



07

Caracterización microbiológica de seis biopreparados artesanales

Microbiological characterization of six artisanal bioproducts

Dr. C. Leónides Castellanos González¹
E-mail: santander.lcicastell@gmail.com

Ing. Néstor E. Céspedes Novo²

Lic. Alexandra Sequeda Serrano¹

Tec. José Enrique Jaime Mendosa²

Lic. Lady Johana Niño Vera¹

¹Universidad de Pamplona. Colombia.

²Granja Agrobiológica Sol Vida. Pamplona. Colombia.

Cita sugerida (APA, sexta edición)

Castellanos González, L., Céspedes Novo, N.E., Sequeda Serrano, A, Jaime Mendosa, J. E., & Niño Vera, L. J. (2018). Caracterización Microbiológica de seis Biopreparados Artesanales. *Revista Científica Agroecosistemas*, 6(3), 57-65. Recuperado de <http://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/index>

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue caracterizar microbiológicamente seis biopreparados que se producen en la de Granja Agrobiológica Sol Vida en Pamplona a los que se les atribuyen efectos biofertilizantes, bioestimulantes y antagonistas. La investigación se desarrolló en los laboratorios de microbiología y bacteriología de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad de Pamplona, de marzo a junio del 2017. Se trabajó en la caracterización de los fundamentales grupos de microorganismos en los seis biopreparados. Se realizaron siembras el medio de Martin para el conteo de hongos, para bacterias y actinobacterias el medio de Bunt y Rovira, para bacterias solubilizadoras de fosfato el medio Pykoskaia y para bacterias de la familia Bacillaceae el medio Mossel modificado. El conteo de colonias de cada microorganismo por biopreparado mostró variaciones notables, así como entre los grupos de microorganismos dentro de cada biopreparado lo que dependió de los ingredientes y del proceso fermentativo. Los seis biopreparados estudiados poseen microorganismos que pudieran tener efecto como bioestimulantes, solubilizadores de fosfatos y antagonistas, aunque las concentraciones son relativamente bajas, ya que solo cuatro alcanzan 10⁶ UFC por ml de microorganismos totales.

Palabras clave:

Microorganismos eficientes, hongos, bacterias, actinomicetos.

ABSTRACT

The present investigation aims to characterize microbiologically six bioproducts that are produced in the Agrobiological Sol Vida Farm in Pamplona to which biofertilizers, biostimulants and antagonistic effects are attributed. The research was carried out in the microbiology and bacteriology laboratories of the Faculty of Basic Sciences of the Pamplona University, from March to June of 2017. The characterization of fundamental groups of microorganisms in the six bioproducts was made. For that the Martin medium was used for counting fungi, the Bunt and Rovira medium for bacteria and actinobacteria, the Pykoskaia medium for phosphate solubilizing bacteria and the modified Mossel medium for bacteria of the Bacillaceae family. The colony count of each microorganism by bioproduct showed remarkable variations among the groups of microorganisms and within each bioproduct which depended on the ingredients and the fermentative process. The six bioproducts studied have microorganisms that could have effect as biostimulants, phosphate solubilizers and antagonists, although the concentrations are relatively low, so only four reached 10⁶ CFU per ml of total microorganisms.

Key Words:

Efficient microorganisms, fungi, bacteria, actinobacteria.

INTRODUCCIÓN

Los Microorganismos Eficientes (ME) son una combinación de microorganismos beneficiosos de cuatro grupos principales: bacterias fototróficas, levaduras, bacterias productoras de ácido láctico y hongos de fermentación. Estos microorganismos efectivos cuando entran en contacto con materia orgánica secretan sustancias beneficiosas como vitaminas, ácidos orgánicos, minerales quelatados y fundamentalmente sustancias antioxidantes. Además, mediante su acción cambian la micro y macroflora de los suelos y mejoran el equilibrio natural, de manera que los suelos causantes de enfermedades se conviertan en suelos supresores de enfermedades. A través de los efectos antioxidantes promueven la descomposición de la materia orgánica y aumentan el contenido de humus (Banco Interamericano de Desarrollo, 2009).

