

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas opción Microbiología

PEDECIBA - Facultad de Ciencias - Universidad de la República

**Caracterización de tres biopreparados:
Bokashi, Microorganismos Eficientes Nativos
y Supermagro, y evaluación de su efecto
en el rendimiento de los cultivos y
en la comunidad microbiana del suelo**

Daniel Dean Lassevich Esperanza

Orientadores: Natalia Bajsa y Raul Platero

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, Uruguay

2021

“El mundo se ha especializado tanto,
que se ha tornado imposible para la gente
comprender nada en su totalidad”

Masanobu Fukuoka

“Los microorganismos son los guardianes invisibles de la agricultura,
estrategas en constante competencia entre ellos,
alquimistas que convierten la materia orgánica en nutrientes,
contrabandistas capaces de transportar hacia el interior de la planta,
la magia misma de la vida”

DNT

AGRADECIMIENTOS

A mi papá que siempre me ha apoyado en todos los aspectos de mi vida procurando mi felicidad y mi desarrollo, enseñándome con el ejemplo valores y formas de transitar la vida que forjan la persona que soy. Que suerte tener un padre así.

A mi hermano y mi cuñada, por las charlas filosóficas que construyen conocimiento, y a mis sobrinos, que son una luz de alegría, con quienes disfruto compartir lo poco que tengo para enseñar.

A mi familia que ya no está, mamá, el abuelo León, la abuela Beba, la abuela Luisa y el abuelo Lasse, a quienes recuerdo y quiero cada día, agradezco lo que compartimos, y cuya ausencia me hace valorar la vida como algo único y finito que hay que aprovechar.

A mis amigos, con los que honramos la vida con cada aventura en la que nos embarcamos, como los campamentos al lejano norte, la banda del año que viene, o las atlántidas submarinas, y muchas otras que por tan alocadas mejor mantenerlas en secreto.

A mi socio, alquimista de los biopreparados, con quien empezamos con dos palas bajo el quincho de Atlántida y desde ahí ha sido un camino de ida lleno de bosta, aprendizajes, historias y proyectos.

A una persona muy especial, cuyo espíritu hace emocionar el mío, llenándome de motivación y sueños para seguir recorriendo.

A mis tutores y colegas del IIBCE, que colaboraron en todo momento para que pudiéramos realizar una linda investigación que esperamos aporte al desarrollo de los bioinsumos y la agroecología.

A los colaboradores de esta investigación, integrantes del proyecto Mas Tecnologías, colegas del laboratorio de Geobotánica de la Universidad de Ruhr, productores de bioinsumos, y especialmente a los productores de la Red de Agroecología, quienes con su honorable labor producen alimentos orgánicos y ecológicos.

A las instituciones que me apoyaron y me hicieron crecer como investigador y explorador, permitiéndome vivir experiencias que me aportaron más de lo que podía imaginar: ANII, Pedeciba, Ruhr Universitat Bochum, Thammasat University, National Institute of Rural Development and Panchayati Raj, Congreso Latinoamericano de Agroecología, Congresso Brasileiro de Agroecologia.

A Masanobu Fukuoka y Jairo Restrepo, mentores de la agroecología, agricultura regenerativa, natural, orgánica o como se le quiera llamar, que me inspiraron a sentir la conexión con la tierra y la importancia de continuar con la revolución de una brizna de paja y la rebeldía ante todo lo que considero que debe cambiar.

A todas las personas que buscan una vida feliz y sustentable, que son críticas y no les importa romper reglas que consideran erradas, que no se quedan quietas o calladas, y que eligen hacer cosas distintas o nuevas, en pos de aportar a la construcción del futuro. Esas personas me emocionan, me hacen palpar el corazón, enamorarme cada día, y me motivan a dar lo mejor de mí.

Esta tesis es parte de la maestría en ciencias biológicas opción microbiología, de PEDECIBA.

La investigación fue realizada en el Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

El análisis de secuenciación masiva se hizo como parte de una pasantía en la Ruhr Universitat Bochum, Alemania.

Parte de la investigación se enmarcó en un proyecto en el que participaron productores de la Regional Toronjil de la Red de Agroecología, junto a investigadores de Facultad de Agronomía, UdelaR y financiado por DGDR-MGAP.

La maestría se realizó con el apoyo de la beca de maestría de ANII.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Modelo de agricultura hegemónico en el mundo	3
2.2. Modelo de agricultura en Uruguay	4
2.3. La agroecología como alternativa al modelo de agricultura convencional	7
2.4. La importancia de los microorganismos y su relación con la salud del suelo	8
2.5. Los biopreparados, una herramienta para regenerar los agroecosistemas	12
2.5.1. <i>Bokashi</i>	14
2.5.2. <i>Microorganismos Eficientes Nativos</i>	18
2.5.3. <i>Supermagro</i>	23
2.6. Antecedentes y justificación del estudio de biopreparados en Uruguay	26
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivos generales	32
4.2. Objetivos específicos	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS	33
5.1. Caracterización de los biopreparados	33
5.1.1. <i>Elaboración</i>	33
5.1.2. <i>Muestreo</i>	35
5.1.3. <i>Caracterización fisicoquímica</i>	36
5.1.4. <i>Caracterización microbiológica</i>	36
5.1.4.1. Cultivables: por el método de recuento en placa	36
5.1.4.2. Independientes de cultivo: por secuenciación masiva de fragmentos del gen de ARNr 16s y de la región intergénica ITS1	37
5.1.5. <i>Caracterización de bokashis y suelo por el método de cromatografía de suelos</i>	39
5.2. Evaluación de la aplicación de biopreparados en el cultivo de papa en campo	40
5.3. Evaluación de la aplicación de biopreparados en cultivo de lechuga en condiciones controladas	41
5.4. Análisis estadísticos	42
6. RESULTADOS	44
6.1. Elaboración de los biopreparados	44
6.2. Caracterización de los biopreparados	44
6.2.1. <i>Caracterización fisicoquímica</i>	44
6.2.2. <i>Caracterización microbiológica</i>	46

6.2.2.1. Abundancia de grupos microbianos de interés en los biopreparados por métodos dependientes de cultivo	46
6.2.2.2. Estabilidad microbiológica de los Bokashis	51
6.2.2.3. Estabilidad microbiológica de los MEN	53
6.2.2.4. Estructura de la comunidad de microorganismos en los biopreparados	55
6.2.3. <i>Caracterización por cromatografía de suelos</i>	61
6.3. Efecto de la aplicación de biopreparados en el suelo y en el rendimiento de los cultivos	62
6.3.1. <i>Ensayo de cultivo de papa en campo</i>	62
6.3.1.1. Efecto de la aplicación de biopreparados en la comunidad microbiana del suelo.	62
6.3.1.2. Efecto de la aplicación de biopreparados en el rendimiento del cultivo de papa	63
6.3.2. <i>Ensayo de cultivo de lechuga en condiciones controladas</i>	64
6.3.2.1. Efecto de la aplicación de biopreparados en la comunidad microbiana del suelo	64
6.3.2.2. Efecto de la aplicación de biopreparados en las propiedades del suelo	66
6.3.2.3. Efecto de la aplicación de biopreparados en el rendimiento del cultivo de lechuga	67
7. DISCUSIÓN	69
7.1. Caracterización del abono Bokashi	69
7.1.1. <i>Caracterización fisicoquímica</i>	69
7.1.2. <i>Caracterización microbiológica</i>	70
7.1.3. <i>Caracterización por cromatografía de suelos</i>	76
7.2. Caracterización de Microorganismos Eficientes Nativos	77
7.2.1. <i>Caracterización microbiológica</i>	77
7.3. Caracterización de Supermagro	81
7.3.1. <i>Caracterización fisicoquímica</i>	81
7.3.2. <i>Caracterización microbiológica</i>	82
7.4. Ensayos de cultivo de papa a campo y de cultivo de lechuga en condiciones controladas	83
7.4.1. <i>Efecto de la aplicación de biopreparados en el suelo</i>	83
7.4.2. <i>Efecto de la aplicación de biopreparados en el rendimiento de los cultivos</i>	87
8. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES	92
9. ANEXOS	95
9.1. Recetas de los biopreparados	95
9.2. Soluciones y medios de cultivo	96
8.3. Abundancias relativas de bacterias y hongos dentro de los biopreparados cultivo	98
10. BIBLIOGRAFÍA	105

1. RESUMEN

La agricultura moderna industrializada se basa en el uso de fertilizantes y plaguicidas químicos sintéticos, cuyo uso indiscriminado repercute negativamente en los agroecosistemas y otros ecosistemas, deteriorando la calidad de suelos y cuerpos de agua, así como también afectando negativamente la salud humana y la economía de los pequeños productores. La sobreexplotación del suelo, el exceso de laboreo, en conjunto con el uso excesivo de maquinaria y agroquímicos, y la falta de estrategias de conservación e incorporación de materia orgánica, han conducido a la degradación de las propiedades físicas, químicas y biológicas que determinan la productividad de los suelos. Los biopreparados son preparados biológicos en base a restos orgánicos, sales minerales y agua, que aportan al suelo nutrientes, materia orgánica y microorganismos que mejoran la disponibilidad de nutrientes que las plantas necesitan, y pueden tener una incidencia positiva en el control de enfermedades y plagas.

El objetivo de esta investigación fue caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente tres tipos de biopreparados: Bokashi, Supermagro y Microorganismos Eficientes Nativos (MEN), y evaluar el efecto de su utilización sobre la comunidad microbiana del suelo y el rendimiento de los cultivos de papa y de lechuga.

Se caracterizó microbiológicamente los biopreparados por la técnica de recuento en placa y por secuenciación masiva de fragmentos de ADN. Los resultados obtenidos indican que los diferentes tipos de biopreparados presentan comunidades microbianas diferentes en su composición. Los ingredientes con que se fabrican pueden ser sustituidos por otros de mayor acceso por parte del productor, sin que la estructura de la comunidad microbiana varíe, siempre que los nuevos ingredientes cumplan con ciertas características específicas del ingrediente a sustituir. La estabilidad de las poblaciones de los principales grupos de interés permite el almacenamiento de los biopreparados por parte del productor por al menos 4 meses.

Con el objetivo de evaluar el efecto del agregado de biopreparados en la comunidad microbiana del suelo y en el rendimiento de los cultivos, se establecieron dos ensayos, uno en campo con cultivo de papa y otro en condiciones controladas con lechuga. Se observó que la aplicación de biopreparados incrementó la abundancia de los grupos de microorganismos de interés en el suelo y promovió el crecimiento de lechuga y papa.

Se concluye que los biopreparados son herramientas útiles para la agroecología por su aporte de nutrientes, materia orgánica y microorganismos al suelo, es importante continuar investigando con el fin de perfeccionar sus formulaciones y dosis de aplicación, y maximizar sus aportes al rendimiento de los cultivos, a la salud del suelo, y a la sustentabilidad de los agroecosistemas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Modelo de agricultura hegemónico en el mundo

La agricultura convencional se basa en el uso de fertilizantes y plaguicidas sintéticos, cuyo uso masivo repercute en los ecosistemas, deteriorando la calidad de suelos y cuerpos de agua, así como también afectando negativamente la salud humana y la economía de los pequeños productores (Gliessman, 2002). La sobreexplotación del suelo, en conjunto con el uso excesivo de maquinaria y agroquímicos, y la falta de incorporación de materia orgánica, han conducido a la degradación de las propiedades físicas, químicas y biológicas que determinan la productividad de los suelos (Viteri, 2002). Los monocultivos, de la mano con la utilización de agroquímicos, pueden provocar una marcada disminución de la diversidad de microorganismos y un aumento en el desarrollo de plagas, enfermedades y malezas al provocar un desequilibrio en el agroecosistema (Morales, 2008). Los alimentos que contienen residuos de plaguicidas deterioran la calidad y esperanza de vida de las personas, teniendo como consecuencia problemas particularmente graves en quienes viven cerca de zonas de aplicación de los mismos (Karam *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 2017).

Otro aspecto negativo de la agricultura basada en el uso masivo de agroquímicos, es la pérdida de diversidad de las variedades de cultivos tradicionales, siendo reemplazadas por las variedades comerciales modernas más adecuadas al método de agricultura convencional (Acosta, 2007), lo que repercute en una pérdida de soberanía alimentaria, tanto por la utilización de variedades estándar para simplificar el manejo, así como por el difícil acceso a alimentos libres de agroquímicos (Barg & Queirós, 2007).

En lo que respecta a lo social, la agricultura industrial no beneficia la diversificación económica ni fomenta la soberanía ni diversidad alimentaria. Los productores a escala familiar se vuelven dependientes económica y culturalmente al entrar en el modelo agroindustrial, al adquirir conocimientos ajenos que no pueden sostener con independencia, lo que resulta en endeudamientos y en desapego de las prácticas tradicionales y culturales que forman su identidad (Saldaña & Ocampo, 2006). Esta

dependencia genera también dificultades a los productores que quieran cambiar sus prácticas productivas por otras amigables con el ambiente, careciendo de herramientas para producir sin depender de insumos comerciales.

Todo esto es consecuencia de un modelo de agricultura que se ha implementado desde la segunda parte del siglo veinte y sigue vigente, profundizando cada vez más los perjuicios antes comentados.

2.2. Modelo de agricultura en Uruguay

Uruguay se ha visto afectado por las prácticas agrícolas modernas, sufriendo impactos negativos en el ambiente, en los suelos cultivables y en cuencas hidrológicas, así como impactos sociales en lo que refiere a la concentración de la tierra y su extranjerización (Gazzano & Gomez, 2015). A fines de la década de 1990, se introdujeron en Uruguay los vegetales transgénicos en la producción agraria. La incorporación de estos organismos genéticamente modificados (OGM) se enmarca dentro de un paquete tecnológico que produce un ecosistema modificado, reducido en diversidad funcional para facilitar la regulación del sistema mediante la aplicación de insumos externos (Ceroni, 2017). Este sistema se vincula a una oferta de tecnología, compuesta de semillas transgénicas resistentes a herbicidas (principalmente glifosato) y paquetes de siembra directa, maquinaria agrícola sofisticada, y aplicación de herbicidas y fertilizantes químicos altamente solubles (Achkar *et al.*, 2008). Esta situación generó una acelerada reproducción del capital en el campo, aumentando los niveles de productividad y de ganancia de la producción, lo que atrajo la instalación de empresas transnacionales (Oyhantcabal & Narbondo, 2011) y a muchos inversores extranjeros con lógicas de producción muy diferentes a la del agricultor tradicional, quien se ha visto perjudicado en el proceso. Estos inversores del agro encontraron en la agricultura una opción atractiva para realizar inversiones que podían llegar a ser seguras y que generaban rentabilidades competitivas con otros sectores de la economía (Arbeletche *et al.* 2007). Estos productores, realizan la mayor parte de los cultivos en tierras arrendadas, tercerizan la mayor parte de los servicios (siembra, tratamientos, cosecha) y actúan fundamentalmente como gerenciadore

negocio agrícola. Tienen en general una escasa vinculación con la tierra, por lo que no tienen compromiso con la sustentabilidad del sistema, realizando cultivos por 4 a 5 años para luego migrar a nuevas tierras (Bruno *et al.*, 2011). Este modelo de agricultura industrial ha crecido intensamente en los últimos años con la explosión de la soja transgénica, cuyo cultivo multiplicó entre 2000 y 2014 más de 100 veces el área sembrada y su producción (Galeano *et al.*, 2016), pasó entre esos años de 12 mil hectáreas a 1,3 millones de hectáreas. Este proceso también es evidenciado por el aumento de la importación de fertilizantes (340%) y herbicidas (874%) ocurrida entre 2002 y 2014 (DIEA-MGAP, 2016).

Este sistema de producción, asociado a la semilla de soja transgénica resistente a glifosato y a la siembra directa, bajo una alta intensificación de agricultura continua que sustituye las rotaciones tradicionales agricultura-pradera, tiene consecuencias ambientales altamente negativas, produciendo modificaciones en la estructura físico-química de los suelos de Uruguay, disminuyendo el contenido de materia orgánica y de nutrientes, además de una contaminación de las aguas superficiales y subterráneas por el uso excesivo de fertilizantes y agroquímicos (Achkar *et al.*, 2009). En nuestro país existen investigaciones con experimentos de largo plazo que abarcan varias décadas, donde se evalúan los efectos positivos en el suelo, de las rotaciones (Morón *et al.*, 2003; Bajsa, 2015) y varias experiencias prácticas documentadas (de León *et al.*, 2000; Huertas *et al.*, 2005).

Los agroquímicos, en algunos casos, son aplicados en dosis preventivas sin tener en cuenta los requerimientos del suelo ni el momento más eficiente para su aplicación. A pesar de que la siembra directa, al no requerir mover el suelo mediante el arado, trae beneficios en cuanto a la disminución de la erosión del suelo (Derpsch *et al.*, 2000), no es así en cuanto a la aplicación de los fertilizantes, que al no ser incorporados al suelo mediante la práctica del arado, quedan en la superficie y se pierden en gran parte por volatilización en el caso del nitrógeno, contaminando la atmósfera con gases de efecto invernadero, o por lavado superficial en el caso del fósforo, produciendo una eutrofización en los cuerpos de agua, promoviendo floraciones de bacterias tóxicas que afectan a animales y humanos (Kruk *et al.*, 2013). Por otra parte el excesivo uso de agroquímicos, contamina el medio físico de los

ecosistemas y tiene efectos negativos sobre los microorganismos del suelo (Altieri & Pengue, 2005), abejas y otros insectos (Ruiz-Toledo & Sánchez-Guillén, 2014), peces (Teixeira de Mello, 2007; Rapal, 2012), además de afectar la salud de las personas que aplican en el terreno estas sustancias (Palacios-Nava *et al.*, 1999; Nogar & Larsen, 2014; Riccioppo, 2011), así como la de los consumidores que entran en contacto con los alimentos contaminados (Trejos & Cedeño, 2016). Ernst *et al.* (2018), identificaron la presencia de 30 plaguicidas en peces de los ríos Uruguay y Negro, dos de los tres principales del país, sugiriendo que el uso de los suelos agrícolas está íntimamente relacionado con la contaminación por plaguicidas en peces, que pueden ser consumidos luego como alimento por las personas. En 2019 se importaron en Uruguay, 10.629 toneladas de principios activos de herbicidas, cuyo uso intensivo es causante también de la aparición de malezas resistentes (Cárcamo, 2020).

El exceso de nutrientes ha causado la eutrofización de un gran número de cursos de agua, como por ejemplo el río Santa Lucía, laguna del Sauce y laguna del Cisne (Kruk *et al.*, 2013). Entre las principales causas del deterioro de la calidad del agua se encuentran el uso de suelo para agricultura industrial, tambos y el vertimiento de aguas urbanas y desechos industriales, lo cual lleva a la contaminación con fósforo, nitrógeno y metales pesados, en algunos casos teniendo como consecuencia el crecimiento de cianobacterias y la mortandad de peces (Bonilla *et al.*, 2015). En el caso de la laguna del Cisne, de donde se abastece de agua potable a más de 30.000 personas del área de la Costa de Oro, Canelones, estas actividades resultaron en un deterioro importante de la calidad del agua y de la vida en el área, afectando a la salud de la población que reside en la zona, siendo constatados casos de diarrea, sarpullidos, ardor y tos (RAPAL, 2012). Todo esto condujo al establecimiento de medidas cautelares para la regulación de las actividades productivas y el uso del suelo en esa área, con la intención de hacer una transición hacia actividades agroecológicas amigables con el ambiente, en orden de proteger este reservorio de agua dulce (Intendencia de Canelones, 2015).

Con el objetivo de contrarrestar los efectos negativos del uso intensivo del suelo, existen reglamentaciones del Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, que exigen a los productores agropecuarios la presentación de un plan de uso y manejo responsable del suelo, que tenga en cuenta las prácticas de manejo, la secuencia de cultivos, y la erosión tolerable (MGAP, 2020). Sin embargo, estas medidas sólo apuntan a disminuir la erosión, mientras que la contaminación química y la degradación biológica de los suelos no están contempladas.

Las consecuencias negativas de este modelo de agricultura basada en los agroquímicos, hacen surgir la necesidad de encontrar un modelo distinto de producción, que no contamine ni dañe la salud de las personas. En este marco cobra importancia la agroecología, la cual incorpora ideas sobre un enfoque de la agricultura ligado al ambiente y más sensible a las necesidades sociales (Altieri, 1999).

2.3. La agroecología como alternativa al modelo de agricultura convencional

La agroecología es un enfoque multidisciplinario abocado al estudio de los sistemas agrícolas desde un punto de vista agronómico, ecológico, socioeconómico y cultural. Ésta es definida como una alternativa al modelo agroindustrial, mediante un manejo sustentable de los agroecosistemas donde se incluye la acción social colectiva (Castillo, 2002), lo que permite la viabilidad económica, social y ecológica de la agricultura familiar de pequeña y mediana escala, que no es compatible con el modelo agroindustrial (Barg & Queirós, 2007).

Los sistemas agroecológicos se caracterizan por ser biodiversos, resilientes ante cambios climáticos, energéticamente eficientes, y tienen un componente de justicia social referente a la calidad de vida de los productores, lo que abarca aspectos sociales, culturales y económicos. Además los sistemas agroecológicos se enfocan siempre en el camino de alcanzar la soberanía alimentaria. Estos se enfocan en la diversidad para promover interacciones biológicas benéficas entre las distintas partes del agroecosistema, logrando así regenerar los suelos y mantener la productividad (Altieri, 1999). Para alcanzar las características mencionadas, la agroecología define una serie de principios básicos que

incluyen: el reciclaje de nutrientes y energía, la sustitución de insumos externos, el incremento de la materia orgánica y la actividad biológica del suelo, la diversificación de las especies de plantas y los recursos genéticos de los agroecosistemas, la integración de los cultivos con los animales, y la optimización del sistema agrícola en su totalidad, en lugar de los rendimientos aislados de las distintas especies (Altieri & Toledo, 2011).

La agroecología entonces, busca desarrollar agroecosistemas con una dependencia mínima de agroquímicos y energía externa, de modo de generar sistemas agrícolas complejos en los cuales las interacciones ecológicas y los sinergismos entre sus componentes biológicos permitan la sustentabilidad de la producción y del agroecosistema (Altieri, 2009). Esto se puede lograr optimizando el uso de insumos locales, en especial en la misma chacra, tales como plantas, animales, y agua, logrando así reciclar materia orgánica (Altieri, 2009). Por ejemplo produciendo biopreparados para incrementar la fertilidad y salud del suelo, mediante la incorporación de lo que se conoce como las “3M”: materia orgánica, minerales y microorganismos.

2.4. La importancia de los microorganismos y su relación con la salud del suelo

Los microorganismos constituyen un grupo de organismos que abarca bacterias, arqueobacterias, hongos, algas, protozoos y virus. Estos han surgido muy tempranamente en la evolución adaptándose a las diversas condiciones ambientales del planeta, resultando en un grupo con una gran diversidad (Frioni, 2006). La diversidad microbiana se evidencia de muchas maneras, como por ejemplo, variaciones en la morfología, en las estrategias metabólicas, en la movilidad, en los mecanismos de división celular, en la patogenicidad, en la adaptación a condiciones ambientales extremas, y en la filogenia. Los microorganismos están implicados en los ciclos biogeoquímicos de la vasta mayoría de elementos de nuestro planeta y realizan muchos procesos químicos que son necesarios para otros organismos, es por esto que la vida en nuestro planeta depende fundamentalmente de la actividad de los organismos (Brock *et al.*, 2003). La diversidad de los microorganismos así como sus

interrelaciones con otros microorganismos y con el ambiente, los convierten en herramientas versátiles para resolver los más diversos problemas en distintos campos de la ciencia y de la vida. Es por esto que los microorganismos son utilizados en tecnología médica, salud humana y animal, procesamiento de alimentos, seguridad y calidad alimentaria, ingeniería genética, protección del medio ambiente, en agricultura, tratamiento de residuos, y distintas aplicaciones biotecnológicas (Higa y Parr, 1994).

En los agroecosistemas, los microorganismos del suelo juegan un papel fundamental en los procesos y dinámicas del ecosistema del suelo, haciendo posible las múltiples funciones necesarias para la sustentabilidad del mismo (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2016; Wagg *et al.*, 2019).

Desde el punto de vista de las ciencias agrícolas, los microorganismos pueden clasificarse como dañinos, benéficos o neutros para los cultivos vegetales. Los microorganismos benéficos son aquellos que pueden cumplir funciones como fijar nitrógeno atmosférico, descomponer desechos y residuos orgánicos, metabolizar plaguicidas para eliminarlos del suelo, suprimir las enfermedades de las plantas y patógenos que habitan el suelo, producir compuestos como vitaminas, hormonas y enzimas que estimulan el crecimiento de las plantas, acelerar el ciclo de los nutrientes en el suelo, entre otras (Frioni, 2006; Cerrato y Alarcón, 2001). Por su parte los microorganismos dañinos son los que pueden inducir enfermedades de las plantas, estimular el desarrollo de los patógenos en el suelo, inmovilizar nutrientes y producir sustancias tóxicas que pueden afectar de manera negativa el crecimiento y la salud de las plantas, así como la calidad de la cosecha (Higa y Parr, 1994).

Cuando se quieren estudiar los microorganismos en el suelo es importante analizar la diversidad y la abundancia de los mismos. La abundancia puede ser muy variable a pequeñas escalas de tiempo según el clima y distintas prácticas de manejo aplicadas en un suelo, sin embargo la diversidad puede colaborar con la comprensión de las distintas funciones que hay en un suelo (Venkateswarlu y Srinivasarao, 2005).

Se estima que la cantidad de especies en un gramo de suelo es del orden de 10^4 (Torsvik *et al.*, 2002) sin embargo, se estima que solamente entre el 1 y el 5% de las especies microbianas son cultivables por los métodos tradicionales (Cadena-Zamudio *et al.*, 2016). Utilizando distintos medios de cultivo selectivos se puede estimar el tamaño poblacional de distintos grupos de microorganismos del suelo, así como realizar aislamientos de especies y cepas o buscar microorganismos que cumplan distintas funciones benéficas como solubilizar fósforo, fijar nitrógeno, etc.

Dentro de la gran diversidad de microorganismos de interés agrícola, esta tesis se centra en el estudio de grupos que se han encontrado en otros biopreparados y que resultan de interés por las funciones benéficas que pueden tener en el suelo. Dentro de estos grupos de interés se pueden encontrar:

- Bacterias ácido lácticas: producen ácido láctico a partir de azúcares y otros carbohidratos presentes en el medio (Hussain *et al.* 1999). El ácido láctico es un compuesto antimicrobiano, suprime microorganismos patógenos (Lavermicocca *et al.*, 2000; Makras *et al.*, 2006) y mejora la descomposición de la materia orgánica (Higa y Kinjo 1991). Estas bacterias promueven la fermentación y descomposición de materiales como la lignina y celulosa (Gao *et al.* 2008; Valerio *et al.* 2008).
- Actinobacterias: son bacterias morfológicamente similar a las hifas de los hongos. Tienen la capacidad de producir una enorme variedad de sustancias antimicrobianas (Doubou *et al.*, 2001; Franco-Correa, 2009). Estas sustancias pueden suprimir hongos y bacterias dañinas. De esta manera colaboran con las características supresoras de enfermedades en los suelos (Condor *et al.*, 2007). Además de la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica, también son capaces de producir diversas enzimas extracelulares como lipasas, fosfolipasas, nucleasas, proteasas, amilasas, quitinasas, lignina-hidrolasas, celulasas, que permiten descomponer polímeros complejos, por lo que son excelentes descomponedores de materia orgánica, interviniendo en el ciclaje de los nutrientes (Chaudhary *et al.*, 2013).

- Bacterias fototróficas: Estas bacterias son un grupo de microorganismos autótrofos facultativos y producen sustancias útiles a partir de compuestos secretados por las raíces de plantas y materia orgánica, utilizando la luz como fuente de energía (Kim *et al.* 2004). Las sustancias secretadas por estas bacterias incluyen aminoácidos y polisacáridos (Kim y Lee 2000).
- Levaduras (hongos unicelulares): Las levaduras sintetizan sustancias útiles, necesarias para el crecimiento de las plantas a partir de aminoácidos y azúcares secretados por bacterias fototróficas, materia orgánica y raíces de plantas (Higa 2000). Las sustancias como las hormonas y enzimas producidas por las levaduras promueven la división activa de células y raíces. Las secreciones también son sustratos útiles para otros microorganismos como las bacterias del ácido láctico y actinobacterias (Hussain *et al.* 2002).
- Hongos filamentosos: los hongos ocupan un rol fundamental en la descomposición de la materia orgánica del suelo. Pueden descomponer polímeros complejos como la lignina (Ortiz, 2009). Además, producen compuestos que inhiben la proliferación de microorganismos patógenos (Higa y Parr, 1994).

En forma paralela, los métodos de microbiología molecular permiten detectar la gran mayoría de los microorganismos en una muestra, incluyendo los que pueden ser cultivados y los que no. Esto permite estudiar la estructura de la comunidad microbiana de un suelo e identificar la presencia de microorganismos específicos. Algunos de estos métodos se basan en el análisis de secuencias de ADN, que por sus características permiten la identificación de individuos a distintos niveles taxonómicos, pudiendo en algunos casos llegar a identificarlos a nivel de especie (Kirk *et al.*, 2004).

Hay estudios que demuestran que la diversidad microbiana promueve la multifuncionalidad de los ecosistemas terrestres (Bardgett & Van Der Putten, 2014; Delgado-Baquerizo *et al.*, 2016) y que las prácticas agrícolas tienen consecuencias en la estructuración de la diversidad, pudiéndola hacer más o menos rica en especies o en diversidad de funciones

por parte de los microorganismos (de Vries *et al.*, 2012). Algunas prácticas que disminuyen la diversidad son el arado (Kennedy, 1999), la aplicación de plaguicidas y herbicidas (Pampulha y Oliveira, 2006), y por otro lado algunas prácticas que la incrementan son las rotaciones de los cultivos (Bajsa, 2015) y la aplicación de biopreparados (Dong *et al.*, 2019).

2.5. Los biopreparados, una herramienta para regenerar los agroecosistemas

Entre las herramientas que provee la agroecología, los biopreparados son de las más importantes, ya que permiten el ingreso de materia orgánica, nutrientes y microorganismos al suelo, mejorando su estructura y su fertilidad.

Los biopreparados se basan en sustancias que contienen organismos vivos y se utilizan en la inoculación de semillas o en aplicaciones directas al suelo y plantas, con el objetivo de mejorar la fertilidad del suelo y acelerar el crecimiento de los cultivos como resultado del incremento de la densidad poblacional microbiana en las proximidades del sistema radical (Hamdi, 1985).

Martínez (2002), plantea que los biopreparados incluyen a todos los recursos biológicos, que a través de la intervención humana estimulan el desarrollo de los cultivos agrícolas mediante transformaciones por parte de los microorganismos, de elementos o compuestos que se encuentran en formas no aprovechables, a formas que puedan ser utilizadas por la planta.

Restrepo (2007), expresa que los biopreparados sirven para nutrir, recuperar y reactivar la vida del suelo, aumentan la fertilidad del suelo y la salud de las plantas, protegiendo a los cultivos contra el ataque de hongos e insectos. De esta manera sirven para sustituir los fertilizantes químicos altamente solubles de la industria, los cuales además de representar un gasto sustantivo para los productores, pueden resultar contaminantes y tóxicos. Explica que al fortalecer el equilibrio nutricional, esto tiene consecuencias en el sistema de defensa de las plantas, este equilibrio se fortalece a través de los ácidos orgánicos, las hormonas de crecimiento, vitaminas, minerales, enzimas y co-enzimas, carbohidratos y aminoácidos. Esto está relacionado con la teoría de la trofobiosis que relaciona la nutrición de un cultivo

con la incidencia de enfermedades y plagas. Esta teoría plantea que una planta cultivada será atacada por un organismo patógeno cuando existe un desequilibrio nutricional que causa un exceso de nutrientes en la savia de la planta de la cual los insectos pueden alimentarse. Las defensas de los vegetales están determinadas entre otras cosas, por una nutrición equilibrada, la cual impide la acumulación de estas sustancias nutritivas en la savia, a diferencia de lo que ocurre cuando se aplican fertilizantes químicos (Chaboussou, 1986).

Los biopreparados, a pesar de contener cantidades menores de nutrientes en comparación con los fertilizantes sintéticos, mantienen una disponibilidad más constante de los elementos durante el desarrollo del cultivo, repercutiendo en una nutrición más equilibrada. Además pueden contener sustancias húmicas y fúlvicas, las cuales mejoran la estructura del suelo, y modifican propiedades como el pH, la capacidad de intercambio catiónico, la disponibilidad de nutrientes e incrementan la población microbiana, propiciando el desarrollo del cultivo (Trinidad, 2013).

Los procesos metabólicos como la respiración aerobia o la fermentación por parte de los microorganismos presentes en estas preparaciones, degradan los restos orgánicos y producen moléculas capaces de ser asimiladas por las plantas (BID, 2009). La incorporación de estas preparaciones al suelo aumenta el tamaño de las poblaciones microbianas y su diversidad. Esto permite mejorar la salud tanto del suelo como de los cultivos mediante la competencia con microorganismos fitopatógenos y la secreción de sustancias beneficiosas para los cultivos (Van Elsas *et al.*, 2002). Por su aporte en micronutrientes, a diferencia de los fertilizantes químicos que en general aportan sólo los macronutrientes, el producto final cosechado será más rico en minerales y vitaminas (Restrepo, 2007; Rembalkowska *et al.*, 2021).

Además de su aporte a la salud del suelo, los biopreparados aportan a la autonomía de los productores, que pueden utilizar recursos generados en su propia chacra tales como estiércol, rastrojo, ceniza, etc., independizándose de la adquisición de insumos en el mercado. Los biopreparados además son adaptables a la realidad de cada productor y no

son insumos estandarizados que buscan que el productor se adapte a ellos. Por lo que se puede decir que la aplicación de biopreparados orgánicos puede ayudar a la independencia, y reforzar vínculos entre agricultores, un mayor apego a la actividad que se desarrolla, y en consecuencia, un mayor cuidado del ambiente (Restrepo, 2007).

Entre los biopreparados más difundidos en Latinoamérica y en Uruguay se encuentran: Bokashi, Supermagro y Microorganismos Eficientes Nativos, los cuales fueron estudiados en este trabajo.

2.5.1. Bokashi

El Bokashi, es un biopreparado sólido hecho a base de desechos vegetales (por ej. cáscara y salvado de arroz y carbón molido), excretas animales (estiércol de vaca o de otros animales), melaza, levadura, tierra y agua, se puede agregar polvo de rocas, carbonato de calcio, ceniza de fogón, entre otros ingredientes locales. Es utilizado para aportar gradualmente al suelo nutrientes solubles rápidamente disponibles para su absorción por las raíces, a partir de moléculas complejas de liberación lenta, materia orgánica que mejora las características fisicoquímicas del sustrato, y una comunidad microbiana que descompone la materia orgánica y puede producir fitohormonas bioestimulantes del crecimiento vegetal y controlar la proliferación de microorganismos patógenos (Shintani, 2000). Este tipo de abono orgánico es de bajo costo ya que existe la posibilidad de utilizar recursos locales, y sustituir ingredientes como por ejemplo la cascarilla de arroz por aserrín u otros materiales secos (Piñeiro, 2009).

