



Compatibilidad y tiempo de sobrevivencia de cuatro microorganismos benéficos de uso agrícola en biol

Compatibility and survivorship of four beneficial microorganism used in boils in agriculture

Villacís-Aldaz Luis*, Chungata Luis, Pomboza Pablo, León Olguer

Datos del Artículo	Resumen
<p>Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Técnica de Ambato. Tungurahua – Ecuador. Casilla postal: 18-01-334. Telf: (+593)032872630-0985471191 luis.chungata@hotmail.com ptamaquiza@gmail.com olguerleon@yahoo.es</p> <p>*Dirección de contacto: Luis Villacís-Aldaz Cantón Cevallos-Tungurahua. Ecuador. Casilla postal: 18-01-334. Telf: (+593) 032872630 – 0985471191. E-mail: la.villacis@uta.edu.ec</p>	<p>Se evaluó la compatibilidad y sobrevivencia de microorganismos benéficos presentes en bioles de uso agrícola con el propósito de generar nuevas tecnologías de producción sustentables. El estudio fue realizado en una granja agroecológica del Gobierno Provincial de Tungurahua. Se evaluó la sobrevivencia y compatibilidad de <i>Trichoderma harzianum</i>, <i>Metarhizium anisopliae</i>, <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Paecilomyces lilacinus</i> en un biol de elaboración artesanal. Los tratamientos consistieron en aplicar 0 mL (T0), 50 mL (T1), 100 mL (T2) y 150 mL (T3) de la combinación de los microorganismos en 20 L de biol. A los 30 días, la mayor población de <i>Metarhizium</i>, <i>Trichoderma</i> y <i>Beauveria</i> fue observado en el T3 (9.1×10^5 UPC/mL de biol) con pH 3.80. A los 60 días, se verificó que la mayor población fue observada en el T2 (2.1×10^6 UPC/mL) a pH 4.95. Se observó que los géneros <i>Paecilomyces</i> y <i>Beauveria</i> no crecieron juntos, lo que permite sugerir una posible incompatibilidad.</p> <p>© 2016. Journal of the Selva Andina Biosphere. Bolivia. Todos los derechos reservados.</p>
<p>Palabras clave:</p> <p>Agroecológico, biol, hongos, microbiológico, pH, sustentable.</p>	<p>Abstract</p>
<p><i>J Selva Andina Biosph.</i> 2016; 4(1):39-45.</p>	<p>Compatibility and survival of a mixture of beneficial microorganisms in a biol used in agriculture were evaluated in order to generate new sustainable production technologies. The study was carried out in an agro ecological farm of the Provincial Government of Tungurahua. Survival and compatibility of <i>Trichoderma harzianum</i>, <i>Metarhizium anisopliae</i>, <i>Beauveria bassiana</i> and <i>Paecilomyces lilacinus</i> in a homemade biol were evaluated. Treatments consisted in adding 0 mL (T0), 50 mL (T1), 100 mL (T2) or 150 mL (T3) of a microorganism combination in 20 L biol. At day 30, higher population of <i>Metarhizium</i>, <i>Trichoderma</i> and <i>Beauveria</i> was observed in T3 (9.1×10^5 UPC/mL biol) at pH 3.80. At day 60, higher population was verified in T2 (2.1×10^6 UPC/mL) at pH 4.95. Genera <i>Paecilomyces</i> and <i>Beauveria</i> were not observed growing together, suggesting a possible incompatibility between them.</p>
<p>Historial del artículo.</p> <p>Recibido febrero, 2016. Devuelto abril 2016 Aceptado mayo, 2016. Disponible en línea, mayo 2016</p>	<p>© 2016. Journal of the Selva Andina Biosphere. Bolivian. All rights reserved.</p>
<p>Editado por: <i>Selva Andina Research Society</i></p>	
<p>Key words:</p> <p>Agro ecological, Boil, Fungi, Microbiological, pH, sustainable.</p>	

Introducción

La continua demanda de aumento en la producción y rendimiento de cultivos ha provocado el incremento en el uso de fertilizantes químicos en la agricultura (Pino 2009). Adicionalmente, la creciente susceptibilidad de algunos cultivos al ataque de plagas también ha favorecido el uso de plaguicidas en detrimento de las poblaciones de microorganismos benéficos del suelo (Sánchez 2009). Este hecho ha ocasionado problemas de contaminación ambiental por la acumulación de tóxicos, entre los cuales se incluyen los metales pesados cuya incorporación a las cadenas alimentarias ha acarreado problemas de salud humana (Semu & Singh 1996). Por otra parte, la microflora y fauna del suelo son de ponderable importancia ecológica, sin embargo, actualmente el equilibrio ecológico de estos organismos ha sido alterado por el uso excesivo de agroquímicos (Campo-Martínez *et al.* 2014).