Los Microorganismos de Montaña (MM) se podrían catalogar como un tipo de ME, o sea, un consorcio de microbianos ya que su composición y las posibles relaciones que generan son múltiples, se indica que contienen bacterias fotosintéticas, bacterias productoras de ácido láctico, actinomicetos, hongos filamentosos y levaduras. Los MM son un producto de fabricación artesanal de bajo costo, que no requiere medios de crecimiento sofisticados para el escalamiento y que pretende aprovechar la diversidad microbiana tanto taxonómica como funcional, de las comunidades de microorganismos nativos de zonas boscosas, para luego incorporarlos en las unidades de producción agrícola. Entre los usuarios de este tipo de tecnología se acepta que la mejor fuente de inóculo son los bosques cercanos a los sitios de producción agrícola, ya que presentan microorganismos adaptados a las condiciones de la zona (Castro-Barquero, Murillo-Roos, Uribe-Lorío & Mata-Chinchilla, 2015).

Se señala que entre las bacterias solubilizadoras eficaces de fosfatos (B.S.F.) se encuentran los géneros *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Agrobacterium* sp., *Burkholderia* sp., *Achromobacter* sp., *Micrococussp.*, *Aerobacter* sp. *Flavobacterium* sp., y *Erwinia* sp. (Paredes & Espinosa, 2010).

En Colombia se ha manifestado avances en el control biológico de las enfermedades en los últimos años. Sin embargo, deben seguir haciéndose esfuerzos por aumentar la eficacia a partir de mayor estabilidad de los agentes microbianos en condiciones de almacenamiento y campo. Así mismo que resulta importante aumentar la investigación y el desarrollo de productos a base de microorganismos nativos para

aprovechar la biodiversidad del país en el desarrollo de nuevos productos (Patiño-Torres, 2014).

En los últimos años se ha puesto de moda el empleo de ME reproducidos por diferentes vías a partir de microorganismos nativos, o consorcios de microorganismos desarrollados a nivel de laboratorio con un conocimiento exacto de su composición pero que no conviven de esa forma en la naturaleza. En ocasiones se comercializan y se realizan ensayos con bioproductos denominados ME (Milián, et al., 2014; Moya, Soto & Ramírez, 2017) con formulaciones comerciales que aunque poseen un control de la calidad se aplican de forma general para cualquier cultivo sin declararse los microorganismos que contienen. Otras veces se validan los efectos de bioproductos producidos artesanalmente sin que se haya realizado una caracterización mínima de los microorganismos que contienen y que puedan explicar los efectos que se producen.

Teniendo en consideración estos antecedentes el objetivo de la presente investigación fue caracterizar microbiológicamente seis biopreparados que se producen en la Granja Agrobiológica Sol Vida en Pamplona a los que se les atribuyen efectos biofertilizantes, bioestimulantes y antagonistas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en los laboratorios de microbiología y bacteriología de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad de Pamplona, de marzo a junio del 2017. Se trabajó en la caracterización microbiológica de seis “biopreparados” que se producen y se comercializan en un proceso de validación con los agricultores por la Granja de Agrobiológicos Sol Vida de Pamplona, integrante de la Asociación ASPAGRO.

En esta granja se obtiene un consorcio de Microorganismos Eficientes (ME) por fermentación anaeróbica a partir de la hojarasca en descomposición de un bosque de un área protegida de la Vereda Jurado en el Municipio de Pamplona, que después se utiliza como base para obtener otros productos comerciales. También se producen otros biopreparados artesanales

Los seis bioproductos estudiados se denominan P1, P2, Microorganismo de Montaña (MM), Caldo rizosfera, Biopreparado de meconio de ternero recién nacido (B. meconio) y M6. A continuación se relacionan los ingredientes de cada biopreparado y tipo de fermentación y el uso que se le propone (Tabla 1).

Tabla 1. Biopreparados, ingredientes, tipo de fermentación y uso propuesto.

Biopreparados artesanales	Ingredientes	Tipo de fermentación	Uso propuesto
P1	Vinagre, roca fosfórica y melaza	aeróbica	Biofertilizante con B.S.F.
P2	ME y melaza, ceniza y roca fosfórica	anaeróbica	Biofertilizante con B.S.F.y antagonista
MM	ME, melaza y salvado de arroz (<i>Oriza sativa</i> L.)	aeróbica	Biofertilizante y antagonista
Caldo rizosfera	Raíces de plantas: ortiga (<i>Urtica dioica</i> L.), borraja (<i>Borago officinalis</i> L.), kikuyo (<i>Pennisetum clandestinum</i> Hochts ex Chiov) CHIOV), trébol blanco (<i>Trifolium repens</i> L.) conseguidas en la granja, yogurt, melaza, agua oxigenada y harina de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	aeróbica	Biofertilizante y antagonista
B. meconio	Meconio de ternero, agua, melaza y ahuyama (<i>Cucurbita máxima</i> Duch.), cocida.	anaeróbica	Biofertilizante y antagonista
M6	ME, vinagre, etanol, plantas aromáticas, jengibre (<i>Zingiber officinale</i> ROSE.), ajo (<i>Allium sativum</i> L.), cebolla (<i>Allium cepa</i> L.), pimienta y ají (<i>Capsicum annum</i> L.).	anaeróbica	Biofertilizante y antagonista