El bokashi se produce mediante un proceso de descomposición aeróbica de los residuos orgánicos, a temperaturas controladas, llevada adelante por las poblaciones de microorganismos existentes en los propios residuos. En condiciones favorables se produce un material parcialmente estable, de lenta descomposición, mediante el cual se incorporan al suelo materia orgánica y nutrientes esenciales como: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, manganeso, zinc, cobre y boro, mejorando sus condiciones físicas y químicas (Restrepo, 1996). La incorporación de bokashi es una buena alternativa para

restablecer el equilibrio en los suelos, al ser un producto que aporta una importante actividad biológica, como son las actinobacterias, las levaduras, las bacterias ácido lácticas, y una amplia diversidad de hongos y bacterias que cumplen diversas funciones en la ecología del suelo (Restrepo, 2007).

Restrepo (2007) señala algunas ventajas prácticas de este tipo de abonos: no se forman gases tóxicos ni malos olores, el volumen producido es adaptable a pequeñas cantidades, se desactivan los agentes patógenos por las altas temperaturas alcanzadas, la elaboración es rápida (15 a 30 días), tiene bajo costo de producción, lo que colabora con la independencia económica de los productores.

En el proceso de elaboración del bokashi hay dos etapas bien definidas: La primera etapa es la estabilización, en la que la temperatura alcanza hasta 70°C, debido a una alta actividad microbiana. Estas temperaturas comienzan a bajar gradualmente debido al agotamiento de las fuentes energéticas. La segunda etapa es la maduración, en la cual la degradación de la materia orgánica con mayor contenido de carbono tiene lugar, hasta llegar a un estado ideal para su utilización (Restrepo, 2007).

Restrepo (2007) señala los factores que afectan el proceso de producción del bokashi:

- Temperatura: depende del incremento de la actividad microbiológica del abono, que comienza después de la etapa de la mezcla de todos los ingredientes. Aproximadamente 14 horas después de haberlo preparado, el abono debe presentar temperaturas que pueden superar los 50 °C, lo que es una buena señal para continuar con las demás etapas del proceso. El incremento de temperatura debe controlarse con el mezclado para que no afecte negativamente a los microorganismos.
- pH: la elaboración de este tipo de abono requiere que el pH se mantenga entre 6 y 7,5, ya que los valores extremos podrían inhibir la actividad microbiológica necesaria para que ocurra la degradación de los materiales. Este se puede incrementar añadiendo carbonato de calcio o ceniza, o disminuir añadiendo estiércol.

- Humedad: la humedad óptima para lograr la máxima eficiencia del proceso de la producción del abono oscila entre el 50% y el 60%. Tanto la falta de humedad como su exceso son perjudiciales para la actividad microbiana y la obtención final de un buen abono orgánico fermentado. Cuando la humedad es inferior al 35%, se enlentece la descomposición aeróbica de los materiales orgánicos que forman parte del preparado. La forma más práctica de ir probando que la humedad está en el rango ideal es por medio de la prueba del puñado o puño, la cual consiste en tomar con la mano una cantidad de la mezcla y apretarla, de la cual no deberán salir gotas de agua entre los dedos y se deberá formar un terrón quebradizo en la mano.
- Aireación: la presencia de oxígeno o una buena aireación es necesaria para que no existan limitaciones en el proceso aeróbico de producción del abono. Por esto es importante la mezcla frecuente de los ingredientes mediante el volteo de la pila de bokashi. Esto además contribuye a mantener la temperatura en el rango óptimo.
- Tamaño de las partículas de los ingredientes: la reducción del tamaño de las partículas de los componentes del abono puede presentar la ventaja de aumentar la superficie para su descomposición microbiana. Sin embargo, el exceso de partículas muy pequeñas puede llevar fácilmente a una compactación que favorece el desarrollo de un proceso anaeróbico.
- Relación carbono-nitrógeno: la relación teórica e ideal para la fabricación de un buen abono de rápida fermentación se calcula que es de 15:1 a 30:1. Las relaciones menores pueden resultar en pérdidas considerables de nitrógeno por mineralización y posterior volatilización; por otro lado, relaciones mayores resultan en descomposición más lenta.

Restrepo (2007) explica las características de los ingredientes típicos que se utilizan para la fabricación de este abono orgánico:

- Carbón vegetal: mejora las características físicas del suelo, como su estructura, lo que facilita una mejor distribución de las raíces, la aireación y la absorción de humedad y calor. Su alto grado de porosidad beneficia la actividad microbiana, al mismo tiempo

que tiene la capacidad de retener, filtrar y liberar gradualmente nutrientes útiles a las plantas, disminuyendo la pérdida y el lavado de éstos en el suelo.

- Estiércol de vaca, ave, caballo, u oveja: es la principal fuente de nitrógeno en la elaboración de los abonos orgánicos. Su aporte básico consiste en mejorar las características vitales y la fertilidad de la tierra con nutrientes como nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, manganeso, zinc, cobre y boro, entre otros elementos. Dependiendo de su origen, puede aportar inóculo microbiano y otros materiales orgánicos en mayor o menor cantidad, los cuales mejorarán las condiciones biológicas, químicas y físicas del terreno donde se aplicarán los abonos.
- Cascarilla de arroz: este ingrediente mejora las características físicas de la tierra y de los abonos orgánicos, facilitando la aireación, la absorción de humedad y el filtrado de nutrientes. También beneficia la actividad microbiológica del suelo, al mismo tiempo que estimula el desarrollo uniforme y abundante del sistema radical de las plantas así como de sus interacciones con los microorganismos de la rizosfera. Es además, una fuente rica en silicio, lo que favorece a los vegetales, pues los hace más resistentes a los ataques de insectos y enfermedades. En la forma de cascarilla carbonizada, aporta principalmente silicio, fósforo y potasio.
- Salvado o afrechillo de arroz: es uno de los ingredientes que favorecen, en alto grado, la fermentación de los abonos, incrementada por el aporte de vitaminas presentes en el salvado de arroz.
- Melaza de caña: debido a su alto contenido en azúcares, es la principal fuente energética para el proceso de descomposición de los abonos orgánicos por parte de los microorganismos. Favorece la actividad microbiológica; es rica en potasio, calcio, fósforo y magnesio; y contiene micronutrientes, principalmente boro, zinc, manganeso y hierro.
- Levadura o mantillo de monte: estos ingredientes constituyen la principal fuente de inoculación con microorganismos para la elaboración de los abonos orgánicos, otra fuente de inóculo es el estiércol de rumiantes y la tierra.

- Tierra : en muchos casos, ocupa hasta una tercera parte del volumen total del abono que se desea elaborar. Tiene la función de dar una mayor homogeneidad física al abono y distribuir su humedad, es medio propicio para el desarrollo de la actividad microbiológica de los abonos. Además funciona como esponja, al tener la capacidad de retener, filtrar y liberar gradualmente nutrientes a las plantas de acuerdo con las necesidades de éstas. Dependiendo de su origen, puede aportar variados tipos de arcillas, microorganismos y otros elementos minerales indispensables para el desarrollo de los vegetales.
- Carbonato de calcio o ceniza: su función principal es regular el pH durante el proceso de fermentación. La ceniza además provee minerales.
- Ceniza o polvo de rocas: aportan elementos minerales, llamados micronutrientes, que en pequeñas cantidades son esenciales para el desarrollo de la planta, lo que repercute en la nutrición de los cultivos y un mejor vigor para resistir el ataque de plagas y enfermedades.
- Agua: tiene la finalidad de homogeneizar la humedad de todos los ingredientes que componen el abono. Propicia las condiciones ideales para el buen desarrollo de la actividad y reproducción microbiológica.

Este biopreparado es muy utilizado en Latinoamérica por campesinos y se han obtenido buenos resultados en el cultivo de cebolla y pimiento (Alvarez-Solis *et al.*, 2016), rábano y cilantro (Morales & Swietenia. 2014), maní (Pei-Sheng & Hui-Lian, 2002), papa (Bautista, 2015) y tomate (Montenegro & Martinez, 2012). Se lo considera un conveniente sustituto de los fertilizantes químicos en la producción de avena para forraje, logrando mejores rendimientos económicos en esta actividad tan extendida en el territorio uruguayo (Chalán, 2012).

2.5.2. Microorganismos Eficientes Nativos (MEN)

Microorganismos Eficientes Nativos (MEN), se le llama a un tipo de biopreparado en el cual se selecciona y reproduce un consorcio de microorganismos benéficos del suelo mediante un proceso de fermentación bajo condiciones de anaerobiosis.

El concepto de microorganismos eficientes fue desarrollado por Teruo Higa (1991) y consiste en cultivar microorganismos naturales que habitan el suelo para aplicar como inoculantes y así aumentar la diversidad microbiana del agroecosistema. Entre los grupos seleccionados en el proceso de fabricación están las bacterias ácido lácticas, levaduras y hongos filamentosos, actinobacterias y bacterias fototróficas, los cuales pueden coexistir en medio líquido.

Cabe mencionar que cuando se habla de microorganismos eficientes (en inglés Efficient Microorganisms - EM) a veces se hace referencia al producto comercial EM de la empresa EMRO, fundada por Teruo Higa, que ofrece un concentrado a partir de cepas de microorganismos de Japón, como inóculo para realizar la “activación” o reproducción en medio líquido. Cuando nos referimos a MEN, nos estamos refiriendo a un biopreparado que se basa en la selección y reproducción de microorganismos nativos del suelo. También se llama a esta preparación Microorganismos de Montaña o de Monte.

Los ingredientes necesarios para su producción son: tierra y mantillo de los primeros 10 centímetros de suelo de un bosque (preferentemente nativo) o un suelo con una alta diversidad microbiológica, melaza para aportar energía para el desarrollo de los microorganismos, salvado de arroz como medio físico de crecimiento y aporte de carbohidratos para energía, opcionalmente se le agrega fosfito artesanal, harina de rocas, o ceniza como aporte extra de minerales. Primero se realiza un biopreparado sólido en base a salvado de arroz, el inóculo de mantillo de bosque que contiene los microorganismos nativos del suelo, melaza y se le puede agregar leche y MEN líquidos o sólidos de una preparación anterior. Eso se lo deja reposar en anaerobiosis durante al menos 3 semanas. Luego se procede a elaborar el biopreparado líquido, en donde se colocan en anaerobiosis los MEN sólidos, melaza, leche, opcionalmente levadura, ceniza, polvo de roca, fosfitos (Fossati, 2010).

Los MEN en muchos casos son de producción artesanal a bajo costo, sin necesidad de medios de crecimiento específicos y se busca aprovechar, de una forma conveniente, la diversidad microbiana de las comunidades de microorganismos nativos provenientes de

suelos ricos en biodiversidad, como son los bosques cercanos a las unidades agrícolas de producción. Estos inóculos, al partir de bosques cercanos, pueden resultar en un mayor éxito en los efectos deseados ya que los microorganismos estarán mejor adaptados a las condiciones ambientales del área (Castro-Barquero *et al.*, 2015).

Los MEN tienen efectos benéficos en el suelo y en las plantas, así como también son utilizados con otros fines en alimentación animal, recuperación de ecosistemas contaminados, limpieza y tratamiento de aguas residuales. Sus beneficios conocidos han sido documentados en distintas publicaciones científicas:

- Aceleración del proceso de descomposición de la materia orgánica: los compost tratados con microorganismos eficientes nativos presentan una tasa de descomposición más rápida, mayor actividad microbiana y mayor cantidad de nutrientes, lográndose mayor eficiencia en el proceso de compostaje, en comparación con compost no tratados con este biopreparado (Saravanan *et al.* 2013; Ab Muttalib *et al.*, 2016; Machaca, 2017; Montero, 2019).
- Promoción del crecimiento vegetal: múltiples investigaciones demuestran que la aplicación de este biopreparado resulta en mejores rendimientos en la producción de hortalizas, cereales y frutales. Sin embargo, normalmente no se determinan los mecanismos de este beneficio. Entre las posibles explicaciones se encuentra el aumento de nutrientes disponibles relacionados a un aumento de los microorganismos en el suelo al aplicarse MEN; secreción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal por parte de los microorganismos, competencia indirecta con patógenos que pueden afectar el desarrollo de las plantas, entre otras. Javaid y Bajwa (2011) demostraron que la aplicación de MEN en conjunto con estiércol o fertilizantes sintéticos incrementó el rendimiento del frijol mungo en un 24% y un 46%, respectivamente. Se han observado aumentos de los rendimientos y de la sanidad en los cultivos cuando se aplica en tomate (Viciado *et al.*, 2015), remolacha (Martinez-Manzo, 2016), espinaca (Facio *et al.*, 2017), cebolla y maíz (Peña *et al.*, 2016) y lechuga (Guamán, 2017). La aplicación de microorganismos eficientes estimula la germinación de semillas y el crecimiento

temprano de cultivos alimentarios (Sangakkara y Higa, 1994) y puede crear un ambiente favorable en la rizósfera, que mejora el crecimiento de la planta (Sangakkara ,1996).

- Aumento en la diversidad de microorganismos benéficos del suelo: su aplicación en las plantas y en el suelo incrementa el número de actinobacterias, bacterias acidolácticas, levaduras y hongos filamentosos (Campo-Martinez *et al.*, 2014), *Enterobacter spp.*, *Trichoderma spp.*, *Penicillium spp.*, lo que resulta en un aumento en la biodiversidad microbiológica del suelo, lo cual impacta positivamente en la sanidad y rendimiento de los cultivos (Higa y Wididana, 1991; Tokeshi *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2011). Los MEN pueden aumentar significativamente ciertas actividades biológicas del suelo como la respiración microbiana, lo que se ha documentado en cultivos de soja, tomate y caña de azúcar (Barquero *et al.*, 2015; Sigstad *et al.*, 2013).
- Control de hongos y bacterias patógenos: hay distintos estudios que evidencian los beneficios de la utilización de microorganismos benéficos para inhibir bacterias y hongos patógenos. Castro-Barquero *et al.* (2015), evidenciaron que el crecimiento micelial de *Pythium spp.*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium spp.* en placas de Petri con una inoculación de microorganismos eficientes diluidos al 5% en agua, se vio inhibido en un 50% en comparación con el control sin agregado de microorganismos eficientes; mientras que el hongo *Aspergillus spp.* no mostró diferencias significativas en su crecimiento con o sin microorganismos eficientes añadidos. Aunque se logró inhibir los hongos patógenos en condiciones de laboratorio, las concentraciones aplicadas a gran escala en campo son mucho menores, siendo muy difícil alcanzar esas concentraciones en la práctica. Chavez (2012), concluyó que los MEN fueron determinantes para controlar *Pythium spp.* y *Fusarium spp.*, en un cultivo de lechuga a campo. De manera similar, Olivera *et al.* (2014) reportaron la capacidad biofungicida y metabólica de MEN sobre *Alternaria solani*, y Tokeshi y Chagas (1997) registraron resultados en el control del hongo *Phytophthora cinnamomi*. García (2016), estudió el efecto de biopreparados de MEN sobre la infección por *Rhizoctonia solani* y *Fusarium spp.* en el cultivo de frijol, obteniendo resultados de una afectación menor a 5% en los tratamientos con MEN

frente al 20% del testigo. El control de patógenos fúngicos podría ser atribuido a la síntesis de ácido láctico por parte de las bacterias acidolácticas, el cual tiene acción antimicrobiana (Higa y Kinjo 1991; Higa 2000).

- Control de insectos: hay escasa investigación acerca de la eficacia del control de insectos mediante la aplicación de MEN y sobre el mecanismo por el cual podría darse este efecto. Ramirez (2018), observó que aplicar 40 L/ha de MEN permitió controlar el 83,8% de las chinches presentes en un cultivo de arroz. Olivera, *et al.* (2014), observaron que la aplicación de MEN para controlar la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en tomate y en melón, causó la mortandad de las larvas en un 92,2% y 65,6 %, respectivamente. Milian, *et al.* (2014), evaluaron el efecto de MEN sobre los rendimientos del cultivo del arroz y su acción sobre las plagas que lo afectan; observaron que la parcela testigo presentó a los 21 días, un índice de infestación de 0,51 larvas de Picudito acuático (*Lissorhoptrus brevis*) por planta, mientras en el tratamiento con MEN, este índice fue de 0,03 larvas/planta.
- Tratamiento de aguas residuales: las aguas residuales de industrias, tambos, y cloacas, pueden contener posibles patógenos humanos. Además el exceso de nutrientes presentes en las aguas residuales pueden eutrofizar los cursos de agua y promover la floración de cianobacterias y algas en ríos y lagunas. Según Rashid y West (2007), la aplicación de MEN redujo significativamente el nitrógeno amoniacal, el fósforo total, los sólidos suspendidos totales y la demanda biológica de oxígeno después de 3 meses en un efluente de un tambo. En Malasia, se aplicaron bolas de arcilla con microorganismos eficientes en lagunas y ríos contaminados con buenos resultados en la disminución del crecimiento de algas, la supresión de patógenos y la eliminación de malos olores (Zakaria *et al.*, 2010). En Uruguay hay experiencias de la utilización de los MEN en la reducción de malos olores y de coliformes en pozos sépticos y hay una empresa sanitaria que los utiliza para evitar el mal olor en hogares (Perez y Mesa, 2018).
- Alimentación animal: la adición de probióticos en la alimentación de animales de granja es una práctica común. La presencia de bacterias acidolácticas y levaduras en los MEN

ha demostrado ser de utilidad para mejorar distintos aspectos de la producción animal. Castillo y Urbina (2014) demostraron que la utilización de MEN en formato sólido y líquido mejoraron el rendimiento productivo de pollos de engorde. Cadena (2019) observó efectos positivos en la salud y asimilación de los nutrientes, así como un aumento en la ganancia de peso semanal en lechones de pre cría.

Los MEN no deben ser considerados un sustituto de otros manejos, pero sí un insumo más para optimizar el resto de los manejos como son las rotaciones de cultivos, el uso de enmiendas orgánicas, el arado mínimo, el reciclaje de residuos orgánicos y el control integrado de plagas (Higa y Wididana, 1991b).

2.5.3. Supermagro

El supermagro es un biofertilizante líquido completo rico en macro y micronutrientes y otros metabolitos. Es elaborado mediante un proceso de descomposición de la materia orgánica, a través de fermentación en medio líquido. Este biofertilizante se elabora a partir de estiércol, sales minerales, leche, melaza y otros aditivos naturales. Aporta una nutrición completa ya que contiene: nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, magnesio, manganeso, zinc, molibdeno, cobre, boro y hierro, que son metabolizados por un consorcio de microorganismos, que mejora la absorción de nutrientes por el cultivo (Restrepo, 2007).

El supermagro se utiliza como abono foliar complementario a la fertilización de base orgánica del suelo. Brinda micronutrientes, en una forma orgánica (quelatos), que actúan en el metabolismo, crecimiento y producción de las plantas (Tarigo, 2004). Asimismo brinda compuestos como proteínas, enzimas, antibióticos, vitaminas, fenoles, ésteres y ácidos orgánicos liberados durante la fermentación por los microorganismos presentes (Santos y Sampaio, 1993). La dosis que se recomienda para su aplicación varía según los requerimientos de cada cultivo, pero en general se recomienda aplicarlos en una dilución del 2 al 5% (Pedini, 2012; Restrepo, 2007).

Se debe tener cuidado de filtrar el preparado, para evitar el tapado de los picos de las pulverizadoras, se recomienda pasar el supermagro por una tela galvanizada o de plástico de malla menor o igual a 1mm. Después de colado se puede almacenar el supermagro en un recipiente que debe estar herméticamente cerrado.

Restrepo (2007) realizó un listado explicando en detalle las funciones de cada uno de los ingredientes con los que se fabrica este biofertilizante:

- Leche: principalmente tiene la función de fuente de energía en el biopreparado, aporta proteínas, vitaminas, grasa y aminoácidos para la formación de otros compuestos orgánicos que se generan durante el periodo de la fermentación del biofertilizante, a su vez es fuente de bacterias acidolácticas y también es un medio propicio para la reproducción de los microorganismos de la fermentación.
- Melaza: la principal función es aportar la energía necesaria para activar el metabolismo microbiológico, para que el proceso de fermentación se potencie, además de aportar otros componentes en menor escala como son algunos minerales, entre ellos: calcio, potasio, fósforo, boro, hierro, azufre, manganeso, zinc y magnesio.
- Sales minerales: activan y enriquecen la fermentación y tienen como función principal fertilizar el suelo y las plantas. Cuando se dificulta encontrar las sales minerales, éstas pueden ser sustituidas por la ceniza o la harina de rocas molidas.
- Ceniza: su principal función es proporcionar minerales y elementos trazas al biofertilizante para activar y enriquecer la fermentación. Dependiendo de su origen y en la falta de las sales minerales, esta puede llegar a sustituirlas (las mejores cenizas para hacer los biopreparados son las que se originan a partir de las gramíneas, ejemplo: cascarilla de arroz, bagazo de caña y maíz).
- Estiércol de vaca: aporta los microorganismos y la materia orgánica para que ocurra la fermentación del biofertilizante rico en nutrientes. Los microorganismos son responsables de digerir, metabolizar y colocar de forma disponible para las plantas y el

suelo todos los elementos nutritivos que se encuentran en el caldo que se está fermentando en el tanque.

- Agua: tiene la función de facilitar el medio líquido donde se desarrolla la fermentación anaeróbica del biofertilizante.

Se ha evaluado el efecto positivo del supermagro en el rendimiento de una varios cultivos. Algunos casos de éxito en cultivos que normalmente son producidos en nuestro país son: sandía (Gonzalez *et al.*, 2015), uva (Muñoz & Mauricio, 2004), lechuga (Bonillo *et al.*, 2015), frutilla (Mazaro *et al.*, 2013) y tomate (Alves, 2016), entre otros cultivos.

Además de su aporte en nutrientes, tiene un efecto en el control de plagas y enfermedades, tiene propiedades como fungistático, bacteriostático y repelente de insectos (Santos y Sampaio, 1993). Distintos estudios han comprobado su eficacia contra diversas plagas en los cultivos. Medeiros *et al.* (2000) verificaron la reducción de fecundidad de un ácaro, *Brevipalpus phoenicis*, que ataca los citrus. El estudio comprobó que el biopreparado actuó por contacto directo y residual pero también funcionó de forma sistémica en la planta. También pudieron comprobar una acción sinérgica con microorganismos entomopatógenos como *Bacillus thuringiensis* y *Beauveria bassiana*, observaron una mayor disminución de la supervivencia de larvas de otra plaga de los citrus, *Ecdytoplopha aurantiana*. Hirose *et al.* (2001) comprobaron que el supermagro no tiene ningún efecto negativo sobre *Beauveria bassiana* ni *Metarhizium anisopliae*, utilizados en el control biológico de insectos, a diferencia de otros fertilizantes e insecticidas que sí afectan a las poblaciones de hongos controladores biológicos. El supermagro es una opción interesante para fertilizar cuando se usan controladores biológicos en manejo orgánico y ecológico. D'Andrea y Medeiros (2002) señalan que los principales mecanismos de acción sobre la plaga son la acción antibiótica y la inducción de resistencia sistémica de la planta. Los mecanismos por los que se induce la resistencia sistémica pueden estar asociados a la composición química y biológica de estos biopreparados la cual es compleja y poco estudiada.

2.6. Antecedentes y justificación del estudio de biopreparados en Uruguay

Los biopreparados han sido utilizados por agricultores en todo el mundo con buenos resultados, sin embargo su aplicación no ha sido ampliamente aceptada por la comunidad científica porque a menudo es difícil reproducir consistentemente sus efectos benéficos. De todas maneras, diversos tipos de biopreparados están disponibles en el mercado, obteniendo buenos logros cuando van de la mano con orientación técnica en cuanto a su producción y aplicación, lo que puede resultar en la eliminación de problemas asociados al uso de fertilizantes sintéticos y plaguicidas y en la transición hacia manejos agrícolas orgánicos y ecológicos (Restrepo, 2007; Higa, 1991; Parr *et al.*, 1994).

Es de suma importancia desarrollar estudios científicos acerca de la preparación, aplicación y efectos de los biopreparados, para poder incorporarlos en la implementación de una agricultura sostenible. En lo que refiere a los métodos de abonado orgánico, hay mucho aspectos que aún no han sido estudiado empleando una aproximación científica, lo cual hace más difícil para un productor escoger una técnica. Es necesario desarrollar experimentos que permitan determinar la eficacia de los abonos orgánicos y la mejor metodología para su producción, aplicación y evaluación. Esto permitiría a los productores tomar decisiones adecuadas para sus circunstancias particulares y complementaría la experiencia sobre estos abonos, proveniente del conocimiento tradicional. El conocimiento tradicional por parte de los productores muchas veces brinda soluciones y alternativas eficaces, a pesar de no haber sido comprobado mediante el método científico. Muchos de estos conocimientos han sido transmitidos de generación en generación o de productor a productor, y abarcan prácticas y estrategias que han sido desarrolladas por quienes realmente están en contacto con la tierra en su labor diaria, los productores, que en definitiva son los que saben y hacen la agricultura. Desde la academia se puede colaborar para validar o rechazar en términos científicos estos conocimientos tradicionales como forma de contribuir a la valorización de este conocimiento.

En Uruguay, la agricultura orgánica como forma de producción más extendida surge a mediados de la década de los 80 a partir del trabajo de ONGs con productores

fundamentalmente hortícolas y frutícolas de la zona sur del país (Prieto *et al.*, 2002). Esto se vio acompañado de un incremento en la utilización de biopreparados para los cultivos agroecológicos, en especial intentando sustituir el estiércol de gallina, que es la forma de fertilización más utilizada por los agricultores orgánicos. Hasta el momento hay un escaso registro de qué tipo de biopreparados y de qué forma son aplicados y pocos trabajos científicos al respecto. Sin embargo, hay algunas investigaciones que evidencian la utilización de los biopreparados en nuestro país: Prieto *et al.* (2002) comprobaron que el biopreparado supermagro es un biofertilizante muy difundido en la producción orgánica en establecimientos familiares de Montevideo y Canelones. Tarigo (2004) realizó ensayos agronómicos en cultivo de lechuga con supermagros realizados por distintos productores, obteniendo buenos resultados como método de fertilización orgánica. Zappolo (2014) constató la utilización del biopreparado supermagro y sus beneficios para el cultivo orgánico del durazno en Uruguay.

Algunos cultivos hortícolas realizados el norte de Uruguay, principalmente en Bella Unión y Salto entre el 2005 y el 2011 demostraron que la utilización de biopreparados en base a microorganismos benéficos puede ser una herramienta útil en el avance hacia sistemas agrícolas más sostenibles. Los productores realizaron una sustitución paulatina de los plaguicidas de síntesis química por productos biológicos, donde además de MEN, que lideró el cambio, se comenzaron a usar *Trichoderma* spp., hongos entomopatógenos (*Beauveria* spp., *Metarhizium* spp.) y otros biopreparados artesanales. Esto produjo una reducción de alrededor del 50% en el uso de plaguicidas (datos de MGAP 2009, sin publicar) y en el caso de algunos productores llegó a un 80%. Esto tuvo como consecuencia la recuperación de los agroecosistemas, con la aparición de numerosos enemigos naturales, mejoró las condiciones de trabajo de productores y trabajadores rurales y posibilitó la obtención de productos hortícolas con menor carga de plaguicidas, es decir, más sanos. Como consecuencia, la industria de congelados de Bella Unión (Greenfrozen S.A - Calagua) pudo por primera vez acceder a los mercados europeos con pimiento congelado, cosa que antes no había sido posible por el alto nivel de residuos de plaguicidas.

A su vez, se han incrementado los grupos, instituciones o empresas que producen biopreparados; a continuación se describen algunos ejemplos. La cooperativa Entrebichitos, nace a partir de un proyecto de investigación escolar, en la que niños de primaria implementaron un sistema de producción de MEN. El proyecto además de resultar positivo para los objetivos educativos planteados, dio lugar a una cooperativa de producción de este biopreparado (Perez y Mesa, 2018). La Estación Experimental Guardia Vieja y la Granja La Compartida, son chacras donde se busca fomentar la agricultura regenerativa, mediante la instalación de fincas modelo para la realización de talleres de difusión de técnicas de producción en agricultura orgánica y ganadería regenerativa, para productores, estudiantes y asesores rurales. Entre sus principales líneas de acción se encuentra la producción de biopreparados. Las empresas Abono de Mar y Jardín Primitivo, son empresas dedicadas a la transformación de residuos de la industria pesquera en biopreparados para la agricultura orgánica, de esta manera se logra evitar la contaminación que estos residuos generarían. La empresa Ecosativa, fundada por dos biólogos, comercializa sus biopreparados principalmente en el rubro del cannabis y de la fruticultura, obteniendo el premio a mejores productos en la Expocannabis 2020, lo que denota una mayor aceptación de este tipo de insumos en ese rubro.

El presente trabajo se enmarca en el proyecto financiado por el llamado “Más Tecnologías para la producción familiar” de la Dirección General de Desarrollo Rural, proyecto desarrollado por productores de la Red de Agroecología (Regional Toronjil) en Canelones, Uruguay, así como por investigadores del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) y Facultad de Agronomía (FAgro). Se trabajó con un grupo de productores ubicados en Rincón de Pando, Canelones, Uruguay, zona contigua a la Laguna del Cisne en donde la Intendencia Municipal de Canelones dispuso una transición hacia sistemas productivos agroecológicos. Por lo tanto la investigación tiene entre sus cometidos servir como herramienta para promover el proceso de transición en el área que podrá ser implementado en otros territorios de nuestro país.

Este proyecto surge de la necesidad de superar distintos desafíos para fomentar la aplicación de biopreparados. Entre otros se identificaron: falta de infraestructura adecuada para la producción y almacenamiento de los productos, falta de controles de calidad de los productos, dificultades para planificar el requerimiento de biofertilizantes en los predios, falta de conocimiento de los modos de preparación y monitoreo de los procesos, dificultades para adquirir insumos necesarios para la preparación e instrumentos para el monitoreo de los procesos de elaboración y alto requerimiento de mano de obra para la aplicación manual de los productos sólidos. Para solucionar estas dificultades, el proyecto “Elaboración colectiva de biopreparados para uso agropecuario en predios agroecológicos familiares, zona de influencia de la Regional Toronjil-Red de Agroecología.” propuso: adaptar y equipar un espacio apropiado para la producción y almacenaje de biofertilizantes, ajustar un sistema de gestión, organizacional y logístico de producción y aplicación colectiva de biofertilizantes por parte de la Regional de la Red, determinar los costos de producción como insumo para el establecimiento del precio del producto, caracterizar los productos obtenidos y su evolución durante el almacenaje, ajustar las técnicas y herramientas de aplicación a los cultivos, evaluar su comportamiento en los predios de los productores, comercializar los biofertilizantes dentro de la Regional Toronjil y con otros productores dentro y fuera de la Red de Agroecología, crear una guía básica para producción, almacenamiento y aplicación de biofertilizantes, y difundir la experiencia.

Cabe destacar que a nivel de legislación, Uruguay está dando sus primeros pasos. Recién en Agosto 2018 se creó la resolución N°97/018 que instrumenta el registro y control de productos orgánicos para uso Agrícola, y en Octubre 2018 se creó la resolución N°141/018 que aprueba los requisitos técnicos para el registro de enmiendas orgánicas, únicamente habilitando a registrar enmiendas sólidas como compost y abono bokashi. En Agosto 2019 se creó la resolución N°536/019 que aprueba los requisitos técnicos para el registro de fertilizantes orgánicos y fertilizantes órgano-minerales. En diciembre de 2019 el Parlamento promulgó la Ley 19.717 que declara de interés general la agroecología y crea una Comisión Honoraria que tiene como principal cometido la elaboración de un Plan Nacional de Agroecología, su implementación y seguimiento. Con este plan se busca fomentar distintas

políticas para el desarrollo de la agroecología en Uruguay. Es importante realizar investigación en distintos campos de la agroecología para brindar herramientas para el desarrollo de estas políticas. En esta realidad se puede entender la pertinencia del estudio de los biopreparados como herramientas para el manejo agroecológico.

3. Hipótesis

- 1) Cada tipo de biopreparado tiene una composición microbiana característica, la cual es reproducible siempre que se mantengan las propiedades de los ingredientes utilizados.
- 2) Una vez alcanzada la madurez, la estructura de las comunidades microbianas de los biopreparados es estable en el tiempo.
- 3) La aplicación de biopreparados tiene efectos sobre la estructura de la comunidad de hongos y bacterias en el suelo y afecta positivamente el rendimiento del cultivo de papa y lechuga.

4. Objetivos

4.1. Objetivos generales

- 1) Determinar la composición microbiológica de tres biopreparados: bokashi, supermagro y Microorganismos Eficientes Nativos, y evaluar su estabilidad en el tiempo.
- 2) Evaluar el efecto de su aplicación en el rendimiento de los cultivos, así como en la comunidad microbiana del suelo.

4.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar la abundancia de grupos cultivables de bacterias y hongos (actinobacterias, bacterias ácido lácticas, bacterias heterótrofas, levaduras y hongos filamentosos) en los biopreparados una vez listos para su utilización y durante su almacenamiento.
- 2) Analizar la estructura de la comunidad microbiana en los biopreparados al momento de estar listos.
- 3) Determinar la abundancia de grupos cultivables de bacterias y hongos de interés en suelos con y sin aplicación de biopreparados.
- 4) Evaluar el efecto de la aplicación de biopreparados en el rendimiento de cultivos de papa y lechuga.

5. Materiales y métodos

5.1. Caracterización de los biopreparados

5.1.1. Elaboración

Se elaboró Bokashi, Supermagro, y Microorganismos Eficientes Nativos siguiendo la metodología de Restrepo (2007) con adaptaciones de acuerdo a los materiales orgánicos localmente disponibles. Las recetas completas de todos los biopreparados nombrados se encuentran en el Anexo 1.

Para la elaboración del Bokashi, se procedió a colocar todos los ingredientes secos (estiércol de vaca, cáscara de arroz, salvado de arroz, carbón molido, tierra, cal agrícola) en varias capas superpuestas hasta formar una pila de aproximadamente 1 metro de alto, 1 metro de ancho y 2 metros de largo, con el objetivo de facilitar la mezcla y lograr una mayor homogenización de los ingredientes. Paralelo a eso se mezcló la levadura, la melaza y el agua en un recipiente. Luego se procedió a mezclar los ingredientes de la pila utilizando una máquina diseñada con estos objetivos, similar a una rotovadora. Al mismo tiempo en que la máquina fue mezclando, se le fue aplicando el agua con la melaza y la levadura hasta llegar a la humedad buscada, la cual es comprobada mediante una técnica tradicional llamada “la prueba del puño”, que indica que se debe tomar una porción del biopreparado con la mano, y apretarla. Si no libera agua al apretarlo y si al abrir la mano el biopreparado mantiene la compactación pero se desarma al presionarlo, esto indica que la humedad es adecuada. Luego se procedió a repetir el mezclado sin agregado de agua, una o dos veces por día durante 15 días, según la temperatura que genere el proceso de compostaje que no debe superar los 65°C, hasta estar listo para ser envasado.

El Supermagro, fue elaborado dentro de una tarrina de 200 litros de capacidad a la cual se le agregó una válvula de escape de gases para poder utilizarla como fermentador. Dentro de la tarrina se mezcló estiércol, melaza, leche y agua. Luego se cerró para que la fermentación pudiera ocurrir, y cada 3 días se abría para agregar leche y melaza y las

correspondientes sales minerales (sulfato de zinc, cloruro de calcio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, cloruro de cobalto, molibdato de sodio, bórax, sulfato ferroso y sulfato de cobre), según lo indicado por el protocolo de Jairo Restrepo (2007). A los 55 días desde el inicio de elaboración se considera que está listo para ser utilizado.