La contaminación de los alimentos debido al uso excesivo de fungicidas sintéticos constituye un problema concomitante, por lo que la utilización de microorganismos benéficos para sustituir el uso de agroquímicos representa una alternativa a escala mundial (Ferrera-Cerrato & Alarcón 2001, Navia *et al.* 2013). La combinación de varios microorganismos benéficos (EMs) fue desarrollada en la Universidad de Ryukyus en Okinawa, Japón en 1980, quienes comenzaron la búsqueda de una alternativa para la producción de alimentos en el mundo entero. Inicialmente los EMs se utilizaron como acondicionador del suelo y actualmente son también usados para producir alimentos de altísima calidad, libres de agroquímicos, así como para el manejo de desechos sólidos y líquidos generados por la producción agropecuaria, la industria de procesamiento de ali-

mentos, fábricas de papel, mataderos y municipalidades, entre otros (Zapata 2015).

La presente investigación fue realizada con el fin de evaluar la compatibilidad y el tiempo de sobrevivencia de cuatro microorganismos benéficos (*Trichoderma harzianum*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus*) de uso agrícola en los bioles, con el propósito de obtener cultivos limpios y garantizando técnicas amigables con el medio ambiente.

Materiales y métodos

El estudio se desarrolló en la Granja Agroecológica Píllaro perteneciente al Consejo Provincial de Tungurahua, Ecuador (01°10'S; 78°32'W), ubicada a 2.825 msnm, con temperatura promedio de 13.5 °C (Datos obtenidos con GPS Garmin).

Tabla 1 Insumos usados para preparar 200 L de biol

Insumos	Cantidad	Unidad	Presentación
Estiércol fresco de bovino	60	lb	Semi-sólido
Hierbas frescas aromáticas	5	lb	Sólido
Hierbas frescas leguminosas	10	lb	Sólido
Sulfato de cobre	2	lb	Sólido
Carbonato de calcio	2	lb	Sólido
Levadura de cerveza	2	lb	Sólido
Melaza	30	l	Líquido
Roca fosfórica	4	lb	Sólido
Sulfato de potasio	4	lb	Sólido
Bórax	200	g	Sólido
Azufre micronizado	200	g	Sólido
Sulfato de hierro	100	g	Sólido
Sulfato de magnesio	200	g	Sólido

Se evaluó la sobrevivencia y compatibilidad de diferentes microorganismos benéficos en un biol de

elaboración artesanal (Tabla 1). Los microorganismos evaluados fueron *Trichoderma harzianum*, (2.5×10^9 UPC/g de sustrato), *Metarhizium anisopliae*, (2.5×10^9 UPC/mL de producto), *Beauveria bassiana* (2.5×10^9 UPC/mL de producto) y *Paecilomyces lilacinus* (2.5×10^9 UPC/mL producto), adquiridos en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, los cuales fueron adicionados al biol y mantenidos bajo cubierta en recipientes de 200 L. Los tratamientos consistieron en aplicar 0 (T0), 50 (T1), 100 (T2) y 150 mL (T3) de la combinación de los microorganismos en 20 L de biol.

Las variables evaluadas fueron: número poblacional y compatibilidad de los EMs. Adicionalmente se midió pH, conductividad eléctrica y densidad del biol. En cada tratamiento se tomaron muestras de 100 mL a los 30 y 60 días después de iniciada la inoculación. Cada muestra fue colocada en frascos de vidrio herméticamente cerrados, rotulados y enviados al laboratorio de fitopatología de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo para su identificación mediante el Método de Placa Pobre o Extensión.

El ensayo fue conducido en un diseño de completamente al azar con tres repeticiones. Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza y las variables que mostraron diferencias significativas fueron sometidas a prueba de medias según Tukey ($p < 0.05$) usando el paquete estadístico Infostat, versión estudiantil.

Resultados

En el análisis microbiológico antes de la inoculación de EMs mostró la presencia de *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp. y *Rhizopus* sp. (Tabla 2).