Se obtuvieron muestras de los biopreparados comerciales entre uno y siete, después de producidos, se llevaron al laboratorio y se mantuvieron en refrigeración a 13 oC hasta su procesamiento. Para el conteo de los microorganismos, fue utilizado inicialmente el procedimiento de dilución en serie (Wollum, 1982). Se trabajó con la tercera dilución para todos los biopreparados.

Se realizaron siembras en diferentes medios de cultivos específicos para cuantificar los diferentes grupos de microorganismos. Para el conteo de los hongos se utilizó el medio de Martin (1950), pH 5,6, añadiendo 60 mg mL⁻¹ de penicilina, 40 mg mL⁻¹ de estreptomina y 70 mg mL⁻¹ de rosa bengala para evitar el crecimiento de las bacterias. Para el conteo de bacterias y actinobacterias (actinomycetes) se empleó el medio de Bunt & Rovira (1955), pH 7,4. Para la cuantificación de las bacterias solubilizadoras de fosfato (B.S.F.) fue utilizado el medio Pykoskaia (Martínez, et al., 2006). Para el conteo de bacterias de la familia Bacillaceae se utilizó el medio Mossel (Mossel, 2003) modificado por la firma MERK para *Bacillus cereus*.

De cada disolución de los biopreparado se sembraron tres placas de Petri en cada uno de los medios de cultivo, añadiendo 1ml por placa. Las placas fueron incubadas a temperatura de 30°C por 24 horas (bacterias y actinobacterias y baciláceas), 72 horas (hongos) y 96 horas (bacterias solubilizadoras de fosfato). Pasado ese tiempo se realizó el conteo del número de colonias por cada grupo de microorganismo en cada placa y se observaron las características principales de las colonias.

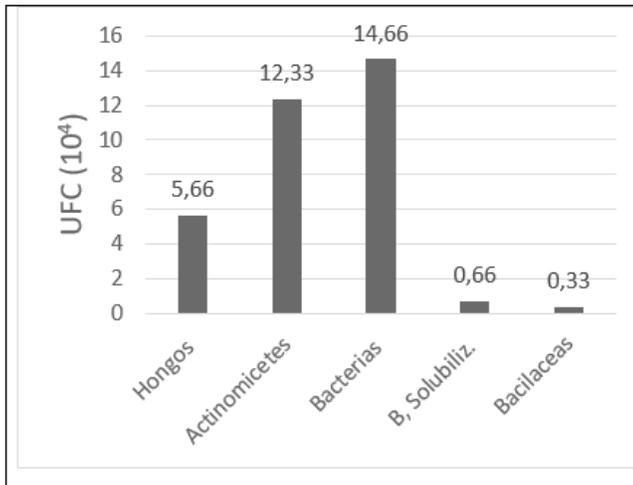
Los datos de las poblaciones de microorganismos fueron transformados en logaritmo y posteriormente en $\sqrt{x+1}$, por no observarse colonias en un mínimo número de placas. Posteriormente fueron sometidos a un análisis de varianza. Las medias de las variables poblacionales de los microorganismos una vez comprobada el cumplimiento del supuesto de normalidad por la prueba de Kolmogorov Smirnov fueron comparadas por medio de un ANOVA mediante el test de Tukey ($P < 0,05$), utilizando el programa estadístico SPSS, versión 21 (IBM, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El conteo de colonias de cada microorganismo por biopreparado mostró variaciones notables entre los biopreparados y entre los grupos de microorganismos dentro de cada biopreparado. Se destacan por el nivel de actinobacterias el biopreparado MM y por el de bacterias el Caldo Rizósfera.

En el biopreparado P1 se determinó un total de 8,34 x 10⁵ UCF por ml de microorganismos (hongos, actinobacterias y bacterias) predominado las actinobacterias. No se detectaron bacterias de la familia Bacillaceae (Figura 1a), mientras que en P2 solo se verificó la presencia de un total de 3,26 10⁵UCF por ml de microorganismos totales, siendo relativamente más abundantes las bacterias entre las que había presencia de B.S.F. y baciláceas (Figura 1b).