Para fabricar los MEN, es necesario pasar por dos etapas, primero fabricar un biopreparado sólido para luego utilizarlo para fabricar el producto final en líquido. Para preparar los MEN sólidos, se procede a mezclar salvado de arroz, mantillo de monte, melaza, y agua, hasta alcanzar la homogeneidad. Esa mezcla se coloca dentro de una tarrina hermética y se compacta lo mejor posible, luego se cierra la tarrina y se incuba 1 mes. Para preparar los MEN líquidos, se procede a colocar el MEN sólido en un saco de tela, leche, melaza, ceniza (opcional) y agua, dentro de una tarrina de 200L adaptada para utilizarse como fermentador. Luego de 30 días está listo para ser utilizado (CENTA, 2010)

En el marco de esta tesis se elaboraron los siguiente biopreparados (Tabla 1):

Con un grupo de productores de la Regional Toronjil de la Red de Agroecología, localizados en Rincón de Pando, Canelones, se elaboraron y analizaron dos preparaciones de MEN (MEN), uno sin ceniza (MEN A), otro con ceniza (MEN B); dos preparaciones de Bokashi, uno con la formulación original (BOK B) y otro sustituyendo la cascarilla de arroz por aserrín (BOK A); y un Supermagro manteniendo la formulación original (SM A).

Con la empresa productora de bioinsumos Ecosativa, ubicada en Montevideo, se elaboraron y analizaron un Bokashi, MEN y Supermagro (BOK E, MEN E, SM E), siguiendo las formulaciones originales de Restrepo (2007).

Además, en ciertas partes de la investigación, se utilizaron biopreparados elaborados por distintos colectivos. Se recibieron para analizar tres Bokashis: BOK G, de la Granja La Compartida, productores orgánicos ubicados en las Sierras de Rocha, BOK GV, de Estación Regenerativa Guarda Vieja, ubicada en Maldonado, y BOK R, de un productor de Sauce, Canelones.

Por el tiempo transcurrido durante esta investigación fue necesario utilizar distintos biopreparados para las distintas actividades realizadas, lo cual se detalla en la Tabla 2.

Tabla 1. Productores de los diferentes biopreparados utilizados en esta investigación.

Productor	Bokashi	MEN	Supermagro
Regional Toronjil	BOK A, BOK B	MEN A, MEN B	SM A
Ecosativa	BOK E	MEN E	SM E
Granja La Compartida	BOK G		
Guardia Vieja	BOK GV		
Sauce	BOK R		

Tabla 2. Biopreparados utilizados para cada actividad de la investigación.

Actividad	BOK A	BOK B	BOK E	BOK G	BOK GV	BOK R	MEN A	MEN B	MEN E	SM A	SM E
Cultivables	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Secuenciación masiva 16s	x	x					x	x			
Secuenciación masiva ITS1	x		x	x			x		x		
Cromatografía	x	x	x								
Ensayo de papa	x						x				
Ensayo de lechuga			x						x		x

5.1.2. Muestreo

Con el objetivo de evaluar los cambios en las poblaciones microbianas de los biopreparados maduros y durante su almacenamiento, se tomaron muestras al momento de estar listos para ser utilizados y a los 2, 4 y 6 meses luego de su preparación.

Para bokashi se extrajeron tres muestras de aproximadamente 1 kg, de distintas partes al azar de la pila de producción. Para los biopreparados líquidos, Supermagro y MEN, se tomaron tres muestras de 50 mL de cada biopreparado. Además se analizó una muestra de 1 kg de estiércol de gallina que fue utilizado para un ensayo de cultivo de papa a campo.

5.1.3. Caracterización fisicoquímica

Los parámetros fisicoquímicos de bokashi y supermagro fueron analizados en el laboratorio analítico Waypoint Analytics, EEUU. Los análisis se basaron en los métodos TMECC (Test Method for the Examination of Composting and Compost) (Leege y Thompson, 1997). Los parámetros analizados fueron pH, nitrógeno total, nitrógeno amoniacal, fósforo total, potasio total, azufre, calcio, magnesio, sodio, hierro, aluminio, manganeso, cobre, zinc, boro, materia orgánica, relación carbono/nitrógeno y conductividad eléctrica.

5.1.4. Caracterización microbiológica

5.1.4.1. Cultivables: por el método de recuento en placa

Se utilizó la técnica de recuento en placa para determinar la presencia y el tamaño poblacional de diferentes grupos de microorganismos cultivables, en los biopreparados al momento de estar listos, así como también a los 2, 4 y 6 meses de almacenados para evaluar la estabilidad de la comunidad microbiana durante el almacenamiento.

Para esto las muestras fueron suspendidas (5 g para bokashi y estiércol de gallina, 5 ml para supermagro y MEN) en 45 ml pirofosfato de sodio 0,1% (p/v) estéril, por agitación a 200 rpm durante 30 minutos. Se realizaron 4 diluciones seriadas en la misma solución, y se sembraron en placas de Petri con medios de cultivo semiselectivos (Anexo 2).

Para el conteo de bacterias heterótrofas, se sembraron gotas de 10uL para cada dilución en el medio TSA 1/10 con cicloheximida 100 µg/ml (Smit *et al.*, 2001). Se incubaron a 25°C en oscuridad y aerobiosis, durante 7 días, se determinó el número de colonias en cada gota a los 3 y 7 días.

Para bacterias acidolácticas, se sembraron en superficie, 30 µL para cada dilución, en el medio Lactobacilli MRS Agar (de Man *et al.*, 1960). Se incubaron a 37°C en anaerobiosis, para lo cual las placas se colocaron dentro de bolsas selladas con un agente generador de

ambiente anaeróbico Anaerocult® de la marca alemana Merck KGaA. El recuento de colonias se hizo a los 3 días.

Para actinobacterias, se sembraron en superficie, 100 µL para cada dilución en el medio Almidón Caseína con cicloheximida 100 µg/ml (Leoni & Ghini 2003). Se incubaron a 25°C en oscuridad y aerobiosis, durante 7 días. Para determinar el número de colonias se removieron con un algodón todas las colonias que se despegaban fácilmente del medio, dejando así únicamente las colonias de actinobacterias, las cuales presentan una morfología piramidal y tienen la particularidad de quedar ancladas al medio.

Para bacterias fototróficas, se sembraron 100 µL en superficie, para cada dilución en el medio Van Niel con cicloheximida 100 µg/ml (Van Niel, 1971). Se incubaron a 30°C con luz constante. A los 10 días se observó si había presencia de colonias coloreadas, características de las bacterias fototróficas.

Para levaduras y hongos filamentosos, se sembraron 100 µL en superficie, en el medio Agar Extracto Malta con cloranfenicol 100 µg/ml. Se incubaron a 25°C en oscuridad y aerobiosis, durante 3 días, determinándose el número de colonias características de cada grupo.

5.1.4.2. Independientes de cultivo: por secuenciación masiva de fragmentos del gen de ARNr 16s y de la región intergénica ITS1

Se extrajo ADN de 0,25g de los bokashis y del pellet resultante del centrifugado de 6ml de los MEN y del supermagro. Se utilizó el kit de extracción DNeasy Power Soil Kit (MoBio, EEUU), siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante.

Se estudió la estructura de la comunidad bacteriana total presente en BOK A, B, E, G y MEN A, B, y E, mediante secuenciación masiva de fragmentos del gen que codifica para el ARNr 16S. La amplificación de los fragmentos deseados se realizó mediante PCR utilizando una mezcla que contenía los dNTP's y la Taq polimerasa (Ranger Mix Kit, Bioline, EEUU), a la que se le agregaron 3ul de ADN y los cebadores 515F/806R, que permiten amplificar la región V4 del gen ARNr 16S conteniendo adaptadores y barcodes (Caporaso *et al.* 2011) para

obtener amplicones de aproximadamente 290 pares de bases. Se utilizaron las siguientes condiciones: 94°C por 3 minutos, 30 ciclos compuestos de: 94°C por 30 segundos, 53°C por 40 segundos y 72°C por un minuto, después de los cuales se finalizó con un paso de extensión final a 72°C por 5 minutos.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, a 90 V durante 2 horas en buffer TAE 1X (Anexo 2). Las bandas de interés se aislaron a partir de los geles utilizando el kit comercial Zymoclean Gel DNA Recovery Kit.

La secuenciación se realizó en la plataforma de secuenciación del IIBCE, con el equipo Ion Personal Genome Machine (PGM™) System (ThermoFisher Scientific). Los datos resultantes de la secuenciación (single end) fueron analizados en el programa QIIME2 (Bolyen *et al.* 2019) siguiendo el protocolo recomendado en la web del software: <https://docs.qiime2.org/2021.4/tutorials/moving-pictures/>

Los pasos generales seguidos en este protocolo para el análisis de las secuencias fueron: Importación de los archivos .fastq bajo el método “EMP protocol multiplexed single-end fastq”, recorte de las secuencias correspondientes a los cebadores y barcodes, filtrado de secuencias con el método DADA2, importación de la base de datos de secuencias de ADN de bacterias SILVA versión silva-132-97-16S, asignación taxonómica a un nivel de 97% de similitud, y realización de gráficos de visualización.

Se utilizó el mismo método independiente de cultivo para estudiar la estructura de la comunidad de hongos de BOK A, BOK E, BOK G, MEN E y SM G, mediante el secuenciado de los fragmentos del espaciador transcrito interno (ITS1), región intergénica que se encuentra entre los genes de ARNr 18S y 5.8S.

Se realizó PCR utilizando Ranger Mix Kit (Bioline, EEUU) y los cebadores ITS1/ITS2 con adaptadores y barcodes que permiten amplificar la región intergénica ITS (Kemler *et al.*, 2013), obteniendo amplicones de aproximadamente entre 200 y 450 pares de bases. Se utilizaron las siguientes condiciones: 94°C por 3 minutos, 30 ciclos compuestos de: 94°C por

30 segundos, 53°C por 40 segundos y 72°C por un minuto, después de los cuales se finalizó con 72°C por 5 minutos.

En este caso, para el estudio de la comunidad de hongos, la secuenciación se realizó en un secuenciador Illumina Miseq® (Illumina Inc.) en el Departamento de Genética de la Universidad de Munich, Alemania. Los datos resultantes de la secuenciación (single end) fueron analizados en el programa QIIME2 (Bolyen *et al.* 2019) utilizando únicamente la secuencia forward (forward read) y siguiendo el siguiente protocolo: <https://forum.qiime2.org/t/fungal-its-analysis-tutorial/7351>.

Los pasos generales seguidos en este protocolo para el análisis de las secuencias fueron: Importación de los archivos .fastq bajo el método del “manifiesto”, recorte de las secuencias correspondientes a los cebadores y barcodes, filtrado de secuencias con el método DADA2, importación de la base de datos de secuencias de ADN de hongos UNITE versión 8-97-02.02.2019 para Fungi, asignación taxonómica a un nivel de 97% de similitud,, y realización de gráficos de visualización.

5.1.5. Caracterización de bokashis y suelo por el método de cromatografía de suelos

Se analizaron mediante cromatografía de suelos BOK A, B y E y los suelos del ensayo de lechuga, siguiendo protocolos de Restrepo y Pinheiro (2011).

Se tomaron las muestras de bokashi y de suelos y con un mortero se molió cada muestra hasta pulverizar. Se tomaron 5g de cada muestra y se colocaron en 50ml de una solución de hidróxido de sodio 1%. El mezclado se realizó con 6 giros en una dirección y 6 hacia la otra, luego se dejó en reposo, y se repitió la acción a los 15 minutos, 1 hora, y luego se dejó reposar por más de 5 horas.

Se utilizó un papel filtro marca Whatman No. 4, circular, de 15 cm de diámetro. Se perforó el centro con un sacabocados y se le insertó un pabito hecho con el mismo tipo de papel, cuya función fue la de difundir sustancias de manera uniforme en el papel circular.

Para impregnar el filtro con el revelador se colocó una caja de Petri de 4 cm de diámetro, de manera centrada, dentro de una de 9 cm, y se agregó una solución de nitrato de plata 0,5% en la caja de petri pequeña. El disco de papel se colocó sobre las cajas de petri (tomándolo únicamente de los bordes), y al entrar en contacto el pabito con la solución de nitrato de plata, ésta se difundió homogéneamente por el papel filtro hasta los 4 cm y luego se quitó el pabito. Se colocó el papel filtro entre papel secante y dentro de un cajón sin luz, durante 5 horas.

Se volvió a usar la misma técnica para impregnar en el papel el sobrenadante de la solución de suelo que estaba en reposo desde hacía al menos 5 horas. Una vez que la solución de suelo recorrió hasta 6 cm del disco de papel, se retiró el pabito y se depositó el disco de papel horizontal para secar. Una vez seco cada disco de papel, se colocó expuesto a luz indirecta por 10 días, hasta revelarse las imágenes con la intensidad deseada. La interpretación de las imágenes se hizo según las recomendaciones de Restrepo y Pinheiro (2011).

5.2. Evaluación de la aplicación de biopreparados en cultivo de papa en campo

Con el objetivo de evaluar el efecto de la aplicación de biopreparados en el rendimiento del cultivo de papa y en la comunidad microbiana del suelo, se estableció un ensayo de campo, con un diseño completamente al azar con tres tratamientos y cuatro repeticiones. El tiempo transcurrido desde la plantación hasta la cosecha fue de 105 días.

Tratamiento 1 (C): control, sin agregado de biopreparados, aplicando 750 mL de agua al surco previo al trasplante.

Tratamiento 2 (EG): con agregado de 480 g de estiércol de gallina por parcela (equivalente a 1067 kg por hectárea), sin agregado de biopreparados, y aplicando 750 mL de agua al surco previo al trasplante.

Tratamiento 3 (BM): con agregado de 560 g de bokashi por parcela (equivalente a 1245 kg por hectárea) y aplicando 750ml de MEN diluido al 5% al surco previo al trasplante, y aplicaciones cada 30 días de 10L de MEN diluido al 5% por parcela (equivalente a 22000L por hectárea).

Se tomaron muestras del suelo, antes de la aplicación de los biopreparados y después de aplicados y realizada la cosecha del cultivo; los parámetros analizados fueron número de plantas por parcela, rendimiento (en peso de papas obtenidas) por planta y parcela, y sanidad del cultivo, evaluado como severidad: porcentaje de superficie de hoja afectado por enfermedades (Kranz, 1988).

5.3. Evaluación de aplicación de biopreparados en cultivo de lechuga en condiciones controladas

Para evaluar el efecto de los biopreparados en el rendimiento del cultivo de lechuga, se estableció un ensayo en condiciones controladas a una temperatura constante de 21°C y un fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad. El tiempo transcurrido desde el trasplante del plantín hasta la cosecha fue de 60 días.

Se utilizaron plantines de lechuga variedad mantecosa, con 30 días de sembrados, los cuales se trasplantaron en macetas de 1,8L de volumen, utilizando un sustrato con 2/3 de tierra y 1/3 de arena. El riego se realizó 3 veces por semana utilizando 50ml de agua destilada por maceta del día 1 al día 20, 75ml del día 20 al día 40 y 100ml del día 40 al día 60.

La cama de pollo y el bokashi fueron aplicados en el sustrato previo al trasplante de los plantines y los insumos líquidos fueron aplicados diluidos en el agua de riego una vez por semana. El fertilizante químico líquido utilizado contenía 0,24% (p/v) de nitrógeno (N), 0,16% (p/v) de fósforo (P_2O_5) y 0,1% (p/v) de potasio (K_2O).

Se establecieron 9 tratamientos con 4 repeticiones al azar: C: Control (sólo con agua de riego), CP: 40g de cama de pollo por maceta, AG: Fertilizante químico diluido al 8%, BOK: 280g (~450ml) de bokashi por maceta, SM: Supermagro diluido al 5%, MEN:

Microorganismos Eficientes Nativos diluidos al 5%, BSM: 280g bokashi + Supermagro al 5% + MEN al 5%, B+SM: 400g (~800ml) de bokashi + supermagro al 5% + MEN al 5%, BS+M: 280g de bokashi + supermagro al 10% + MEN al 5%.

Los parámetros evaluados en lechuga fueron: peso fresco de la parte aérea y de la raíz, número de hojas, altura y diámetro de la parte aérea. Se determinó también el peso seco de la parte aérea y de la raíz para lo cual las plantas fueron secadas en estufa a 60°C hasta peso constante.

Se analizó por recuento en placa al momento de la cosecha, la abundancia de bacterias heterotróficas, ácido láctico, actinobacterias, levaduras y hongos filamentosos en los sustratos con los distintos tratamientos, de la misma forma que se realizó con los biopreparados. Los recuentos se realizaron para las 4 repeticiones de cada tratamiento.

La actividad microbiana se estimó mediante la evaluación de la respiración del suelo por retrotitulación con HCl del CO₂ emitido por el suelo incubado 48h a 25°C y capturado por una solución de NaOH, con una humedad equivalente al 75% de capacidad de campo (Sparling y West, 1990).

Se analizaron mediante cromatografía de suelos, las muestras de suelos antes del trasplante y después de la cosecha, siguiendo protocolos de Restrepo y Pinheiro (2011).

5.4. Análisis estadísticos

Los valores de los recuentos bacterianos, respiración microbiana y parámetros agronómicos del ensayo de cultivo de lechuga, fueron analizados utilizando el programa Statistica 5.0. Se examinó la distribución normal de los datos por el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Bartlett. En los casos donde la distribución de los datos fue normal y las varianzas homogéneas, se evaluaron en cada tiempo y para cada variable (abundancia de los grupos de microorganismos y respiración) las diferencias entre los tratamientos mediante ANOVA de una vía (con tratamiento como factor) y el test de Tukey's HSD (Honestly Significant Difference). De lo contrario, se realizó el análisis de varianza no

paramétrico de Kruskal-Wallis y el test de Mann-Whitney. Para los datos agronómicos del ensayo de cultivo de papa, el análisis estadístico se realizó bajo el análisis Residual Maximum likelihood (de Maxima Verosimilitud, o Modelo lineal generalizado).

6. Resultados

6.1. Elaboración de los biopreparados

Se logró elaborar con éxito los distintos biopreparados propuestos junto a los productores. En el transcurso de la investigación se trabajó con seis lotes de bokashi: BOK A, BOK B, BOK E, BOK G, BOK R y BOK GV, dos de supermagro: SM A y SM E, y tres de MEN: MEN A, MEN B y MEN E.

Además de los tiempos estándar de elaboración, se evaluaron distintos parámetros que permitieron establecer que cada biopreparado estuviera listo para su utilización. En el caso del Bokashi, se determinó que estaba listo una vez que la temperatura se estabilizó y que sus ingredientes estuvieron homogéneamente mezclados. Para el MEN y el Supermagro, se observó que la fermentación no produjera más gases a través de la válvula y que sus propiedades organolépticas fueran las características de este tipo de biopreparados fermentados para determinar que estaban listos para utilizar.

6.2. Caracterización de los biopreparados

6.2.1. Caracterización fisicoquímica

Se analizó la composición fisicoquímica de dos bokashis y un supermagro: BOK B (utilizado en el ensayo de cultivo de papa), y de BOK E y SM E (utilizados en el ensayo de cultivo de lechuga) (Tabla 3). Los resultados para los macronutrientes en BOK B Y BOK E presentaron diferencias. Se halló en BOK E mayor contenido de fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, manganeso, zinc y cobre, y menor contenido de nitrógeno en comparación con BOK B. El pH de BOK B fue 8,5 mientras que BOK E fue 7,7. En BOK E el porcentaje de materia orgánica fue 29,4% y la relación C/N fue 40,9. La concentración de macronutrientes, micronutrientes y el pH del supermagro E se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3. Análisis fisicoquímico de Bokashi B (BOK B) y Bokashi E (BOK E).

Parámetro	BOK B	BOK E
Nitrógeno (ppm)	10000	4300
Fósforo (ppm)	19.1	302
Potasio (ppm)	467	2768
Calcio (ppm)	48	3842
Magnesio (ppm)	8	414
Hierro (ppm)	3.8	9
Manganeso (ppm)	0.8	112
Zinc (ppm)	1.7	55
Cobre (ppm)	0	4.7
Boro (ppm)	0.1	0.1
Electroconductividad (dS/m)	2.81	1.8
pH	8.5	7.7
Relación carbono/nitrógeno	No determinado	40.9
Materia orgánica (%)	No determinado	29.4

Tabla 4. Análisis fisicoquímico de Supermagro E (SM E).

Parámetro	SM E
Nitrógeno (ppm)	1400
Nitrógeno amoniacal (ppm)	600
Fósforo (ppm)	360
Potasio (ppm)	4620
Calcio (ppm)	4080
Magnesio (ppm)	1300
Hierro (ppm)	404
Manganeso (ppm)	283
Zinc (ppm)	1600
Cobre (ppm)	218
Boro (ppm)	923
Azufre (ppm)	2080
Sodio (ppm)	1300
Aluminio (ppm)	147
pH	5.5

6.2.2. Caracterización microbiológica

6.2.2.1. Abundancia de grupos microbianos de interés en los biopreparados por métodos dependientes de cultivo

Se determinó la abundancia de seis grupos de microorganismos de interés en diferentes bokashis: levaduras, hongos filamentosos, bacterias ácido lácticas, actinobacterias, bacterias fototróficas, y bacterias heterótrofas totales (Tabla 5). Las medias de las abundancias fueron $3,8 \times 10^4$ UFC/g para levaduras, $7,0 \times 10^4$ UFC/g para hongos filamentosos, $6,9 \times 10^5$ UFC/g para bacterias ácido lácticas, $3,6 \times 10^7$ UFC/g para actinobacterias, y $2,4 \times 10^8$ UFC/g para bacterias heterótrofas totales (Tabla 5). En ningún bokashi se encontraron bacterias fototróficas. Los dos grupos más abundantes fueron las bacterias heterótrofas totales con una abundancia del orden de 10^7 a 10^8 UFC/g y las actinobacterias con una abundancia del orden de 10^6 a 10^7 UFC/g. Por su parte la abundancia de bacterias ácido lácticas estuvo en el rango de 10^4 a 10^6 UFC/g, mientras que el rango de las abundancias de levaduras y hongos filamentosos fue de 10^3 a 10^5 UFC/g (Figura 1).

Tabla 5. Abundancia de grupos de microorganismos de interés en Bokashis

	Levaduras (UFC/g)	Hongos filamentosos (UFC/g)	Bacterias ácido lácticas (UFC/g)	Bacterias heterótrofas (UFC/g)	Actinobacterias (UFC/g)
BOK A	$1,7 \times 10^4$	$7,3 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$	$2,7 \times 10^8$	$2,3 \times 10^7$
BOK B	$1,7 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$6,2 \times 10^4$	$1,8 \times 10^8$	$4,5 \times 10^7$
BOK M	$1,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$3,2 \times 10^8$	$2,0 \times 10^7$
BOK R	$5,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^6$	$3,8 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
BOK GV	$9,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	$2,7 \times 10^8$	$5,0 \times 10^6$
BOK E	$1,0 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	12×10^5	$1,2 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$
Media	$3,8 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$	$6,9 \times 10^5$	$2,4 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$

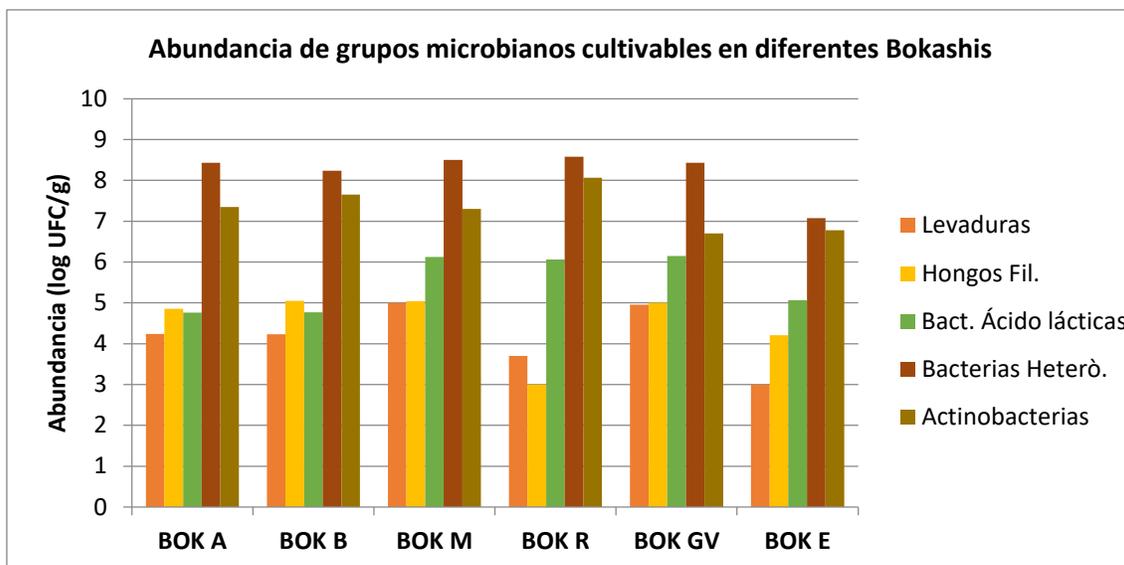


FIGURA 1. Abundancia de grupos microbianos de interés en diferentes preparaciones de bokashi.

Las abundancias de levaduras, hongos filamentosos, bacterias ácido lácticas, y bacterias heterótrofas fueron similares en BOK A (utilizando aserrín además de cascarilla de arroz) y en BOK B (utilizando cascarilla de arroz como es la forma tradicional), el único grupo que presentó diferencias significativas en su abundancia fueron las actinobacterias, cuya abundancia en BOK B fue el doble que en BOK A. Ambos preparados tuvieron una comunidad microbiana con alta abundancia de actinobacterias y bacterias heterótrofas y una menor abundancia de levaduras y hongos filamentosos, y bacterias ácido lácticas (Figura 2).

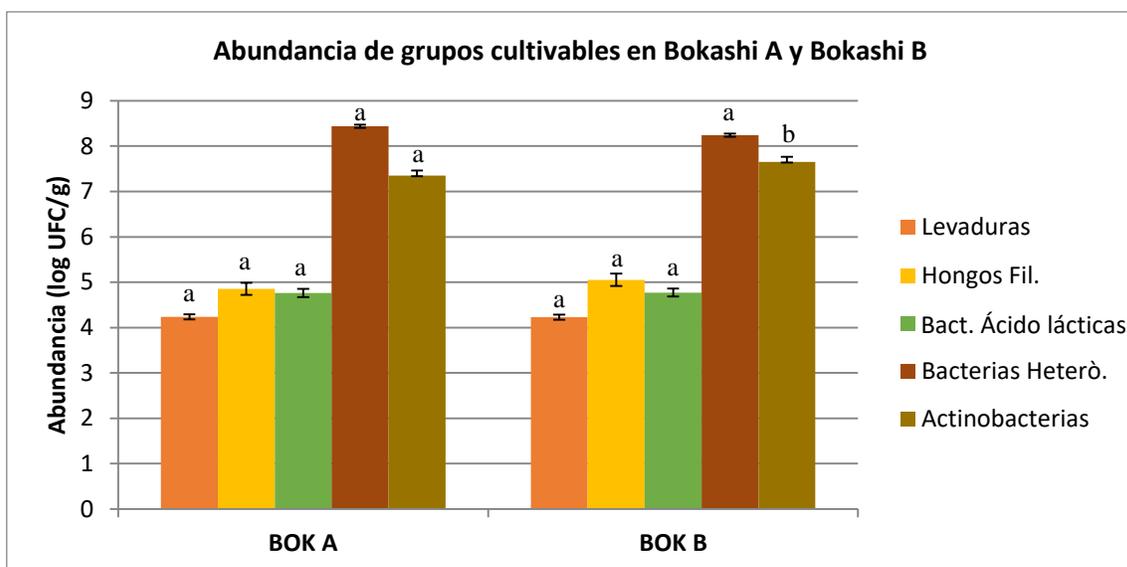


FIGURA 2. Abundancia de grupos microbianos de interés en BOK A (utilizando aserrín para sustituir la mitad de la cascarilla de arroz entre sus ingredientes) y de BOK B (receta tradicional únicamente con cascarilla de arroz). Se grafica la media de 3 repeticiones; letras diferentes representan diferencias significativas entre un mismo grupo microbiano para cada tratamientos por ANOVA - Tukey's ($p < 0,05$); las barras de error representan el desvío estándar

Se determinó la abundancia de los mismos grupos de microorganismos para las tres preparaciones de MEN: MEN A, MEN B y MEN E (Tabla 6, Figura 3). El grupo de bacterias mayoritario en este biopreparado fue el de las bacterias ácido lácticas con una abundancia del orden de entre 10^7 y 10^8 UFC/ml, abundancia similar al número de bacterias heterótrofas en el preparado. MEN E, presentó una abundancia de hongos filamentosos del orden de 10^4 UFC/ml y no se detectaron actinobacterias, mientras que MEN A y B presentaron una abundancia de actinobacterias del orden de 10^3 UFC/ml y no presentaron hongos filamentosos. En cuanto a las levaduras, su abundancia varió entre 10^3 UFC/ml para el caso de MEN A y MEN E y 10^5 UFC/ml para MEN B. En ninguno de los preparados se encontraron bacterias fototróficas.

Tabla 6. Abundancia de grupos de microorganismos de interés en MEN

	Levaduras (UFC/ml)	Hongos filamentosos (UFC/ml)	Bacterias ácido lácticas (UFC/ml)	Bacterias heterótrofas (UFC/ml)	Actinobacterias (UFC/ml)
MEN A	$1,6 \times 10^3$	<LD	$3,4 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$	$9,0 \times 10^2$
MEN B	$7,7 \times 10^5$	<LD	$1,2 \times 10^8$	$9,7 \times 10^7$	$1,2 \times 10^3$
MEN E	$1,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	$4,7 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$	<LD
Media	$2,6 \times 10^5$	$4,0 \times 10^3$	$6,7 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$	$7,0 \times 10^2$

*LD = Límite de detección $1,0 \times 10^2$ UFC/ml

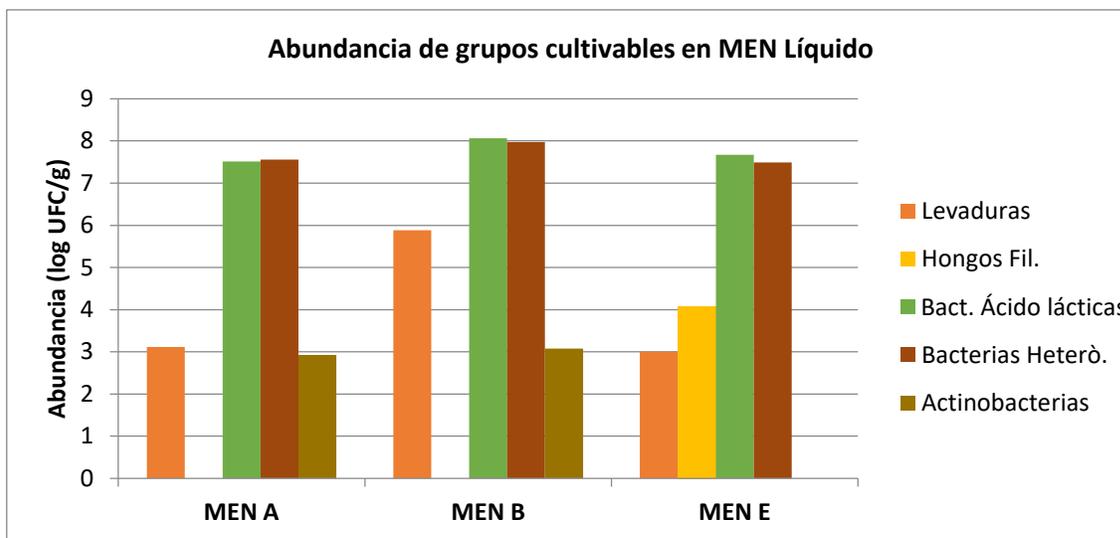


FIGURA 3. Abundancia de grupos microbianos de interés en diferentes preparaciones de Microorganismos Eficientes Nativos.

Al comparar las abundancias de los grupos de interés de MEN A (sin ceniza) y MEN B (con agregado de ceniza) se observó que MEN A tuvo menor abundancia de levaduras (10^3 UFC/ml) en comparación con MEN B (10^5 UFC/ml). También se observaron diferencias en la abundancia de bacterias ácido lácticas y bacterias heterótrofas siendo para ambos grupos microbianos del orden de 10^7 UFC/ml en MEN A y 10^8 UFC/ml en MEN B (Figura 4).

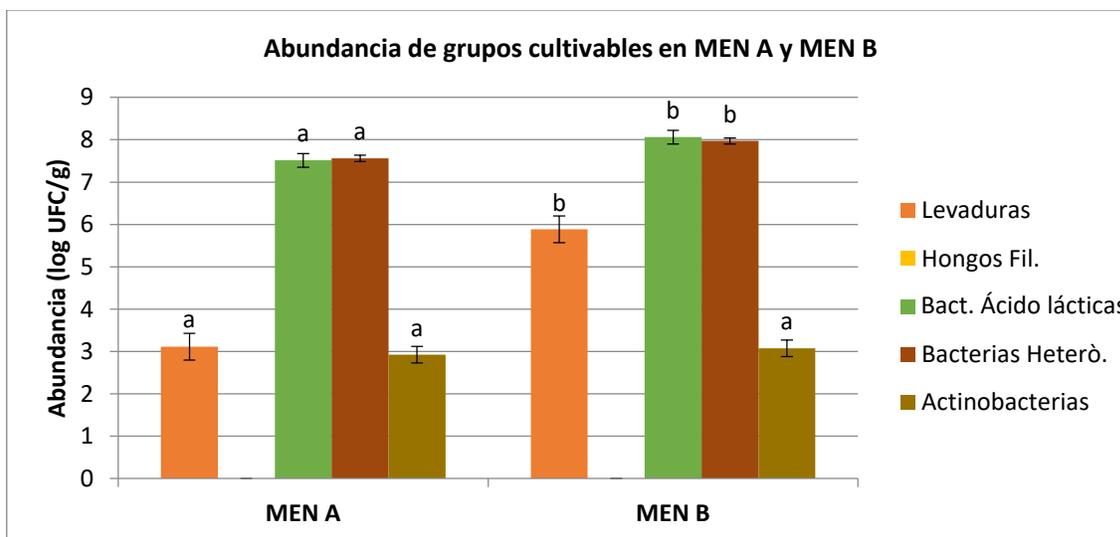


FIGURA 4. Abundancia de grupos microbianos de interés en MEN A (receta tradicional sin enriquecer con ceniza) y de MEN B (enriquecido con ceniza). Se grafica la media de 3 repeticiones; letras diferentes representan diferencias significativas entre un mismo grupo microbiano para cada tratamiento por ANOVA - Tukey's ($p < 0,05$); las barras de error representan el desvío estándar

Se determinó por el método de recuento en placa la abundancia de microorganismos de interés en las dos preparaciones de supermagro: SM A, producido por los productores de Rincón de Pando y SM E, producido por la empresa Ecosativa. Para SM A, no se logró cultivar ningún tipo de microorganismo. Para SM E, se pudieron cultivar hongos filamentosos y bacterias ácido lácticas, con abundancias de $1,1 \times 10^4$ UFC/ml y $3,3 \times 10^3$ UFC/ml respectivamente, y no se lograron cultivar levaduras, actinobacterias, bacterias fototróficas ni bacterias heterótrofas (Tabla 7, Figura 5).

