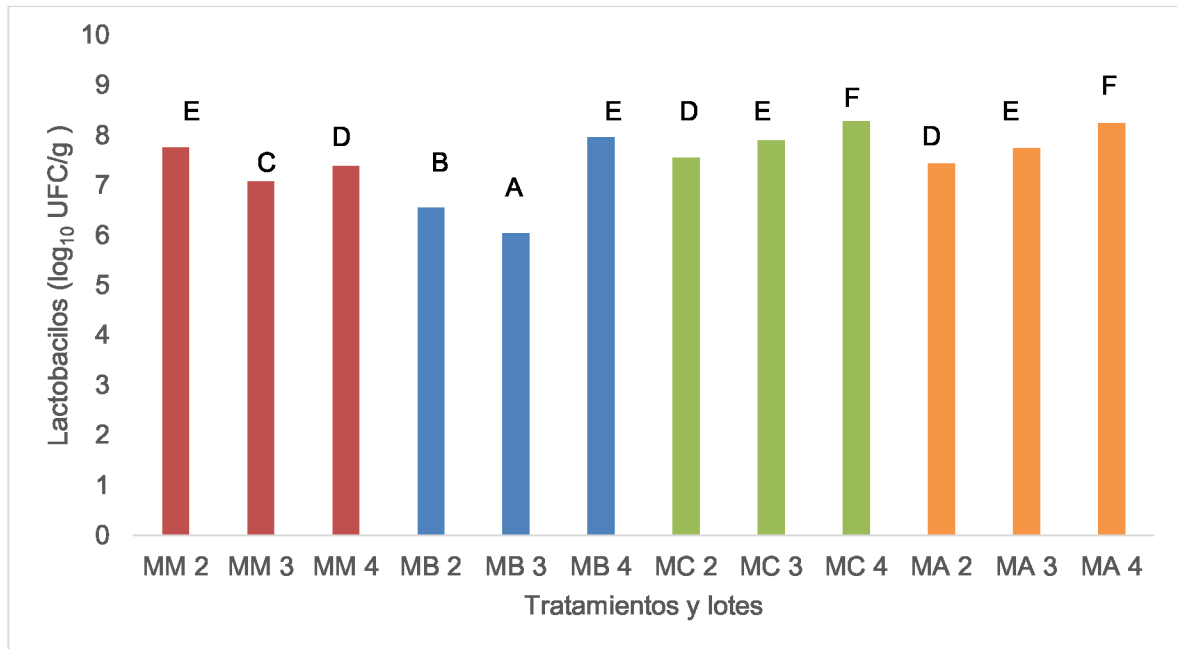
Los lactobacilos son bacterias que producen ácido láctico, acético, CO<sub>2</sub> y otros subproductos en el proceso de fermentación (Ito, 2006; Knoll, 2007), por lo que contribuyen al pH ácido encontrado en los biofermentos (Cuadro 4). Esta disminución del pH, así como la producción de otros compuestos como peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, pueden regular las poblaciones microbianas, lo cual podría explicar porqué estos son predominantes en los bioles de MC, MA y MM (Uribe, 2019).

Cuando se estudió el factor lote del biol se observó que la población de lactobacilos aumentó en el cuarto lote (Figura 6), lo cual puede deberse a que el proceso de fermentación favorece la presencia de dicha población (Frioni, 1999). Además, se puede inferir a que el proceso fermentativo en los lotes 2 y 3 no ha llegado a la fase estacionaria y que probablemente se encuentre en la fase exponencial (Rodríguez, 2016).



**Figura 6.** Efecto del factor lote sobre la población de Lactobacilos presentes en los diferentes bioles. Letras diferentes representan diferencias significativas entre lotes ( $p > 0,05$ )  $N=9$ .

Como se observa en la Figura 7, el comportamiento de los lotes dependió tanto con el lote utilizado como con el tipo de mantillo en la preparación del fermento. Así, MC y MA presentaron mayores Log de UFC en el cuarto lote, mientras que el MM presentó los mayores valores en el lote 2. Cabe recordar que en los mantillos de MC y MA se encontraron las menores poblaciones de lactobacilos.



**Figura 7.** Efecto de los tratamientos y lotes utilizados sobre la población de Lactobacilos presente. Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos y lotes ( $p > 0,05$ )  $N=3$ .

En el Cuadro 4 se observan los valores de pH y EC en los diferentes lotes de fermentos, en los que se mantuvieron constantes entre lotes del mismo tipo de biol. El pH varió de 3.8 a 4.5 y la EC osciló entre 0.9 y 1.1 ms/cm. El MB presentó valores superiores de pH y menor EC; mientras que el MA un menor pH y mayor EC, lo que concuerda con Ito (2006) quien reportó que los lactobacilos provocan la disminución del pH. De igual manera el pH y la EC están relacionados, ya que en condiciones de menor pH se observa un aumento de EC.

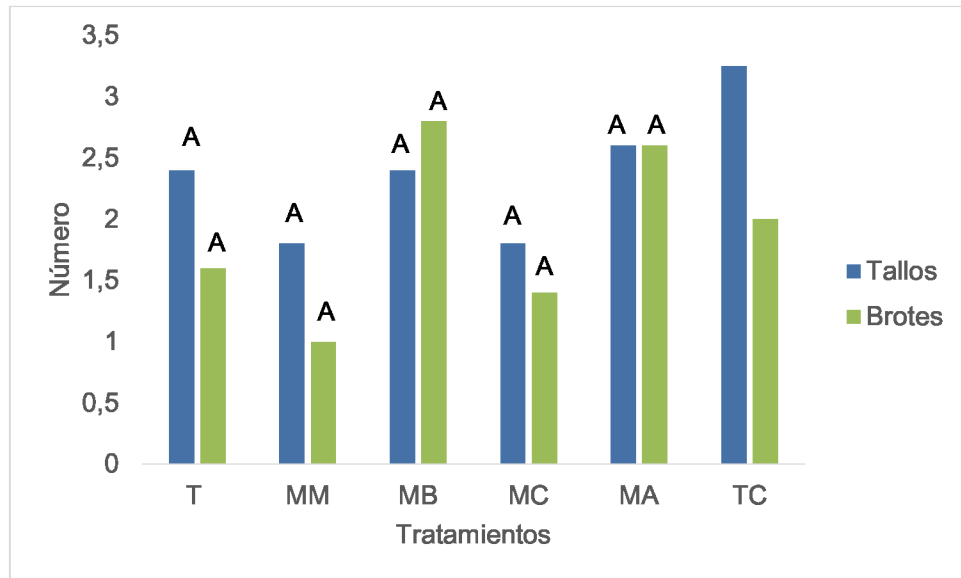


**Cuadro 4.** Valores de pH y EC presentes en los diferentes biofermentos utilizados

<b>Biofermento</b>	<b>Lote</b>	<b>Característica</b>	
		<b>pH</b>	<b>EC (ms/cm)</b>
MM	2	4.0	1.0
	3	4.0	1.0
	4	3.8	1.0
MB	2	4.5	0.9
	3	4.4	0.9
	4	4.5	0.9
MC	2	4.0	1.0
	3	4.0	1.0
	4	4.0	1.1
MA	2	3.8	1.1
	3	3.8	1.1
	4	3.8	1.1

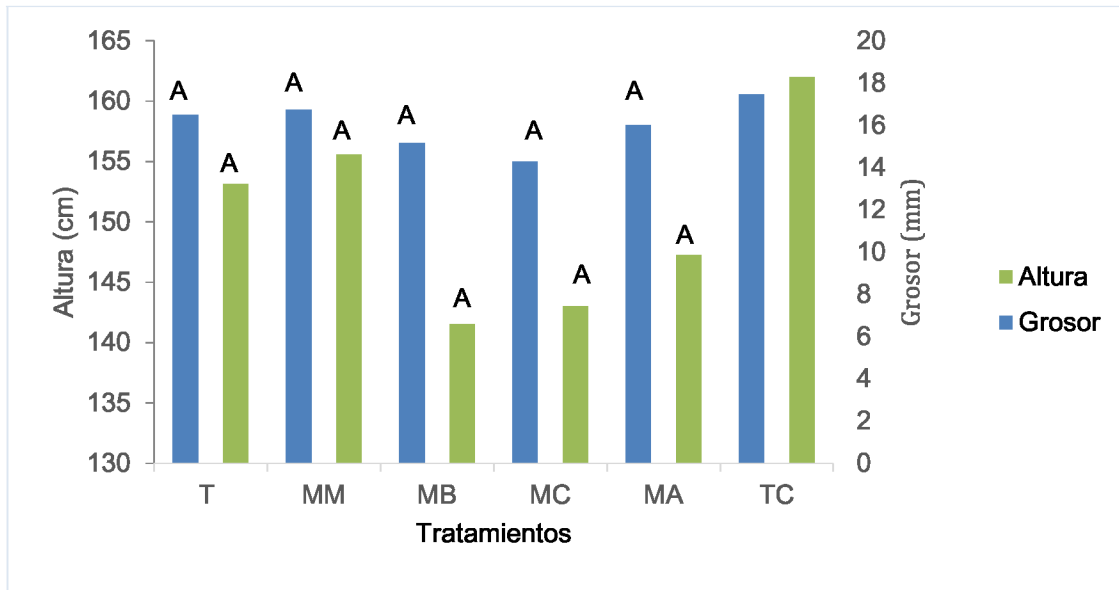
## **2. Efecto de los tratamientos sobre las plantas**

Cuando se estudió el efecto de los diferentes fermentos sobre el crecimiento de las plantas de caña de azúcar, se encontró una variación de 1.8 a 3.2 tallos por plántula. Mientras que el número de brotes varió entre 1.0 y 2.8 por plántula. No se encontraron diferencias significativas en ambas variables (Figura 8).