(P1)



(P2)

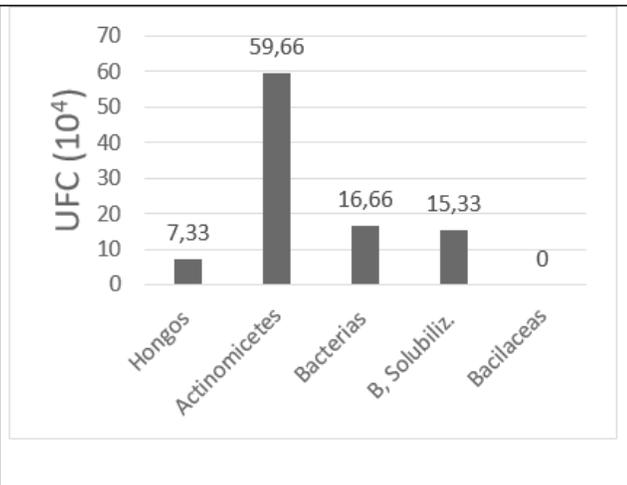


Figura 1a y 1b. Grupos de microorganismos presentes y concentración en los biopreparados P1 y P2 respectivamente.

El MM manifestó $1,72 \times 10^6$ UFC por ml de microorganismos totales y de ellas $1,65 \times 10^6$ correspondieron a actinobacterias (Figura 2a). En las placas predominaban colonias de color crema y en algunos casos de color amarillo. Por reproducirse este biopreparado basado en un consorcio de ME obtenido a partir de un sitio de un ecosistema de Pamplona es de interés verificar su acción en campo, tanto como biofertilizante como antagonista, mientras que en el

Caldo rizosfera se contabilizaron $1,24 \times 10^6$ UFC por ml de microorganismos totales predominando las bacterias, con presencia de B.S.F. así como hongos y actinomicetos (Figura 2b). Como este biopreparado se reproduce a partir de materiales existentes en la propia finca es de interés comprobar en campo si los microorganismos presentes tienen acción antagonista o biofertilizante.

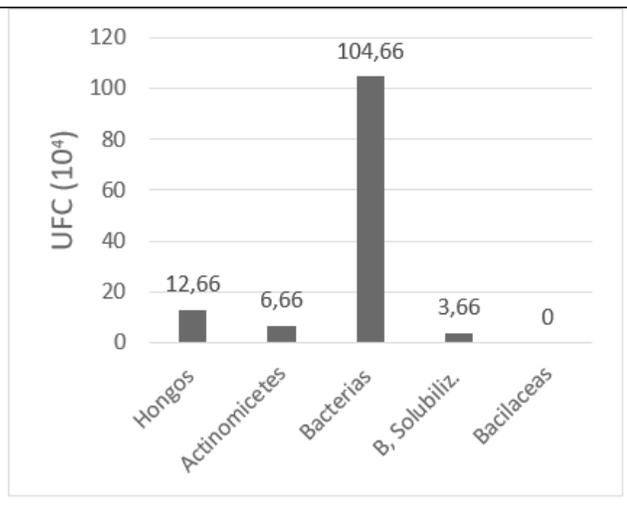
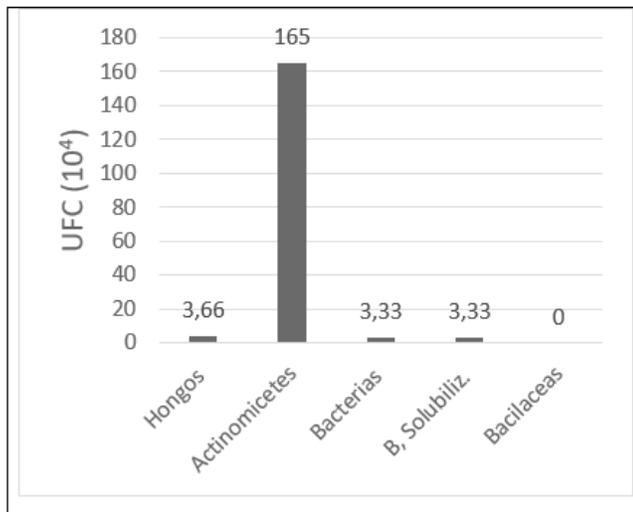


Figura 2a y ab. Grupos de microorganismos presentes y concentración en los biopreparados MM y Caldo rizosfera, respectivamente.