Tabla 7. Abundancia de grupos de microorganismos de interés en Supermagro

	Levaduras (UFC/ml)	Hongos filamentosos (UFC/ml)	Bacterias ácido lácticas (UFC/ml)	Bacterias Heterótrofas (UFC/ml)	Actinobacterias (UFC/ml)
SM A	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
SM E	<LD	$1,1 \times 10^4$	$3,3 \times 10^3$	<LD	<LD

*LD = Límite de detección $1,0 \times 10^2$ UFC/ml

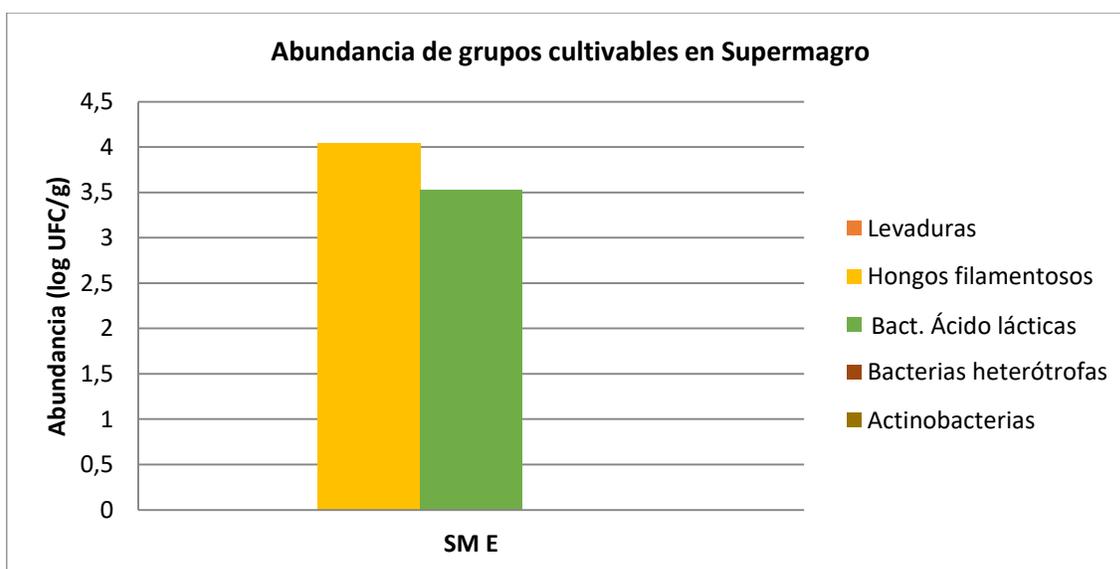


FIGURA 5. Abundancia de grupos microbianos de interés en SM E.

Se determinó por el mismo método la abundancia de los grupos de microorganismos de interés en el estiércol de gallina utilizado para el ensayo de cultivo de papa a campo (Tabla 8). Presentó una abundancia de levaduras del orden de 10^2 UFC/g, de hongos filamentosos del orden de 10^3 UFC/g, de bacterias ácido lácticas del orden de 10^5 UFC/g, de actinobacterias del orden de 10^8 UFC/g, y de bacterias heterótrofas totales del orden de 10^9 UFC/g (Figura 6).

Tabla 8. Abundancia de grupos de microorganismos de interés en estiércol de gallina

	Levaduras (UFC/g)	Hongos filamentosos (UFC/g)	Bacterias ácido lácticas (UFC/g)	Bacterias Heterótrofas (UFC/g)	Actinobacterias (UFC/g)
Estiércol de gallina	$5,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	$8,9 \times 10^5$	$2,3 \times 10^9$	$2,2 \times 10^8$

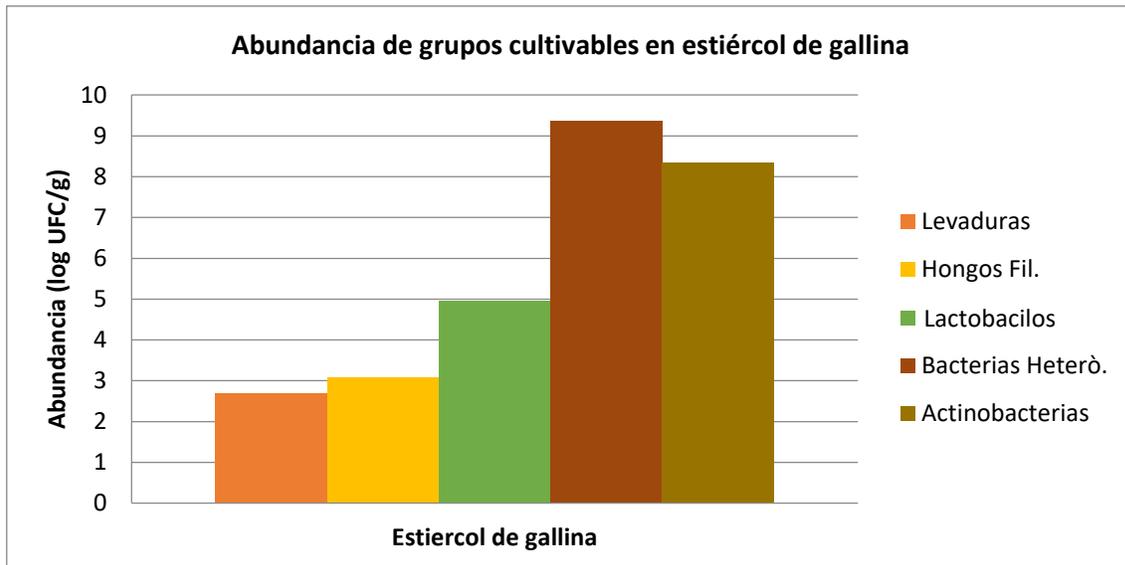


FIGURA 6. Abundancia de grupos microbianos de interés en estiércol de gallina.

6.2.2.2. Estabilidad microbiológica de los Bokashis

Con el objetivo de evaluar la estabilidad de BOK A y BOK B, se determinó la abundancia de los distintos grupos de interés al momento de estar listos para su utilización y a los 2, 4 y 6 meses de almacenados. El aumento o disminución de la abundancia de cada grupo de microorganismos en función del tiempo fue similar para ambos bokashis. A los 6 meses de almacenamiento, se observó que las abundancias de levaduras, bacterias ácido lácticas, y bacterias heterótrofas disminuyeron un orden de magnitud tanto en BOK A como en BOK B, la abundancia de actinobacterias disminuyó un orden en BOK A y dos órdenes en BOK B, mientras que la abundancia de hongos filamentosos aumentó a casi el triple en BOK A y se mantuvo en BOK B (Tabla 9). Se encontró que la composición de la comunidad microbiana de BOK A y BOK B varió durante los 6 meses en que fueron almacenados en bolsas de plastillera a partir de que estuvieron listos para su utilización (Figuras 7 y 8).

Tabla 9. Estabilidad de Bokashi A y B durante su almacenamiento a partir de que está listo para utilizarse

Bioinsumo	Mes	Levaduras (UFC/g)	Hongos filamentosos (UFC/g)	Bacterias ácido lácticas (UFC/g)	Bacterias Heterótrofas (UFC/g)	Actinobacterias (UFC/g)
BOK A	0	$1,7 \times 10^4$	$7,3 \times 10^4$	$5,9 \times 10^4$	$2,7 \times 10^8$	$2,3 \times 10^7$
	2	$2,1 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$2,9 \times 10^7$	$5,1 \times 10^6$
	4	$5,0 \times 10^3$	$8,1 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$	$5,5 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
	6	$2,0 \times 10^3$	$1,9 \times 10^5$	$6,9 \times 10^3$	$3,2 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$
BOK B	0	$1,7 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$6,2 \times 10^4$	$1,8 \times 10^8$	$4,5 \times 10^7$
	2	$3,2 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$5,0 \times 10^7$	$6,3 \times 10^6$
	4	$7,0 \times 10^3$	$5,5 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$2,8 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$
	6	$5,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^5$	$8,9 \times 10^3$	$2,4 \times 10^7$	$1,0 \times 10^5$

*LD = Límite de detección 100 UFC/ml

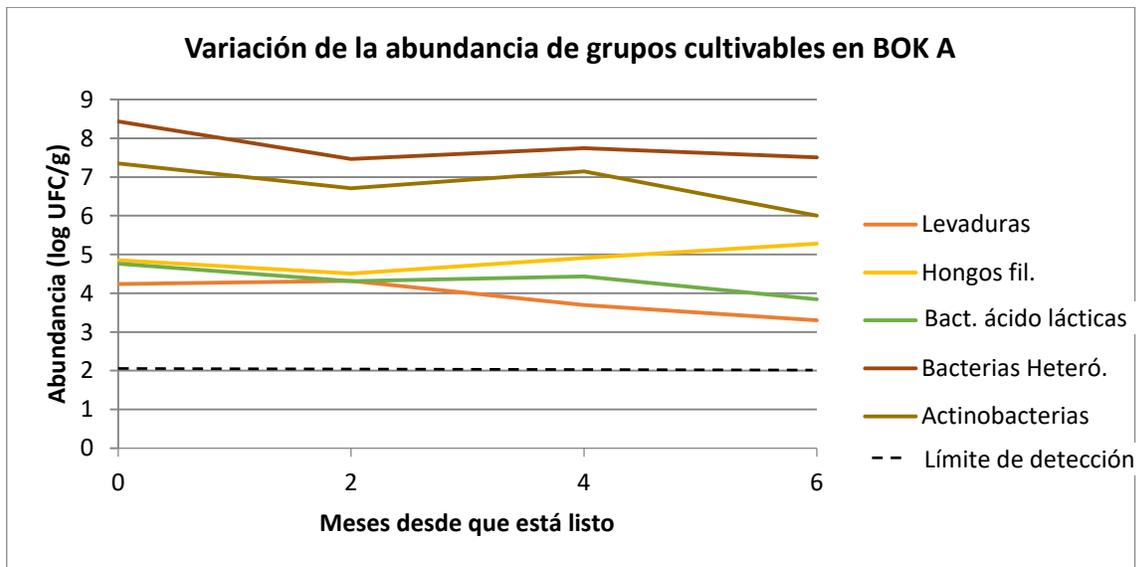


FIGURA 7. Abundancia de microorganismos durante el almacenamiento de BOK A

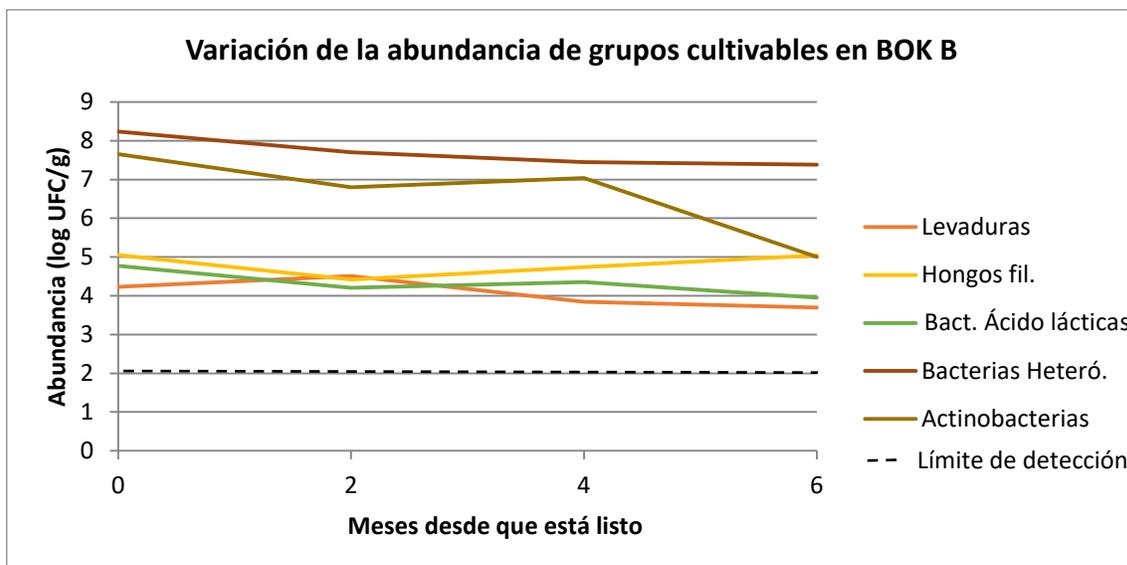


FIGURA 8. Abundancia de microorganismos durante el almacenamiento de BOK B.

6.2.2.3. Estabilidad microbiológica de los MEN

Se encontró que la composición de la comunidad microbiana de MEN A (sin ceniza) y MEN B (con ceniza) varió de forma distinta para cada uno de los biopreparados durante los 6 meses de almacenamiento en botella de plástico cerrada (Figuras 9 y 10). Cabe destacar que en ninguno de los dos MEN se detectó presencia de hongos filamentosos luego de estar listos para su utilización. En el caso de MEN A, a los 6 meses de almacenamiento la abundancia de levaduras aumentó 20 veces, la de bacterias heterótrofas aumentó 8 veces, mientras que la abundancia de bacterias ácido lácticas disminuyó levemente y no se constató presencia de actinobacterias, que sí se habían encontrado en el orden de 10^3 en el mes 4. Para el caso de MEN B, a los 2 meses ya no se encontró presencia de levaduras, cuya abundancia en el mes 0 (al momento de estar listo para utilizarse) era del orden de 10^5 , y a los 6 meses no se constató presencia de actinobacterias, cuya abundancia era del orden de 10^3 en el mes 4, y se observó una disminución en la abundancia de bacterias ácido lácticas del 10% y una disminución de la abundancia de bacterias heterótrofas del 80% (Tabla 10).

Además a los 2 meses el MEN B sufrió un cambio en sus propiedades organolépticas, cambiando su color a un marrón oscuro y desarrollando un olor intenso diferente al esperado.

Tabla 10. Estabilidad de MEN A y MEN B durante su almacenamiento a partir de que está listo para utilizarse (mes 0)

Bioinsumo	Mes	Levaduras (UFC/ml)	Hongos filamentosos (UFC/ml)	Bacterias ácido lácticas (UFC/ml)	Bacterias Heterótrofas (UFC/ml)	Actinobacterias (UFC/ml)
MEN A	0	$1,6 \times 10^3$	<LD	$3,4 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$	$9,0 \times 10^2$
	2	$2,2 \times 10^3$	<LD	$2,3 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$2,0 \times 10^3$
	4	$2,1 \times 10^3$	<LD	$2,5 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$	$9,0 \times 10^3$
	6	$2,9 \times 10^4$	<LD	$2,9 \times 10^7$	$3,1 \times 10^8$	<LD
MEN B	0	$7,7 \times 10^5$	<LD	$1,2 \times 10^8$	$9,7 \times 10^7$	$1,2 \times 10^3$
	2	<LD	<LD	$3,3 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$3,0 \times 10^2$
	4	<LD	<LD	$2,8 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$3,0 \times 10^3$
	6	<LD	<LD	$1,3 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	<LD

*LD = Límite de detección 100 UFC/ml

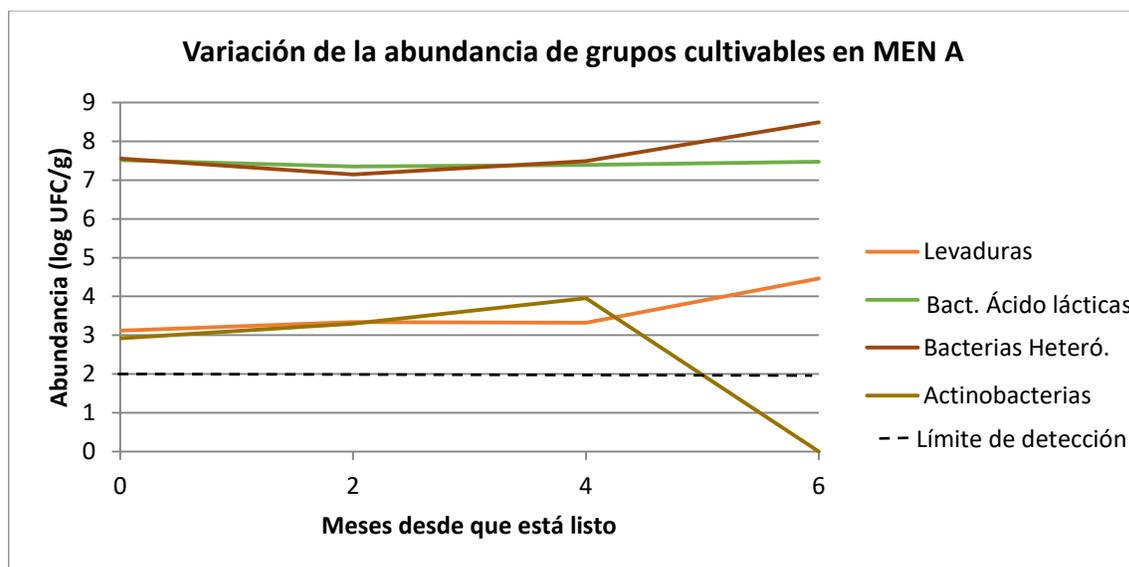


FIGURA 9. Estabilidad en el tiempo de la comunidad microbiana de MEN A.

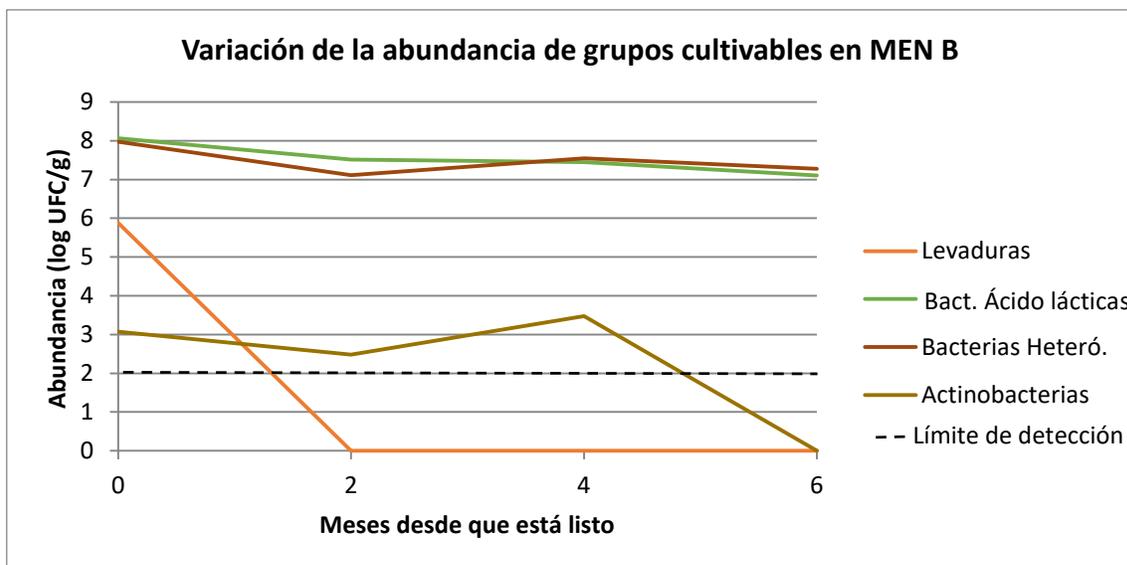


FIGURA 10. Estabilidad en el tiempo de la comunidad microbiana de MEN B.

6.2.2.4. Estructura de la comunidad de microorganismos en los biopreparados

Se estudió la estructura de la comunidad bacteriana total presente en BOK A, BOK B, MEN A, y MEN B, a distintos niveles taxonómicos. Se presentan los resultados obtenidos a nivel de filo y a nivel de género.

Para el caso de los bokashis, se identificaron 92 géneros comprendidos en 19 filos. Los filos más abundantes fueron Proteobacteria, con una abundancia relativa de 42,2% en BOK A y 50,8% en BOK B, Chloroflexi cuya abundancia relativa fue 28,4% en BOK A y 18,2% en BOK B, seguidos por los filos Acidobacteria y Planctomycetes (Figura 11). Los géneros mayoritarios resultaron ser *Herpetosiphon* con una abundancia relativa de 7,9% en BOK A y de 1,4% en BOK B, y *Pseudomonas* con abundancias relativas de 4,1% y 7,5% respectivamente. A nivel de género no se pudo identificar aproximadamente la mitad de las unidades taxonómicas operativas (OTU) en cada bokashi, categorizándolas como "Indefinidos" (Figura 12). A grandes rasgos la estructura de la comunidad de bacterias fue similar entre ambas preparaciones. Los porcentajes correspondientes a cada filo y género de las gráficas 11 y 12, se encuentran en el Anexo 3.

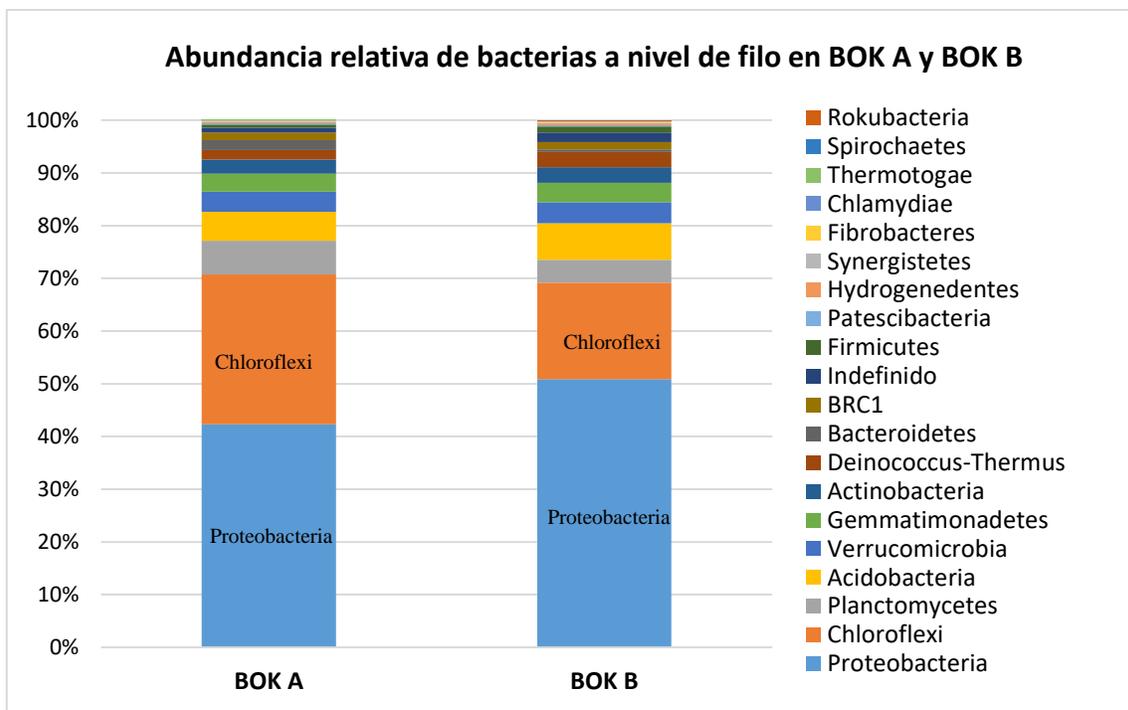


FIGURA 11. Estructura de la comunidad bacteriana a nivel de filo en BOK A y BOK B.

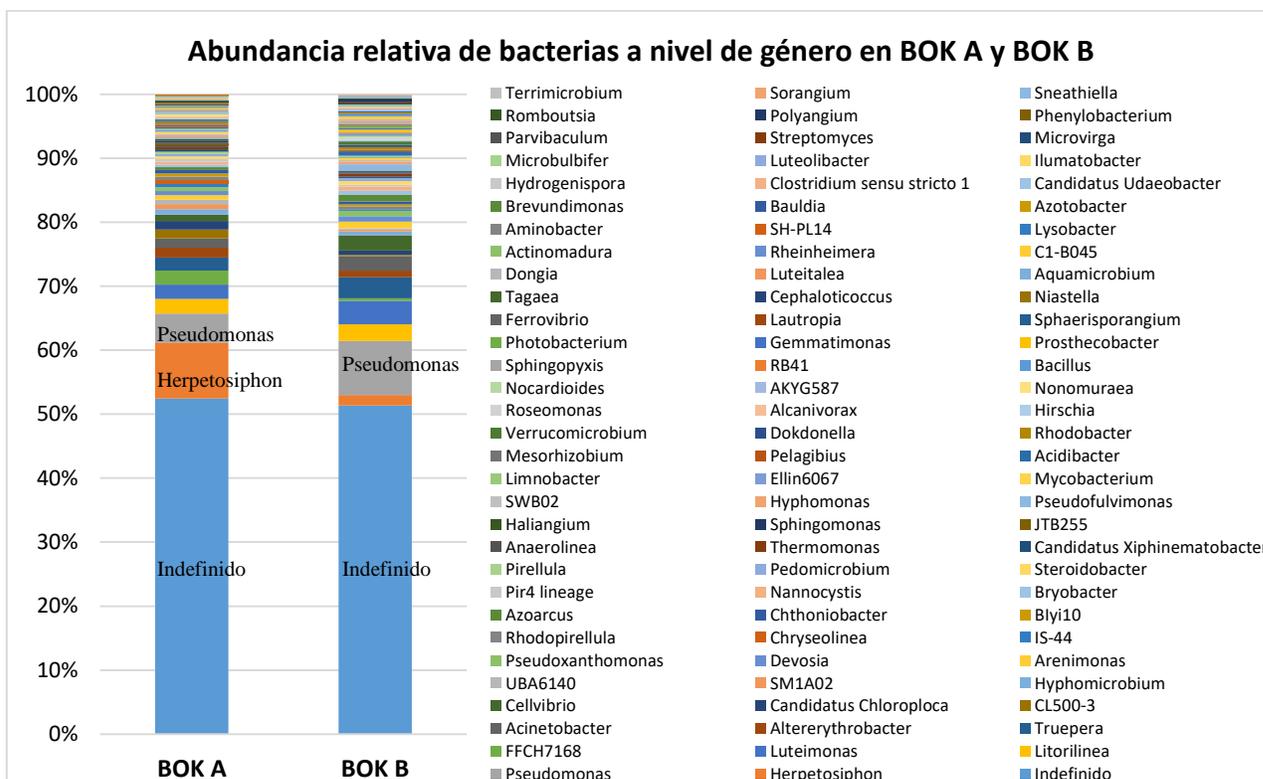


FIGURA 12. Estructura de la comunidad bacteriana a nivel de género en BOK A y BOK B.

Para los MEN A y B, se identificaron 11 filos. Los mayoritarios fueron: Firmicutes con abundancia relativa de 64,2% y 83,9%, respectivamente, y Proteobacteria con abundancia relativa de 35,8% y 15,9%, respectivamente. El resto de los filos que aparecen en la gráfica tienen una abundancia relativa menor a 0,04% (Figura 13). Se identificaron 22 géneros, siendo el mayoritario *Lactobacillus* con una abundancia relativa del 41,9% y 65,6% para MEN A y MEN B, respectivamente. Se encontraron diferencias entre las dos preparaciones en cuanto al resto de los géneros mayoritarios, algunos de ellos son: *Aeromonas*, *Lactococcus*, *Enterobacter*, y *Pediococcus* (Figura 14).

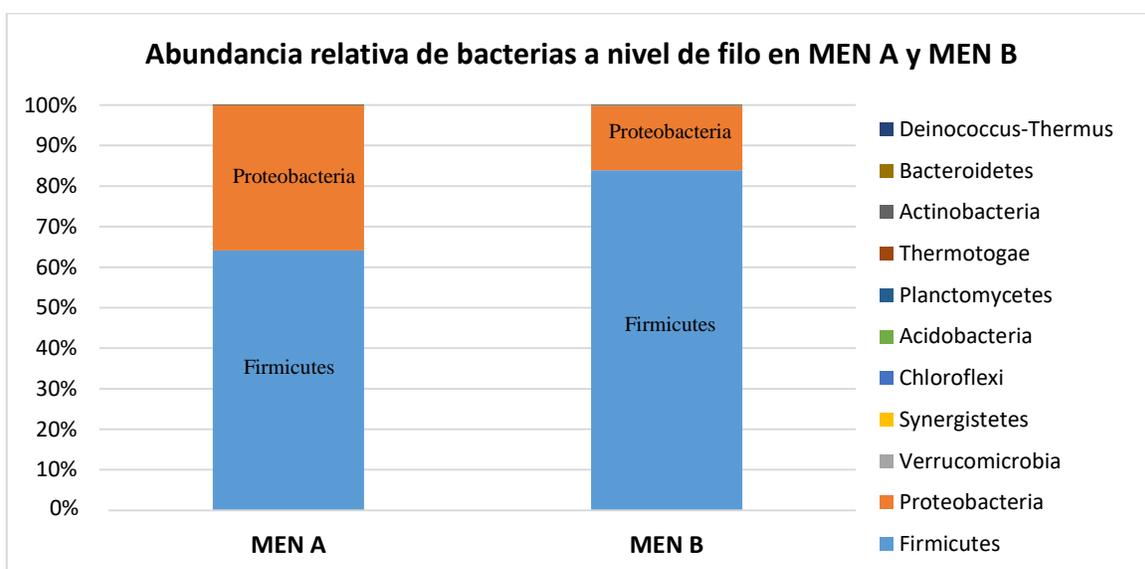


FIGURA 13. Estructura de la comunidad bacteriana a nivel de filo en MEN A y MEN B.

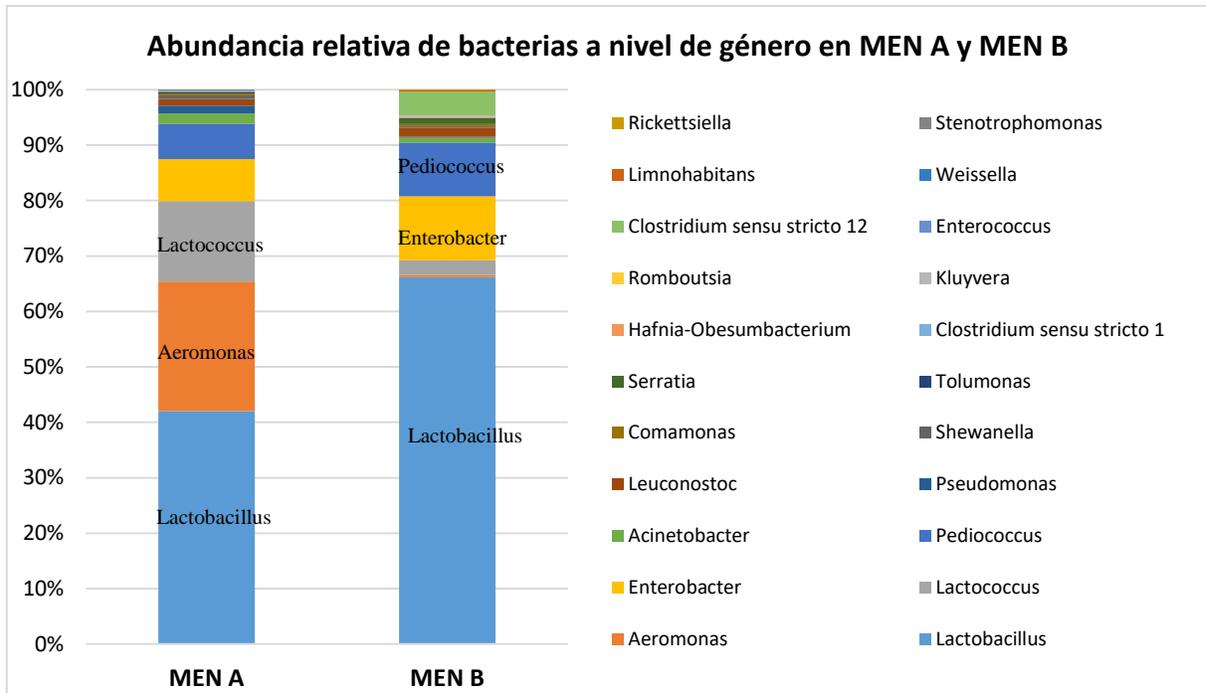


FIGURA 14. Estructura de la comunidad bacteriana a nivel de género en MEN A y MEN B.

Se estudió la estructura de la comunidad total de hongos presente en BOK A, BOK G, BOK E MEN A, y MEN E, a distintos niveles taxonómicos. Se presentan los resultados a nivel de filo y a nivel de género.

Para los distintos bokashi se identificaron 92 géneros pertenecientes a 11 filos. Los filos más abundantes fueron Ascomycota para BOK A, BOK G y BOK E, con abundancias relativas de 74,1%, 81,8% y 79,6% respectivamente, seguido por Mortierellomycota en el caso de BOK A, Basidiomycota en el caso de BOK G, y Rozellomycota en el caso de BOK E (Figura 15). Los géneros mayoritarios resultaron *Chaetomium*, *Zopfiella*, *Mortierella*, *Cladorrhinum*, y *Trichosporon* (Figura 16).

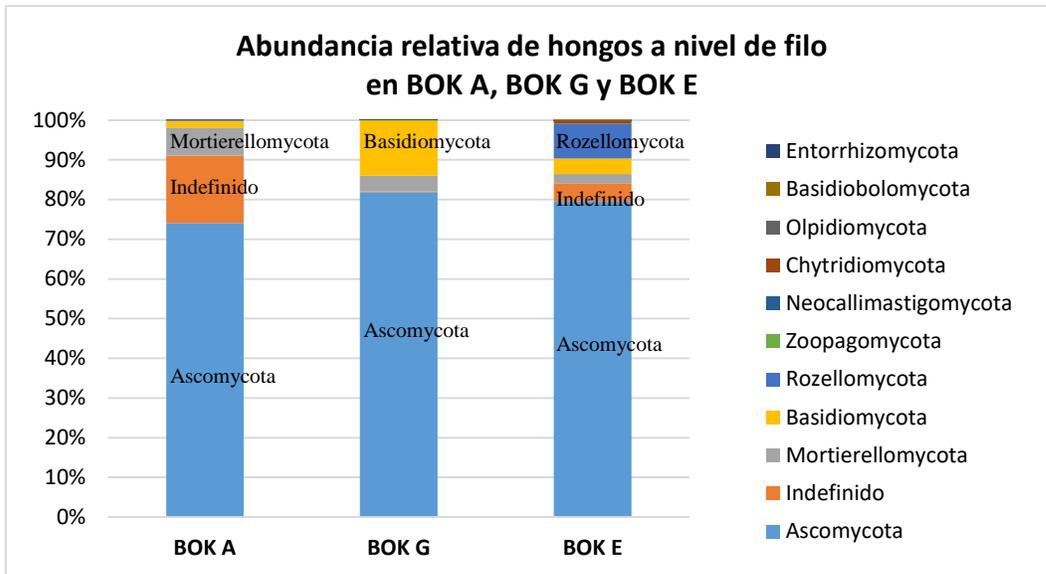


FIGURA 15. Estructura de la comunidad de hongos a nivel de filo en BOK A, BOK G y BOK E.