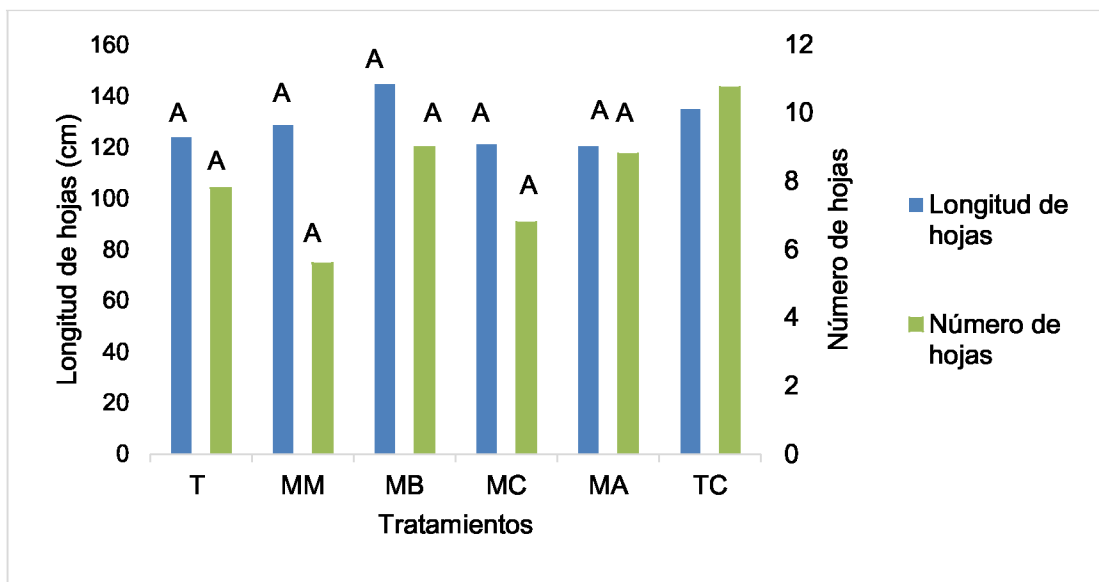
**Figura 8.** Efecto de los tratamientos utilizados en el número de tallos y brotes obtenidos, en las plántulas de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ ) N=5.

En lo que respecta a la altura de las plantas esta varió de 141.5 a 162.0 cm. Por su parte, el grosor de los tallos osciló entre los 14.3 y 17.5 mm. No se encontraron diferencias significativas entre el testigo absoluto y los tratamientos utilizados (Figura 9).



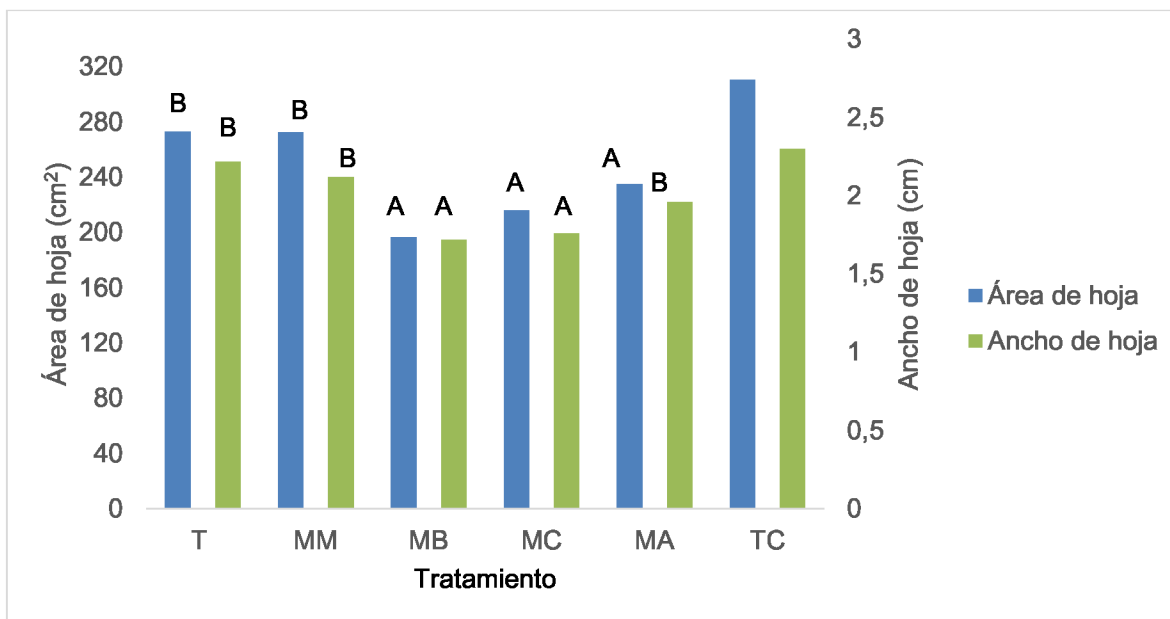
**Figura 9.** Efecto de los tratamientos utilizados en la altura y grosor de los tallos obtenidos, en las plántulas de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ )  $N=5$ .

La longitud de las hojas varió entre 120.2 y 144.7 cm, mientras que el número de hojas entre 5.6 y 9.0 por plántula (Figura 10). Lo anterior difiere de lo observado por Umaña (2017), ya que dicho autor reportó una mayor longitud de hojas en plantas de espinaca y culantro expuestas a MM.



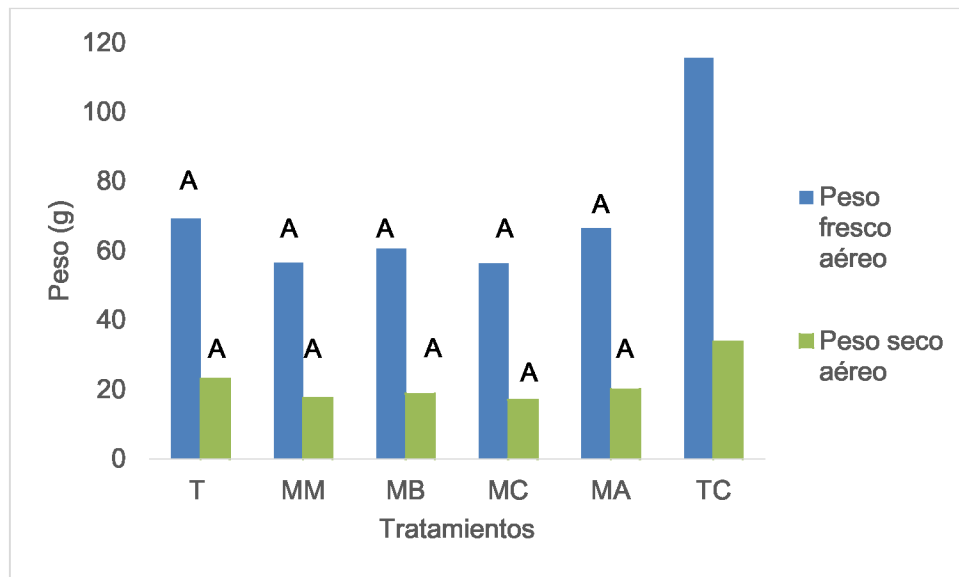
**Figura 10.** Efecto de los tratamientos utilizados en la longitud y número de hojas obtenidos, en las plántulas de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ )  $N=5$ .

En la Figura 11 se observa que MB y MC presentaron una menor área y ancho de hojas en comparación con T y MM, mientras que MA presentó una menor área de la hoja que estos mismos tratamientos. Estos resultados muestran que los fermentos con excepción del MM tuvieron un efecto negativo en el largo y ancho de la hoja, en comparación con el tratamiento testigo. Al respecto, Umaña (2017), reportó un mayor ancho y tamaño de hojas de culantro y espinacas expuestas a MM.



**Figura 11.** Efecto de los tratamientos utilizados en el área y ancho de hojas, obtenidos en las plántulas de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ )  $N=5$ .

