



Revista de CIENCIAS AMBIENTALES

Tropical Journal of Environmental Sciences



¿Funcionan realmente los microorganismos de montaña (MM) como estrategia de biofertilización? Un enfoque de ingeniería de biosistemas

¿Do Mountain Microorganisms (MM) Really Work as a Biofertilization Strategy? A Biosystems Engineering Approach

Steven Umaña^a, Karina Rodríguez^b, Carlos Rojas^c

^a Ingeniero Agrícola con especialidad en suelo y aguas, Escuela de Ingeniería de Biosistemas, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica, steven_030889@hotmail.com

^b Máster en Química con especialidad en procesos de laboratorio, Instituto de Investigaciones en Ingeniería, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica, karina.rodriguez@mora@ucr.ac.cr

^c Doctor en Biología con especialidad en microorganismos de suelo, Instituto de Investigaciones en Ingeniería y Escuela de Ingeniería de Biosistemas, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica, carlos.rojasalvarado@ucr.ac.cr

Director y Editor:

Dr. Sergio A. Molina-Murillo

Consejo Editorial:

Dra. Mónica Araya, Costa Rica Limpia, Costa Rica

Dr. Gerardo Ávalos-Rodríguez. SFS y UCR, USA y Costa Rica

Dr. Manuel Guariguata. CIFOR-Perú

Dr. Luko Hilje, CATIE, Costa Rica

Dr. Arturo Sánchez Azofoifa. Universidad de Alberta-Canadá

Asistente:

Rebeca Bolaños-Cerdas

Editorial:

Editorial de la Universidad Nacional de Costa Rica (EUNA)





¿Funcionan realmente los microorganismos de montaña (MM) como estrategia de biofertilización? Un enfoque de ingeniería de biosistemas

¿Do Mountain Microorganisms (MM) Really Work as a Biofertilization Strategy? A Biosystems Engineering Approach

Steven Umaña^a, Karina Rodríguez^b, Carlos Rojas^c

[Recibido: 21 de febrero 2017; Aceptado: 18 de abril 2017; Corregido: 08 de mayo 2017; Publicado: 01 de julio 2017]

Resumen

El uso de microorganismos en aplicaciones ingenieriles, en particular desde un contexto de ingeniería de biosistemas tropicales, es útil para comprender el efecto de variables que determinan la dinámica microbiológica del suelo. Hemos enmarcado y diseñado el presente estudio dentro de esos esfuerzos para documentar el potencial de microorganismos de montaña como estrategia de biofertilización de suelos a partir de un experimento con dos plantas de ciclo de vida corto. Para ello, realizamos un diseño en el cual los cultivos escogidos fueron irrigados de forma diferencial con tres tratamientos de un biol elaborado con tres tiempos diferentes de retención en un biorreactor. Estos tratamientos los comparamos con un control que fue irrigado únicamente con agua. Tras la cosecha, llevamos a cabo una serie de pruebas biológicas, químicas, físico-estructurales y agronómicas con el suelo y con las plantas cultivadas para determinar diferencias potenciales en el efecto de los tratamientos experimentales. Los resultados indicaron que un tiempo de retención en biorreactor cercano a dos semanas fue el que generó un biol con un impacto positivo significativo a nivel de actividad biológica, propiedades químicas del suelo y calidad de los cultivos. Estas diferencias significativas parecen estar relacionadas con una dinámica más activa del sistema edáfico correspondiente al mismo tratamiento. Lo anterior demuestra que la biofertilización con microorganismos de montaña funciona, pero sugiere que una serie de parámetros ingenieriles deben ser estudiados para optimizar esta estrategia de fertilización de bajo costo y ambientalmente sostenible.

Palabras clave: Biol, biosistema, culantro, espinaca, matriz edáfica, sostenibilidad.

Abstract

The use of microorganisms for engineering applications, in particular from a context of tropical biosystems engineering, has been useful to quantify important variables that are needed to understand the dynamics of edaphic systems in these areas. The current study is framed within those efforts and has been designed to document the potential of mountain microorganisms for soil biofertilization activities by using a standard experiment with two short-cycle plants. For that, an experiment including three biofertilization irrigation treatments, associated with three retention times in a bioreactor, were selected and compared with a control that was irrigated only with water. After harvesting, a series of biological, chemical, structural, and agronomic tests were conducted on both the soil and the cultivated plants to determine potential differences in the effect of the experimental treatments. Results

^a Ingeniero Agrícola con especialidad en suelo y aguas, Escuela de Ingeniería de Biosistemas, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica, steven_030889@hotmail.com

^b Máster en Química con especialidad en procesos de laboratorio, Instituto de Investigaciones en Ingeniería, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica, karina.rodriguez@mora@ucr.ac.cr

^c Doctor en Biología con especialidad en microorganismos de suelo, Instituto de Investigaciones en Ingeniería y Escuela de Ingeniería de Biosistemas, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica, carlos.rojasalvarado@ucr.ac.cr



indicated that a bioreactor retention time, close to two weeks, was the best treatment in terms of positive and significant impact on the biological activity, soil chemical properties, and quality of crops. Such significant differences seem to be related with a more active soil biosystem for the associated treatment. This demonstrates that biofertilization with mountain microorganisms works; but it also suggests that a series of engineering parameters should be studied to optimize such low cost and sustainable fertilization method.

Keywords: bioferment, biosystem, cilantro, soil matrix, spinach, sustainability.