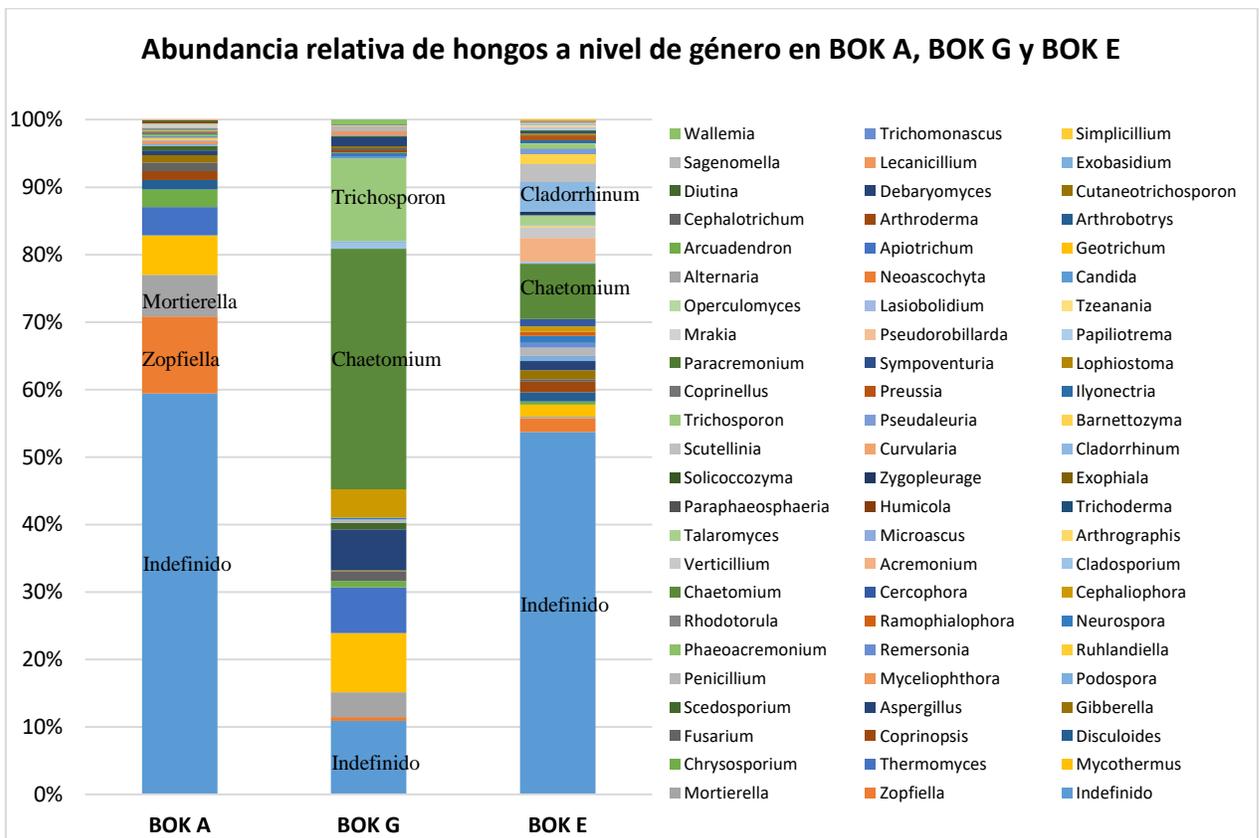


FIGURA 16. Estructura de la comunidad de hongos a nivel de género en BOK A, BOK G y BOK E.

Para MEN A y E se identificaron 2 filos: Ascomycota, el único presente en MEN A y 99,6% en MEN E, y Basidiomycota con una abundancia relativa de 0,4% en MEN E (Figura 17). Se identificaron 11 géneros, siendo los mayoritarios *Sacharomyces* en MEN A, con una abundancia relativa del 93,6% y *Candida* en MEN E, con una abundancia relativa del 93,7%. A pesar de que en ambos MEN dominaron las levaduras de la familia Saccharomycetaceae, éstos difirieron en los géneros que los componen (Figura 18).

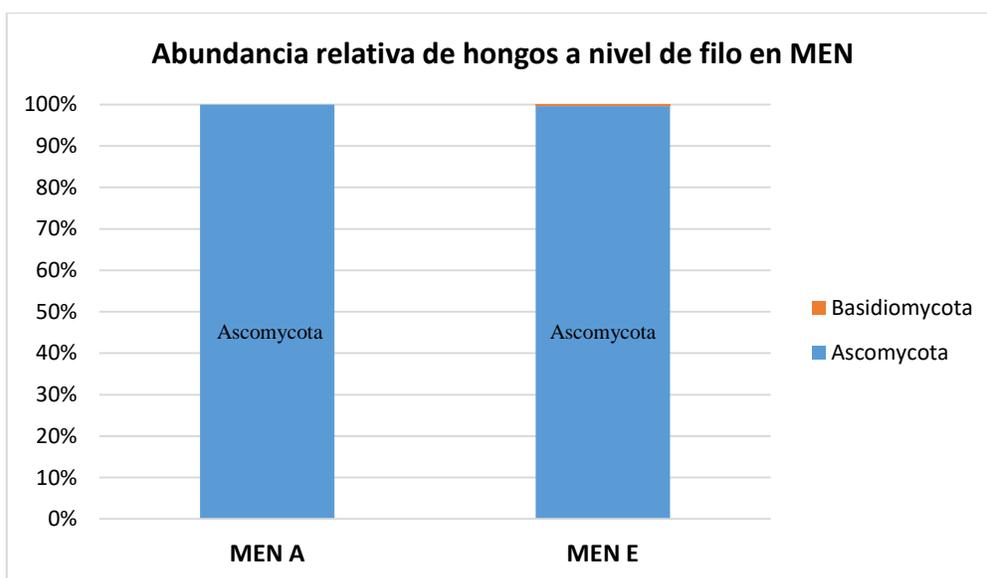


FIGURA 17. Estructura de la comunidad de hongos a nivel de filo en MEN A y MEN E.

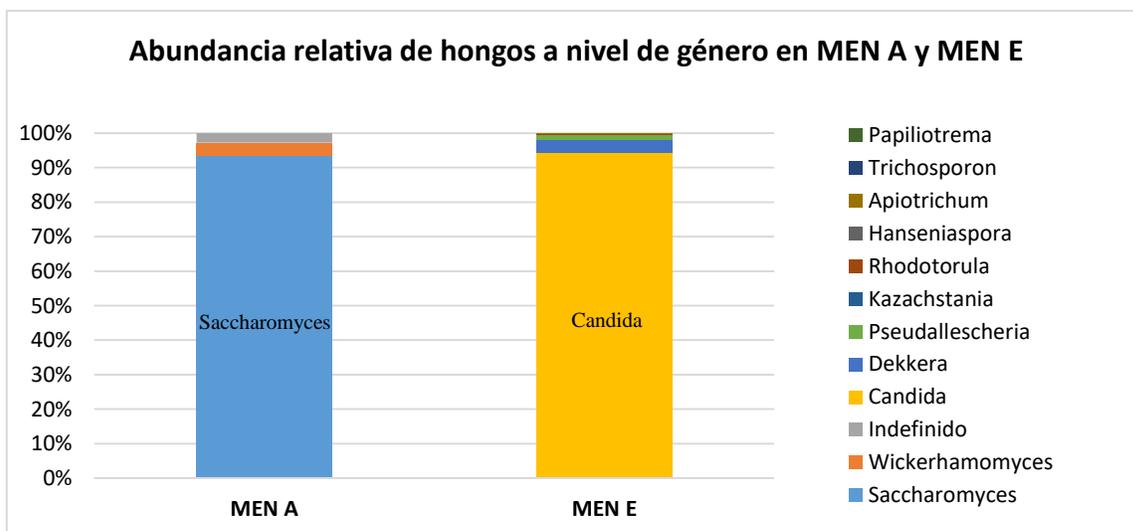


FIGURA 18. Estructura de la comunidad de hongos a nivel de género en MEN A y MEN E.

6.2.3. Caracterización por cromatografía de suelos

Por cromatografía se evaluó la maduración y calidad de BOK A, BOK B, y BOK E. La zona interna se ve color crema en los tres abonos lo cual indica que tienen una buena aireación y no están compactados en exceso, en especial BOK E cuya zona interna es mayor. La región mineral (zona media) es de mayor tamaño en BOK A y B en comparación con BOK E. Por otro lado, BOK E presentó mayor contenido de materia orgánica (zona media) que BOK A y B. La región enzimática (zona externa) que representa la actividad microbiológica está visible en los tres abonos. La poca integración entre las zonas refleja la elaboración rápida de este compost, donde no se han llegado descomponer todos los ingredientes. Los colores pardo, marrón y ocre son característicos en los abonos de buena calidad (Figura 19).

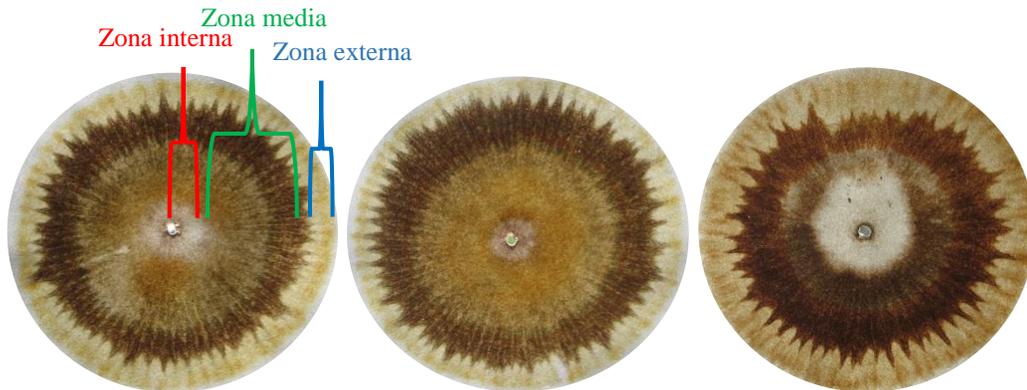


FIGURA 19. Cromatografía de suelos de BOK A (izquierda), BOK B (medio), y BOK E (derecha).

6.3. Efecto de la aplicación de biopreparados en el suelo y en el rendimiento de los cultivos

6.3.1. Ensayo de cultivo de papa en campo

6.3.1.1. Efecto de la aplicación de biopreparados en la comunidad microbiana del suelo

Se analizó mediante métodos dependientes de cultivo las abundancias de los grupos de interés en los suelos de los distintos tratamientos de un ensayo de cultivo de papa en campo (Figura 20). No hubo diferencias significativas para actinobacterias, bacterias heterótrofas totales, levaduras y hongos filamentosos, pero si para bacterias ácido lácticas cuya abundancia fue mayor en el tratamiento Control (C) en comparación con el que recibió aplicación de estiércol de gallina (EG) y el que recibió aplicación de bokashi y MEN (BM) (Tabla 11).

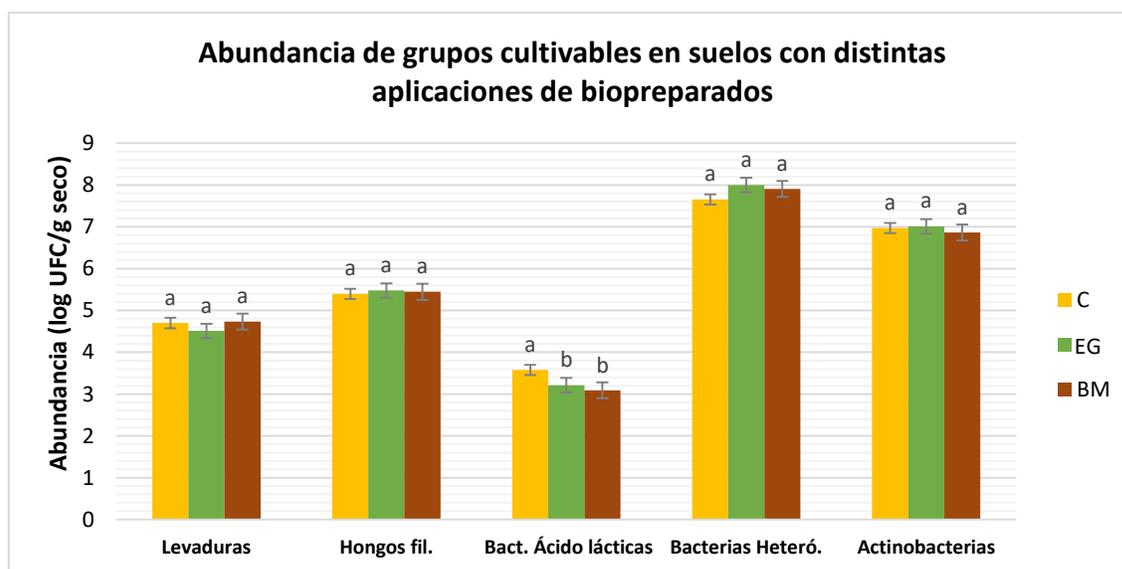


FIGURA 20. Abundancia de grupos cultivables en suelos de un cultivo de papa con tres tratamientos: Control (C), con agregado de estiércol de gallina (EG) y con agregado de bokashi y MEN (BM). Se grafica la media de 4 repeticiones; letras diferentes representan diferencias significativas entre un mismo grupo microbiano para cada tratamiento por ANOVA - Tukey's ($p < 0,05$).

Tabla 11. Abundancia de grupos cultivables en suelos de un cultivo de papa con tres tratamientos: Control (C), con agregado de estiércol de gallina (EG) y con agregado de bokashi y MEN (BM). Se expresa la media de 4 repeticiones para cada tratamiento, medido en unidades formadoras de colonia por gramo de suelo seco.

Tratamiento	Levaduras (UFC/g)	Hongos filamentosos (UFC/g)	Bacterias ácido lácticas (UFC/g)	Bacterias Heterótrofas (UFC/g)	Actinobacterias (UFC/g)
C	5,2 x 10 ⁴ a	2,9 x 10 ⁵ a	4,1 x 10 ³ a	5,5 x 10 ⁷ a	9,5 x 10 ⁶ a
EG	3,8 x 10 ⁴ a	3,2 x 10 ⁵ a	1,7 x 10 ³ b	1,1 x 10 ⁸ a	1,0 x 10 ⁷ a
BM	4,1 x 10 ⁴ a	3,2 x 10 ⁵ a	1,7 x 10 ³ b	8,7 x 10 ⁷ a	7,7 x 10 ⁶ a

6.3.1.2. Efecto de la aplicación de biopreparados en el rendimiento del cultivo de papa

La aplicación de biopreparados no mostró diferencias significativas en ninguna variable productiva (rendimiento/parcela, rendimiento/planta, severidad de enfermedades) bajo el análisis de máxima verosimilitud. Sin embargo, se observó una tendencia de mayor rendimiento y sanidad del tratamiento BM (con bokashi y MEN) frente al tratamiento C (control).

Tabla 12. Rendimiento por parcela, rendimiento por planta y severidad de enfermedades foliares en un cultivo de papa con tres tratamientos distintos. Se expresa la media de 4 repeticiones para cada tratamiento.

Tratamiento	Rendimiento/parcela (g)	Rendimiento/planta (g)	Severidad (% de hoja afectado)
C	2110 a	431 a	32 a
EG	2420 a	453 a	21 a
BM	2335 a	503 a	22 a

6.3.2. Ensayo de cultivo de lechuga en condiciones controladas

6.3.2.1. Efecto de la aplicación de biopreparados en la comunidad microbiana del suelo

Se analizaron por el método de recuento en placa, las abundancias de grupos microbianos de interés en los suelos de los diferentes tratamientos del ensayo de cultivo de lechuga en condiciones controladas (Figura 21).

Para las levaduras, se encontró la mayor abundancia en los tratamientos BOK y BSM, seguidos de BS+M, B+SM y MEN, mientras que la menor abundancia se encontró en el tratamiento AG, sin embargo ninguna de estas diferencias fueron significativas. Para los hongos filamentosos, se encontró la mayor abundancia en los tratamientos B+SM, BSM, BOK y BS+M, mientras que la menor abundancia se encontró en el tratamiento C, seguido por AG. Para las bacterias ácido lácticas, no se encontraron diferencias significativas, siendo BOK el tratamiento con mayor abundancia y SM y BS+M los que presentaron menor abundancia. Para las actinobacterias, se encontró la mayor abundancia en los tratamientos BSM, B+SM, BS+M y BOK, mientras que la menor abundancia se halló en los tratamientos C, SM y MEN. Para las bacterias heterótrofas totales, la mayor abundancia se encontró en los tratamientos B+SM, BS+M, BSM, BOK y CP, mientras que la menor abundancia se halló en los tratamientos C, AG y SM. En resumen, se observó un aumento significativo de la abundancia de hongos filamentosos, bacterias heterótrofas y actinobacterias en los tratamientos con aplicación de bokashi respecto al control, al agregado de fertilizante sintético, SM y MEN, y una tendencia al aumento de la abundancia de levaduras y bacterias ácido lácticas. (Tabla 13).

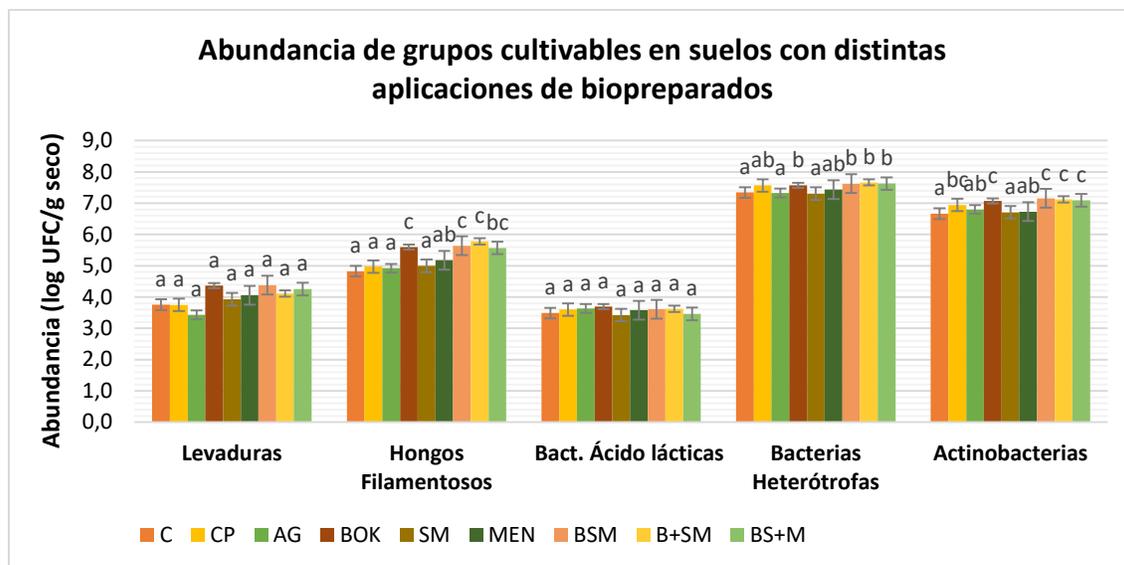


FIGURA 21. Abundancia de grupos cultivables en suelos de un cultivo de lechuga con distintos tratamientos. C: Control (sólo con agua de riego), CP: 40g de cama de pollo por maceta, AG: Fertilizante químico diluido al 8%, BOK: 280g (~450ml) de bokashi por maceta, SM: Supermagro diluido al 5%, MEN: Microorganismos Eficientes Nativos diluidos al 5%, BSM: 280g bokashi + Supermagro al 5% + MEN al 5%, B+SM: 400g (~800ml) de bokashi + supermagro al 5% + MEN al 5%, BS+M: 280g de bokashi + supermagro al 10% + MEN al 5%. Se grafica la media de 4 repeticiones; letras diferentes representan diferencias significativas entre un mismo grupo microbiano para cada tratamiento por ANOVA - Tukey's ($p < 0,05$).

Tabla 13. Abundancia de grupos de microorganismos de interés en suelos de un cultivo de lechuga con distintas aplicaciones de biopreparados. Medido en unidades formadoras de colonia por gramo de suelo seco.

Tratamiento	Levaduras (UFC/g)	Hongos Filamentosos (UFC/g)	Bacterias ácido lácticas (UFC/g)	Bacterias heterótrofas (UFC/g)	Actinobacterias (UFC/g)
C	$5,7 \times 10^3$ a	$6,7 \times 10^4$ a	$3,1 \times 10^3$ a	$2,2 \times 10^7$ a	$4,6 \times 10^6$ a
CP	$5,6 \times 10^3$ a	$9,4 \times 10^4$ a	$3,9 \times 10^3$ a	$3,7 \times 10^7$ ab	$8,7 \times 10^6$ bc
AG	$2,7 \times 10^3$ a	$8,3 \times 10^4$ a	$4,3 \times 10^3$ a	$2,1 \times 10^7$ a	$6,3 \times 10^6$ ab
BOK	$2,3 \times 10^4$ a	$3,9 \times 10^5$ c	$4,9 \times 10^3$ a	$3,7 \times 10^7$ b	$1,2 \times 10^7$ c
Sm	$8,5 \times 10^3$ a	$9,9 \times 10^4$ a	$2,6 \times 10^3$ a	$2,0 \times 10^7$ a	$5,1 \times 10^6$ a
MEN	$1,1 \times 10^4$ a	$1,5 \times 10^5$ ab	$3,8 \times 10^3$ a	$2,7 \times 10^7$ ab	$5,3 \times 10^6$ ab
BSM	$2,4 \times 10^4$ a	$4,4 \times 10^5$ c	$4,1 \times 10^3$ a	$4,2 \times 10^7$ b	$1,4 \times 10^7$ c
B+SM	$1,3 \times 10^4$ a	$5,9 \times 10^5$ c	$4,2 \times 10^3$ a	$4,6 \times 10^7$ b	$1,3 \times 10^7$ c
BS+M	$1,8 \times 10^4$ a	$3,7 \times 10^5$ bc	$2,9 \times 10^3$ a	$4,2 \times 10^7$ b	$1,2 \times 10^7$ c

Se analizó por respiración la actividad microbiana en los suelos de los distintos tratamientos del ensayo de lechuga. El suelo tratado con bokashi (BOK) fue el que presentó mayor actividad microbiana, siendo ésta 5 veces mayor que la actividad microbiana del suelo tratado con aplicación de fertilizante sintético (AG), 4 veces mayor que los suelos tratados

con cama de pollo (CP) o con aplicación de Microorganismos Eficientes Nativos (MEN), y 3 veces mayor que el tratamiento control (C) (Figura 22).

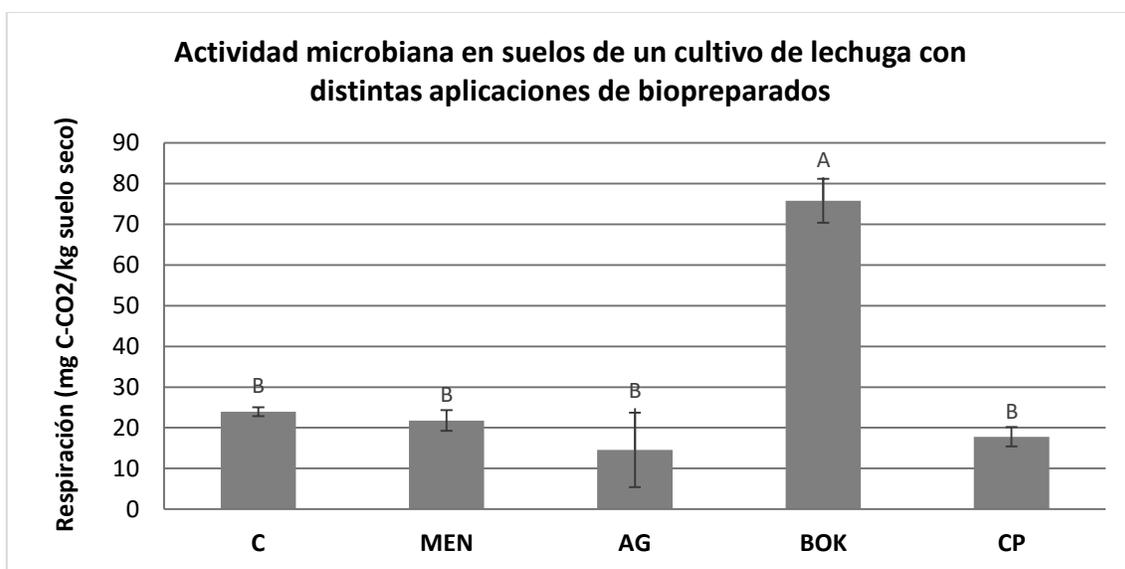


Figura 22. Actividad microbiana en el sustrato medida como respiración. Se grafica la media de 4 repeticiones; letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos por ANOVA - Tukey's ($p < 0,05$); las barras de error representan el desvío estándar.

6.3.2.2. Efecto de la aplicación de biopreparados en las propiedades del suelo

Se estudió por el método de cromatografía de suelo, las muestras de los distintos tratamientos al finalizar el ensayo. Ninguno de los suelos presentó buena integración de las distintas zonas del cromatograma. La zona interna se observa pequeña y de color oscuro lo que refleja una estructura pobre, de un suelo compactado, y con poca aireación. La zona media muestra una amplia zona mineral similar en todas las muestras y la zona que representa la materia orgánica ocupa una proporción minoritaria. En cuanto a la zona externa, se observa actividad enzimática mayor en CP, AG, BOK, SM, MEN, y BSM. Las diferencias observadas son menores.

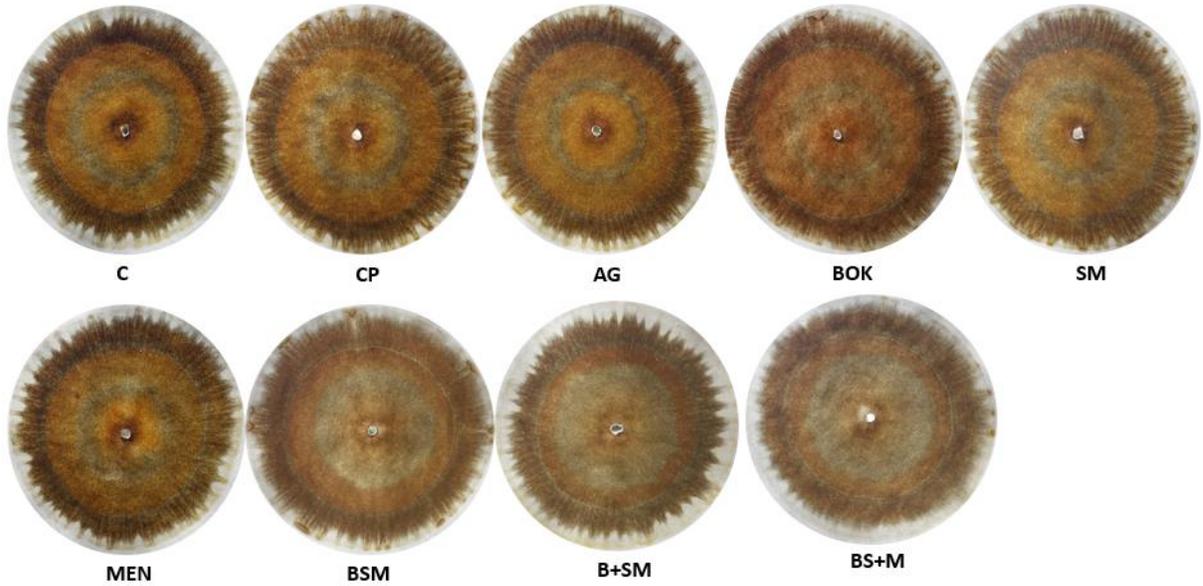


Figura 23. Cromatografías de suelo de los diferentes tratamientos del ensayo de cultivo de lechuga.

6.3.2.3. Efecto de la aplicación de biopreparados en el rendimiento del cultivo de lechuga

Se analizaron parámetros agronómicos para evaluar el rendimiento del cultivo de lechuga en condiciones controladas. Se presentan los resultados de los siguientes parámetros evaluados: peso fresco y seco tanto de parte aérea como de raíces (Tabla 14).

Se observó que CP y AG tuvieron los mayores pesos frescos de parte aérea, seguidos por BOK, sin embargo en cuanto al peso seco de parte aérea, BOK fue el único que se diferenció significativamente del control. Además BOK fue el que presentó menor relación entre peso fresco y seco de parte aérea, evidenciando una menor acumulación de agua en los tejidos.

En relación al peso fresco y seco de raíz, el valor más alto fue el de BOK, y los tratamientos que mostraron menor relación entre peso fresco y seco de raíz fueron B+SM, MEN, BOK y BSM, nuevamente evidenciando una menor acumulación de agua en los tejidos.

Tabla 14. Valores de peso fresco y seco de parte aérea y de raíz en cultivo de lechuga en condiciones controladas.

Valores medios de 4 repeticiones; letras diferentes representan diferencias significativas para cada variable; *diferencia significativa con el control (C) por ANOVA - Tukey's ($p < 0,05$).

Tratamiento	Peso fresco foliar (g)	Peso seco foliar (g)	Fresco/seco foliar	Peso fresco raíz (g)	Peso seco raíz (g)	Fresco/seco radicular
C	28,86 c	1,35 b	25,27	1,89 b	0,16 b	14,27
CP	62,44 a	2,27 ab	30,02	3,73 ab	0,39 ab	11,67
AG	46,56 a	2,11 ab	23,10	1,87 b	0,14 b	13,58
BOK	32,90 b	2,47 a	13,43 *	5,26 a	0,74 a	8,63 *
Sm	26,58 c	1,38 ab	21,74	1,41 b	0,17 b	10,27
MEN	24,20 c	1,65 ab	15,11	2,77 ab	0,34 a	8,14 *
BSM	23,42 c	1,29 b	20,12	2,18 ab	0,31 ab	8,69 *
B+SM	18,18 d	1,44 ab	13,93	2,68 ab	0,47 ab	7,95 *
BS+M	25,62 c	1,50 ab	17,42	1,69 b	0,16 b	11,43

7. Discusión

7.1. Caracterización del abono Bokashi

7.1.1. Caracterización fisicoquímica

Se obtuvieron resultados muy diferentes para los distintos parámetros analizados, en especial para los macronutrientes, lo que puede deberse a diferencias entre los materiales utilizados inicialmente para su producción, ya que tuvieron diferentes procedencias, como por ejemplo el estiércol y al suelo, cuyas composiciones de nutrientes pueden ser muy diferentes según el estado de maduración del estiércol o las características del suelo. Pérez *et al.* (2008) analizaron la composición físico-química de 6 bokashis, observando variabilidades importantes entre cada uno de los parámetros observados en cada bokashi, lo que le atribuyen a la cantidad de humedad (relacionada con el lavado de los nutrientes y la actividad microbiana), la calidad de la materia prima utilizada, si es estiércol fresco o viejo, y de qué especie de animal y tipo de crianza proviene.

En ambos bokashis el pH resultó ligeramente alcalino y lo mismo reportaron Arrieta *et al.* (2018) y Pérez *et al.* (2008), esto puede deberse al tipo de insumos utilizados en su elaboración, como es el carbonato de calcio cuyo aporte aumenta el pH.

La relación C/N del BOK E con un valor de 40.9 demuestra que ese lote resultó en un abono de lenta liberación de nutrientes, ya que los microorganismos carecen del nitrógeno necesario para descomponer la materia orgánica y metabolizar el carbono orgánico contenido en la misma. Esto se puede explicar por el tipo de estiércol utilizado, que en esa ocasión no fue fresco, estaba carente de orina, y por tanto deficiente en nitrógeno. Esta relación puede manipularse fácilmente utilizando un estiércol más fresco, o aumentando la cantidad de este ingrediente, lo cual ha sido experimentado por la empresa Ecosativa

logrando relación C/N de 10:1 a 30:1, prefiriéndose como valor óptimo entre 15:1 y 20:1 para que el nitrógeno esté disponible al ser aplicado en los cultivos (A. Ferreira, comunicación personal, 3 de abril de 2021).

Cabe destacar que los aportes del abono bokashi, no son solamente sus nutrientes, sino el aporte de materia orgánica compleja y microorganismos. La materia orgánica se irá mineralizando por acción de los microorganismos a medida que el cultivo se vaya desarrollando y de esta manera evitar excesos y lixiviaciones o volatilización de nutrientes como el nitrógeno (Pérez *et al.*, 2012). BOK E, presentó un contenido de materia orgánica del 29%, lo cual está dentro de los valores encontrados por Pérez *et al.* (2008) al analizar 6 bokashis producidos en distintas granjas, cuyos porcentajes de materia orgánica variaron entre 25 y 40%. Por su parte la empresa Ecosativa, luego de analizar 6 bokashis producidos, encontró que el promedio del porcentaje de materia orgánica fue 34%, siendo el valor menor 29% y el mayor 48% (A. Ferreira, comunicación personal, 3 de abril de 2021). El otro aporte del bokashi son los microorganismos, que descomponen la materia orgánica y sintetizan sustancias que pueden promover el crecimiento vegetal, permitir la disponibilidad de nutrientes como por ejemplo el fósforo, y competir o inhibir otros microorganismos patógenos (Restrepo, 2007; Ortiz, 2009; Chaudhary *et al.*, 2013).

7.1.2. Caracterización microbiológica

A grandes rasgos se puede considerar que las abundancias de los principales grupos de microorganismos cultivables de interés se mantuvieron en una proporción similar entre sí para cada uno de los distintos bokashis analizados. El grupo de bacterias heterótrofas, que abarca la gran mayoría de las bacterias descomponedoras de materia orgánica fue el más abundante, alcanzando valores medios de 8,2 log UFC/g; seguido por las actinobacterias, con una abundancia media de 7,3 log UFC/g, conocidas por su capacidad para producir compuestos antimicrobianos que pueden ayudar a inhibir la proliferación de patógenos; bacterias ácido lácticas con 5,5 log UFC/g, promotores de la fermentación láctica de la

materia orgánica y productores de ácido láctico que inhibe el desarrollo de patógenos; y en menor cantidad se encontraron los hongos filamentosos, con 4,5 log UFC/g, descomponedores de materia orgánica; y levaduras, con 4,2 log UFC/g, que producen hormonas y enzimas que son utilizadas por el resto de la comunidad microbiana; y no se encontraron bacterias fototróficas. Existieron variaciones como en el caso de BOK B que presentó mayor cantidad de actinobacterias en comparación a BOK A, o BOK R que presentó menor abundancia de hongos filamentosos y levaduras en comparación al resto, o BOK E que presentó menor abundancia para todos los grupos de microorganismos de interés. Esto pudo deberse a diferencias en el proceso de producción como son las diferentes temperaturas alcanzadas durante el proceso de descomposición y la cantidad de agua empleada, que normalmente no es medida de forma cuantitativa, sino con la técnica cualitativa del puño, donde se evalúa que al apretar un puñado de bokashi, no escurra agua pero mantenga la estructura y no se desmorone al abrir la palma de la mano (Restrepo, 2007).

El bokashi requiere volteos frecuentes para mantener las temperaturas en el entorno de los 50°C (Soto *et al.*, 2003), pero en los primeros días se busca que esta temperatura alcance entre 60 y 65°C para asegurar la eliminación de microorganismos patógenos (Román *et al.*, 2013), esto puede explicar que haya menor abundancia de hongos en comparación con bacterias en el bokashi, puesto que estos no toleran temperaturas superiores a 50°C (Tiquia *et al.*, 2002), lo que favorece a las bacterias heterótrofas, actinobacterias y bacterias ácido lácticas, cuya velocidad de reproducción es más rápida en comparación con los hongos (Atlas y Bartha, 2002).