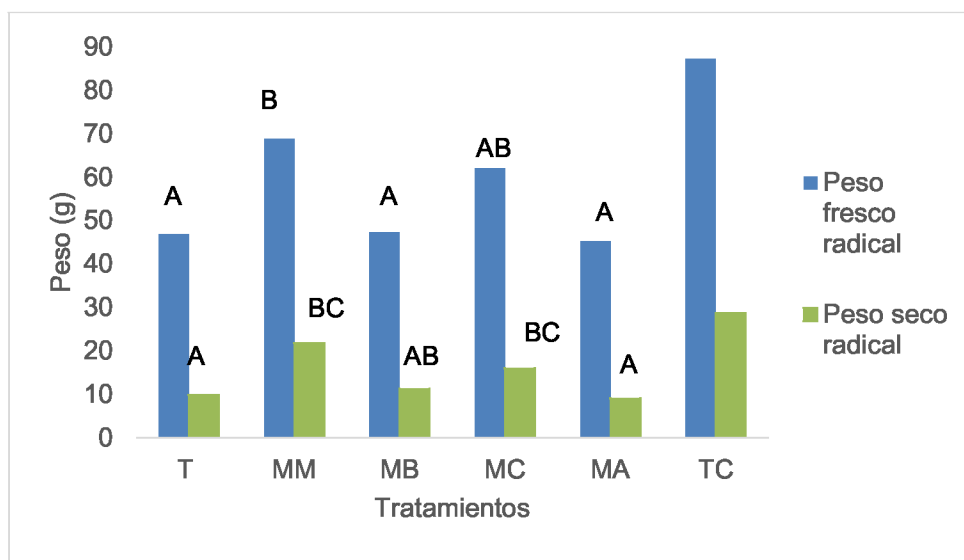
El peso fresco aéreo varió de 56.3 a 115.7 gramos, mientras que el peso seco de 17.0 a 33.8 gramos, sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 12). Estos resultados difieren de lo observado por Umaña (2017), quien reportó aumentos en el peso aéreo de plantas de espinaca y culantro, tratadas con fermentos microbianos elaborados a partir de mantillo de montaña. Castro *et al.*, (2015) también observaron aumentos en el peso foliar de plantas de soya y tomate, tratadas con MM y MM con *Azospirillum oryzae*.



**Figura 12.** Efecto de los tratamientos utilizados en el peso fresco y seco aëreo, obtenidos en las plántulas de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ )  $N=5$ .

El peso fresco radical varió entre 45.3 y 87.3 gramos (Figura 13), siendo el tratamiento MM significativamente mayor que T y los tratamientos MB y MA. Por su parte, el peso seco radical varió entre 9.1 y 28.7 g, y el MM presentó valores significativamente mayores que T, MB y MA, mientras que MC fue mayor que T y MA. Lo anterior coincide con lo observado por Umaña (2017), quien reportó un aumento en el peso radical en plantas de espinaca y culantro a las que se trató con MM.

Un mayor desarrollo radical es de gran relevancia ya que es mediante este órgano que la planta absorbe agua y nutrientes. Por ende, un sistema radicular desarrollado puede ser sinónimo de plantas saludables, al permitir la respuesta ante eventos de estrés biótico y abiótico (Pedraza *et al.*, 2010). El tipo de raíces que se desarrollan es también determinante, ya que raíces tipo cuerda pueden penetrar a profundidades de hasta 6 metros, lo cual permitiría el acceso a reservas de agua profundo. Por otro lado, la ramificación de la raíz en perfiles menos profundos aumenta la superficie de contacto y por ende la absorción de nutrientes (Smith *et al.*, 2005).

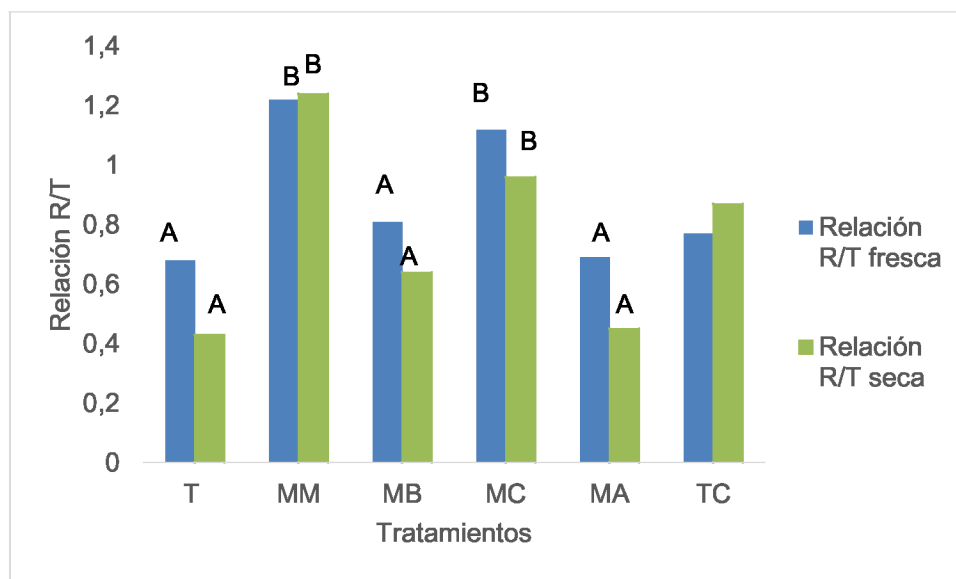


**Figura 13.** Efecto de los tratamientos utilizados en el peso fresco y seco de las raíces, obtenidos en las plántulas de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ )  $N=5$ .

El efecto observado en el desarrollo radical del tratamiento MM se pudo deber a la presencia de lactobacilos o a los compuestos microbianos o químicos no analizados, debido a que las cuantificaciones por grupo funcional no consideran las especies presentes, y que a pesar de que se determinaron los contenidos químicos en los bioles estos no reportan la presencia de biomoléculas.

En los ecosistemas existe una compleja interacción suelo-microbioma-planta, en donde todos los elementos interactúan, por ejemplo los exudados radicales pueden favorecer un grupo específico y el grupo o especie a su vez el crecimiento de la planta (van Der Heijden *et al.*, 2008). Además, si las condiciones del medio permiten el establecimiento de la interacción los microorganismos pueden tener efecto sobre las características físicas y químicas del suelo que a su vez tienen efecto directo sobre las raíces.

La relación R/T en base fresca varió entre 0.68 y 1.2, con valores superiores en MM en comparación con T, MB y MA. La relación seca R/T se comportó de manera similar y varió entre 0.45 y 1.24. Esta relación responde a la acción de fitohormonas y a la disponibilidad de nitrógeno en el suelo, así, en condiciones de poca disponibilidad las plantas responden en dos fases, la primera es una disminución de la elongación de las hojas sin afectación de la fotosíntesis; mientras que el crecimiento de las raíces se mantiene o estimula debido al transporte de carbono asimilado a las raíces, lo que podría ocasionar un aumento de la relación raíz/tallo (Hawkesford, *et al.*, 2012). El tratamiento MM presentó una alta relación raíz/tallo, lo cual pudo aumentar la disposición de recursos, el intercambio gaseoso, la economía de carbono y partición de asimilados (Smith *et al.*, 2005).



**Figura 14.** Efecto de los tratamientos utilizados sobre la relación R/T fresca y seca, obtenida en las plántulas de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0,05$ )  $N=5$ .

En lo que respecta al contenido foliar de diferentes macronutrientes (Cuadro 5), no se encontraron diferencias entre tratamientos con la aplicación de bioles. Lo anterior



difiere de lo observado por Castro *et al.*, (2015), ya que dichos autores encontraron mayor contenido foliar de P, N, Ca, Mg, K y S, en plantas de tomate aplicadas con MM y MM más *Azospirillum oryzae*. Sin embargo, es importante mencionar que en dicho ensayo también se incorporó 2 ciclos de residuos de soya, lo que podría sugerir una insuficiencia de los nutrientes presentes en el suelo utilizado en este trabajo, lo cual pudo limitar el crecimiento de las plantas y de los microorganismos, provocando también una posible competencia entre éstos.

Es importante mencionar que el testigo comercial se fertilizó con N, P, K y S. Este tratamiento presentó mayores contenidos foliares de N, K, Ca, Mg y S, tal como se observa en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Contenido foliar de macronutrientes obtenido en las plántulas de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.), según el tratamiento utilizado.

Tratamiento	N	P	K	Ca	Mg	S
	g/planta					
T	0.14 A	0.04 A	0.35 A	0.07 A	0.03 A	0.06 A
MM	0.11 A	0.04 A	0.3 A	0.05 A	0.02 A	0.05 A
MB	0.13 A	0.04 A	0.28 A	0.05 A	0.03 A	0.05 A
MC	0.15 A	0.04 A	0.34 A	0.06 A	0.03 A	0.05 A
MA	0.15 A	0.04 A	0.31 A	0.06 A	0.03 A	0.05 A
TC	0.26	0.05	0.57	0.11	0.05	0.09

Letras diferentes representan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) N=3

En el Cuadro 6 se observa un mayor contenido foliar de hierro en T en comparación a MM, MB, MC y MA. Se ha reportado la producción de sideróforos por parte de un gran número de bacterias rizosféricas (Otero, 2011; Sarode *et al.*, 2013); por su parte las plantas monocotiledóneas utilizan la estrategia I en el mecanismo de adquisición de hierro, la cual corresponde a la producción de fitosideróforos, por lo que los microorganismos presentes en los bioles pudieron acomplejar parte del Fe presente en suelo, disminuyendo su disponibilidad para las plantas.