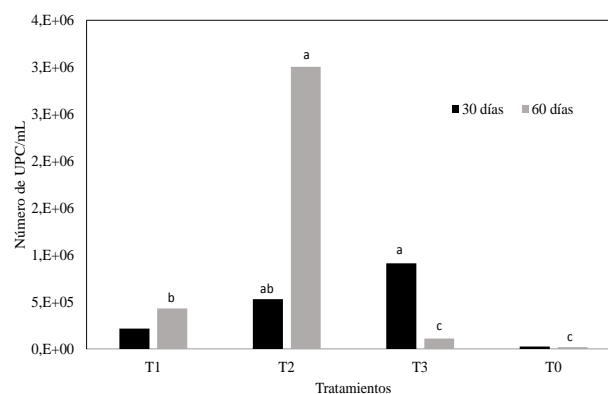
Tabla 2 Análisis microbiológico del biol antes de la inoculación de los EMs.

Hongos	Cantidad UPC/mL
<i>Aspergillus</i> sp.	3.0×10^4
<i>Rhizopus</i> sp.	2.0×10^4
<i>Alternaria</i> sp.	2.0×10^4
<i>Penicillium</i> sp.	1.0×10^5

UPC/mL: Unidad propagadora de colonias

Número de unidades propagadoras de colonias (UPC). Se observaron diferencias significativas en el número promedio de UPC/mL a los 30 y 60 días después del inicio del ensayo ($p_{30 \text{ días}} < 0.0148$, F: 6.60, gl: 11 y $p_{60 \text{ días}} < 0.000$, F: 1243.72, gl: 11) (Fig. 1).

Figura 1 Número promedio de Unidades Propagadoras de colonias (UPC/mL) a los 30 y 60 días de inoculado



A los 30 días, se observó que el número promedio de UPC/mL fue de 2.2×10^5 en el biol tratado con 50 mL de microorganismos, mientras que se observó un incremento de 2.45 y 4.20 veces en el biol donde se adicionaron 100 y 150 mL de microorganismos, respectivamente. El mayor número de UPC/mL (2.1×10^6) se lo encontró en el tratamiento T2 (100 mL de cada uno de los EMs), seguido del T3 (150 mL de cada uno de los EMs), con un pH de 4.72 con un

numero de UPC/mL, 8.6×10^5 ubicándose en último lugar al testigo con el menor promedio de 1.6×10^4 UPC/mL.

En la evaluación hecha 60 días después de la inoculación también se observó un incremento en el número de UPC/mL en los diferentes tratamientos, sin embargo este número fue significativamente mayor en el biol donde se agregaron 100 mL de microorganismos. Por otra parte, la inoculación de los EMs provocó un incremento de nutrientes en nitrógeno, fósforo, calcio y magnesio (Tabla 3).

En el análisis de compatibilidad y el tiempo de sobrevivencia de los microorganismos a los 30 días se observaron niveles poblacionales altos de los géneros de hongos *Trichoderma* sp., *Metarhizium* sp. y *Beauveria* sp., con 9.1×10^5 UPC/mL, en el T3, el cual tenía un pH 3.80. En el segundo análisis (60 días), se encontraron mayores niveles poblacionales de los hongos *Trichoderma* sp., *Metarhizium* sp., y *Paecilomyces* sp., con relación a los 30 días, siendo de 2.1×10^6 UPC/mL en el T2.

Tabla 3 Análisis químico del biol antes y después de la inoculación de los EMs.

0 a 60 días	pH	CE cs/cm	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Fe ppm
Antes	5,95	21,12	0,21	0,35	0,87	0,96	0,16	1,38
Después	5,0	28,16	1,50	2,21	0,38	2,40	0,33	0,005

Características físicas del biol. Los resultados de las variables físico-químicas del biol (Tabla 4). En general, se observó un incremento en los valores de pH, CE y la densidad del biol a los 60 días con relación a los valores observados a los 30 días. Los va-

lores de pH estuvieron en el rango de ligeramente ácido, con valores de 4.05, 3.73, 4.05 y 3.80 para los tratamientos T0, T1, T2 y T3, respectivamente, los cuales se incrementaron en 7.4, 44.8, 16.5 y 30.3 %, respectivamente.