Se identificaron por métodos independientes de cultivo un total de 92 géneros de bacterias y 72 géneros de hongos en los bokashis analizados. Berendsen *et al.* (2012) expresa que varios microorganismos identificados en abonos como el bokashi tienen el potencial de suprimir las enfermedades transmitidas por el suelo, sin embargo la capacidad de los abonos orgánicos para suprimir patógenos se ha atribuido a la cantidad y diversidad microbiana total, es decir una supresión general de enfermedades (Berendsen *et al.*, 2012).

Para los efectos de esta tesis, se comentará la presencia o ausencia de algunos grupos de interés y sus potencialidades en cuanto a degradación de materia orgánica, promoción del crecimiento vegetal o control de enfermedades.

Al realizar la secuenciación masiva para determinar la composición de la comunidad de bacterias de los bokashis A y B, se observó que el filo dominante fue Proteobacteria con abundancia relativa de 42% y 51%, respectivamente, seguido por Chloroflexi con abundancia relativa de 28% y 18%, y otros filios en abundancias menores al 7% como Planctomycetes, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Gemmatimonadetes, Actinobacteria, entre otros. Blaya *et al.* (2016), encontraron una mayor abundancia de los filios Proteobacteria y Chloroflexi, en abonos supresivos del hongo *Phytophthora nicotianae* en cultivos de morrones. Por su parte Yu *et al.* (2015), encontraron que los abonos con más abundancia de los filios Acidobacteria y Actinobacteria, eran supresores del hongo *Pythium* en pepino, estos filios se encontraron en abundancias relativas menores al 10%, sin embargo, su presencia podría potencialmente colaborar con la supresión de diversos patógenos, por la capacidad de producción de antibióticos y ácidos orgánicos.

Dentro del filo Proteobacteria, *Pseudomonas* fue el género más abundante en BOK B y el segundo más abundante en BOK A. Muchas cepas de *Pseudomonas* son consideradas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y tienen potencial de control biológico (Weller, 2007). La inoculación de semillas con *Pseudomonas* previo a la siembra, es una práctica utilizada para prevenir el ataque de enfermedades. Entre algunas de las enfermedades que pueden controlar está la antracnosis causada por *Colletotrichum orbiculare*, el mal del talluelo o marchitamiento fúngico causado por diversos hongos de géneros como *Botrytis*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Sclerotinium*, el mal del pie causado por *Gaeumannomyces graminis*, e infecciones causadas por *Fusarium* (Gao *et al.*, 2018; Haddoudi *et al.*, 2017; Mavrodi *et al.*, 2012; Weller, 2007). Algunas *Pseudomonas* spp. poseen la capacidad de producción de sideróforos que limitan la cantidad de hierro disponible para microorganismos patógenos (Matthijs *et al.*, 2007). Este tipo de rizobacterias, cuando son utilizadas para inocular semillas, tienen facilidad para distribuirse

rápidamente en todo el sistema radicular de la planta, aumentando las poblaciones en comparación con otras plantas que no fueron inoculadas, y persistiendo durante varios meses por ser buenas colonizadoras de la raíz (Yanes y Bajsa, 2016).

El filo Chloroflexi es abundante en los abonos orgánicos fabricados con estiércol animal y participan de la degradación inicial de macromoléculas como azúcares, almidón y restos celulares (Li *et al.*, 2019). No se ha visto que tengan una función de promoción del crecimiento vegetal o control biológico de enfermedades, sin embargo, por su abundancia y presencia en diversidad de ambientes, se considera que ocupan un lugar importante en la ecología de la comunidad microbiana.

Las bacterias del filo Acidobacteria son consideradas como ingenieras del ecosistema del suelo agrícola, por ser descomponedoras de la materia orgánica, participar de los procesos de desnitrificación, y se las considera piedra fundamental (“key stone”) de los ecosistemas agrícolas (Kalam *et al.*, 2020).

En relación al filo Actinobacteria, está bien documentada su capacidad de producción de compuestos antibióticos y de enzimas que degradan la pared celular de hongos y bacterias (Pal y Gardener, 2006). También tienen la capacidad de producir sideróforos y de esta manera promover el crecimiento vegetal, inhibir patógenos o fitoremediar suelos contaminados con metales pesados (Palaniyandi *et al.*, 2013).

Al realizar la secuenciación masiva para determinar la composición de la comunidad de hongos de los bokashis A, G y E, en todas las muestras se encontró que el filo dominante fue Ascomycota con una abundancia relativa mayor a 74%, seguido por los filos Basidiomycota, Mortierellomycota y Rozellomycota en una abundancia relativa sensiblemente menor. Sin embargo, a nivel de género se encontraron diferencias en la composición, encontrándose los géneros *Zopfiella*, *Mortierella* y *Mycothermus* dominando en BOK A, *Chaetomium*, *Trichosporon* y *Mycothermus* dominando en BOK G, y *Chaetomium* y *Cladorrhinum* dominando BOK E, sin embargo, sus abundancias relativas no superaron el

12% del total de la población de hongos, excepto para *Chaetomium* en BOK G cuya abundancia relativa fue de 35%.

La composición de la comunidad microbiana de los abonos orgánicos depende ampliamente de la comunidad microbiana que aportan las materias primas, por lo que es de esperar que bokashis que utilizaron diferentes estiércoles, tierra y materiales secos, difieran en su composición especialmente a nivel de género.

Representantes de los géneros antes mencionados (*Chaetomium*, *Zopfiella*, *Mortierella*, *Mycothermus*, *Trichosporon* y *Cladorrhinum*) han sido reportados como microorganismos supresores de enfermedades del suelo, causadas por *Fusarium*, *Pythium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, y/o *Phytophthora* (Xiong *et al.*, 2017; Aswini, 2019, Huang *et al.*, 2019). Huang *et al.* (2019) encontraron que el aumento de la abundancia relativa de *Zopfiella* y *Mycothermus* estaba correlacionado con la disminución de la abundancia relativa de *Fusarium*. Asimismo, Blaya *et al.* (2016) encontraron una mayor abundancia de *Zopfiella* y de una cepa no patógena de *Fusarium*, en compost supresivos de *Phytophthora*.

No se encontraron por secuenciación masiva microorganismos patógenos de humanos como *Escherichia* o *Salmonella*, lo que se puede atribuir a un correcto proceso de producción. La presencia de coliformes como *Escherichia* puede ser un problema a la hora de fabricar abonos orgánicos utilizando como materia prima estiércol, es por esto que según la resolución N°97/018 del MGAP, la abundancia de coliformes fecales máxima permitida en un abono orgánico es de $1,0 \times 10^3$ UFC/g.

Por otra parte se encontró presencia del género *Fusarium* en BOK A, G y E, con abundancias relativas de entre 0,4% y 1,4%. Este género está conformado por algunas cepas causantes de enfermedades de las plantas, aunque cabe destacar que no todas las especies y cepas son patógenas (Nelson *et al.*, 1994). Vale la pena mencionar la presencia de este hongo en los bokashis, puesto que muchas veces se recomienda al abono bokashi para suprimir el desarrollo de enfermedades causadas por *Fusarium*, en especial por la presencia de actinobacterias presentes en este tipo de abonos (Gopalakrishnan *et al.*, 2010).

Con el objetivo de observar si había alguna variación en las abundancias de los principales grupos de interés al sustituir algún ingrediente de la preparación original de Restrepo (2007) por otro más accesible en la localidad, se produjeron dos bokashis, uno al cual se le sustituyó parte de la cascarilla de arroz por aserrín (BOK A). Entre BOK A y BOK B no se encontraron diferencias significativas en los recuentos de ninguno de los grupos analizados. Esto es interesante ya que permite la posibilidad de cambiar ingredientes, dando más independencia a los productores a la hora de fabricar sus abonos orgánicos. La cascarilla de arroz aporta carbono a la mezcla, al igual que el aserrín, ambos tienen una relación C/N específica, que hay que considerar para que el proceso de descomposición de la materia orgánica se dé de forma eficiente por parte de los microorganismos. Considerando que el aserrín contiene una relación C/N 10 veces más alta, es importante colocar 10 veces menos de este material, lo que fue tenido en cuenta, de modo que la relación total al mezclar con el estiércol no genere una falta de nitrógeno para que los microorganismos puedan descomponer la materia orgánica (Roman *et al.*, 2013). Pérez *et al.* (2013) obtuvieron resultados diferentes al analizar actinobacterias, bacterias heterótrofas y hongos filamentosos en 6 bokashis fabricados con diferentes ingredientes, observando que las actinobacterias fueron el grupo de menor variación, mientras que los hongos fueron los que más variaron. Los investigadores concluyen que la cantidad de microorganismos en las enmiendas orgánicas depende de factores como temperatura, humedad, pH, y una disponibilidad de nutrientes balanceada. Este último punto es a lo que hacemos referencia a la hora de tener en cuenta la cantidad de carbono y de nitrógeno del ingrediente a sustituir. Por su parte, Jairo Restrepo (2007) en su libro ABC de la Agricultura Orgánica, comunica diversidad de recetas para fabricar el abono bokashi, variando las proporciones y teniendo en cuenta todas las características antes mencionadas para realizar un correcto abono. En su libro él escribe: “Los diferentes materiales que se encuentran disponibles en las diversas zonas de trabajo, más la creatividad de los campesinos, hace que se puedan variar las formulaciones o las recetas, haciéndolas más apropiadas a cada actividad agropecuaria o condición rural”.

Para determinar cómo afectaba el almacenamiento a las poblaciones de estos grupos de microorganismos, se hicieron recuentos cada dos meses después de estar listo para su utilización. Se observó que las abundancias de estos grupos variaron durante su almacenamiento de forma similar para BOK A y BOK B, lo que demuestra una vez más que el comportamiento de los microorganismos en estas preparaciones fue similar. Levaduras, bacterias ácido lácticas, actinobacterias y bacterias heterótrofas disminuyeron sus poblaciones a casi la mitad en ambos bokashis, mientras que los hongos filamentosos aumentaron al triple su abundancia en BOK A, aunque en BOK B su abundancia casi no varió. Esto es coincidente con lo reportado por Baltodano (2002) que observó que las poblaciones de hongos aumentaron a los 60 días mientras que actinobacterias y bacterias heterótrofas disminuyeron durante ese almacenamiento. También observó que la mayor abundancia de bacterias se dio a los 15 días de iniciada la fabricación, es decir al momento de estar listo para su utilización, lo cual también coincide con los resultados obtenidos para BOK A y BOK B. Esta información permite a los productores decidir cuánta cantidad producir, incluso asociarse para producir en conjunto mayores cantidades, y almacenarlo, sabiendo se conservarán los grupos microbianos de interés al menos hasta los 6 meses de almacenamiento.

7.1.3. Caracterización por cromatografía de suelos

Para aportar más información a la caracterización de los bokashis se realizó un análisis por el método de cromatografía de suelos (Restrepo y Pinheiro, 2011), de BOK A, B y E. Esta técnica permitió observar de forma cualitativa las cualidades de los tres abonos. Esta técnica tiene la cualidad de poder ser aplicada por los propios productores en sus campos, sin necesidad de realizar grandes inversiones. No brinda información cuantitativa, pero sí permite comparar distintos suelos o abonos y ver las principales características que normalmente se quiere observar, como es la cantidad de materia orgánica, de minerales, la actividad microbiológica y producción de enzimas por parte de los microorganismos, la estructura y porosidad del suelo, capacidad de retención de agua, presencia de plaguicidas,

entre otras cosas. La zona interna se ve color crema en los tres abonos lo cual es algo bueno, porque indica que el abono tiene buena aireación y no está compactado en exceso. La zona que sigue hacia afuera representa la región mineral, la cual es de mayor tamaño y está mejor integrada con la zona que representa la materia orgánica en BOK A y B en comparación con BOK E, esto significa que hay mayor cantidad de nutrientes disponibles para las plantas por la actividad de microorganismos que metabolizan la materia orgánica, lo cual concuerda con las mayores abundancias de bacterias heterótrofas y hongos filamentosos observadas en los recuentos de BOK A y B. Por otro lado, BOK E presentó mayor contenido de materia orgánica que BOK A y B, lo cual es esperable, ya que BOK E presentó una relación C/N muy alta, limitando la capacidad de los microorganismos de degradar la materia orgánica. De esta forma, con este tipo de análisis un productor puede tener una idea de si el abono que produjo es de buena calidad y qué decisiones tomar para obtener un producto más cercano a sus intereses.

7.2. Caracterización de Microorganismos Eficientes Nativos

7.2.1. Caracterización microbiológica

Los tres MEN analizados presentaron valores de recuentos distintos para cada uno de los grupos de microorganismos estudiados. MEN A y MEN B fueron más parecidos entre sí en comparación con MEN E, mientras que en los primeros dos no se encontraron hongos filamentosos en los recuentos, en MEN E se encontraron en una abundancia del orden de 10^4 UFC/ml; y mientras que en los recuentos de MEN A y MEN B se registraron actinobacterias del orden de 10^4 UFC/ml (datos que luego serían contrastados por los resultados de secuenciación masiva), en MEN E estuvieron por debajo del límite de detección. Esto demuestra una variabilidad entre distintos MEN preparados por distintos productores, aunque los grupos dominantes que son las bacterias ácido lácticas y las

levaduras se mantuvieron similares. En ninguno de los tres MEN se encontraron bacterias fototróficas, lo cual no es coincidente con la información que se encuentra en manuales y artículos científicos donde se señala que los MEN contienen este tipo de bacterias (Ab Muttilab *et al.*, 2016; Feijoo, 2016). Estas bacterias autótrofas facultativas sintetizan sustancias útiles a partir de secreciones de raíces y materia orgánica, usando la luz solar como fuente de energía, sirviendo estos metabolitos como fuente de alimento para otros microorganismos y por eso se las considera clave en el consorcio de microorganismos eficientes (Martínez *et al.*, 2014; Joshi *et al.*, 2019). Al momento de estar listo para su utilización, el MEN B al cual se le había añadido cenizas con el objetivo de agregar micronutrientes a la preparación, tenía abundancias mayores de levaduras, bacterias ácido lácticas y bacterias heterótrofas que MEN A y MEN E, esto puede deberse a la presencia de minerales que sirvieron de nutrientes para el desarrollo de las poblaciones durante el proceso de fermentación (Ruiz López, 2013).

Se analizó por secuenciación masiva la comunidad de bacterias de MEN A y MEN B y la comunidad de hongos de MEN A y MEN E. No se pudo asociar ninguna de las secuencias analizadas a ningún género de bacterias fototróficas como por ejemplo *Rhodopseudomonas*, por lo que se confirma su ausencia en los MEN analizados, a diferencia de los resultados obtenidos por Toalombo (2012) que logró identificarlas al microscopio en un MEN fabricado en Ecuador, y que según Xu (2001) se pueden hallar como parte de la comunidad bacteriana de EM comerciales provenientes de Japón.

No se encontraron actinobacterias en MEN A ni en MEN B por el método de secuenciación masiva, contrastando los resultados obtenidos por recuento en placa, y también con lo publicado por González *et al.* (2018) en donde encontraron una abundancia de actinobacterias de $1,6 \times 10^6$ UFC/ml en MEN por el método de recuento en placa. Los resultados de los recuentos de actinobacterias en estas muestras puede explicarse por un error de identificación: la técnica para actinobacterias se basa en una característica de este grupo que es el crecimiento de la colonia hacia el interior del agar de la placa de Petri, ocurriendo así un anclaje de la colonia. En ese medio además de actinobacterias crecen

otras bacterias que no tendrían esta característica, por lo que al realizar un barrido con algodón, lo esperado es que solamente queden las actinobacterias. Además estas presentan una morfología piramidal y colores blancos y verdes (Camacho, 2013). En el caso de MEN A y MEN B, lo que ocurrió fue que luego de realizar la técnica de barrido con algodón, quedaron ancladas colonias transparentes con forma redondeada en lugar de piramidal, que fueron contadas como actinobacterias. Esto demuestra también los beneficios de cada método y la importancia, cuando es posible, de realizar los estudios de ecología microbiana utilizando técnicas moleculares (Cadena-Zamudio *et al.*, 2016).

La comunidad bacteriana determinada según la secuenciación masiva se mostró dominada por las bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus*, del orden Lactobacillales, con una abundancia relativa de un 57% en MEN A y 65% en MEN B del total de bacterias. Es interesante saber que dentro del orden Lactobacillales se identificaron más de 5 géneros, lo que da evidencia de la diversidad en este grupo en comparación con la formulación comercial EM de la empresa EMRO, la cual señala contener únicamente dos especies de bacterias ácido lácticas, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* (EEAITAJ, 2013). El segundo grupo más abundante son las bacterias del orden Aeromonadales, en específico el género *Aeromonas*, un género que engloba a varias especies, de las cuales algunas cepas relacionadas al suelo han sido categorizadas como promotoras del crecimiento vegetal (Vaikuntapu *et al.*, 2014; Tapia-García *et al.*, 2020); así como también bacterias del orden Enterobacterales, en específico del género *Enterobacter*, las cuales pueden ser coliformes, aunque también hay cepas categorizadas como promotoras del crecimiento vegetal y con efecto supresor de patógenos (Shoebitz *et al.*, 2009; Abraham, & Silambarasan, 2020). Otros géneros con cepas consideradas promotoras de crecimiento vegetal fueron encontrados en menores cantidades como *Acinetobacter*, con cepas que han sido descritas como degradadoras de plaguicidas como clorpirifos (Zhao *et al.*, 2014), *Pseudomonas* conocidas por su potencialidad como solubilizadoras de fósforo (Marulanda *et al.*, 2015) y como controladores biológicos de fitopatógenos (Rodríguez *et al.*, 2020), *Clostridium sensu stricto 12*, referenciada como degradadora de materia orgánica (Lu *et al.*, 2020). Muchas cepas pertenecientes a estos géneros tienen representantes que pueden ser

patógenos o promotores del crecimiento vegetal, por lo que es importante seguir estudiándolos con otras técnicas para conocer sus funciones y su rol dentro de la comunidad microbiana. Según Van Der Heijden *et al.* (2008), la aplicación de insumos que contengan diversidad de microorganismos compatibles, puede ser eficaz en el control de variedad de patógenos transmitidos por el suelo y mejorar la posibilidad de supervivencia del consorcio en la planta o en el suelo.

En cuanto a la presencia de hongos en MEN A y MEN E, se encontró que más del 95% correspondían al orden Saccharomycetales (levaduras), de las cuales la mayor diferencia se encontró en la especie dominante, que en MEN A fue *Saccharomyces cerevisiae* con una abundancia relativa de 93,6%, mientras que en MEN E fue *Candida ethanolica* con una abundancia relativa de 93,7%, además se identificaron otras especies de levadura como *Dekkera bruxellensis* y *Kasachstania exigua*. Esto evidencia que distintos MEN fabricados por distintos productores, utilizando como inóculo distintos mantillos de monte, pueden estar dominados por distintos géneros de hongos, sin embargo, estas pueden estar cumpliendo la misma función en el consorcio. Otros investigadores han identificado en preparaciones de MEN *Candida utilis* y *Saccharomyces cerevisiae* (Feijoo, 2016), pero no se había descrito hasta ahora la presencia de estas otras especies de levaduras. Otras especies de hongos identificadas con abundancias minoritarias fueron *Wickerhamomyces anomalus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Apiotrichum gracile*, *Penicillium bilaiae*, *Pseudallescheria boydii*. Sin embargo, no se encontraron especies de hongos descritas para los EM comerciales provenientes de Japón como *Aspergillus oryzae*, *Mucor hiemalis* (Xu, 2001).

Durante su almacenamiento se observó que en MEN A aumentó la abundancia de bacterias heterótrofas, que son las que descomponen materia orgánica, liberando nutrientes que las plantas pueden asimilar. También se observó un aumento en la abundancia de levaduras, de interés para el cultivo, ya que sintetizan sustancias antimicrobiales y otras requeridas por las plantas para su crecimiento y desarrollo radicular, a partir de aminoácidos y azúcares provenientes de la materia orgánica y raíces de plantas (Valdivieso, 2013). Por su parte las bacterias ácido lácticas disminuyeron levemente su población, por lo que en cuanto a estos

tres grupos se puede decir que a los 6 meses el producto está en buen estado para ser utilizado. Además sus propiedades organolépticas se conservaron, y la actividad microbiana se evidenciaba al salir gas al abrir el envase donde se almacenó. Para el caso del MEN B, que contenía cenizas, al segundo mes de almacenado perdió todas sus levaduras. Además a los 2 meses sus propiedades organolépticas cambiaron, desarrollándose un olor intenso y adquirió un color marrón oscuro, características distintas a las esperadas en este tipo de biopreparados. Por lo que el agregado de cenizas a los MEN no colaboraría con el almacenamiento del producto, sino que sería recomendable utilizarlo al momento de estar listo en donde conserva los mismos grupos que la receta original, e incluso en abundancias mayores.

7.3. Caracterización del Supermagro

7.3.1. Caracterización fisicoquímica

El supermagro analizado, producido por los productores de la Red de Agroecología de Rincón de Pando, presentó valores de 0,14% de nitrógeno, lo cual entra dentro del rango reportado por Tarigo (2004), quien analizó la composición química de 5 supermagros producidos por distintos productores, cuyas concentraciones de nitrógeno abarcaron desde 0,07% a 0,17%. En cuanto al contenido de fósforo cuyo porcentaje fue 0,036%, es similar al de los supermagros fabricados por Ecosativa (A. Ferreira, comunicación personal, 3 de abril de 2021), y está dentro del rango de los estudiados por Tarigo (2004) que presentaron mucha variabilidad desde 0,001% a 0,18%, lo cual él explica se puede deber a variaciones en los detalles de la elaboración, los ingredientes utilizados, el tiempo de fermentación, los procesos y reacciones dentro del biodigestor y factores del ambiente como temperatura, oxígeno y pH. El otro macronutriente principal es el potasio, que presentó una concentración del 0,46%, similar a dos de los supermagros estudiados por Tarigo (2004) y a

los preparados por Ecosativa (A. Ferreira, comunicación personal, 3 de abril de 2021). Lo interesante del supermagro, además de su aporte en macronutrientes, es su aporte en micronutrientes, minerales y sustancias beneficiosas que ayudan a brindar una nutrición balanceada a las plantas (Restrepo, 2007), mejorando su resistencia al ataque de plagas y patógenos como expresa la teoría de la trofobiosis (Chaboussou, 1986).

7.3.2. Caracterización microbiológica

Para SM A no se logró cultivar microorganismos, lo cual concuerda con la explicación del proceso de producción del supermagro que dan de Medeiros y da Silva Lopes (2006), en donde consideran que el proceso de fermentación es complejo y los microorganismos existentes, provenientes principalmente del estiércol y de la leche, pasan por cuatro fases distintas de crecimiento celular: latencia, crecimiento exponencial, fase estacionaria y finalmente muerte celular, durante la etapa de crecimiento, distintos microorganismos degradan alimentos (materia orgánica y minerales de las sales agregadas), permitiendo a otros microorganismos utilizar sus desechos, en una relación de interdependencia mutua, y así el proceso de fermentación continúa hasta que se agotan los recursos para el crecimiento, y es por ello que al estar listo el biopreparado, es posible que no se encuentren microorganismos vivos. Asimismo, la adición de sulfato de cobre en la etapa final de la preparación, puede tener efectos antimicrobianos sobre las poblaciones de microorganismos presentes en el biopreparado en las últimas dos semanas previo a estar listo para utilizar (Esparza-Rivera *et al.*, 2014). Por su parte Ruiz Lopez (2013) señala que al final del proceso de fermentación, se espera que el producto tenga una combinación de microorganismos y minerales disueltos en la parte líquida del producto, así como ácido láctico como subproducto de la fermentación, lo que puede tener efectos beneficiosos para controlar enfermedades en la planta cuando se aplica foliar. Al analizar el SM E, se logró realizar el recuento en placa de hongos filamentosos y bacterias ácido lácticas, lo que concuerda con lo señalado por Ruiz Lopez (2013), además la presencia de bacterias ácido lácticas puede relacionarse a la producción de ácido láctico y al pH del biopreparado.

7.4. Ensayos de cultivo de papa a campo y de cultivo de lechuga en condiciones controladas

7.4.1. Efecto de la aplicación de biopreparados en el suelo

En Uruguay no hay antecedentes de estudios sobre los efectos que tiene la aplicación de biopreparados en la comunidad microbiana de suelos agrícolas.

Aunque la actividad microbiana y la sucesión durante el proceso de fabricación de enmiendas orgánicas se han investigado en varias oportunidades, se sabe poco sobre cómo las enmiendas orgánicas actúan como inóculo microbiano para el suelo y si la comunidad microbiana incorporada por su aplicación tiene un efecto directo en las comunidades microbianas del suelo a corto y largo plazo (Knapp *et al.*, 2010). Según Knapp *et al.* (2010), la utilización de enmiendas orgánicas puede tener efectos sobre la microbiología del suelo en tres niveles: en la biomasa microbiana, actividad microbiana o estructura comunitaria de los microorganismos, y estos efectos pueden ser a corto plazo o a largo plazo. A su vez, Noble y Coventry (2005) expresan que es esperable que ocurra un cambio en la comunidad microbiana del suelo luego de aplicarse algún tipo de enmienda orgánica ya sea por microorganismos provenientes de la enmienda como por la influencia de la enmienda en los microorganismos nativos del suelo. Franco-Otero *et al.* (2012) mencionan que las adiciones de diferentes enmiendas orgánicas afectan significativamente la biomasa microbiana del suelo a corto plazo pero no encontraron diferencias significativas con el tratamiento con fertilizantes químicos, por lo que concluyen que el cambio en la comunidad microbiana no se debe al ingreso de microorganismos sino a un cambio en la concentración de nutrientes presentes en el suelo luego de aplicar enmiendas orgánicas o fertilizantes químicos.

En el ensayo de cultivo de papa a campo, se analizó por métodos dependientes de cultivo las abundancias de levaduras, hongos filamentosos, actinobacterias, bacterias ácido lácticas y bacterias heterótrofas, de un suelo donde no se aplicaron biopreparados, otro donde se abonó con estiércol de gallina, y otro donde se aplicaron biopreparados (bokashi y MEN).

Los resultados no mostraron diferencias significativas en las abundancias de los grupos de interés para cada tratamiento, excepto para bacterias ácido lácticas donde se observó una abundancia mayor en el tratamiento control en comparación con los otros tratamientos.

El resultado para la mayoría de los grupos microbianos analizados, concuerda con lo reportado por Loja y Mendez (2015), quienes caracterizaron los cambios iniciales en la cantidad de bacterias y hongos inducidos por la aplicación de estiércol, bokashi y compost en un suelo cultivado con maíz, para determinar el efecto en el corto plazo de la aplicación de estas enmiendas en la biología del suelo, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los suelos que recibieron enmiendas y el control que no recibió aplicación de enmiendas. Sin embargo, para estos grupos que no variaron, el resultado difiere de lo concluido por Zhen *et al.* (2014) que observaron que la aplicación de estiércol de gallina compostado incrementa la abundancia de microorganismos cultivables y aumentó la respiración microbiana y la actividad enzimática en un suelo agrícola, o lo reportado por Hata *et al.* (2020), quienes observaron que la aplicación de abono bokashi es capaz de producir un aumento en la abundancia de microorganismos en suelos cultivados con lechuga.

Es posible que los efectos producidos por la aplicación de enmiendas no fueran significativos para la mayoría de los grupos estudiados debido a las características del ensayo, siendo éste a campo abierto, y ocurriendo varias lluvias durante el ensayo que pudieran disminuir los efectos. Además, al ser una investigación participativa donde los productores llevaron a cabo las actividades de riego y aplicación de biopreparados durante el ensayo, no fue posible realizar un ensayo más complejo con más cantidad de tratamientos donde se pudiera aplicar mayor cantidad de abono bokashi y MEN, siendo tal vez la dosis de aplicación inferior a la necesaria para observar un efecto en la comunidad microbiana del suelo, ya que hay estudios que indican que el cambio en la estructura de la comunidad microbiana del suelo es dependiente de la cantidad de enmienda aplicada (Saison *et al.*, 2006). Es por esto, que sería interesante realizar otro ensayo a campo con mayor número de réplicas y tratamientos para ver si se obtienen resultados diferentes.

La ausencia de efecto significativo de la aplicación de biopreparados en la comunidad microbiana del suelo del cultivo de papa a campo, excepto para bacterias ácido lácticas, difiere de los resultados obtenidos en el otro ensayo realizado en esta investigación, donde se evaluó el efecto de la aplicación de distintos biopreparados y sus combinaciones en la comunidad microbiana del suelo en un cultivo de lechuga en condiciones controladas.

En el ensayo de cultivo de lechuga, se observó que la aplicación de bokashi al suelo provocó un aumento significativo de la abundancia de hongos filamentosos, bacterias heterótrofas y actinobacterias, así como una tendencia al aumento de la abundancia de levaduras y bacterias ácido lácticas en los suelos tratados con este biopreparado. También se midió la respiración microbiana, siendo significativamente mayor para el tratamiento BOK, con bokashi, entre 4 y 5 veces mayor en comparación con los tratamientos C, AG, CP y MEN. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Hata *et al.* (2020), en donde comprobó que la aplicación de bokashi aumentó la abundancia de microorganismos en el suelo midiendo el carbono de la biomasa microbiana y la respiración microbiana. Esta medida de la actividad microbiana, se puede relacionar con el aumento de la abundancia en las poblaciones de microorganismos, así como de la materia orgánica aportada por el bokashi, que es consumida por los microorganismos del suelo permitiendo su reproducción, lo que tiene un efecto positivo en la fertilidad del suelo ya que muchos nutrientes se incorporarán como biomasa microbiana en lugar de perderse por lixiviación, y serán liberados a las plantas a medida que los microorganismos mueran (Hata *et al.*, 2020). Además, según Saison *et al.* (2006), el aumento de la materia orgánica es uno de los principales responsables del aumento de la abundancia y actividad microbiana en el suelo, incluso más que el aumento relacionado al ingreso de microorganismos provenientes de la enmienda aplicada.

El aumento de hongos filamentosos, actinobacterias y bacterias heterótrofas puede (aunque no necesariamente) significar una mejora en la protección contra enfermedades, por la producción de antibióticos por parte de estos microorganismos. Según Al Jarah *et al.* (2016), la aplicación de bokashi en el suelo puede estimular el crecimiento de

microorganismos benéficos que supriman otras enfermedades ya sea por competencia por nutrientes, producción de sideróforos, antibiosis, o por la secreción de enzimas líticas, y además producir una resistencia sistémica inducida (ISR) por su alto contenido en microorganismos y materia orgánica. Estos investigadores encontraron que la aplicación de bokashi en un cultivo de pepino desencadenó la resistencia sistémica inducida (lo cual midieron indirectamente por la presencia de ciertas enzimas características de ISR) y restringió el crecimiento de *Pythium* y *Rhizoctonia*.

En el ensayo de cultivo de papa se observó una tendencia de mayor porcentaje de superficie de hoja afectada por *Alternaria alternata* en el tratamiento control en comparación con el tratamiento con aplicación de biopreparados, a pesar de que no se observó un aumento de los grupos de microorganismos de interés. Esto pudo deberse a una resistencia sistémica inducida, que no necesariamente debe ser causada por un aumento de la abundancia en las poblaciones de microorganismos del suelo, sino que como indican Al Jarah *et al.* (2016), puede deberse a otros factores, como por ejemplo, un incremento en las concentraciones de nutrientes o materia orgánica producido por el bokashi o el efecto del ácido láctico presente en los MEN y su bajo pH. Esto puede explicar que se haya observado una tendencia a una mejora en la sanidad del cultivo de papa a pesar de no observar cambios en las poblaciones de microorganismos estudiadas.

Es muy difícil atribuir los efectos benéficos de control biológico o promoción del crecimiento vegetal a individuos particulares de la comunidad, o a otros marcadores bióticos como la respiración microbiana o marcadores abióticos como cantidad de materia orgánica. Ese tipo de enfoques no ha tenido éxito hasta ahora (Hadar y Papadopoulou, 2012). Los agricultores a menudo informan un incremento de los efectos supresores de enfermedades de los abonos en comparación con la aplicación de cepas individuales, es por esta misma razón, que el éxito de un biopreparado para controlar una enfermedad patogénica específica depende de muchos factores y su predictibilidad puede tornarse limitada y sus efectos no necesariamente deberían ser adjudicados a un componente en específico sino al biopreparado en su conjunto (Lutz *et al.*, 2020).

Las cromatografías de suelo realizadas de los distintos tratamientos, mostraron una estructura pobre (compactación) y poca integración entre las distintas zonas del cromatograma, lo que evidencia un suelo degradado. La baja integración de la zona media correspondiente a la región mineral, con la zona correspondiente a la materia orgánica, indica que no hay muchos microorganismos metabolizando minerales y transformando la materia orgánica, que va de la mano con una zona externa tenue, correspondiente a una baja actividad enzimática que da una idea de la actividad microbiana en la muestra. CP, AG, BOK, SM, MEN y BSM fueron los tratamientos que presentaron más actividad microbiana, lo cual tiene sentido por ser los que recibieron mayor cantidad de biofertilización y nutrientes disponibles para que los microorganismos estén activos. De todas maneras, no se evidencian grandes cambios entre los distintos tratamientos, esto puede deberse al poco tiempo del ensayo, que no permite que la aplicación de biopreparados genere cambios visibles por esta técnica en el suelo. Sería interesante realizar este tipo de análisis en suelos que han experimentado cambios en su manejo sostenidos en el tiempo para poder comparar las características antes mencionadas que la cromatografía de suelos permite observar.

7.4.2. Efecto de la aplicación de biopreparados en el rendimiento de los cultivos

En el ensayo de cultivo de papa a campo, se observó una tendencia (estadísticamente no significativa) de mayor rendimiento por parcela y por planta en el tratamiento BM (con bokashi y MEN) frente al control. La observación de una tendencia y no una diferencia significativa, se puede deber a lo también mencionado anteriormente, acerca de que el ensayo fue en campo, en un predio de producción y en un esquema de investigación participativa, en donde influyeron muchas variables como la lluvia y la acumulación de agua diferencial en el predio, la imposibilidad, por ser una producción real, de realizar mayor cantidad de tratamientos variando las dosis de aplicación por unas mayores, y otras cuestiones que hacen a los desafíos que enfrentan los productores durante el cultivo.