Este micronutriente es importante ya que actúa como cofactor de varias enzimas, responsables de diferentes procesos fisiológicos como: fijación de nitrógeno, ciclo del ácido tricarboxílico (CAT), cadena de transporte de electrones, fosforilación oxidativa, fotosíntesis y respiración; los cuales regulan las rutas biosintéticas de producción de clorofila II, toxinas, vitaminas, antibióticos, citocromos y pigmentos respectivamente (Sarode *et al.*, 2013).

**Cuadro 6.** Contenido foliar de micronutrientes obtenido en las plántulas de Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum L.*), según el tratamiento utilizado.

Tratamiento	Fe	Cu	Mn	B	Zn
	mg/ planta				
T	4.70 B	0.10 A	5.28 A	0.16 A	0.55 A
MM	2.89 A	0.08 A	3.62 A	0.10 A	0.49 A
MB	3.01 A	0.08 A	3.91 A	0.13 A	0.40 A
MC	3.42 A	0.07 A	3.82 A	0.11 A	0.29 A
MA	3.55 A	0.08 A	3.59 A	0.12 A	0.42 A
TC	6.30	0.15	6.12	0.22	0.69

Letras diferentes representan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) N=3

### **3. Efecto de los tratamientos sobre variables del suelo**

#### **3.1 Propiedades químicas**

En el Cuadro 7 se presentan los contenidos de macro y micronutrientes, pH y acidez presentes en los suelos antes del establecimiento de las plantas y al concluir el ensayo. Se observa un aumento en el pH de los tratamientos aplicados con biofermentos en comparación con los no aplicados. Este aumento de pH se puede asociar a la acción de los microorganismos, ya que estos mineralizan nutrientes, lo que se traduce en el aumento de las bases en la solución del suelo (Morales *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2015). Además los aportes de calcio y potasio presentes en la melaza contribuyen en el aumento de las sales que puede reflejarse en la conductividad eléctrica (Fajardo y Sarmiento, 2007), por ejemplo el MM presentó un leve aumento en esta variable (Cuadro 8).

En cuanto a la capacidad de intercambio catiónico (CICE) se obtuvo un ligero aumento en MM, en comparación con testigo absoluto y con los otros biofermentos (Cuadro 7). La CICE se debe a la presencia de arcillas y materia orgánica (Hartel, 2005), por lo que la suma de factores como el aumento de pH, la presencia de materia orgánica y la CICE, pudieron contribuir con el desarrollo de raíz en el tratamiento MM.

No se observaron grandes variaciones en los contenidos nutricionales del suelo al inicio y posterior al establecimiento del ensayo (Cuadro 7), a pesar de la extracción de nutrientes por parte de las plantas. Esto podría deberse al error asociado presente en los análisis de suelos, el cual varía según elemento, por ejemplo la determinación de las bases presenta un error asociado de 10%, mientras que el S de 20 a 25% y, el P y Fe de un 25 a 30%. Por otro lado, en los análisis foliares el error es menor, en los elementos mayores es de un 5 a 10%, mientras que en los menores de 10 a 15% (Corrales *et al.*, 2005).

Es importante mencionar que los contenidos iniciales de fósforo, potasio y zinc fueron bajos en suelo. Esto pudo representar una limitante en la disponibilidad de los

nutrientes, ya que se presentaron síntomas de deficiencias de fósforo y potasio en todos los tratamientos (Anexo 4). Hussain *et al.* (2000) y Castro *et al.*, (2015), observaron efectos positivos al mezclar microorganismos con enmiendas y residuos orgánicos, ya que los nutrientes contenidos en las enmiendas pueden ser mineralizadas por los microorganismos presentes en los bioles.

**Cuadro 7.** Contenidos de macro y micronutrientes; pH y acidez presentes en suelos expuestos a los diferentes tratamientos utilizados.

<b>Solución extractora</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>K</b>	<b>CICE</b>	<b>SA</b>	<b>P</b>	<b>Zn</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>
<b>KCl-Olsen Modificado</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>		<b>Cmol (+)/L</b>				<b>%</b>		<b>mgL<sup>-1</sup></b>			
Nivel crítico	5.5	0.5	4.0	1.0	0.2	5.0		10.0	3.0	1.0	10.0	5.0
Muestra inicial	5.9	0.1	17.2	6.8	0.4	24.5	0.5	3.0	2.3	15.0	74.0	35.0
T	5.9	0.1	18.1	7.2	0.4	25.8	0.4	5.0	2.8	11.0	66.0	19.0
MM	6.1	0.1	19.5	7.7	0.4	27.7	0.4	4.0	2.7	12.0	52.0	18.0
MB	6.1	0.1	17.9	7.0	0.4	25.4	0.4	4.0	3.0	12.0	52.0	16.0
MC	6.1	0.1	18.1	7.2	0.4	25.8	0.3	4.0	2.8	12.0	54.0	15.0
MA	6.1	0.1	18.0	7.1	0.4	25.6	0.4	3.0	2.7	12.0	49.0	15.0
TC	5.9	0.1	18.4	7.1	0.4	25.9	0.3	7.0	2.7	12.0	52.0	20.0

Nota: N=1

Como se observa en el Cuadro 8 la CE, C, N y MO fueron muy similares entre tratamientos así como con la muestra inicial. En general, todos los tratamientos presentaron relaciones C/N de entre 10 y 12; los cuales representan valores aceptables, ya que entre 10 y 14 se da una rápida ruptura de tejidos y mineralización de nutrientes (Gamarra *et al.*, 2018). El TC presentó la menor tasa C/N.

**Cuadro 8.** Conductividad eléctrica, porcentaje de carbono (C), nitrógeno (N), relación C/N, y porcentaje de materia orgánica presente en suelos expuestos a los diferentes tratamientos utilizados.

Tratamiento	CE	C	N	C/N	MO
	mScm <sup>-1</sup>		%	Relación	%
Muestra inicial	0.2	1.8	0.2	11.2	2.5
Testigo absoluto	0.2	1.7	0.1	11.5	2.5
Testigo comercial	0.2	1.7	0.2	10.2	2.5
MM	0.3	1.7	0.1	11.6	2.5
MB	0.2	1.7	0.1	11.3	2.4
MC	0.2	1.6	0.1	11.0	2.4
MA	0.2	1.6	0.1	10.9	2.3

\*Los valores de C y N se encuentran redondeados, sin embargo la relación se sacó con los datos originales. N=3

### 3.2 Poblaciones microbianas

El uso de bioles de MM permite la introducción de cepas nativas, lo que aumenta la probabilidad de establecimiento y por ende de éxito de los mismos, ya que están adaptadas a las condiciones edáficas y climáticas (Armenta *et al.*, 2010; Rodríguez, 2018). Sin embargo en el suelo se pueden encontrar poblaciones microbianas de hasta  $10^{10}$ , lo que podría dificultar el establecimiento de los microorganismos aplicados, debido a las complejas relaciones de competitividad y simbiosis presentes en el suelo (van Der Heijden *et al.*, 2008).

En este ensayo se observó, en todos los tratamientos, el aumento en las poblaciones de lactobacilos con respecto al suelo inicial, debido principalmente al impacto del crecimiento de la planta sobre la comunidad microbiana del suelo y a la inoculación con los lactobacilos en los tratamientos a los que se adicionaron fermentos

(Cuadro 9). Sin embargo, el tratamiento MB presentó valores significativamente menores del UFC de lactobacilos que los demás tratamientos, lo que coincide con el menor número de estas bacterias presentes en el biol a base de residuos de bambú. Se encontró una disminución en el número de hongos y el aumento en los solubilizadores de P después del establecimiento y cosecha del cultivo; mientras que no se observaron cambios en las poblaciones de bacterias y actinomicetes. Lo anterior difiere con lo reportado por Castro *et al.*, (2015), quienes encontraron aumentos en las UFC de actinomicetes después de 4 ciclos de cultivo (soya y tomate intercalado) y en el suelo sin disturbar, lo cual sugiere que una extensión en el tiempo o número de aplicaciones podría incidir positivamente en el aumento de las UFC establecidas en el suelo.

**Cuadro 9.** Poblaciones microbianas presentes en el suelo al concluir el ensayo.

Tratamiento	Lactobacilos	Bacterias	Actinomicetes	Hongos	Solubilizadores de fósforo
	(log <sub>10</sub> UFC/g)				(NMP)
Inicial *	<2	7.0	6.8	5.4	4.8
T	4.9 B	7.0 A	6.3 A	4.7 A	5.8 A
TC	4.9 B	7.0 A	6.4 A	4.9 A	5.1 A
MM	5.1 B	6.7 A	6.5 A	4.7 A	5.3 A
MB	4.7 A	6.9 A	6.4 A	4.9 A	5.1 A
MC	4.9 B	7.1 A	6.3 A	4.7 A	5.1 A
MA	5.2 B	7.1 A	6.5 A	4.8 A	5.7 A

Letras diferentes representan diferencias significativas ( $p > 0,05$ )  $N=3$ , a excepción del recuento inicial ( $N=1$ ).