Resultados de la evaluación de bioles de MM afectaron las propiedades químicas y biológicas de las unidades experimentales, lo que promovió un mayor crecimiento de las plantas de soya y tomate (Castro, et al., 2015), sin embargo estos autores señalan que es la investigación de este inóculo microbiano lo que permitirá identificar a nivel molecular los consorcios microbianos presentes en las diferentes etapas del

proceso de elaboración y los mecanismos por los cuales afectan positivamente el crecimiento de las plantas. Según Restrepo, Marulanda, Fe-Pérez, Díaz, Vera & Hernández (2015), los géneros bacterianos con mayores potencialidades de uso como solubilizadores de P son *Pseudomonas* y *Bacillus* debido a que sus principales mecanismos de acción incluyen la producción de ácidos orgánicos, la quelación

de los elementos responsables de la insolubilidad de los fosfatos presentes y asimilación directa de fosfatos insolubles, por lo que el hecho que Caldo rizosfera no presentara Baciláceas y si B.S.F., presupone la presencia de otras bacterias solubilizadoras de P en este biopreparado incluyendo las del género *Pseudomonas* que también tiene efectos como antagonistas.

En el B. de meconio se contabilizaron $1,3 \times 10^6$ UFC por ml de microorganismos totales, con un mayor nivel relativo de actinomicetos, pero estuvieron presentes poblaciones de hongos en $3,83 \times 10^5$ UFC

por ml y de bacterias en $1,6 \times 10^5$ UFC por ml, con presencia de $6,33 \times 10^4$ UFC por ml de B.S.F. (Figura 3a); mientras que el biopreparado M6 presentó $9,13 \times 10^5$ UFC por ml de microorganismos totales, predominando los hongos y las bacterias, con presencia de B.S.F. y baciláceas (Figura 3b), o sea, no presentó la concentración relativa más alta de microorganismos pero si más variada. Como este biopreparado se reproduce a partir de un consorcio de ME obtenido en un sitio de ecosistema de Pamplona es de interés verificar su acción en campo, tanto como biofertilizante como antagonista.

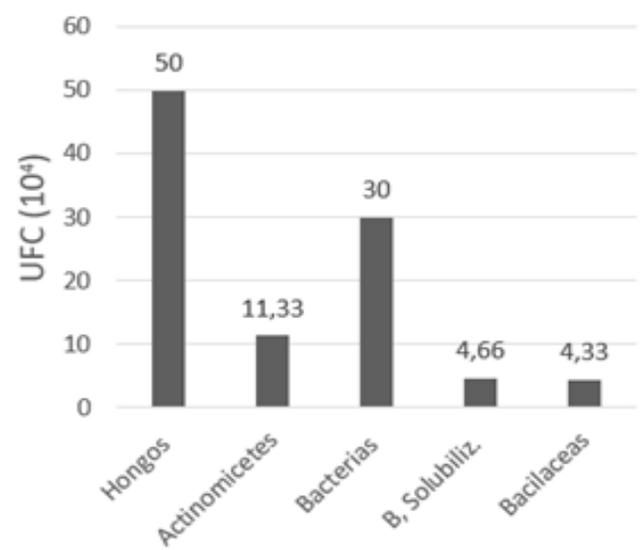
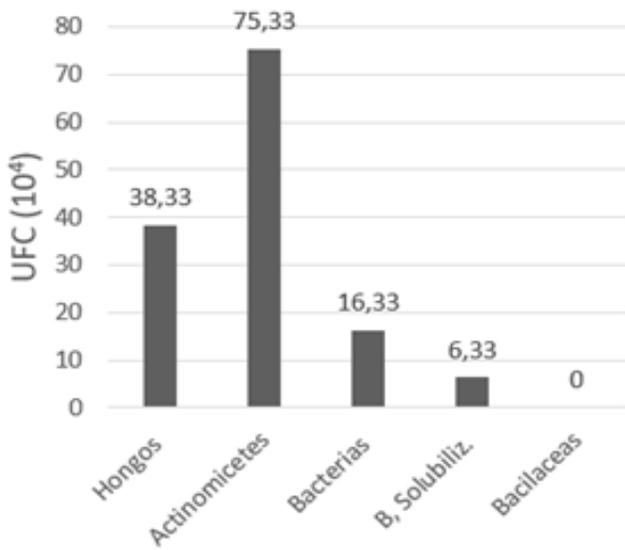


Figura 3a y 3b. Grupos de microorganismos presentes y concentración en los biopreparados B de meconio y M6, respectivamente.