En lo referente a la dosis, Bautista (2015) aplicó una dosis de 20 toneladas de bokashi por hectárea de papa, obteniendo con esta dosis el mayor porcentaje de emergencia, de altura

de la planta en floración, de promedio de tubérculos por planta, y el segundo mayor rendimiento total, apenas por debajo del tratamiento con compost y 25% más alto que el tratamiento control. Además mostró tener un beneficio económico mayor que el tratamiento testigo, lo que demuestra que la utilización de bokashi puede ser rentable para los productores. Pimentel (2015) realizó un ensayo donde comparó el rendimiento de la papa en tratamientos con distintas dosis de bokashi y de MEN, y encontró que la interacción entre MEN y bokashi produjo efectos positivos significativos en el peso de los tubérculos, la altura promedio de las plantas, y el rendimiento neto. Leandro y Cristobal (2016) estudiaron los efectos de la aplicación de diferentes dosis de bokashi junto a la fertilización química en papa, encontrando el mejor rendimiento en la aplicación por hectárea de 160kg de nitrógeno, 160kg de fósforo y 140kg de potasio (en forma de fertilizante sintético altamente soluble) sumado a 4 toneladas de abono bokashi, y concluyeron que utilizar el abono orgánico fermentado tipo bokashi en interacción con abonos químicos por la compatibilidad entre ellos, supera los rendimientos en el cultivo de la papa bajo un manejo únicamente con agroquímicos. Estas investigaciones, que encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con biopreparados frente al control, permiten considerar la posibilidad de realizar más ensayos a campo con dosis más altas, bajo la hipótesis de que esto evidenciará diferencias significativas en el rendimiento del cultivo de papa.

En el ensayo de cultivo de lechuga en condiciones controladas, se observó que el tratamiento que recibió cama de pollo (CP) y el tratamiento que recibió aplicaciones de fertilizante sintético (AG), tuvieron mayores pesos frescos de la parte aérea, seguidos por BOK, sin embargo, BOK fue el único que se diferenció significativamente del control en la variable peso seco de parte aérea, y fue el que tuvo menor relación entre peso fresco y seco de parte aérea, evidenciando menor acumulación de agua en los tejidos. En cuanto al peso fresco y seco de raíz, BOK nuevamente presentó los valores más altos, diferenciándose significativamente del control, y B+SM, MEN, BOK y BSM fueron los tratamientos que presentaron menor acumulación de agua en la raíz.

Son varias las investigaciones agronómicas que han demostrado el potencial del bokashi y de los MEN para abonar cultivos de lechuga (Girón *et al.*, 2012; Agredo, 2014; Huayanca, 2016; Guamán, 2017; Goulart *et al.*, 2018; Hata *et al.*, 2020).

La dosis de bokashi de 280g por planta resultó en un peso fresco de la parte aérea mayor que la dosis de 400g, siendo este resultado concordante con lo reportado por Díaz y Suárez (2001) quienes evaluaron tres dosis de bokashi (454, 227 y 113 g/planta) en el cultivo de lechuga, y encontraron que la dosis de 227g fue la que resultó en un mayor peso fresco de la parte aérea, un valor similar a la dosis aplicada en el tratamiento BOK.

El tratamiento con cama de pollo y el de agroquímicos presentaron los valores más altos de peso fresco foliar, seguramente debido a su aporte de nutrientes fácilmente disponibles para la planta, sin embargo el tratamiento con bokashi fue el que tuvo mayor peso seco foliar y menor relación peso fresco foliar/peso seco foliar, lo que indirectamente puede dar una idea de mayor concentración de fibra y nutrientes alimenticios en la planta. A la hora de comparar el rendimiento de la cosecha, es interesante tener presente la variable peso fresco/peso seco, puesto que la fertilización con estiércoles o con sales solubles tiende a incrementar el peso fresco y tamaño de la cosecha, pero también la acumulación de agua en los tejidos de la planta, en algunos casos teniendo los cultivos orgánicos una mayor concentración de nutrientes y fibra que los cultivados con agroquímicos (Rembalkowska *et al.*, 2012). Además, la utilización de agroquímicos o cama de pollo, tiene consecuencias negativas para el ambiente, por el exceso de nutrientes que se pierden por evaporación, lixiviación y erosión.

El tratamiento BOK presentó el mayor peso fresco y seco de raíz siendo el único que se diferenció significativamente del control. Esto se podría atribuir, a la mejora en la estructura física del sustrato, ya que el bokashi aumenta la porosidad del suelo, no solo por su textura propia sino también por su aporte de hongos benéficos que con sus secreciones y estructuras celulares ayudan a la formación de agregados de suelo; así como también a la estimulación de crecimiento de la raíz por parte de los microorganismos que contiene el bokashi.

Neri *et al.* (2017) realizaron un ensayo de cultivo de lechuga a campo utilizando distintas combinaciones de abono bokashi, gallinaza y humus líquido. Encontraron que la combinación de abono bokashi con gallinaza y humus líquido fue la que tuvo mayor rendimiento por hectárea, mientras que el tratamiento con bokashi y humus líquido fue el que arrojó valores más altos de altura promedio de las plantas, peso promedio por planta y diámetro foliar promedio, seguido por el de bokashi y gallinaza.

Milagrosa & Balaki (1996) comprobaron que la adición de bokashi y microorganismos eficientes comerciales (EM) al manejo convencional fertilizado con agroquímicos, mejoró la variable peso fresco de las plantas de un cultivo de lechuga en comparación con la aplicación de agroquímicos sin biopreparados. Este resultado permite favorecer el proceso de transición hacia la agroecología por parte de productores convencionales que quieran virar hacia una metodología más amigable con el ambiente y con la salud de las personas, sin necesariamente realizar un cambio radical sino un proceso de cambio gradual.

Es llamativo que los tratamientos con supermagro no hayan presentado valores altos de peso fresco foliar, puesto que la recomendación de su uso está dada para aportar nutrientes fácilmente asimilables por las plantas (Restrepo, 2007). Varios investigadores han reportado efectos negativos del supermagro en este cultivo, encontrando que su aporte como biofertilizante nitrogenado es insuficiente y recomendando adicionar estiércol o compost para cumplir con los requerimientos (Tarigo *et al.*, 2004; Roel *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2009; Bonillo *et al.*, 2015). Tarigo *et al.* (2004) recomiendan el supermagro para realizar aportes de micronutrientes de manera puntual, como corrector de deficiencias que el cultivo pueda tener, y advierten que su utilización periódica en exceso (como biofertilizante nitrogenado) puede tener un efecto negativo y crear un desequilibrio y bloqueo nutricional de los micronutrientes. A su vez, Hata *et al.* (2020) evidenciaron que el exceso de un biofertilizante rico en micronutrientes (similar al supermagro) tuvo consecuencias negativas en el tamaño de la lechuga cuando fue aplicado regularmente pero tuvo consecuencias positivas cuando se redujo su frecuencia de aplicación. Sería interesante realizar ensayos con diferentes dosis de supermagro para evaluar si las dosis establecidas para este ensayo

eran las adecuadas para promover el crecimiento de la lechuga. Así como también comparar el contenido de cada micronutriente del supermagro con los requeridos por la lechuga durante su crecimiento para ver si están en las cantidades adecuadas, y en el caso de que fuera necesario, fabricar un supermagro adaptando las cantidades de sales añadidas, a los requerimientos de la lechuga.

Guamán (2017) comparó el rendimiento de lechuga utilizando distintos biopreparados: MEN, bacterias acidolácticas y *Trichoderma* spp., obteniendo el mayor rendimiento con la aplicación de MEN, y concluyó que los MEN ayudaron a la absorción de nutrientes del suelo por parte de la planta, y aceleraron la descomposición de macromoléculas de la materia orgánica presente en el suelo. Por esta razón es que se considera que la aplicación de MEN debe estar acompañada por la aplicación de abono bokashi, para que los microorganismos puedan ejercer la función de descomposición de la materia orgánica y así promover el crecimiento de la planta. En el experimento realizado para esta investigación, hubiera sido interesante un tratamiento donde se aplicaran bokashi y MEN pero sin supermagro, para poder comparar con el tratamiento BOK (solo bokashi) y MEN (solo MEN).

El incremento en el rendimiento de la papa y la lechuga, se puede deber a los beneficios mencionados anteriormente acerca de la incorporación de Bokashi y de MEN en el suelo y en la planta. Por una parte los microorganismos que estos biopreparados aportan, aceleran la descomposición de la materia orgánica y permiten que los nutrientes queden disponibles para las plantas, secretan sustancias promotoras del crecimiento vegetal, e inhiben el desarrollo de enfermedades causadas por bacterias y hongos patógenos. A su vez, el bokashi aporta materia orgánica y nutrientes al suelo lo que repercute directamente en satisfacer los requerimientos nutricionales de la planta a medida que se desarrolla el cultivo. Otra característica que aporta el bokashi, es una mejora en la textura del suelo, permitiendo a las raíces de las plantas desarrollarse mejor y a su vez a la comunidad microbiana del suelo a encontrar mayor cantidad de nichos para desarrollarse.

8. Conclusiones y consideraciones finales

Se describió por primera vez para Uruguay la composición microbiana de 3 biopreparados muy utilizados en agroecología: bokashi, MEN y supermagro, los cuales presentaron diferencias en las comunidades que los componen, relacionadas a sus ingredientes y proceso de elaboración. La mayor diversidad se encontró en el bokashi, tanto en hongos como en bacterias. Los ingredientes con que se fabrican pueden ser sustituidos por otros de mejor acceso por parte del productor siempre que cumplan con las funciones y características específicas del ingrediente a sustituir, por ejemplo su contenido de carbono y nitrógeno en el caso de la cáscara de arroz y el aserrín en bokashi. De esta manera, los productores pueden utilizar materias primas de su predio o localidad, abaratando los costos de producción y dándoles mayor independencia para producir biopreparados.

La estabilidad de las poblaciones de los principales grupos de interés permiten el almacenamiento de los biopreparados por parte del productor por al menos 4 meses, en bolsas de plastillera cerradas para el bokashi y en bidones de plástico cerrado para los biopreparados líquidos, procurando mantenerlos sin contacto directo con la luz y a temperatura ambiente. Esto permite la producción de tandas de mayor volumen de forma anticipada al momento de uso del biopreparados (esto aplica para todos los biopreparados estudiados con excepción del MEN con ceniza). Esto es muy importante puesto que un impedimento para la utilización de biopreparados por parte de los productores es el esfuerzo que lleva producirlos, por lo que de esta forma pueden realizarlo en épocas que les sea más conveniente así como también agruparse entre vecinos o asociaciones para producirlos de forma comunitaria facilitando la logística, permitiendo la utilización de maquinaria sencilla y accesible, y fomentando la unión entre productores.

Los resultados de la secuenciación masiva de la comunidad microbiana de los MEN no mostraron presencia de actinobacterias y bacterias fototróficas, al contrario de lo propuesto por el conocimiento popular. Esto no quita los beneficios que la comunidad de

microorganismos de este biopreparados pueda brindar al desarrollo de los cultivos, ya que contiene en su mayoría bacterias ácido lácticas que promueven la fermentación y descomposición de la materia orgánica y producen ácido láctico que disminuye la presencia de patógenos; así como levaduras que pueden ser antagonistas de patógenos, y una diversidad muy amplia con muchos microorganismos pertenecientes a grupos de conocido potencial de promoción de crecimiento vegetal, antibiosis, inhibición de patógenos, degradación de la materia orgánica, entre otras funciones benéficas.

La caracterización de biopreparados aporta información científica para el desarrollo de regulaciones legales de los mismos, las cuales están diseñadas para productos que contengan una o unas pocas cepas microbianas, respondiendo a una visión conservadora de la agricultura y no a una visión agroecológica. La enorme diversidad de microorganismos en los biopreparados plantea grandes desafíos para la identificación de posibles cepas benéficas e interacciones entre microorganismos que contribuyen conjuntamente a la supresión de enfermedades (Chen *et al.*, 2012). Es posible que una gran proporción de los microorganismos no estén involucrados en interacciones directas, por ejemplo patógeno-antagonista, sino que influyan en las interacciones entre otros organismos (Lutz *et al.*, 2020). Es por esto que debe valorarse el biopreparado en todo su conjunto y no buscar aislar cepas individuales cuya funcionalidad no será la misma que la de la comunidad en su conjunto. Los procesos para registrar biopreparados en Uruguay son lentos y costosos, lo que impide que las empresas realicen los registros y da como resultado un número muy bajo de biopreparados registrados, en una realidad en la cual su utilización está difundida en el campo. Tener información de sus características físicoquímicas y microbiológicas, servirá como insumo para discutir si es necesario desarrollar reglamentaciones que se adecúen a las características de estos productos, como la diversidad microbiana que los compone.

Los ensayos agronómicos permitieron observar que la aplicación de biopreparados (particularmente bokashi) incrementó la abundancia de los grupos de microorganismos de

interés, incrementando la salud del suelo. Además los biopreparados demostraron una tendencia a incrementar el rendimiento de los cultivos de lechuga y papa.

La aplicación de biopreparados a los cultivos es importante, ya que éstos aportan nutrientes, materia orgánica y microorganismos que aceleran la degradación de la materia orgánica, compiten contra organismos patógenos y producen sustancias como fitohormonas y antibióticos. Además son una forma de revalorizar recursos que de otra manera serían considerados desechos, permitiendo reciclar materia orgánica proveniente de la industria y así evitar que contamine el ambiente.

Los biopreparados son herramientas útiles para la agroecología, es importante caracterizarlos fisicoquímica y microbiológicamente y realizar ensayos agronómicos, con el fin de perfeccionar sus formulaciones y dosis de aplicación, y maximizar sus aportes tanto al rendimiento de los cultivos como a la salud del suelo y la sustentabilidad del agroecosistema.

9. Anexos

9.1. Ingredientes de los biopreparados

(Restrepo, 2007)

Bokashi	
Estiércol vacuno	200 Kg
Cascarilla de arroz	200 Kg
Tierra	200 Kg
Carbón molido	40 Kg
Salvado de arroz	10 Kg
Cal agrícola	10 Kg
Melaza de caña	1 L
Levadura para pan	100 g
agua de acuerdo con la prueba del puño	

Microorganismos Eficientes Nativos Sólidos	
Mantillo bosque	50 Kg
salvado	50 Kg
Melaza	4 L
Leche o suero de leche	4 L
agua de acuerdo con la prueba del puño	

Microorganismos Eficientes Nativos Líquidos	
MEN Sólidos	10 Kg
Melaza de caña	7,5 L
Leche o suero de leche	7,5 L
MEN Líquido (opcional)	3 L
Ceniza (opcional)	1 Kg
Agua sin cloro	150L

Supermagro	
Estiércol vacuno	50 Kg
Melaza (o jugo de caña)	14 (28) L *
Leche (o suero)	28 (56) L **
Roca fosfatada	2.6 Kg
Ceniza	1.3 Kg
Sulfato de zinc	2 Kg
Cloruro de calcio	2 Kg
Sulfato de magnesio	2 Kg
Sulfato de manganeso	300 g
Cloruro de cobalto	50 g
Molibdato de sodio	100 g
Bórax	1.5 Kg
Sulfato ferroso	300 g
Sulfato de cobre	300 g
Agua sin cloro	70 L***

* Inicialmente se coloca 14 L y luego se agrega 1L junto con cada aplicación de sales

** Inicialmente se coloca 28 L y luego se agregan 2L junto con cada aplicación de sales

*** Inicialmente se coloca 70 L y el último día se completa hasta llenar 170L totales

9.2. Soluciones y medios de cultivo

Pirofosfato de Sodio	
Pirofosfato de Sodio decahidratado	1,68 g
Agua desionizada	1000 ml

ajustar pH a 7 con HCl

Buffer TAE 50X	
Tris-Base	60,5 g
Ácido acético glacial	14.3 ml
Sol. EDTA 0.5M pH8.0	25 ml
Agua ultra pura	250 ml

Agar Trypticase Soja	
(Smit <i>et al.</i> , 2001)	
TSB	3 g
Agar	15 g
Agua desionizada	1 l

Lactobacilli MRS Agar	
(de Man <i>et al.</i> , 1960)	
Agar MRS	62 g
Agua desionizada	1 l

ajustar pH a 5,4 con ácido acético

Almidón Caseína Agar	
(Leoni y Ghini, 2003)	
Almidón	10 g
Caseína	0,3 g
KNO ₃	2 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Agar	16 g
Agua desionizada	1 l

Van Niel	
(Van Niel, 1971)	
Extracto de levadura	10 g
Fosfato Hidrogeno di potásico	1 g
Sulfato de magnesio	0,5 g
Cisteína	16 ml
Etanol	60 ml
Agar	15 g
Agua desionizada	1 l

ajustar pH a 7 con ácido láctico

Agar Extracto Malta	
Extracto de malta	30 g
Peptona de Soja	3 g
Agar	15 g
Agua desionizada	1 l

ajustar pH a 4,5 con ácido láctico

9.3. Abundancias relativas de bacterias y hongos dentro de los biopreparados

Abundancia relativa de bacterias a nivel de filo en BOK A y BOK B

Filo	BOK A	BOK B
Proteobacteria	42,2%	50,8%
Chloroflexi	28,4%	18,2%
Planctomycetes	6,4%	4,3%
Acidobacteria	5,5%	6,9%
Verrucomicrobia	3,8%	4,0%
Gemmatimonadetes	3,5%	3,7%
Actinobacteria	2,6%	2,9%
Deinococcus-Thermus	1,9%	2,9%
Bacteroidetes	1,8%	0,5%
BRC1	1,5%	1,4%
Indefinido	0,9%	1,8%
Firmicutes	0,6%	1,2%
Patescibacteria	0,3%	0,2%
Hydrogenedentes	0,3%	0,4%
Synergistetes	0,1%	0,1%
Fibrobacteres	0,1%	0,1%
Chlamydiae	0,1%	0,1%
Thermotogae	0,1%	
Spirochaetes		0,2%
Rokubacteria		0,1%

Abundancia relativa de bacterias a nivel de género en BOK A y BOK B

Genero	BOK A	BOK B
Indefinido	46,96%	45,25%
Herpetosiphon	7,85%	1,41%
Pseudomonas	4,05%	7,47%
Litorilinea	2,03%	2,29%
Luteimonas	1,99%	3,21%
FFCH7168	1,95%	0,39%
Truepera	1,86%	2,87%
Altererythrobacter	1,38%	0,90%
Acinetobacter	1,29%	1,97%
CL500-3	1,24%	0,20%
Candidatus Chloroploca	1,19%	0,62%

Cellvibrio	0,88%	2,07%
Hyphomicrobium	0,75%	0,53%
SM1A02	0,72%	0,27%
UBA6140	0,64%	0,19%
Arenimonas	0,62%	0,91%
Devosia	0,59%	0,75%
Pseudoxanthomonas	0,53%	0,75%
IS-44	0,50%	0,21%
Chryseolinea	0,48%	
Rhodopirellula	0,48%	0,34%
Blyi10	0,46%	0,31%
Chthoniobacter	0,45%	0,38%
Azoarcus	0,41%	0,96%
Bryobacter	0,39%	0,52%
Nannocystis	0,39%	0,58%
Pir4 lineage	0,39%	0,30%
Steroidobacter	0,36%	0,45%
Pedomicrobium	0,34%	0,44%
Pirellula	0,33%	
Candidatus Xiphinematobacter	0,33%	0,24%
Thermomonas	0,31%	0,37%
Anaerolinea	0,29%	0,14%
JTB255	0,29%	
Sphingomonas	0,29%	0,18%
Haliangium	0,27%	0,11%
Pseudofulvimonas	0,25%	0,87%
Hyphomonas	0,25%	0,40%
SWB02	0,24%	0,18%
Mycobacterium	0,24%	0,29%
Ellin6067	0,24%	0,16%
Limnobacter	0,23%	0,17%
Acidibacter	0,23%	0,45%
Pelagibius	0,23%	0,12%
Mesorhizobium	0,23%	0,25%
Rhodobacter	0,22%	0,35%
Dokdonella	0,19%	0,32%
Verrucomicrobium	0,19%	0,47%
Hirschia	0,19%	0,22%
Alcanivorax	0,18%	
Roseomonas	0,18%	0,26%
Nonomuraea	0,17%	

AKYG587	0,16%	
Nocardioides	0,16%	0,27%
Bacillus	0,15%	0,23%
RB41	0,15%	0,13%
Sphingopyxis	0,14%	0,16%
Prostheco bacter	0,14%	0,36%
Gemmatimonas	0,14%	0,20%
Photobacterium	0,13%	0,31%
Sphaerisporangium	0,13%	
Lautropia	0,13%	0,13%
Ferrovibrio	0,13%	0,10%
Niastella	0,13%	
Cephaloticoccus	0,12%	
Tagaea	0,12%	
Aquamicrobium	0,11%	0,15%
Luteitalea	0,11%	0,26%
Dongia	0,11%	0,28%
C1-B045	0,11%	0,33%
Rheinheimera	0,11%	0,17%
Actinomadura	0,11%	
Lysobacter	0,10%	0,13%
SH-PL14	0,10%	
Aminobacter		0,10%
Azotobacter		0,13%
Bauldia		0,13%
Brevundimonas		0,16%
Candidatus Udaeobacter		0,21%
Clostridium sensu stricto 1		0,17%
Hydrogenispora		0,14%
Ilumatobacter		0,11%
Luteolibacter		0,16%
Microbulbifer		0,15%
Microvirga		0,10%
Streptomyces		0,15%
Parvibaculum		0,12%
Phenylobacterium		0,10%
Polyangium		0,17%
Romboutsia		0,23%
Sneathiella		0,14%
Sorangium		0,20%
Terrimicrobium		0,14%

Abundancia relativa de bacterias a nivel de filo en MEN A y MEN B

Filo	MEN A	MEN B
Firmicutes	64,15%	83,87%
Proteobacteria	35,75%	15,92%
Verrucomicrobia	0,03%	0,02%
Synergistetes	0,02%	0,01%
Chloroflexi	0,02%	0,07%
Acidobacteria	0,01%	0,02%
Planctomycetes	0,01%	0,01%
Thermotogae	0,01%	0,01%
Actinobacteria	0,00%	0,02%
Bacteroidetes	0,00%	0,02%
Deinococcus-Thermus	0,00%	0,01%

Abundancia relativa de bacterias a nivel de género en MEN A y MEN B

Género	MEN A	MEN B
Lactobacillus	41,9%	65,6%
Aeromonas	23,3%	0,4%
Lactococcus	14,4%	2,7%
Enterobacter	7,5%	11,5%
Pediococcus	6,4%	9,6%
Acinetobacter	1,8%	0,8%
Pseudomonas	1,4%	0,1%
Leuconostoc	1,2%	1,6%
Shewanella	0,7%	0,3%
Comamonas	0,4%	0,4%
Tolomonas	0,1%	
Serratia	0,1%	1,1%
Clostridium sensu stricto 1	0,1%	
Hafnia-Obesumbacterium	0,1%	0,2%
Kluyvera	0,1%	0,4%
Romboutsia	0,1%	
Enterococcus	0,1%	
Clostridium sensu stricto 12		4,2%
Weissella		0,1%
Limnohabitans		0,1%
Stenotrophomonas		0,1%

Rickettsiella		0,1%
---------------	--	------

Abundancia relativa de hongos a nivel de filo en BOK A y BOK G y BOK E

Filo	BOK A	BOK G	BOK E
Ascomycota	74,1	81,8	79,6
Indefinido	17,0	0,2	4,5
Mortierellomycota	7,0	4,0	2,3
Basidiomycota	1,7	14,0	4,0
Rozellomycota	0,1	0,0	8,7
Zoopagomycota	0,0	0,0	0,0
Neocallimastigomycota	0,0	0,0	0,0
Chytridiomycota	0,0	0,0	0,8
Olpidiomycota	0,0	0,0	0,1
Basidiobolomycota	0,0	0,0	0,0
Entorrhizomycota	0,0	0,0	0,0
Mucoromycota	0,0	0,0	0,0

Abundancia relativa de hongos a nivel de género en BOK A y BOK G y BOK E

Género	BOK A	BOK G	BOK E
Indefinido	58,9	10,8	51,0
Zopfiella	11,3	0,6	2,0
Mortierella	6,1	3,6	0,2
Mycothermus	5,8	8,7	1,7
Thermomyces	4,1	6,7	
Chrysosporium	2,6	0,9	0,4
Disculoides	1,4		1,3
Coprinopsis	1,3		1,4
Fusarium	1,3	1,4	0,4
Gibberella	1,1	0,1	1,3
Aspergillus	0,7	6,0	1,3
Scedosporium	0,7	0,9	
Podospora	0,3		0,7
Myceliophthora	0,3		
Penicillium	0,3	0,5	1,2
Ruhlandiella	0,3		
Remersonia	0,3		0,7
Phaeoacremonium	0,2		
Neurospora	0,2	0,3	1,0
Ramophialophora	0,2		0,6

Rhodotorula	0,2		
Cephalophora	0,2	4,1	0,7
Cercophora	0,1		1,0
Chaetomium	0,1	35,4	7,8
Cladosporium	0,1	0,9	0,3
Acremonium	0,1		3,3
Verticillium	0,1		1,4
Arthrographis	0,1		0,2
Microascus	0,1		0,1
Talaromyces	0,1		1,4
Trichoderma	0,1		
Humicola	0,1		
Paraphaeosphaeria	0,1		
Exophiala	0,1		
Zygopleurage	0,1		0,5
Solicoccozyma	0,1		
Cladorrhinum	0,1	0,2	4,3
Curvularia	0,1		
Trichosporon		12,2	0,8
Debaryomyces		1,3	
Lecanicillium		0,6	
Wallemia		0,6	
Sagenomella		0,6	
Candida		0,4	0,1
Apiotrichum		0,4	
Cephalotrichum		0,3	
Cutaneotrichosporon		0,3	
Simplicillium		0,2	
Exobasidium		0,2	
Arthroderma		0,2	
Diutina		0,2	
Trichomonascus		0,2	
Arcuadendron		0,1	
Arthrobotrys		0,1	
Scutellinia			2,4
Barnettozyma			1,4
Pseudaleuria			0,8
Ilyonectria			0,5
Preussia			0,4
Coprinellus			0,3
Lophiostoma			0,3

Symptoventuria			0,2
Paracremonium			0,2
Papiliotrema			0,2
Pseudorobillarda			0,2
Mrakia			0,2
Tzeanania			0,2
Lasiobolidium			0,1
Operculomyces			0,1
Neosascochyta			0,1
Alternaria			0,1
Geotrichum			0,1

Abundancia relativa de hongos a nivel de filo en MEN A y MEN E

Filo	MEN A	MEN E
Ascomycota	100,00	99,62
Basidiomycota	0,00	0,38

Abundancia relativa de hongos a nivel de género en MEN A y MEN E

Género	MEN A	MEN E
Candida		93,75
Dekkera		3,45
Pseudallescheria		1,38
Indefinido	2,81	0,41
Kazachstania		0,24
Rhodotorula		0,17
Hanseniaspora		0,14
Apiotrichum		0,10
Saccharomyces	93,57	
Wickerhamomyces	3,61	
Trichosporon		
Papiliotrema		

10. Bibliografía

Ab Muttalib, S. A., Ismail, S. N. S., & Praveena, S. M. (2016). Application of Effective Microorganism (EM) in Food Waste Composting: A review.

Abraham, J., & Silambarasan, S. (2015). Plant growth promoting bacteria *Enterobacter asburiae* JAS5 and *Enterobacter cloacae* JAS7 in mineralization of endosulfan. Applied biochemistry and biotechnology, 175(7), 3336-3348.

Achkar, M.; Domínguez, A. y Pesce, F. (2008) Agronegocios Ltda. Nuevas modalidades de colonialismo en el Cono Sur de América Latina. REDES. Montevideo.

Achkar, M.; Domínguez, A. y Pesce, F. (2009) Territorios rurales en Uruguay y América del Sur. Transformaciones, (des)integraciones y agronegocios. Revista Estudios, 122.

Acosta Naranjo, R. (2007). La biodiversidad en la agricultura: la importancia de las variedades locales. Nuevas rutas para el desarrollo en América Latina: experiencias globales y locales, 239-260.

Agredo, D. (2014). Comparación de la eficiencia en la producción de lechuga (*Lactuca sativa*) en un suelo rehabilitado con abono orgánico Bocashi y el mismo suelo con fertilizante químico NPK.

Al Jarah, N., Begum, K., Omar, S., & Al Ani, R. (2016). Some biochemical indicators of induced systemic resistance in cucumber seedling against damping off pathogens by local bokashi and fermented plant extracts (FPE). Journal of University of Duhok, 19(1), 585-592.

Altieri, M., Hecht, S., Liebman, M., Magdoff, F., Norgaard, R., & Sikor, T. (1999). Agroecología: Bases científicas para una agricultura sustentable. Nordan-Comunidad.

Altieri, M. (2009). Escalonando la propuesta agroecológica para la soberanía alimentaria de América Latina. Agroecología, 4, 39-48.

Altieri, M. & Pengue, W. (2005). La soja transgénica en América Latina. Una maquinaria de hambre, deforestación y devastación socio ecológica. Ecología política, (30), 87-94.

Altieri, M. , & Toledo, V. (2011). The agroecological revolution in Latin America: rescuing nature, ensuring food sovereignty and empowering peasants. Journal of peasant studies, 38(3), 587-612.

Álvarez-Solís, J. D., Mendoza-Núñez, J. A., León-Martínez, N. S., Castellanos-Albores, J., & Gutiérrez-Miceli, F. A. (2016). Effect of bokashi and vermicompost leachate on yield and quality of pepper (*Capsicum annuum*) and onion (*Allium cepa*) under monoculture and intercropping cultures. *Ciencia e Investigación Agraria*, 43(2), 243-252.

Alves, G., Simões, A. , Ferreira, R., & Neto, S. (2016). Produtividade de tomate orgânico cultivado em diferentes ambientes e níveis de insumos. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*.

Arbeletche, P., Courdin, V., & Oliveira, G. (2007). Soja y forestación: los impactos sobre la ganadería uruguaya. CIEA. Buenos Aires.

Arrieta, R. A. L., Gómez, G. G., Paneque, O. S. G., & Arteaga, M. C. J. (2018). Caracterización del abono Bocachi y su aplicación en el cultivo del pimentón (*Capsicum annuum*, L.), en el estado Falcón. *Revista Arbitrada Interdisciplinaria Koinonía*, 3(6), 110-127.

Aswini, C. (2019). A review on *Chaetomium globosum* is versatile weapons for various plant pathogens. *J. Pharmocognosy Phytochem*, 8, 946-949.

Atlas, R. M., & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Educación SA (Addison Wesley), Madrid.

Bajsa, N. (2015). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en suelos con rotación de cultivos. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Baltodano Hernández, P. (2002). Determinación de la calidad microbiológica del abono orgánico bocashi durante el proceso de fabricación y almacenamiento. Tesis de grado en Microbiología. Universidad de Costa Rica.

Bardgett, R. D., & Van Der Putten, W. H. (2014). Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, 515(7528), 505-511.

Barg, R., & Queirós, F. (2007). Agricultura agroecologica-organica en el Uruguay: principales conceptos, situación actual y desafíos. RAP-AL Uruguay.

Barquero, L. C., Roos, M. M., Lorío, L. U., & Chinchilla, R. 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.

Bautista, A. P. (2015). Evaluación de la aplicación de cuatro tipos de abonos orgánicos, en la productividad del cultivo de papa *Solanum tuberosum*, variedad chola, en San Agustín, parroquia Pintag, canton Quito, provincia Pichincha.

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478-486.

Banco Interamericano de Desarrollo. (2009). Manual Práctico de Uso de EM . Obtenido de www.emuruguay.org/images/Manual_Practico_Uso_EM_OISCA_BID.pdf.

Blaya, J., Marhuenda, F. C., Pascual, J. A., & Ros, M. (2016). Microbiota characterization of compost using omics approaches opens new perspectives for *Phytophthora* root rot control. *PLoS One*, 11(8).

Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciolk T, Kreps J, Langille MGI, Lee J, Ley R, Liu YX, Loftfield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Pruesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson MS, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, Ul-Hasan S, van der Hooft JJJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, von Hippel M, Walters W, Wan Y, Wang M, Warren J, Weber KC, Williamson CHD, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang Y, Zhu Q, Knight R, and Caporaso JG. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37: 852–857.

Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L., De León, L., Brena, B., Pérez, M. Piccini, C., Martínez de la Escalera, G., Chalar, G., Gonzalez Piana, M., Marigani, M., Aubriot, L (2015). Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. *Innotec*, 9-22.

Bonillo, M. C., Filippini, M. F., & Lipinski, V. (2015). Efectos de abonos orgánicos foliares: té de compost, té de lombricompost y supermagro en la productividad en cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.). In V Congreso Latinoamericano de Agroecología-SOCLA.

Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River (NJ): Prentice-Hall.

Bruno, Y., Carriquiry, M. R., Courdin, V., Durán, V., García, F., Hernández, A., Rodríguez, N., Tamosiunas, M., & Vasallo, M. (2011). Dinámica y competencia intrasectorial en el agro: Uruguay 2000-2010. Ediciones Universitarias.

Cadena, B. (2019). Evaluación de microorganismos de montaña y pro biótico comercial, en lechones de pre-cría en el cantón Babahoyo. Tesis de grado Universidad Técnica de Babahoyo, Los Ríos, Ecuador.

Cadena-Zamudio, J., Martínez-Peña, M., Guzmán-Rodríguez, L., Arteaga-Garibay, R., De Morelos, T., & México, J. (2016). Aplicación de secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. *Agroproductividad*, 9(2), 70-83.

Camacho, D. A. G. (2013). Manual electrónico de actinomicetos. Tesis de grado en Química farmacéutica. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Costello, E. K., Berg-Lyons, D., Gonzalez, A., Stombaugh, J., ... & Knight, R. (2011). Moving pictures of the human microbiome. *Genome biology*, 12(5), 1-8.

Cárcamo, M. I. (2020). Los plaguicidas altamente peligrosos (PAP) en Uruguay. Rapal. Uruguay.

Castillo Amador, C. J., & Urbina Zambrana, G. A. (2014). Evaluación del uso de microorganismos de montaña como probióticos naturales líquidos y sólidos en pollos de engorde, finca Santa Rosa, Managua. Tesis de doctorado, Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.).Castillo, R. M. (2002). Agroecología: atributos de sustentabilidad. *InterSedes: Revista de las Sedes Regionales*, 3(5), 25-45.

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

Ceroni, M. (2017). Profundización del capitalismo agrario en el Uruguay: dinámicas en el espacio agrario durante el comienzo del siglo XXI. *Revista NERA*, 20(35).

Cerrato, R. F., & Alarcón, A. (2001). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *CIENCIA ergo-sum, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva*, 8(2).

Chaboussou, F. (1986). How pesticides increase pests. *The Ecologist*, 16, 29-35.

Chaudhary, H. S., Soni, B., Shrivastava, A. R., Shrivastava, S. (2013). Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Vol. 3. S83 - S94.

Chavez Rios, G. (2012). Evaluación de la aplicación de cinco dosis de microorganismos eficientes, para el control de *Pythium* sp. y *Fusarium* sp. en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*) variedad Great Lakes 659 en lamas-San Martín.

Chen, M.-H., Jack, A. L. H., Cristina McGuire, I., and Nelson, E. B. (2012). Seed-colonizing bacterial communities associated with the suppression of *Pythium* seedling disease in a municipal biosolids compost. *Phytopathology* 102, 478–489.

Condor, A., Gonzalez, P. & Lakre, C. (2007). Effective microorganisms: Myth or reality? *The Peruvian Journal of Biology*, 14, 315–319.

Cuesta, G., García de la Fuente, R., Abad, M., & Fornes, F. (2012). Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. *Journal of Environmental Management*, 95, S280-S284.

D'Andrea, P. A.; Medeiros, M. B. (2002). Biofertilizantes biodinâmicos na nutrição e proteção de hortaliças. In *Congresso Brasileiro de Agricultura Orgânica, Natural, Ecológica e Biodinâmica*.