En la producción de bioles debido a cambios como la disminución de la concentración de oxígeno y pH, se seleccionan microorganismos adaptados a dichas condiciones, estos cambios progresivos, se traducen en las variaciones de las poblaciones observadas en los lotes provenientes de un mismo bioreactor. Los microorganismos presentes interactúan de manera directa e indirecta entre sí, ya que

pueden producir compuestos que favorezcan o perjudiquen otras poblaciones de microorganismos, o pueden producir cambios en el sustrato y o condiciones presentes.

La adición de fermentos microbianos a un sistema puede afectar el desarrollo del cultivo presente en el mismo, ya que como se observó aplicaciones de biofermentos de MB y MC tuvieron efectos negativos en el ancho y área de las hojas; por su parte el tratamiento MM mostró un efecto positivo en el crecimiento radical de plántulas de caña de azúcar; estas respuestas son explicadas por la compleja interacción suelo-microbioma-planta, ya que los microorganismos presentes pueden tener efecto en las características químicas del suelo, como se observó con el contenido foliar de hierro, pH, CICE, entre otros. De igual manera el establecimiento de un cultivo, puede tener efecto sobre el microbioma del suelo.

## CONCLUSIONES

- Los insumos para la producción de biofermentos como los mantillos y la semolina fueron fuente de inóculo de microorganismos pertenecientes a grupos funcionales de interés como bacterias, lactobacilos, actinomicetes, levaduras y solubilizadores de fósforo.
- Las poblaciones microbianas variaron con el mantillo utilizado y con el proceso de fermentación.
- En los biofermentos líquidos proliferaron los lactobacilos, cuyo metabolismo provocó la disminución en el pH y aumento en la EC del medio, lo que a su vez limita el crecimiento de otras especies, debido a la selección que ejercen estas condiciones.
- Se pudo observar diferencias en el log de UFC según el lote utilizado, posiblemente debido a que las especies capaces de proliferar en estas condiciones crecen exponencialmente mientras las condiciones son óptimas.
- Las plantas de caña de azúcar inoculadas con los biofermentos MC y MB presentaron menor ancho y área foliar.
- Las plantas de caña de azúcar inoculadas con el biofermento MM presentaron mayor peso fresco y seco radicular y una mayor relación R/T.
- La aplicación de biofermentos a base de mantillo de montaña, bambú, caña y arroz aumentó el pH en suelo sembrado con plantas de caña de azúcar.



## **RECOMENDACIONES**

- Se recomienda caracterizar a nivel molecular las comunidades microbianas presentes en los biofermentos, ya que muchos microorganismos son incapaces de crecer en medios de cultivo.
- Realizar un ensayo con la aplicación de bioles en combinación con adición de materia orgánica y/o aplicaciones crecientes de fertilizante, con el fin de observar la respuesta microbiana y de la planta a condiciones más favorables.
- Realizar un ensayo a nivel de campo con aplicaciones de MM con el fin de observar la respuesta del cultivo bajo dichas condiciones.

## LITERATURA CITADA

Aguirre-von-Wobeser E; Rocha-Estrada J; Shapiro LR; de la Torre M. 2018. Enrichment of Verrucomicrobia, Actinobacteria and Burkholderiales drives selection of bacterial community from soil by maize roots in a traditional *milpa* agroecosystem. PLoS ONE 13(12).

Alvarado-Capó; Cruz-Martín, M; Suárez-Acosta, M; Leiva-Mora, M; Berkis, R; Sánchez-García, C; Freire-Seijo, M; Mariño, M. 2011. Diversidad de microorganismos cultivables aislados de suelo en plantaciones de bambú. Biotecnología vegetal 11(3): 189-192 p.

Armenta, A; García, C; Camacho, R; Apodaca, M; Montoya, L; Nava, E. 2010. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible, 6(1): 51-56 p.

Basanta, R; Delgado, M. G; Martínez, J. C; Vázquez, H. M; Vázquez, G. B. 2007. Sostenibilidad del reciclaje de residuos de la agroindustria azucarera: una revisión. CYTA-Journal of Food, 5(4): 293-305 p.

Bautista, F; Delgado, C. 2005. Caracterización y manejo de los suelos de Yucatán: Descomposición de hojarasca y abundancia de micro invertebrados por el uso de mantillos y cultivos de cobertura. Bautista, F; Palacio, G (Eds). Yucatán, México. Instituto Nacional de Ecología. 267 p.

Bronick, C. J; Lal, R. 2005. Soil structure and management: a review. Geoderma(124): 3-22 p.

Caballero-Mellado, J. 2006. Microbiología agrícola e interacciones con plantas. Revista Latinoamericana de Microbiología 48(2): 154-161 p.

Camacho, C. F; Uribe, L. L; Newcomer, Q; Masters, K; Kinyua, M. 2018. Fitotoxicidad de compost producido con cultivos de microorganismos de montaña y lodos de biodigestor. Cuadernos de Investigación UNED 11(2): 75-84 p.

Castro Barquero, L; Uribe Lorío, L; Mata Chinchilla, R; Murillo Roos, M; 2015. Inoculación al suelo con *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum oryzae*, *Bacillus subtilis* y microorganismos de montaña (MM) y su efecto sobre un sistema de rotación soya-tomate bajo condiciones de invernadero. Agronomía Costarricense, 39(3): 21–36 p.

Chaves, S, M. 2017. Sinergismo N-K y productividad agroindustrial de la caña de azúcar en Costa Rica. Congreso Nacional de Suelos (2017. San José, Costa Rica). San José, Costa Rica. LAICA. 7 p.

CONADESUCA. 2015. Ficha Técnica del Cultivo de la Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.): 19 p. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/141823/Ficha Tcnica Ca a de Az car.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/141823/Ficha_Tecnica_Ca_a_de_Az_car.pdf)  
[http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/141823/Ficha Tcnica Ca a de Az car.pdf](http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/141823/Ficha_Tcnica_Ca_a_de_Az_car.pdf)

Corrales, M; Bertsch, F; Bejarano, J, A. 2005. Los laboratorios de análisis de suelos y foliares en Costa Rica: Informe del comité de laboratorios de análisis de suelos, plantas y aguas. Agronomía Costarricense 29(3): 125-135 p.

Costa, J; Oliveira, R. S; Tiago, I; Ma, Y; Galhano, C; Freitas, H; Castro, P. 2018. Advances in Plant Ecophysiology Techniques: Soil Microorganisms. Sánchez-Moreiras, A; Reigosa, M. (eds). Springer, Cham. 457-482 p.

Daly, M.J; Stewart, D.P.C. 1999. Influence of effective microorganisms (EM) on vegetable production and carbon mineralization- A preliminary investigation. Journal of Sustainable Agriculture. 14:15-25 p.

Delgado, V. 2006. Evaluación de la eficiencia del uso de biofermentos como bioestimulantes radiculares en el cultivo orgánico de piña *Ananas Comosus Linnaeus (Forinoseae: Bromiliaceae)*. Tesis: Lic. Guácimo, Costa Rica. Earth. 38 p.

Duarte, O; González, J. D. 2019. Guía técnica del cultivo de caña de azúcar. Duarte, O. (Ed.). San Lorenzo, Paraguay. 40 p.

Fajardo, E; Sarmiento, S. 2007. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*: Características generales. Bogotá, Colombia, Pontifica Universidad Javeriana. 120 p.

Ochoa, M, G; Reyes, M; Manríquez, J, A. 2010. Producción sostenible de caña de azúcar en México. FIRA (11): 11-55 p.

Frioni, L. 1999. Procesos microbianos: Promoción directa del crecimiento vegetal. Montevideo, Uruguay, Editorial de la fundación Universidad Río Cuarto. 257-265 p.

Gamarra Lezcano, C. C; Díaz Lezcano, M. I; Vera de Ortiz, M; Galeano, M. D. P; Cabrera Cardús, A. J. N. 2018. Relación carbono-nitrógeno en suelos de sistemas silvopastoriles del Chaco paraguayo. Revista mexicana de ciencias forestales 9(46): 4-26 p.

García-Salgado, S; Aranda-Ibañez, E; Castelán-Estrada, M; Ortiz-Laurel, H; Palma-López, D; Córdova-Sánchez. 2014. Qué hacer con la paja de la cosecha mecanizada de la caña de azúcar. Agro productividad: volumen 7(2): 3-8 p.

Garro, J. 2016. El suelo y los abonos orgánicos. Ramírez, L; Mesén, M (Eds). San José, Costa Rica. INTA 106 p.

Gliessman, S. R. 2002. Agroecología: procesos ecológicos en agricultura sostenible. Rodríguez, E; Benjamin, T; Rodríguez, L; Cortés, A. (Eds). Turrialba, Costa Rica. CATIE.

Golec, A. F. C; Pérez, P. G; Lokare, C. 2007. Microorganismos eficientes: ¿Mito o realidad?. Revista Peruana de Biología 14(2): 315-319 p.