Peralta, Juscamaita & Meza (2016), caracterizaron un biopreparado líquido fermentado anaeróbicamente a partir de excreta fresca de vacuno tratada, que entre sus atributos no están la cantidad de microorganismos, sino el contenido de N, P, K y micronutrientes, aunque utilizan en el proceso un inoculante de un consorcio microbiano de bacterias ácido lácticas, que contiene bacterias probióticas del género *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*, por lo que es de gran interés verificar los efectos de B. meconio en el campo y profundizar en la caracterización microbiológica y de los macro elementos y micro elementos que contiene.

Por medio del AVOVA se verificó que el B. de Meconio y M6 presentaron los mayores niveles de hongos, los actinomicetos predominaron en P1 y en los MM. El Caldo rizosfera superó a los demás biopreparados en cuanto a las poblaciones de bacterias. P1 mostró el mayor nivel de B.S.F. y P2 el más bajo, el resto de los biopreparados quedaron intermedios entre estos dos. Las baciláceas se presentaron en mayor

medida en M6, que presentó diferencia estadística con P2 (Tabla 2).

Tabla 2. Poblaciones del análisis estadístico de las poblaciones (raíz (log UCF por ml) de los grupos de microorganismos de cada biopreparado

Biopreparados	Hongos	Actinomicetos	Bacterias	B.S.F.	Baciláceas
P1	2,85 bc	7,01 ab	4,10 b	3,94 a	1,0 b
P2	2,58 bc	3,55 b	3,85 b	1,27 b	1,13 b
MM	2,15 c	12,71 a	2,02 b	1,94 ab	1,0 b
Caldo Rizósfera	3,66 b	2,76 b	10,26 a	1,99 ab	1,0 b
B del meconio	6,25 a	8,56 ab	4,08 b	2,49 ab	1,0 b
M6	7,12 a	3,12 b	5,07 b	2,37ab	2,30 a
CV (%)	10,71	21,3	20,24	18,3	8,83
Error Típico*	0,25	1,35	0,79	0,57	0,06

* Valores con letras desiguales en las columnas difieren por la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

La predominancia de altas poblaciones de actinomicetos en MM se justifica debido a que este biopreparado se obtiene por un proceso de fermentación aeróbica y los actinomicetos son aeróbicos y algunos géneros aeróbicos estrictos. Estos también predominaron en P1 que también se obtiene por un método aeróbico, aunque en el Biopreparado de meconio las poblaciones fueron altas, pero no predominaron dentro del conjunto de microorganismos.

Algunos actinomicetos han sido descritos como agentes de biocontrol por la capacidad de producir enzimas biodegradativas como quitinasas, glucanases, peroxidasas y otras (Tokata, et al., 2002; Arasu, Esmail, Al-Dhabi & Ponmurugan, 2016). Otros del género *Streptomyces* también son importantes para promover la nodulación y ayudar a los bacteriodes de *Rhizobium* a la asimilación del hierro en la fijación de nitrógeno en leguminosas (Tokata et al., 2002), mientras que otros géneros como *Frankia* han sido reportados como fijadores de nitrógeno atmosférico, así como también algunas cepas pertenecientes a las familias *Thermomonosporaceae* y *Micromonosporaceae* (Valdés, et al., 2005).

Los actinomicetos controlan hongos y bacterias patogénicas y también aumentan la resistencia de las plantas, mediante un mecanismo de producción de antibióticos que provocan inhibición de patógenos del suelo y benefician el crecimiento y la actividad de *Azotobacter* y de las micorrizas (Coutinho, 2011).

Resulta de gran importancia profundizar en las especies bacterias del Caldo rizosfera, biopreparado donde este grupo tuvo las más altas poblaciones. Dentro de las bacterias que han demostrado tener eficiencia en la solubilización de fosfatos en Colombia se encuentran varios géneros destacándose *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas sp.*, *Aeromona hydrophilia*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter sakasaki*, *Pantoea sp.* y *Enterobacter cloacae* (Lara, Esquivel & Negrete, 2011).

En la última década se ha puesto en evidencia la capacidad solubilizadora de fosfatos de muchos grupos de bacterias: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Arthrobacter*, *Rhodobacter*, *Pantoea* y *Klebsiella*, entre las bacterias y, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium* entre los hongos (Zaidi, Khan, Ahemad, Oves & Wani, 2009; Khan, Zaidi, Ahemad, Oves & Ahmad, 2010; Awasthi, Tewari & Nayyar, 2011).