De Man, J. C., Rogosa, D., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of applied Bacteriology*, 23(1), 130-135.

de León, L., Banchemo, L., López-Pérez, J. A., & Bello, A. (2000). Control de *Meloidogyne incognita* en cultivo de tomate en Uruguay. *Bol. San. Veg. Plagas*, 26, 401-407.

de Medeiros, M. B., & da Silva Lopes, J. (2006). Biofertilizantes líquidos e sustentabilidade agrícola. *Bahia Agrícola*. Salvador, 7.

de Vries, F.T., Liiri, M.E., Bjørnlund, L., Bowker, M.A., Christensen, S., Setälä, H.M., Bardgett, R.D., 2012. Land use alters the resistance and resilience of soil food webs to drought. *Natural Climate Change* 2, 276–280.

Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F.T., Reich, P.B., Jeffries, T.C., Gaitan, J.J., Encinar, D., Berdugo, M., Campbell, C.D., Singh, B.K., (2016). Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Natural Communications*. 7(1), 1-8.

Derpsch, R., Florentin, M. A., & Moriya, K. (2000). Importancia de la siembra directa para alcanzar la sustentabilidad agrícola (No. 631.53 D437). Ministerio de Agricultura y Ganadería, San Lorenzo (Paraguay). Proyecto Conservación de Suelos MAG-GTZ.

Dias, N., de Brito, A., Neto, O., de Lira, R., & de Brito, R. (2009). Produção de alface hidropônica utilizando biofertilizante como solução nutritiva. *Revista Caatinga*, 22(4), 158-162.

Díaz, P., Alvarez, S., & Moses, M. (2002). Plaguicidas, tabaco y salud el caso de los jornaleros huicholes, jornaleros mestizos y ejidatarios en Nayarit.

Díaz, R., & Suárez, A. (2001). Evaluación de tres dosis de bocashi en el cultivo de lechuga tipo romana en La Esperanza, Honduras, 2000. Proyecto demostrativo de agricultura La Esperanza, 33.

DIEA, MGAP. (2016). Anuario estadístico agropecuario 2016.

Dong, L., Li, Y., Xu, J., Yang, J., Wei, G., Shen, L., & Chen, S. (2019). Biofertilizers regulate the soil microbial community and enhance *Panax ginseng* yields. *Chinese medicine*, 14(1), 1-14.

Doubou, C. L.; Hamby-S, M. K.; Crawford, D. L. and Beaulieu, C. (2001). Actinimycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*. 82(3):85-102.

EEAITAJ Estación Experimental Agropecuaria para Instalación de Tecnologías Apropriadas de Japón. (2013).

www.emuruaguay.org/PDF/Microorganismos_Eficaces_EM_Presentacion_breve.pdf

Ernst, F., Alonso, B., Colazzo, M., Pareja, L., Cesio, V., Pereira, A., Marquez, A., Errico, E., Segura, A., Heinzen, H., Perez-Parada, A. (2018). Occurrence of pesticide residues in fish from south American rainfed agroecosystems. *Science of the Total Environment*, 631, 169-179.

Esparza-Rivera, E., Lira-Saldivar, R. H., Hernández-Suárez, M., Rebeca, B. G., García-Cerda, L. A., & Puente-Urbina, B. (2014). Actividad antimicrobial de nanopartículas de cobre y óxido de zinc contra bacterias y hongos fitopatógenos. Conference 36 Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales.

Facio, S. R., Rica, C., & Carmona, S. U. (2017). Ingeniería Ecológica: efecto del uso de microorganismos de montaña sobre el suelo con base en dos cultivos agrícolas.

Feijoo, M. A. L. (2016). Microorganismos eficientes y sus beneficios para los agricultores. *Revista Científica Agroecosistemas*, 4(2), 31-40.

Franco-Correa, M. (2009). Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Rev. Perú. Biol.* 16(2):239-242.

Franco-Otero, V. G., Soler-Rovira, P., Hernández, D., López-de-Sá, E. G., & Plaza, C. (2012). Short-term effects of organic municipal wastes on wheat yield, microbial biomass, microbial activity, and chemical properties of soil. *Biology and Fertility of Soils*, 48(2), 205-216.

Froni, L. (2006). *Microbiología. Básica, ambiental y agrícola*. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Galeano, P., Galván, G., Cauci, A., Martinez, C., Oyhantcabal, G., Narbondo, I., Barcia, M., Burger, M., Bajsa, N., Evia, V., Artia, P., Bandeira, E., Taroco, L., Rosano, L., Rama, P., Franco, L., & Toledo, S. (2016). Cultivos transgénicos en Uruguay. Aportes para la comprensión de un tema complejo, CSIC, UdelaR.

García, C. (2016). Efecto de dos biopreparados a base de microorganismos eficientes sobre el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris*, L.) en Aguada de Pasajeros. Tesis de grado en Ingeniería Agronómica, Universidad de Cienfuegos. Cienfuegos, Cuba.

Gao L, Yang H, Wang X, Huang Z, Ishii M, Igarashi Y, Cui Z (2008) Rice straw fermentation using lactic acid bacteria. *Bioresour Technol* 99:2742–2748.

Gazzano, I., & Gómez, A. (2015). Agroecología en Uruguay. *Agroecología*, 10(2), 103-113.

Girón, C. E., Fuencisla, M. O., & Monterroza, M. P. (2012). Influencia de la aplicación de bokashi y lombriabono en el rendimiento de calabacín (*Cucurbita pepo*), espinaca (*Spinacia oleracea* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.) y remolacha (*Beta vulgaris* L.), bajo el método de cultivo biointensivo. *Revista Agrociencia*, 1(3), 28-40.

Gliessman, S. R. (2002). *Agroecología: procesos ecológicos en agricultura sostenible*. Catie.

González, J. D., Mosquera, J. D., & Trujillo, A. T. (2015). Efectos e impactos ambientales en la producción y aplicación del abono supermagro en el cultivo de sandía. *Ingeniería y Región*, (13), 103-111.

González, C. L. C., Novo, N. E. C., Serrano, A. S., Mendosa, T. J. E. J., & Vera, L. J. N. (2018). Caracterización microbiológica de seis biopreparados artesanales. *Revista Científica Agroecosistemas*, 6(3), 57-65.

Gopalakrishnan, S., Pande, S., Sharma, M., Humayun, P., Kiran, B. K., Sandeep, D. & Rupela, O. P. (2010). Evaluation of Actinomycetes isolated from herbal vermicompost for biological control of Fusarium wilt of chickpea. *Microbiological Research*, 32pp.

Goulart, R. G. T., dos Santos, C. A., de Oliveira, C. M., Costa, E. S. P., de Oliveira, F. A., de Andrade, N. F., & do Carmo, M. G. F. (2018). Desempenho agrônomico de cultivares de alface sob adubação orgânica em Seropédica, RJ. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, 8(3).

Guamán, A. (2017). Efecto de la aplicación de tres bioformulados en el desarrollo de 2 variedades de lechuga (*Lactuca sativa* L.) Var. Coolguard y Gentilina a campo abierto, en el cantón Riobamba, provincia de Chimborazo. Tesis de grado en Ingeniería Agronómica, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

CENTA. Guía Técnica 4, Microorganismos (2010). Proyecto para el apoyo a pequeños agricultores en la zona oriental. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal.

Hadar, Y. & Papadopoulou, K. (2012). Suppressive composts: microbial ecology links between abiotic environments and healthy plants. *Annual review of phytopathology*, 50, 133-153.

Haddoudi, I., Sendi, Y., Batnini, M., Romdhane, S. B., Mhadhbi, H., & Mrabet, M. (2017). The bean rhizosphere *Pseudomonas aeruginosa* strain RZ9 strongly reduces *Fusarium culmorum* growth and infectiveness of plant roots. Spanish journal of agricultural research, 15(2), 21.

Hamdi, Y. (1985). La fijación del nitrógeno en la explotación de los suelos. Boletín de suelos de la FAO., No. 49. 188 p.

Hata, F. T., Spagnuolob, F. A., de Paulaa, M. T., Moreiraa, A. A., Venturaa, M. U., de Freitas Fregonezic, G. A., & de Oliveiraa, A. L. M. (2020). Bokashi compost and biofertilizer increase lettuce agronomic variables in protected cultivation and indicates substrate microbiological changes. Emirates Journal of Food and Agriculture, 640-646.

Hernández González, M. M., Jiménez Garcés, C., Jiménez Albarrán, F. R., & Arceo Guzman, M. E. (2007). Caracterización de las intoxicaciones agudas por plaguicidas: perfil ocupacional y conductas de uso de agroquímicos en una zona agrícola del Estado de México, México. Revista internacional de contaminación ambiental, 23(4), 159-167.

Higa T (2000) What is EM technology? EM World J 1:1–6

Higa, T. (1991). Effective microorganisms: A biotechnology for mankind. In Proceedings of the first international conference on Kyusei nature farming. US Department of Agriculture, Washington, DC, USA (pp. 8-14).

Higa, T., & Parr, J. F. (1994). Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment (Vol. 1). Atami: International Nature Farming Research Center.

Higa, T., & Kinjo, S. (1991). Effect of lactic acid fermentation bacteria on plant growth and soil humus formation. In Proceedings of 1th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Khon Kaen, Thailand (pp. 140-147).

Higa, T., & Wididana, G. N. (1991). Changes in the soil microflora induced by effective microorganisms. In Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming. US Department of Agriculture, Washington, DC, USA (pp. 153-162).

Higa, T., & Wididana, G. N. (1991b). The concept and theories of effective microorganisms. In Proceedings of the first international conference on Kyusei nature farming. US Department of Agriculture, Washington, DC, USA (pp. 118-124).

Hirose, E., Neves, P. M., Zequi, J. A., Martins, L. H., Peralta, C. H., & Moino Jr, A. (2001). Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Brazilian Archives of Biology and Technology, 44(4), 419-423.

Huang, X., Zhao, J., Zhou, X., Han, Y., Zhang, J., & Cai, Z. (2019). How green alternatives to chemical pesticides are environmentally friendly and more efficient. European Journal of Soil Science, 70(3), 518-529.

Huayanca, L. (2016). Producción de abono Bocashi a partir de residuos vegetales y su aplicación en la fertilidad del suelo para la producción de *Lactuca sativa* en el Instituto “Manuel Arévalo”, distrito de Los Olivos–2016. Tesis de grado en Ingeniería Ambiental, Universidad Cesar Vallejo, Lima, Perú.

Huertas, S., César, D., & Gil, A. (2005). Buenas prácticas de manejo de bovinos en la cadena cárnica; experiencia de difusión y capacitación en Uruguay. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría.

Hussain T., Javaid A., Parr J., Jilani G., Haq M. (1999) Rice and wheat production in Pakistan with effective microorganisms. *Am J Alternative Agriculture* 14:30–36.

Hussain T., Anjum A., Tahir J. (2002) Technology of beneficial microorganisms. *Natural Farming Environment* 3:1–14

Intendencia de Canelones, 2015.
https://imcanelones.gub.uy/sites/default/files/noticias/archivos_adjuntos/d_0012-016.pdf

Javaid, A., & Bajwa, R. (2011). Field evaluation of effective microorganisms (EM) application for growth, nodulation, and nutrition of mung bean. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35(4), 443-452.

Joshi, H., Somduttand, C. P., & Mundra, S. L. (2019). Role of effective microorganisms (EM) in sustainable agriculture. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(3), 172-181.

Kalam, S., Basu, A., Ahmad, I., Sayyed, R. Z., El Enshasy, H. A., Dailin, D. J., & Suriani, N. (2020). Recent understanding of soil Acidobacteria and their ecological significance: A critical review. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2712.

Karam, M. Á., Ramírez, G., Montes, L. P. B., & Galván, J. M. (2004). Plaguicidas y salud de la población. *CIENCIA ergo-sum, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva*, 11(3), 246-254.

Kemler, M., Garnas, J., Wingfield, M. J., Gryzenhout, M., Pillay, K. A., & Slippers, B. (2013). Ion Torrent PGM as tool for fungal community analysis: a case study of endophytes in *Eucalyptus grandis* reveals high taxonomic diversity. *PLoS One*, 8(12), e81718.

Kennedy, A. C. (1999). Bacterial diversity in agroecosystems. *Invertebrate biodiversity as bioindicators of sustainable landscapes*, 65-76.

Kim J., Lee B. (2000) Mass production of *Rhodopseudomonas palustris* as diet for aquaculture. *Aquaculture engineering*, 23:281–293

Kim M., Choi K., Yin C. (2004) Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodospseudomonas palustris*, isolated from eutrophicated ponds. *Biotechnology Letter* 26:819–822.

Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of microbiological methods*, 58(2), 169-188.

Knapp, B. A., Ros, M., & Insam, H. (2010). Do composts affect the soil microbial community?. In *Microbes at work* (pp. 271-291). Springer, Berlin, Heidelberg.

Kruk, C., Suárez, C., Ríos, M., Zaldúa, N., & Martino, D. (2013). Ficha: análisis calidad de agua en Uruguay. Asesoramiento Ambiental Estratégico.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobbetti, M., (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4084–4090.

Leandro, B. Z., & Cristobal, Y. M. (2016). Respuesta de dos dosis de fertilización y tres niveles de bokashi en el rendimiento del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en el Distrito de Yanahuanca–Provincia de Daniel Carrión.

Leege, P. B., & Thompson, W. H. (1997). Test methods for the examination of composting and compost. US Composting Council.

Leoni, C., & Ghini, R. (2003). Efeito do lodo de esgoto na indução de supressividade in vitro a *Phytophthora nicotianae*. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 67-75.

Li, X., Shi, X. S., Lu, M. Y., Zhao, Y. Z., Li, X., Peng, H., & Guo, R. B. (2019). Succession of the bacterial community and functional characteristics during continuous thermophilic composting of dairy manure amended with recycled ceramsite. *Bioresource technology*, 294, 122044.

Liu, S. H., Liu, S. Q., Zhang, Z. K., Wei, H., Zhang, Y., Ma, L., & Dou, J. (2011). Impact of effective microorganisms on microbial communities and enzyme activities in rhizosphere soil of continuously cropped garlic. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, (3), 29.

Loja, C., & Méndez, K. (2015). Primeros cambios en la cantidad de bacterias, hongos, macroinvertebrados y propiedades físicas del suelo luego de la aplicación de enmiendas orgánicas en un suelo previamente manejado de forma convencional. Tesis de grado en Ingeniería Agronómica, Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

Lu, J. H., Chen, C., Huang, C., & Lee, D. J. (2020). Glucose fermentation with biochar-amended consortium: microbial consortium shift. *Bioengineered*, 11(1), 272-280.

Lutz, S., Thuerig, B., Oberhaensli, T., Mayerhofer, J., Fuchs, J. G., Widmer, F. & Ahrens, C. H. (2020). Harnessing the microbiomes of suppressive composts for plant protection: from metagenomes to beneficial microorganisms and reliable diagnostics. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1810.

Machaca, J. (2017). Influencia del uso de microorganismos eficientes en el tiempo de elaboración del compost a partir de residuos sólidos orgánicos en Tacna. Tesis de grado en Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional Jorge Basadre. Tacna, Perú.

Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Servin, A., De Vuyst, L. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology* 157, 241–247.

Martinez, A. D. P. C., Sanchez, R. L. A., Velasco, S. M., & Prado, F. A. (2014). Evaluación de microorganismos de montaña (mm) en la producción de acelga en la meseta de Popayán. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 12(1), 79-87.

Martínez Manzo, A. I. (2016). Evaluación comparativa de tres variedades de remolacha (*Beta vulgaris* L.) en sustrato potencializado con em-biol, mediante sistema organopónico Tesis de grado en Ingeniería Agronómica. Universidad Técnica de Babahoyo, Los Ríos, Ecuador.

Martinez, A., Sanchez, R., Velasco, S., & Prado, F. (2014). Evaluación de microorganismos de montaña (mm) en la producción de acelga en la meseta de Popayán. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 12(1), 79-87.

Martínez, V. R. (2002). Biofertilización y producción agrícola sostenible. In *Retos y perspectivas*. XIII Congreso Científico del INCA. La Habana.

Marulanda, S., Restrepo, G. M., Fe-Pérez, Y., Díaz, A., Vera, L., & Hernández, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 63-76.

Matthijs, S., Tehrani, K. A., Laus, G., Jackson, R. W., Cooper, R. M., & Cornelis, P. (2007). Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity. *Environmental Microbiology*, 9(2), 425-434.

Mavrodi, O. V., Walter, N., Elateek, S., Taylor, C. G., & Okubara, P. A. (2012). Suppression of *Rhizoctonia* and *Pythium* root rot of wheat by new strains of *Pseudomonas*. *Biological Control*, 62(2), 93-102.

Mazaro, S. M., Mangnabosco, M. C., Citadin, I., Paulus, D., & de Gouvêa, A. (2013). Strawberry production and quality under different concentrations of bordeaux mixture, lime sulfur and the biofertilizer supermagro. *Semina: Ciências Agrárias*, 34, 3285-3294.

Medeiros, M. (2000). Effect of liquid biofertilizer on the oviposition of *Brevipalpus phoenicis*. In: International symposium of undergraduate research, 9.

Medeiros, M., Wanderley, P., Wanderley, M. (2003). Biofertilizantes líquidos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.31, p.38-44.

Melloni, R., Duarte, K., & Cardoso, E. (1995). Efeito do composto de lixo urbano e/ou de EM 4 (effective microorganisms) no desenvolvimento de pepino (*Cucumis sativus*) e no controle de fusariose. *Summa Phytopathologica*, 21(1), 21-24.

Milagrosa, S. P., & Balaki, E. T. (1996). Influence of Bokashi organic fertilizer and effective microorganisms (EM) on growth and yield of field grown vegetables. In fifth International Conference on Kyusei Nature Farming, Thailand, pp. 84-91.

Milian, M., Ramírez, J. , Valero, E. , Casanova, C. , Quintana, C. , & Matos, W. (2014). Efecto de microorganismos eficientes (ME-50) sobre la morfología y el rendimiento del cultivo del arroz (*Oryza sativa*) en Aguada de Pasajeros. *Revista Científica Agroecosistemas*, 2(2).

MGAP (2020). <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/politicas-y-gestion/planes-uso-manejo-suelos>

Montenegro, E. J., & Martinez Blandon, D. O. (2012). Efecto de la aplicación del abono tipo bocashi sobre el rendimiento productivo en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* mill), bajo riego, San Isidro.

Montero, S. (2019). Eficacia de los microorganismos eficientes en la elaboración de compost con materia orgánica generados en los mercadillos de Cayhuayna, Distrito de Pillco Marca, Departamento de Huanuco. Tesis de grado en Ingeniería Ambiental, Universidad de Huanuco. Huanuco, Perú.

Morales G. A. (2008). Buenas prácticas agropecuarias. San José Costa Rica: Ministerio de Agricultura y Ganadería

Morales, F., & Swietenia, D. (2014). Mezcla de suelo y tezontle con compost y bocashi como fuente nutrimental para la producción casera de hortalizas de porte bajo. Tesis de maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de México, Ciudad de México, México.

Morón, A. (2003). Efecto de las rotaciones Cultivos-Pasturas sobre la fertilidad de los suelos en ensayos de larga duración del INIA La Estanzuela (1963-2003). *Inf. Agronómicas*, 1-20.

Muñoz, E., & Mauricio, A. (2004). Evaluación de la aplicación del fertilizante foliar Super Magro en *Vitis vinifera* L. cv. Carmenere en uva viña orgánica, Quilpue quinta región. Tesis de grado de Ingeniería Agronómica, Universidad Católica del Maule. Maule, Chile.

Murphy, D. V., Stockdale, E. A., Brookes, P. C., & Goulding, K. W. (2007). Impact of microorganisms on chemical transformations in soil. In *Soil biological fertility*. 37-59.

- Nelson, P. E., Dignani, M. C., & Anaissie, E. J. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical microbiology reviews*, 7(4), 479-504.
- Neri, J. C., Oclocho, F. E., Huamán, E., & Collazos, R. (2017). Influencia de la aplicación de biopreparados en el rendimiento del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Revista UNTRM*, 11-15.
- Noble, R., & Coventry, E. (2005). Suppression of soil-borne plant diseases with composts: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 15(1), 3-20.
- Nogar, A. G., & Larsen, B. A. (2014). Análisis de riesgos en la salud de la población rural de la pampa argentina por uso de agroquímicos en cultivo de soja. *RIAA*, 5(2), 71-84.
- Olivera, D., Ayala, J. L., & Calero, A. (2014). Prácticas agroecológicas en la provincia de Sancti Spíritus, Cuba. Microorganismos eficientes (EM), una tecnología apropiada sobre bases agroecológicas. *Revista Logos Ciencia & Tecnología*, 1(7).
- Ortiz, M. L. (2009). Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina. *Orinoquia*, 13(2), 137-144.
- Oyhantçabal, G., & Narbondo, I. (2011). Radiografía del agronegocio sojero. Descripción de los principales actores y los impactos socio-económicos en Uruguay. *Redes—Amigos de la tierra (REDES-AT)*. Montevideo.
- Pal, K., & Gardener, B. (2006). Biological control of plant pathogens. *Plant Health Instruct.* 2:1117-1142.
- Palacios-Nava, M., Paz-Román, P., Hernández-Robles, S., & Mendoza-Alvarado, L. (1999). Sintomatología persistente en trabajadores industrialmente expuestos a plaguicidas organofosforados. *Salud pública de México*, 41, 55-61.
- Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., Zhang, L., & Suh, J. W. (2013). Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(22), 9621-9636.
- Pampulha, M. E., & Oliveira, A. (2006). Impact of an herbicide combination of bromoxynil and prosulfuron on soil microorganisms. *Current Microbiology*, 53(3), 238-243.
- Park, G. S., Khan, A. R., Kwak, Y., Hong, S. J., Jung, B., Ullah, I., & Shin, J. H. (2016). An improved effective microorganism (EM) soil ball-making method for water quality restoration. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1100-1107.
- Parr, J. F., Hornick, S. B., & Simpson, M. E. (1994). Second International Conference on Kyusei Nature Farming. In *International Conference on Kyusei Nature Farming 1991*: Luiz de Queiroz College of Agriculture, University of São Paulo.

Pedini, S. (2012). Cafeicultura Orgânica, Arborização e Certificação. Material de apoio à disciplina de Arborização, Cafeicultura Orgânica e Certificação do curso de pós-graduação lato senso de Cafeicultura Empresarial. Brasil.

Pei-Sheng, Y., & Hui-Lian, X. (2002). Influence of EM Bokashi on nodulation, physiological characters and yield of peanut in nature farming fields. *Journal of Sustainable Agriculture*, 19(4), 105-112.

Pérez, A., Céspedes, C., & Núñez, P. (2008). Caracterización física-química y biológica de enmiendas orgánicas aplicadas en la producción de cultivos en República Dominicana. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*, 8(3), 10-29.

Pérez, A., Céspedes, C., & Núñez, P. (2008). Caracterización física-química y biológica de enmiendas orgánicas aplicadas en la producción de cultivos en República Dominicana. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*, 8(3), 10-29.

Perez, M., & Mesa, F. (2018). Entrebichitos: una experiencia emancipadora desde la educación formal en la comunidad de Casavalle. *Cadernos de Agroecología*, 13(1).

Pimentel, A. J. (2015). Efecto de los microorganismos eficaces (EM) en el rendimiento del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) variedad yungay en condiciones de Huacrachuco-Huánuco. Tesis de grado en Ingeniería Ambiental, Universidad de Huanuco. Huanuco, Perú.

Piñeiro S. (2009). Diplomado en agricultura orgánica, cromatografía y permacultura. Instituto Tecnológico Superior de Uruapan, Uruapan, Michoacán.

Fossati, M. (2010). Preparación y usos de Microorganismos Eficientes Nativos (MEN), (2010). Programa “Rescate y Revalorización de Variedades Nativas y Criollas y Soberanía Alimentaria” hacia una Red de Semillas Locales.

Prieto, A., Castiglioni, F., Chiappe, M., Gómez, A., & García, M. (2002). Estrategias de producción orgánica en establecimientos familiares de Montevideo y Canelones. *Agrociencia*, 6(1), 79-91.

Ramírez Coello, E. L. (2018). Alternativas en el manejo del chinche del arroz (*Oebalus insularis*) con la utilización de una fuente de microorganismos eficientes en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) en el cantón Mocache–Los Ríos-Ecuador.

Rapal Uruguay (2012). http://www.rapaluruguay.org/agrotoxicos/Uruguay/Escuelas_fumigadas_regulacion_que%20_no%20_se_cumple.htm

Rashid, M. T., & West, J. (2007). Dairy wastewater treatment with effective microorganisms and duckweed for pollutants and pathogen control. *Wastewater reuse–risk assessment, Decision-making and environmental security*, 93.

Rembialkowska, E., Załęcka, A., Badowski, M., & Ploeger, A. (2012). La calidad de los alimentos producidos orgánicamente. <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Organicos/documentos/La-calidad-de-los-alimentos-producidos-organicamente.pdf>

Restrepo, J. (1996). Abonos orgánicos fermentados: experiencias de agricultores en Centroamérica y Brasil. CEDECO. San José Costa Rica.

Restrepo, J. (2007). El ABC de la agricultura orgánica, fosfitos y panes de piedra. Colombia.

Restrepo, J. & Pinheiro, S. (2011). Cromatografía: imágenes de vida y destrucción del suelo. Cali: Feriva.

Riccioppo, R. (2011). Agroquímicos: Sus efectos en la población-Medidas de prevención. Colegio de Médicos de la Provincia de Buenos Aires.

Rodriguez, A. (2003). Posibilidades de uso de agentes microbianos nativos para el control de plagas en la Agricultura Orgánica e Integrada en Uruguay. El País Agropecuario.

Rodriguez, M. y Paniagua, G. (1994). Horticultura orgánica: una guía basada en la experiencia en Laguna de Alfaró Ruiz. Costa Rica.

Rodríguez, M., Torres, M., Blanco, L., Béjar, V., Sampedro, I., & Llamas, I. (2020). Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Scientific reports*, 10(1), 1-12.

Roel, A. R., Leonel, L. A. K., Favaro, S. P., Zatarim, M., Momesso, C. M. V., & SOARES, M. V. (2007). Avaliação de fertilizantes orgânicos na produção de alface em Campo Grande, MS. *Scientia Agraria*, 8(3), 325-329.

Román, P., Martínez, M. M., & Pantoja, A. (2013). Manual de compostaje del agricultorexperiencias en América Latina. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Ruiz Lopez, M. A. (2013). Comportamento químico e microbiológico no biofertilizante tipo supermagro. Tesis de Maestría en Agronomía, Universidade de Brasilia. Brasilia, Brasil.

Ruiz-Toledo, J., & Sánchez-Guillén, D. (2014). Efecto de la concentración de glifosato presente en cuerpos de agua cercanos a campos de soya transgénica sobre la abeja *Apis mellifera* y la abeja sin aguijón *Tetragonisca angustula*. *Acta zoológica mexicana*, 30(2), 408-413.

Saison, C., Degrange, V., Oliver, R., Millard, P., Commeaux, C., Montange, D., & Le Roux, X. (2006). Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environmental microbiology*, 8(2), 247-257.

Saldaña, K. S., & Ocampo, P. B. (2006). Aspectos socioeconómicos y culturales en el uso de agroquímicos y plaguicidas en los Altos de Morelos, México. *Revibec: revista iberoamericana de economía ecológica*, 3, 33-47.

Santos, A. C.; Sampaio, H. N. (1993). Efeito do biofertilizante líquido obtido da fermentação anaeróbica do esterco bovino, no controle de insetos prejudiciais à lavoura citros. In: Seminario bienal de pesquisa, 6.

Saravanan, P., Kumar, S. S., & Ajithan, C. 2013. Eco-friendly Practice of Utilization of Food Wastes. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Innovation*, 14-17.

Sangakkara, U. R., & Higa, T. (1994). Effect of EM on nitrogen fixation by bush bean and mungbean. In *Proceedings of the Second International Conference on Kyusei Nature Farming*, US Department of Agriculture, Washington, DC, USA (pp. 111-117).

Sangakkara, U. R. (1996). Effect of EM on nitrogen and potassium levels in the rhizosphere of bush bean. In *Proceedings of the 3rd International Conference on Kyusei Nature Farming*, USDA, Santa Barbara, CA (pp. 216-222).

Shintani, M., Leblac, H., & Tabora, P. (2000). Tecnología tradicional adaptada para una agricultura sostenible y un manejo de desechos modernos. Guácimo (CR): Universidad EARTH. Guía para uso práctico, 1, 25.

Shoebitz, M., Ribaudó, C. M., Pardo, M. A., Cantore, M. L., Ciampi, L., & Cura, J. A. (2009). Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9), 1768-1774.

Sigstad, E. E., Schabes, F. I., & Tejerina, F. (2013). A calorimetric analysis of soil treated with effective microorganisms. *Thermochimica Acta*, 569, 139-143.

Smit E., Leeflansg P., Gommans S., van den Broek J., van Mil S., y Wernars K. (2001). Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2284-2291.

Soto, G., Meléndez, G., & Uribe, L. (2003). Abonos orgánicos: principios, aplicaciones e impacto en la agricultura Universidad de Costa Rica, San José (Costa Rica). Centro de Investigaciones Agronómicas.

Sparling, G.P., & West, A.W. (1990). A comparison of gas chromatography and differential respirometer methods to measure soil respiration and to estimate the soil microbial biomass. *Pedobiologia*, 34, 103-112.

Suchini, J. (2013). Innovaciones agroecológicas para una producción agropecuaria sostenible en la región del Trifinio. (No. E21-33). CATIE.

Tapia-García, E. Y., Hernández-Trejo, V., Guevara-Luna, J., Rojas-Rojas, F. U., Arroyo-Herrera, I., Meza-Radilla, G. & Estrada-de Los Santos, P. (2020). Plant growth-promoting bacteria isolated from wild legume nodules and nodules of *Phaseolus vulgaris* L. trap plants in central and southern Mexico. *Microbiological Research*, 239, 126522.

Tarigo, A., Repetto, C., & Acosta, D. (2004). Evaluación agronómica de biofertilizantes en la producción de lechuga (*Lactuca sativa*) a campo. Tesis de grado en Ingeniería Agronómica, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Teixeira de Mello, F. (2007). Efecto del uso del suelo sobre la calidad del agua y las comunidades de peces en sistemas lóticos de la cuenca baja del Río Santa Lucía (Uruguay). Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Tiquia, S. M., Wan, H. C., & Tam, N. F. (2002). Microbial population dynamics and enzyme activities during composting. *Compost Sciences and Utilizations*, 10(2), 150-161.

Toalombo, R. M. (2012). Evaluación de microorganismos eficientes autóctonos aplicados en el cultivo de cebolla blanca (*Allium fistulosum*). Tesis de grado de Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica de Ambato. Cevallos, Ecuador.

Tokeshi H, Chagas PRR (1997) Control of sweet pepper anthracnose with effective microorganisms under greenhouse conditions. In: 11th IFOAM International Science Conference, Copenhagen, Denmark, 11–15 Aug 1996.

Tokeshi, H., Lima, M. A. T., & Jorge, M. J. A. (1996). Effect of EM and green manure on soil productivity in Brazil. In Proceedings of the Third International Conference on Kyusei Nature Farming. US (pp. 193-202).

Torsvik, V., Øvreås, L., & Thingstad, T. F. (2002). Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296(5570), 1064-1066.

Trejos, Y. & Cedeño, W. (2016). Alimentos con sabor a agroquímicos. Contaminación agrotóxica de alimentos y sus efectos en la salud de la población costarricense, 1950-2015. VI Conferencia de la Tierra. Foro de Medio ambiente. Universidad Nacional de Costa Rica.

Trinidad, A. (2013). Abonos orgánicos. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Subsecretaría de Desarrollo Rural.

Vaikuntapu, P. R., Dutta, S., Samudrala, R. B., Rao, V. R., Kalam, S., & Podile, A. R. (2014). Preferential promotion of *Lycopersicon esculentum* (Tomato) growth by plant growth promoting bacteria associated with tomato. *Indian journal of microbiology*, 54(4), 403-412.

Valdivieso, M. (2013). Obtención y caracterización de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* superproductoras de glutatión. Editorial de la Universidad de Granada.

- Valerio, F., Bellis, P.D., Lonigro, S.L., Visconti, A., Lavermicocca, P. (2008). Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread-making to prevent *Bacillus subtilis* rosy spoilage.
- 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.
- Van Elsas J., Garbeva P., y Salles J. (2002). Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation*, 13: 29–40.
- Van Niel, C. B. (1971). Techniques for the enrichment, isolation, and maintenance of the photosynthetic bacteria. In *Methods in enzymology*, 23:3-28.
- Venkateswarlu, B. & Srinivasarao, C. (2005). Soil Microbial Diversity and the Impact. *Indian Journal of Dryland Agriculture Research and Development*, 19(2), 97-105.
- Viciedo, D. O., Leiva, L., Calero, A., & Meléndrez, J. F. (2015). Empleo de microorganismos nativos multipropósitos (MNM) en el comportamiento agro productivo de cultivos hortícolas. *Agrotecnia de Cuba*, 39(7).
- Viteri, S. (2002). Selección de cultivos de cobertura con potencial para el desarrollo agrícola sostenible en el municipio de Samacá, Boyacá. Tesis de Maestría en Desarrollo Rural, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja, Colombia.
- Wagg, C., Schlaeppi, K., Banerjee, S., Kuramae, E., van der Heijden, M., (2019). Fungal-bacterial diversity and microbiome complexity predict ecosystem functioning. *Nature Communications*. 10(1), 1-10
- Weller, D. M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97(2), 250-256.
- Xiong, W., Li, R., Ren, Y., Liu, C., Zhao, Q., Wu, H. & Shen, Q. (2017). Distinct roles for soil fungal and bacterial communities associated with the suppression of vanilla *Fusarium* wilt disease. *Soil Biology and Biochemistry*, 107, 198-207.
- Xu, H. L. (2001). Effects of a microbial inoculant and organic fertilizers on the growth, photosynthesis and yield of sweet corn. *Journal of crop production*, 3(1), 183-214.
- Yanes, M. L., & Bajsa, N. (2016). Fluorescent *Pseudomonas*: a natural resource from soil to enhance crop growth and health. In *Microbial models: From environmental to industrial sustainability* (pp. 323-349). Springer, Singapore.

Yu, D., Sinkkonen, A., Hui, N., Kurola, J. M., Kukkonen, S., Parikka, P. & Romantschuk, M. (2015). Molecular profile of microbiota of Finnish commercial compost suppressive against *Pythium* disease on cucumber plants. *Applied Soil Ecology*, 92, 47-53.

Zakaria, Z., Gairola, S., & Shariff, N. M. (2010). Effective microorganisms (EM) technology for water quality restoration and potential for sustainable water resources and management. In: International congress on environmental modelling and software modelling for environment's sake. Fifth Biennial meeting, Ottawa, Canada, pp. 8

Zhao, L., Wang, F., & Zhao, J. (2014). Identification and functional characteristics of chlorpyrifos-degrading and plant growth promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of basic microbiology*, 54(5), 457-463.

Zhen, Z., Liu, H., Wang, N., Guo, L., Meng, J., Ding, N., & Jiang, G. (2014). Effects of manure compost application on soil microbial community diversity and soil microenvironments in a temperate cropland in China. *PloS one*, 9(10), e108555.

Zoppolo, R. (2014) Producción orgánica en el cultivo del duraznero. *Boletín de Divulgación INIA*, 94.