González-Hernández, J; Peña, A. 2002. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). Revista Latinoamericana de Microbiología 44(3-4): 137-156 p.

Hartel, P.G. 2005. The soil habitat: Principles and applications of soil microbiology. Sylvia, D. M; Fuhrmann, J. J; Hartel, P. G; Zuberer, D. A. (Eds.). Upper Saddle River. NJ, United States. Pearson Prentice Hall. 39-51 p.

Higa, T; Parr, J.F. 1994. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agricultura and environment. International Nature Farming Research Center Atami, Japón (1): 1-16 p.

Hawkesford, M; Horst, W; Kichey, T; Lambers, H; Chioerring, J; Møller, I; White, P. 2012. Functions of macronutrients in Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3<sup>rd</sup> ed. Pergamon, England. 135-189 p.

Hussain, T; Anjum, AD; Tahir, J. 2002. Technology of beneficial microorganisms. Nat Farm Environ 3:1-14 p.

Ilyas, N; Bano, A. 2012. Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics. Potential Use of Soil Microbial Community in Agriculture. Maheshwari, D.K. (Ed.) Heidelberg, Alemania. Springer. 45-65 p.

Ito, S. 2006. Caracterización y evaluación de los factores que determinan la calidad nutricional e inocuidad en la producción de fertilizantes orgánicos fermentados. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 107 p.

Khan, M, S; Ahmad, E; Zaidi, A; Oves, M. 2013. Bacteria in Agrobiolgy, Crop Productivity: Functional Aspect of Phosphate-Solubilizing Bacteria, Importance in Crop Production. Maheshwari, D; Saraf, M; Aeron, A. (Eds.) Berlin, Germany. Springer. 237-263 p.

Kielak, A. M; Barreto, C. C; Kowalchuk, G. A; van Veen, J. A; Kuramae, E. E. 2016. The Ecology of Acidobacteria: Moving beyond Genes and Genomes. *Frontiers in microbiology* (7): 744 p.

Knoll, C. 2007. Investigation of bacteriocins from lactic acid bacteria and their impact in winemaking: Lactic acid bacteria. Tesis M.Sc. Stellenbosch. Sudáfrica. Stellenbosch University. 5-12 p.

León-Martínez, T. S; Dopico-Ramírez, D; Triana-Hernández, O; Medina-Estevez, M. 2013. Paja de la caña de azúcar. Sus usos en la actualidad. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. 47(2): 13-22 p.

Lorch, HJ; Benckieser, G; Ottow, JCG. 1995. Basic methods for counting microorganisms in soil and water. 146-191 p. In: Alef, K; Nannipieri, P. (eds.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press.

Lücker, S; Wagner, M; Maixner, F; Pelletier, E; Koch, H; Vacherie, B; Rattei, T; Damsté, J; Spieck, H; Le Paslier, D; Daims, H. 2010. A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(30):13479-13484 p.

MAG. 2007. Agrocadena de caña de azúcar para la producción de dulce. Puriscal, Costa Rica. Consultado el 23 de septiembre del 2019. Disponible en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E70-10273.pdf>

Meléndez, G. 2003. Abonos orgánicos Principios, aplicaciones e impactos en la agricultura: Fracción orgánica del suelo. Meléndez, G; Soto, G; Uribe, L. (Eds). San José, Costa Rica. CATIE. 1-20 p.

Morales-Velasco, S; Prado, F. A. 2014. Evaluación de Microorganismos de Montaña (MM) en la producción de Acelga en la Meseta de Popayán, Colombia. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: 12(1): 79–87 p.

OCDE/FAO. 2017. Azúcar, en OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2017-2026, OECD Publishing, París. Consultado el 1/10/2019, disponible en: <http://www.fao.org/3/a-BT088s.pdf>

Osorio, N; Habte, M. 2001. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and a P solubilizing fungus on growth and P uptake of *Leucaena leucocephala* in a Oxisol. Arid Land Research and Management 15: 263-274 p.

Otero Jiménez, V. 2011. Aislamiento, selección e identificación de actinomicetes, bacterias fotosintéticas no sulfurosas y bacterias ácido lácticas con potencial biofertilizante, a partir de suelos asociados al cultivo de plátano en la Costa Atlántica Colombiana. Magister. Bogotá, Colombia, Universidad Nacional de Colombia. 141 p.

Pachecho, 2003. Abonos orgánicos Principios, aplicaciones e impactos en la agricultura: Producción, utilización y algunos aspectos técnicos de los biofermentos. Meléndez, G; Soto, G; Uribe, L. (Eds). San José, Costa Rica. CATIE. 123-160 p.

Paredes M; Espinosa, D. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*: 28(1): 61-70 p.

Patiño Torres C; Sanclemente Reyes O. 2014. Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entrado*: 10(2): 288-297 p.

Pedraza, R. O; Teixeira, K. R; Scavino, A. F; de Salamone, I. G; Baca, B. E; Azcón, R; Baldani, V; Bonilla, R. 2010. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2): 155-164 p.

Ramírez, J; Ulloa, P; Velázquez, M; Ulloa, A; Arce, F. 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente* 2(7): 1-16 p.

Ramírez, Z. A. 2017. Manejo de excretas de ovejas mediante compostaje, inoculado con microorganismos de montaña (MM) nativos en la Finca Experimental Santa Lucia, Heredia. Tesis Lic. Heredia, Costa Rica, Universidad Nacional. 52 p.

Rathore, P. 2005. Studies on phosphate solubilizing activity of indigenous soil isolate *Citrobacter freundii*. Tesis de doctorado. Anand, India, Sardar Patel University. 16-41 p.

Rayment, G. E; Lyons, D. J. 2011. Soil chemical methods-, Australasia: Carbon/nitrogen ratio. Melbourne, Australia, CSIRO publishing (Vol. 3). CSIRO publishing. 145 p.

Restrepo, J; Hensel, J. 2001. Manual práctico el ABC de la agricultura orgánica fosfitos y panes de piedra: Abonos orgánicos fermentados. Cali, Colombia.



Richardson, A. E. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Austr. J. Plant Physiology*. 28: 897-906 p.

Robalino, H. 2011. Evaluación de la actividad biológica y nutricional del Biol en diferentes formulaciones y la respuesta a su aplicación en cultivo de arroz (*Oriza sativa*) y maíz (*Zea mays*). Tesis M.Sc. Guayaquil, Ecuador, Escuela superior politécnica del Litoral. 54 p.

Rodríguez, A. 2018. Nuevas propuestas de investigación y desarrollo biotecnológico con microorganismos benéficos para la caña de azúcar. Congreso Tecnológico del Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (VII), 2018, Alajuela, Costa Rica. Laica. 26 p.

Rodríguez, E; Gamboa, MM; Hernández, F; García, J.D. 2005. *Bacteriología General*. San José, Costa Rica, Editorial Universidad de Costa Rica. 370 p.

Rodríguez, M; Alfaro, R; Ocampo, R. 2018. Respuesta productiva de la caña de azúcar (*Saccharum spp*), a la interacción de diferentes dosis de nitrógeno y potasio en la Región de Guanacaste. Promedio de dos cosechas. Congreso Tecnológico del Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (VII), 2018, Alajuela, Costa Rica. Laica. 26 p.

Rodríguez, M.R. 2016. Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a un proceso de acidificación: Modelos microbiológicos predictivos. Tesis PhD. Madrid. España, Universidad complutense de Madrid. 261 p.

Saini, A; Aggarwal, N. K; Sharma, A; Yadav, A. 2015. Actinomycetes: A Source of Lignocellulolytic Enzymes. *Enzyme Research*, 279381. Disponible en: <http://doi.org/10.1155/2015/279381>

Salgado-García, S; Aranda-Ibañez, E; Castelán-Estrada, M; Ortiz-Laurel, H; Palma-López, D; Córdova-Sánchez, S. 2014. Qué hacer con la paja de la cosecha mecanizada de la caña de azúcar. *Agroproductividad* 7(2):3-9 p.

Sarode, P; Rane, M; Kadam, M; Chincholkar, S. 2013. Bacteria in Agrobiology, Crop productivity: Role of microbial Siderophores in Improving Crop Productivity in Wheat. Maheshwari, D; Saraf, M; Aeron, A. (Eds.). Berlin, Germany. Springer. 287-308 p.

SEPSA. 2019. Boletín estadístico agropecuario #29: serie cronológica 2015-2018. Consultado el 23 de septiembre del 2019. Disponible en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/BEA-0029.PDF>

Sharma, I. P; Chandra, S; Humar, N; Chandra D. 2017. Agriculturally important microbes for the sustainable Agriculture: PGPR heart of the soil and their role in soil fertility. Meena V, G; Kumar; Brisht, J; Pattanayak, A. (Eds). Uttarakhand, India. 51-68 p.

Smith, D.M; Inman-Bamber, N.G; Thorburn, P.J. 2005 Growth and function of the sugarcane roots system. *Field Crops Research* 92(2-3): 169-183 p.