Tabla 4 Propiedades físico-químicas del biol a 30 y 60 días después de inoculados con los EMs

Inóculo	pH		CE mmhos/cm		Densidad	
	30 días	60 días	30 días	60 días	30 días	60 días
0	4.05 ± 0.000	4.35 ± 0.000	20.37 ± 0.252	27.07 ± 0.252	1.00 ± 0.000	1.01 ± 0.000
50 ml	3.73 ± 0.161	5.40 ± 0.400	20.30 ± 0.000	28.40 ± 0.265	0.98 ± 0.016	1.01 ± 0.005
100 ml	4.05 ± 0.134	4.72 ± 0.765	18.22 ± 10.519	29.87 ± 0.058	0.99 ± 0.005	1.01 ± 0.001
150 ml	3.80 ± 0.180	4.95 ± 0.695	23.05 ± 0.050	25.60 ± 0.100	0.99 ± 0.574	1.00 ± 0.002

Con relación a la CE, ésta mostró un incremento que varió entre 32.9 y 63.9 % en los tratamientos control y T2 (100 mL de microorganismos), mientras que en el tratamiento donde fueron adicionados 150 mL de microorganismos la variación a los

60 días fue de apenas 11.1 % con respecto al valor a los 30 días.

Discusión

La presencia de *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., y *Rhizopus* sp., pudo ser debido al tipo de insumos utilizados en la preparación del biol. Estos microorganismos han mostrado alta capacidad para producir antibióticos y micotoxinas que compiten con otras especies fúngicas (Arias *et al.* 2008). Por otro lado, este grupo de hongos posee un complejo de enzimas que les permite aprovechar el fósforo y el nitrógeno o degradar ácidos nucleicos y glicerofosfatos o fosfatos simples. De acuerdo con Díaz *et al.* (2009), estos hongos son saprófitos, habitantes naturales de materiales en descomposición por lo que es razonable encontrarlos en niveles poblacionales altos.

En los resultados del laboratorio con microorganismos en los primeros 30 días, tanto *Penicillium* y *Aspergillus* fueron encontrados en bajas poblaciones, demostrando la ubicuidad y la capacidad de crecer en diferentes temperaturas sobre sustratos o un caldo de cultivo, producen una amplia gama de antibióticos y micotoxinas, dificultando el crecimiento de otras especies. Los géneros de hongos *Trichoderma* sp., *Metharhizum* sp., y *Beauveria* sp., fueron encontrados en poblaciones altas sugiriendo que existe compatibilidad entre ellos.

Contrario a lo esperado, se obtuvo un mayor número de UPC/mL en el biol tratado con 100 mL de inóculo. Aunque el tamaño del inóculo tiene una influencia importante sobre el crecimiento de un microorganismo (Velastegui 2005, Bidlas *et al.* 2008), otros factores tales como pH, temperatura y presión de vapor parcial también pueden favorecer o no el crecimiento de los microorganismos (Leistner 2000). Basados en los estudios de Velas-

tegui (2005), el pH podría ser considerado el factor determinante en el crecimiento microbiano, sugiriendo que estos microorganismos benéficos pueden reproducirse entre valores de pH entre 4.0 y 6.5. En tal sentido, probablemente el valor de pH alcanzado en el T2 (pH = 4.05) provocó un mayor incremento del número de UPC/mL al compararlo con el T3, donde dado el mayor inóculo, se esperaba que tuviera mayor incremento. Adicionalmente, la cantidad inicial de inóculo pudo haber influenciado favorablemente la multiplicación de los EMs y el control biológico de agentes patógenos, tal como fue evidenciado por el mayor número de UPC/mL de *T. harzianum*, *P. lilacinus*, *M. anisopliae* y *B. bassiana* en el tratamiento T3.

De acuerdo con los resultados, aunque no se verificó la presencia de *Paecilomyces* sp a los 30 días, su aparición a los 60 días pudo haber estado relacionada con las condiciones de pH de 4.95 en el biol. Esto podría sugerir que existe compatibilidad de tres hongos en cada análisis, mientras que *Paecilomyces* sp., y *Beauveria* sp., no fueron observados juntos, por lo que se asume que exista una posible incompatibilidad. De acuerdo con Sharma *et al.* (2014), la mayor proliferación de *Paecilomyces lilacinus* fue alcanzada a valores de pH cercano a la neutralidad. Estudios previos han demostrado el efecto sobre la producción de metabolitos primarios y secundarios por parte de los microorganismos (Tamerler *et al.* 1998), los cuales podrían tener efecto de inducción o de antagonismo en el crecimiento de algunas poblaciones microbianas. Con base en estos estudios, se podría sugerir que posiblemente el valor de pH observado en el T2 pudo haber inducido algún mecanismo que favoreció el crecimiento de los hongos coexistiendo en el biol.