Las baciláceas se presentaron en mayor medida en M6 y en P2 con grandes posibilidades de solubilizar P (Paredes & Espinosa, 2010) y se obtienen por fermentación anaeróbica. Como el resto de los biopreparados no presentaron baciláceas a la disolución estudiada, de favorecer estos la solubilización de P se atribuiría a la presencia géneros diferentes a *Bacillus*, teniendo en cuenta que en el Caldo rizosfera que se obtiene por una fermentación aeróbica predominaron las bacterias como grupo.

Contrasta la predominancia de los hongos en M6 contra la predominancia de los actinomicetos en MM cuando los dos biopreparados parten de ME obtenidos del mismo sitio, esto puede explicarse porque después los productos comerciales se hacen con procesos diferentes. En M6 se observaron colonias típicas de hongos de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium* los cuales se incluyen en el grupo que se consideran solubilizadores de P (Awasthi, et al., 2011). Según Lumley, Gignac & Currah (2001), *Trichoderma* y *Penicillium* están entre los hongos que predominan en los suelos del bosque, mientras que Lorenzo (2002), relacionan a estos dos géneros y a *Aspergillus* como antagonistas promisorios encontrados dentro de plantaciones de cítricos.

En general los seis biopreparados presentan una gran diversidad de microorganismos que pudieran ejercer efecto como biofertilizantes (solubilización del P), bioestimuladores o antagonistas, ya que difieren en cuanto a los grupos de microorganismos que predominan. Cuatro de los biopreparados presentan más de 106UFC por ml que pudieran certificarse como biopreparados comerciales de baja concentración y dos 105 UCF, siendo el de menor concentración relativa total P2. Otras investigaciones informan poblaciones de bacterias, hongos y levaduras superiores a los presentes, en algunos biocompuestos orgánicos, pero menores para el caso de los actinomicetos (Pérez, Céspedes & Núñez, 2008).

Deben realizarse investigaciones de laboratorio para precisar los géneros y especies de microorganismos presentes en cada biopreparado como ha señalado Patiño-Torres (2014), así como ensayos de campo, con diseños experimentales adecuados, para verificar la acción como biofertilizantes para la solubilizar P, medir su capacidad como bioestimulantes y como antagonistas en los fundamentales cultivos de Pamplona. A partir de ahí, dar pasos para que se certifique su comercialización por el ICA. Según Kibblewhit, Ritz & Swift (2015), la diversidad microbiana y los procesos en el suelo son llevados a cabo por "consorcios microbianos" cuya característica

principal es la diversidad funcional más que la de grupos taxonómicos, por lo que se hace necesario a partir de estos resultados realizar ensayos de campo con el rigor necesario para verificar los efectos de cada uno de estos bioproductos.