Soto, G. 2003. Abonos orgánicos Principios, aplicaciones e impactos en la agricultura: Definiciones y procesos. Meléndez, G; Soto, G; Uribe, L. (Eds). San José, Costa Rica. CATIE. 21-51 p.

Sousa, C; Fermino, S, A; Garrido, M. 2008. Characterization of the streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. *Scientia Agricola*. 65(1): 50-55 p.

Subramanian K.S; Muniraj I; Uthandi S. 2016. Role of Actinomycete-Mediated Nanosystem in Agriculture. In: Subramaniam G., Arumugam S., Rajendran V. (eds) Plant Growth Promoting Actinobacteria. Springer, Singapore.

Thompson, L, M; Troeh, F. R. 1988. Los suelos y su fertilidad: Nitrógeno. Puigdefábregas, D. J. (Ed). Barcelona, España. Reverté. 299-331 p.

Torriani-Gorini, A. 1994. Regulation of phosphate metabolism and transport. Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology, 1-4 p.

Tortora, G. J; Funke, B. R; Case, C. L. 2007a. Introducción a la microbiología: Metabolismo microbiano. Novena Ed. Buenos Aires. Argentina. Médica Panamericana. páginas: 125-134 p.

Tortora, G. J; Funke, B. R; Case, C. L. 2007b. Introducción a la microbiología: Procariontes Dominios Bacterias y Archaea. Novena Ed. Buenos Aires. Argentina. Médica Panamericana. páginas: 330 p.

Umaña, S; Rodríguez, K; Rojas, C. 2017. ¿Funcionan realmente los microorganismos de montaña (MM) como estrategia de biofertilización? Un enfoque de ingeniería de biosistemas. *Revista de Ciencias Ambientales*, 51(2): 133–144p. Disponible en: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15359/rca.51-2.7>

Uribe, L; Badilla, S; Brenes, L; Uribe-Lorío, L. 2019. Cambios en la estructura y diversidad microbiana durante la elaboración del MM. En proceso.

Vargas-Barrantes, P; Castro-Barquero, L. 2019. Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de fósforo de andisoles de Costa Rica. *Agronomía costarricense* 43(1): 47-68 p.

Van Der Heijden, M. G; Bardgett, R. D; Van Straalen, N. M. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology letters*. 11(3): 296-310 p.

Wollum, AG. 1982. Cultural methods for soil microorganisms. In: Page, AL; Miller, R.H; Keeney, KR (eds.). *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. 781-802 p.

Xiao, C; Chi, R; He, H; Qiu, G; Wang, D; Zhang, W. 2009. Isolation of phosphate-solubilizing fungi from phosphate mines and their effect on wheat seedling growth. *Applied biochemistry and biotechnology*, 159(2): 330-342 p.

Yépez Ramírez, F. 2016. Evaluación de cinco especies de *Lactobacillus* spp., como agentes biocontrol y actividad promotora del crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum*). Universidad Politécnica de Guanajuato. Disponible en: [https://mcbaupgto.weebly.com/uploads/5/3/4/9/53493203/tesis\\_mcba\\_francisco\\_y\\_epez.pdf](https://mcbaupgto.weebly.com/uploads/5/3/4/9/53493203/tesis_mcba_francisco_y_epez.pdf)

## ANEXOS

**Anexo 1.** Medios de cultivo utilizados según el aislamiento de diferentes microorganismos.

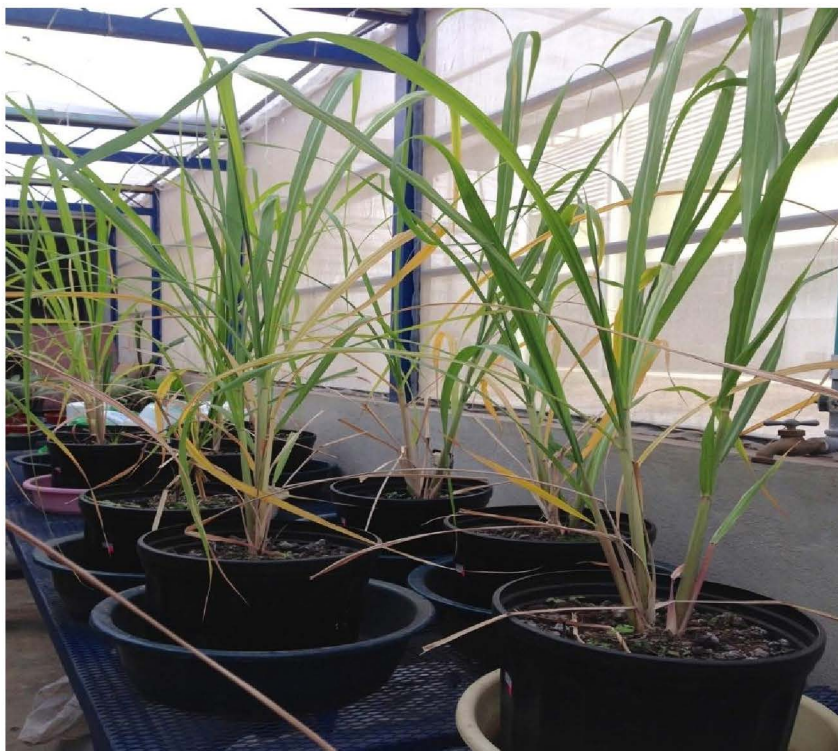
Medio de cultivo	Aislamiento de
Albuminato de sodio	Actinomicetes y bacterias
Extracto de malta	Levaduras
Agar M.R.S.	Lactobacilos
Solubilizadores de fósforo	Solubilizadores de fósforo
PDA + ac	Hongos

**Anexo 2.** Contenidos nutricionales, pH, EC y densidad presente en los diferentes biofermentos.

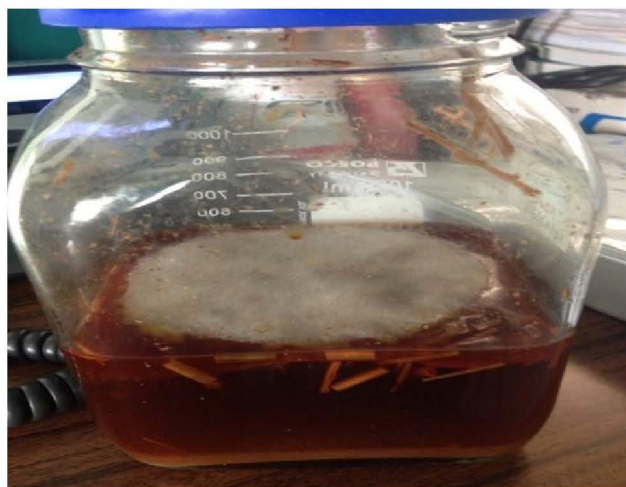
Análisis químico de biofermentos														
Biofermento	% masa						mg/kg					pH	mS/ cm	g/mL
	N	P	Ca	Mg	K	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B	H <sub>2</sub> O	CE	Dens
MM	ND	ND	0.01	ND	0.02	ND	8.1	0.15	0.3	0.8	0.7	3.9	1.1	1.0
MB	ND	ND	0.01	ND	0.01	ND	17.5	0.2	0.3	1.2	0.6	4.5	1.0	1.0
MC	ND	ND	ND	ND	0.02	ND	2.02	0.15	0.2	0.6	0.4	3.8	1.2	1.0
MA	ND	ND	0.01	ND	0.02	ND	2	ND	ND	1	ND	3.8	1.1	1.0