La existencia de los microorganismos benéficos en niveles poblacionales altos a los 60 días después de la inoculación pudo favorecer la movilización del fósforo y el nitrógeno y la degradación de ácidos nucleicos y glicerofosfatos o fosfatos simples (Richardson & Simpsom 2011). Díaz *et al.* (2009) deducen que algunos hongos y bacterias recuperan el nitrógeno, fósforo y otros micronutrientes que no pueden ser asimilados, lo vuelven disponibles para las plantas mejorando el intercambio catiónico. Estudios previos han demostrado que durante el proceso de fermentación, estos hongos liberan CO₂ conjuntamente con el agua durante este proceso los fosfatos insolubles lo transforman en solubles.

En conclusión, los resultados evidenciaron que existe compatibilidad entre los hongos *Trichoderma sp.*, *Metarhizium sp.*, y *Beauveria sp.*, mientras que este último no mostró compatibilidad aparente entre *Paecilomyces sp.*, lo cual debería ser tomado en cuenta al momento de formular la incorporación de estos microorganismos en bioles artesanales. Por otra parte, el pH parece tener un rol fundamental en el crecimiento de las poblaciones de los microorganismos, por lo que se sugiere realizar estudios en los que se evalúe su efecto directo en el desarrollo poblacional de estos géneros de hongos y sus posibles efectos en la compatibilidad y/o antagonismo entre ellos.

Conflictos de intereses

Esta investigación se la realizó en la granja agroecológica del cantón Píllaro perteneciente al Honorable Consejo Provincial de Tungurahua Ecuador y no presenta conflictos de interés.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencias Agropecuarias y al Honorable Consejo Provincial de Tungurahua, por el apoyo técnico, científico y logístico realizado a la presente investigación.

Literatura citada

- Arias EL, Piñeros PA. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras del suelo de los páramos de Guasca y cruz verde. [Tesis de Licenciatura]. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 2008; 204 pp.
- Bidlas E, Du T, Lambert RJW. An explanation for the effect of inoculum size on MIC and the Growth/No-Growth Interface. *Int J Food Microbiol* 2008; 126 (1-2): 140-152.
- Campo-Martínez, ADP, Acosta-Sánchez RL, Morales-Velasco S. Evaluation of microorganisms of mountain (mm) in the production of chard on the plateau of Popayán. *Rev Bio Agro*. 2014; 12(1); 79-87.
- Díaz OA, Montero DM, Lagos JA. Acción de microorganismos eficientes sobre la actividad de intercambio catiónico en plántulas de acacia (*Acacia melanoxylon*) para la recuperación de un suelo del municipio de Mondoñedo, Cundinamarca. *Colomb For* 2009; 2 (1): 141-160.
- Ferrera-Cerrato R, Alarcón A. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum* 2001; 8(2): 175-183.
- Leistner L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int J Food Microbiol* 2000; 55, 181-186.
- Navia CA, Cordova YZ, Morales S, Prado FA, López NA. Evaluation of different formula-

- tions from waste composting crop tomato (*Solanum lycopersicum*). *Rev Bio Agro* 2013; 11: 165-173.
- Pino C. Determinación de la mejor dosis de Biol en el cultivo de (*Musa sapientum*) Banano, como alternativa a la fertilización química. [Tesis de Licenciatura]. Escuela Superior politécnica del Litoral. Guayaquil. 2009; 11 pp.
- Richardson AE, Simpson RJ. Soil Microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiol* 2011; 156: 989-996.
- Sánchez GL, Garzón MJ, Garzón MA, Giraldo FJ, Millán L, Villada ME. Aprovechamiento del suero lácteo de una empresa del norte antioqueño mediante microorganismos eficientes. *P + L*. 2009; 4 (2): 65-74.
- Semu E, Singh BR. Accumulation of heavy metals in soils and plants after long-term use of fertilizers and fungicides in Tanzania. *Fertil Res* 1996; 44 (3): 241-248.
- Sharma A., Sharma S., Mittal A., Naik S. Statistical optimization of growth media for *Paecilomyces lilacinus* 6029 using non-edible oil cakes. *Ann Microbiol* 2014; 64:515-520.
- Tamerler C., Ullah M., Adlard M.W., Keshavarz T. Effect of pH on physiology of *Metarhizium anisopliae* for production of swainsonine. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 168: 17-23.
- Velastegui R. Alternativas ecológicas para el manejo integrado fitosanitario en los cultivos. Ed. Agro-Express Quito. 2005; 35-40.
- Zapata JJ. Determinar la compatibilidad y el tiempo de sobrevivencia de tres microorganismos benéficos de uso agrícola: *Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis* y *Paecilomyces lilacinus* en compost. [Tesis de Maestría]. Universidad Técnica de Ambato. Querocha. 2015; 91 pp.
-