CONCLUSIONES

Los seis biopreparados estudiados poseen microorganismos que pudieran tener efecto como bioestimulantes, solubilizadores de fosfatos o antagonistas, aunque las concentraciones son relativamente bajas, ya que solo cuatro alcanzan 106 UFC por ml de microorganismos totales. Los biopreparados presentan diferencias estadísticas en cuanto a la concentración de los diferentes grupos de microorganismos evaluados lo que obliga a realizar ensayos de laboratorio y de campo para verificar y diferenciar los posibles efectos que pudieran promover en los sistemas de cultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arasu, M. V., Esmail, G. A., Al-Dhabi, N. A., & Ponmuran, K. (2016) Managing Pests and Diseases of Grain Legumes with Secondary Metabolites from Actinomycetes. In: Subramaniam G., Arumugam S., Rajendran V. (eds) Plant Growth Promoting Actinobacteria. Singapore: Springer.
- Awasthi, R., Tewari, R., & Nayyar, H. (2011). Synergy between plants and P-solubilizing microbes in soils: effects on growth and physiology of crops. *International Research Journal of Microbiology*, 2(12), 484-503. Recuperado de <https://www.interestjournals.org/articles/synergy-between-plants-and-psolubilizing-microbes-in-soils-effects-on-growth-and-physiology-of-crops.pdf>
- Banco Interamericano de Desarrollo. (2009). Manual Práctico de Uso de EM. Convenio Fondo Especial de Japón / BID ATN/JO-10792. Montevideo: BID.
- Bunt, J. S., & Rovira, A.D. (1955). Microbiological studies of some subantarctic soils. *J. SoilSci.* 6, 119-128. Recuperado de <http://garfield.library.upenn.edu/classics1987/A1987H329400001.pdf>
- Castro-Barquero, L., Murillo-Roos, M., Uribe-Lorío, L., & 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(3), 21-36. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/436/43642604002.pdf>
- Coutinho, F. M. (2011). Programa de extensión “Divulgación das Plantas Mediciniais, da Homeopatia e da Produção de Alimentos Orgânicos”. *Caderno los Microrganismos Eficientes (EM). Instruções práticas sobre uso Ecológico e social do EM*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- International Business Machines Corporation. (2012). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. New York: IBM Corp.
- Khan, M.S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., & Ahmad, P. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Arch Agron Soil Scien*, 56(1), 73–98. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4510416/>
- Kibblewhit, E. M., Ritz, K., & Swift, M. (2015). Soil health in agricultural systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1492), 685-701. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17785275>
- Lara, C., Esquivel, L., & Negrete, J. (2011). Bacterias nativas solubilizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 9(2), 114-120. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v9n2/v9n2a13.pdf>
- Lorenzo, M. E. (2002). Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de cepas nativas de *Trichoderma*. Tesis de grados para la opción del Título de Master en Ciencias Agrícolas. La Habana: Universidad Agraria de La Habana.
- Lumley, T. C., Gignac, L. D., & Currah, R. S. (2001). Microfungus communities of white spruce and trembling aspen logs at different decay stages in disturbed and undisturbed sites in the boreal mixed wood region of Alberta. *Canadian Journal of Botany*, 79(1), 76–92. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302925781>
- Martin, J. P. (1950). Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *SoilSci.*, 69(3), 215-232. Recuperado de https://journals.lww.com/soilsci/Citation/1950/03000/Use_of_Acid,_Rose_Bengal,_and_Streptomycin_in_the.6.aspx
- Martínez, V.R., et al. (2006). Procedimientos para el Estudio y Fabricación de Biofertilizantes Bacterianos. Maracay: Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.
- Milian, P. R. (2015). Evaluación del efecto de ME-50 en la variedad de arroz Prosequia 4 en el municipio de Aguada de Pasajeros. Tesis de Diploma. Cienfuegos: Universidad de Cienfuegos.

- Mossel, D. A. (2003). Microbiología de los alimentos. Zaragoza: Acribia.
- Moya, M., Soto, R., & Ramírez, F. (2017). Efecto de los microorganismos eficientes sobre el crecimiento, desarrollo y rendimiento del arroz (*Oryza sativa* L.) en Aguada de Pasajeros. *Revista científica Agroecosistemas*, 5 (1), 17-22. Recuperado de <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/>
- Paredes, M., & Espinosa, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por Rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Rev. Tierra Latinoamérica*, 28(1), 61-70. Recuperado de <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/14>
- Patiño-Torres, C. O., & Sanclemente-Reyes, O. E. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado*, 10(2), 288-297. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/2654/265433711018.pdf>
- Peralta, L., Juscamaita, J., & Meza, V. (2016). Obtención y caracterización de abono orgánico líquido a través del tratamiento de excretas del ganado vacuno de un establo lechero usando un consorcio microbiano ácido láctico. *Ecología Aplicada*, 15(1), 1-10. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162016000100001
- Pérez, A., Céspedes, C., & Núñez, P. (2008). Caracterización física-química y biológica de enmiendas orgánicas aplicadas en la producción de cultivos en República Dominicana. *J. Soil Sc. Plant Nutr.* 8(4), 10-29. Recuperado de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-27912008000300002
- Restrepo, G. M., Marulanda, S., 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. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181238817006.pdf>
- Tokata, R. K., et al. (2002). Novel plant–microberhizosphere interaction involving *Streptomyces cesioidicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2161–2171. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC127534/>
- Valdés, M., et al. (2005). Non-*Frankia* actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. *Appl. Environ Microbiol.*, 71(1), 460–466. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15640222>
- Wollum, A. G. (1982). Cultural methods for soil microorganisms. En, A. L., Page, R. H. Miller, y D. R. Keeney (eds). *Methods of Soil Analysis*. (pp. 781-802). Madison: Soil Science Society of America.
- Zaidi, A., Khan, M.S., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P A. (2009). *Microbial strategies for crop improvement*. Berlin: Springer-Verlag.