**Anexo 3. Poblaciones microbianas presentes en los diferentes biofermentos.**

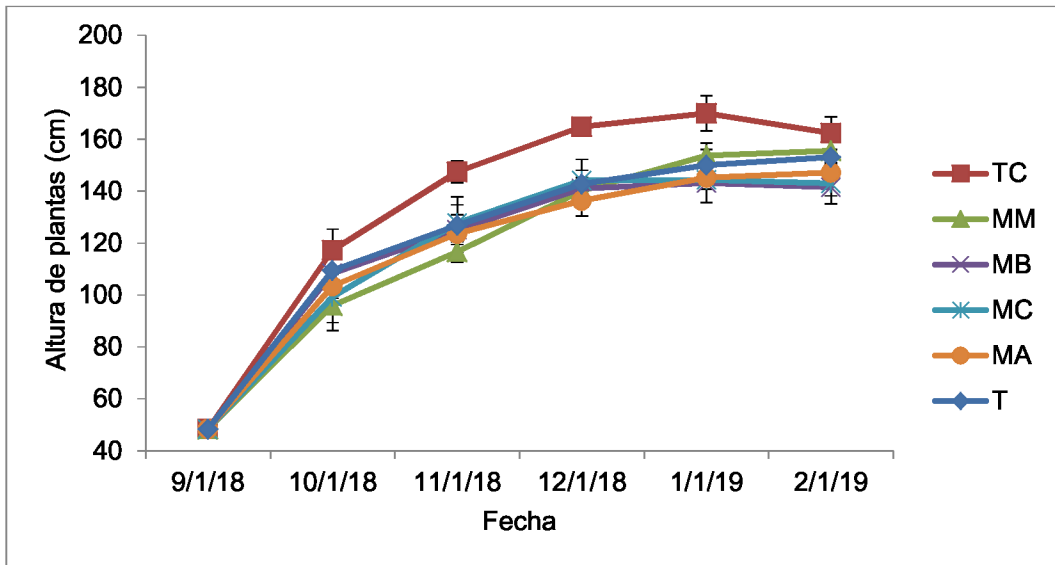
<b>Grupo funcional</b>	<b>Lotes</b>	<b>MM</b>	<b>MB</b>	<b>MC</b>	<b>MA</b>
<b>Lactobacilos</b> (log <sub>10</sub> UFC/mL muestra)	1°	6.31 ± 0.14	6.26 ± 0.29	5.91 ± 0.27	<4
	2°	7.76 B	6.56 A	7.55 AB	7.44 AB
	3°	7.08 AB	6.05 A	7.75 B	7.9 B
	4°	7.39 A	7.96 B	8.28 B	8.25 B
<b>Bacterias</b> (log <sub>10</sub> UFC/mL muestra)	1°	7.08 ± 0.13	<4	5.75 ± 0.16	6.09 ± 0.14
	2°	<2	4.92 ± 0.32	<2	<2
	3°	3.89 A	4.05 AB	5.31 C	5.27 BC
	4°	3.17 A	6.45 B	3.83 A	5.92 AB
<b>Levaduras</b> (log <sub>10</sub> UFC/mL muestra)	1°	5.25 ± 0.12	<2	5.61 ± 0.12	<2
	2°	<2	<2	<2	4.10 ± 0.61
	3°	<2	<2	5.58 ± 0.06	7.75 ± 0.11
	4°	3.78 AB	4.13 AB	2.53 A	5.87 B
<b>Solubilizadores de fósforo</b> (log <sub>10</sub> NMP/mL muestra)	1°	5.0 ± 0.69	2.60 ± 0	3.47 ± 0.12	5.87 B
	2°	2.95 A	4.7 B	3.05 A	5.04 ± 0
	3°	3.39 A	3.85 AB	5.04 B	4.23 B
	4°	<b>3.22 A</b>	<b>6.04 C</b>	<b>3.88 AB</b>	<b>5.39 BC</b>



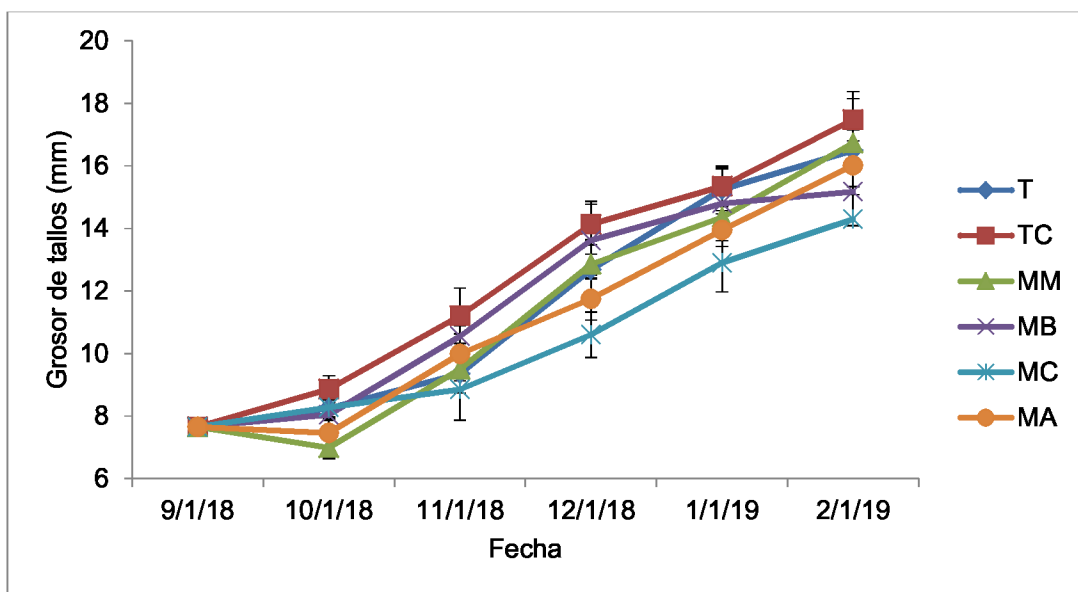
**Anexo 4.** Deficiencias nutricionales presentes en todos los tratamientos a la semana 18.



**Anexo 5.** Crecimiento de *Mucor* sp. en tratamiento MA.

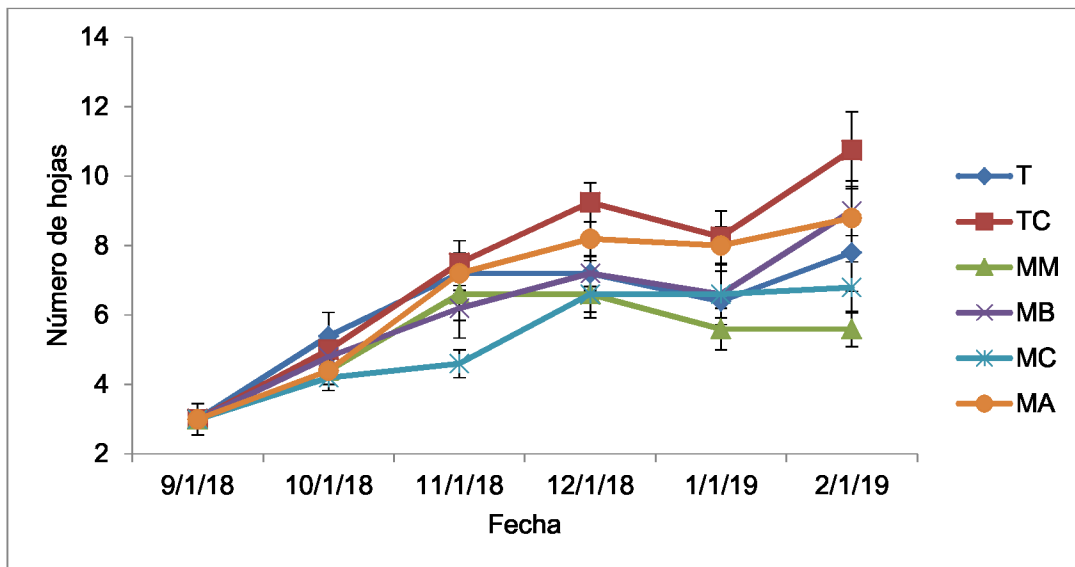


**Anexo 6.** Altura de plantas de acuerdo a tratamientos a lo largo del ensayo. Nota: N=5

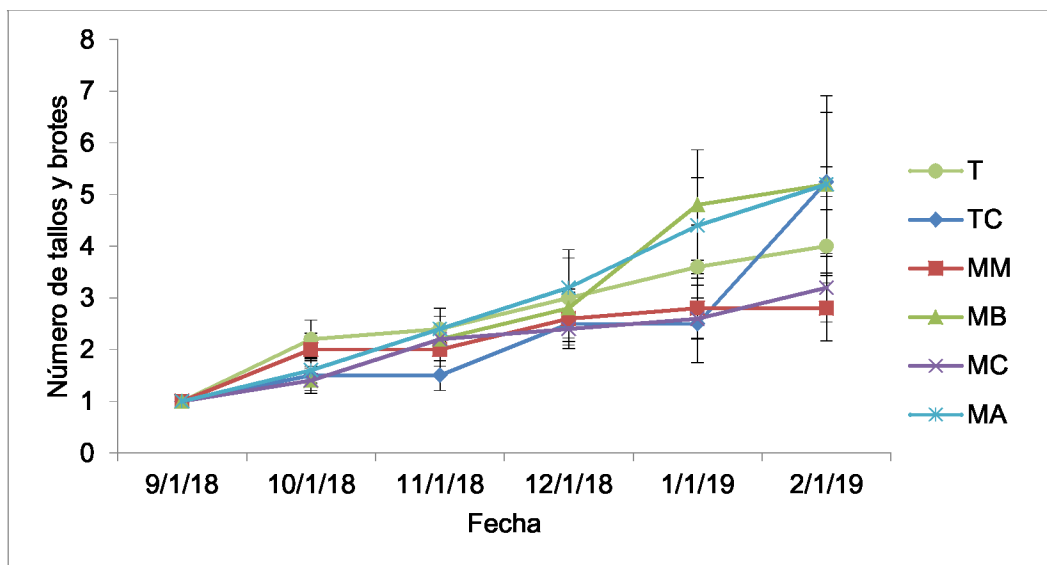


**Anexo 7.** Grosor de tallos de acuerdo a tratamientos a lo largo del ensayo. Nota: N=5





**Anexo 8.** Número de hojas de acuerdo a tratamientos a lo largo del ensayo. Nota: N=5



**Anexo 9.** Número de tallos y brotes de acuerdo a tratamientos a lo largo del ensayo.

Nota: N=5