1. Introducción

En la actualidad, la ingeniería se enfrenta a retos muy grandes que están íntimamente relacionados con el cotidiano manejo inadecuado de los recursos naturales (Haapala et al., 2013). Cuando enmarcamos estos retos en un contexto presupuestario y espaciotemporal ajustado, como sucede actualmente en los mercados mundiales, la implicación directa es que la innovación se convierte en un aliado directo dentro de la disciplina (Brem & Ivens, 2013). Es así que todas las ramas de la ingeniería se han abocado a reajustar gastos y a usar tecnologías más económicas y amigables con el ambiente para lograr sus objetivos (Martínez-Trujillo & García-Rivero, 2012).

En el caso particular de la ingeniería de biosistemas, el uso de microorganismos para diferentes aplicaciones ingenieriles ha ganado fuerza en las últimas décadas (Wittmann & Liao, 2017). Lo anterior, por cuanto esta rama del conocimiento toma la investigación básica del entorno natural y la lleva a un nivel aplicado al cuantificar y diseñar modelos de trabajo más integrados que en el pasado (Ruiz-Altisent, 1991). Debido a la multiplicidad de funciones llevadas a cabo por microorganismos en biosistemas naturales, su estudio y aplicabilidad ingenieril ha ganado auge y popularidad, en particular en las ramas agrícolas y productivas.

Un consorcio particular de microorganismos conocido como microorganismos de montaña (MM), está compuesto principalmente por hongos y bacterias que representan habitantes naturales de sistemas edáficos alrededor del mundo (Kondo, 2015). Este sistema de microorganismos ha sido promovido recientemente para crear bioles o biofermentos – sistemas líquidos de fertilización con actividad biológica – que puedan ser usados para fertilizar sistemas agrícolas (Campo Martínez, Acosta Sánchez, Morales Velasco & Prado, 2014) y hasta para otros sistemas productivos (Chiari, 2015). Si bien, la eficiencia de los MM en estos sistemas ha sido documentada (Suchini, 2012), carecemos de un cuerpo de documentación científicamente caracterizada para entender lo que sucede en ellos.

Por esta razón, para países en desarrollo que buscan estrategias productivas de bajo costo y alto beneficio ambiental, la investigación documental con los MM se convierte en una potencial estrategia de capitalización científica y tecnológica. De ahí que nosotros hayamos decidido establecer este proyecto como una forma de 1) documentar el efecto de los MM en dos cultivos de ciclo corto y 2) promover el enfoque de ingeniería de biosistemas en el diseño y aplicación de estrategias de sostenibilidad. Para el contexto de un país como Costa Rica, donde se desarrolló la investigación, la ejecución de este tipo de proyectos es relevante.



En Costa Rica la tecnología de los MM se ha manejado desde una perspectiva muy artesanal que no necesariamente ha tomado en cuenta elementos científicos de documentación (Tencio Camacho, 2013). Una excepción es el trabajo de Castro, Murillo, Uribe & Mata (2015), quienes realizaron un proyecto que incluyó los MM como tratamiento para evaluar un sistema agrícola definido. Sin embargo, ese estudio no incorporó diferentes tiempos de retención del biol usado y, por ello, hemos decidido, en el presente proyecto, aportar al tema desde esta arista ingenieril. La importancia de diseñar experimentos sencillos con los cuales se puedan cuantificar las diferencias con respecto a sistemas tipo control es primordial para entender los sistemas de estudio y necesaria, en todo caso, para la documentación científica de procesos con potencial aplicabilidad. De esta forma, el presente proyecto constituye, además, un esfuerzo adicional para continuar la documentación de los MM en Costa Rica y para promover el estudio de estos sistemas microbiológicos en la región.

2. Metodología

Este proyecto lo desarrollamos por completo en una finca privada en la zona de Paraíso de Cartago, Costa Rica, durante el año 2016. Hemos usado la metodología de producción de un biofertilizante a partir de MM según el manual de Abonos Orgánicos y Bio-fermentos del Instituto Agro Eco Louis Bolck (ALBI por sus siglas en inglés) en África Oriental (Kalema & Chacón, 2010). Para detalles de procedimiento, recomendamos seguir la anterior metodología original.

Con este procedimiento, recolectamos muestras de suelo y hojas de bosques riparios de la zona alrededor del Lago de Cachí y las mezclamos con granza de arroz, semolina, agua y melaza. La mezcla resultante la separamos en dos secciones, una de las cuales la mantuvimos en condiciones aeróbicas naturales y otra en condiciones anaeróbicas por 30 días. Tras este periodo, mezclamos las dos secciones y las incorporamos a un sistema líquido de 200 L en un biorreactor con agitación sistemática periódica. El biol resultante lo mantuvimos en el biorreactor por tres periodos de retención que correspondieron con una, dos y tres semanas tras lo cual lo consideramos listo para usarse. Estos tiempos de retención los establecimos según Kalema & Chacón (2010), al ser los picos de actividad de bacterias, hongos y levaduras, respectivamente y para efectos del proyecto los hemos denominado *tratamiento 1* (referido de acá en adelante como T1, tiempo de retención de una semana, actividad biológica dominada por bacterias), *tratamiento 2* (T2, tiempo de retención de dos semanas, actividad biológica dominada por hongos) y *tratamiento 3* (T3, tiempo de retención de tres semanas, actividad biológica dominada por levaduras).

En todos los casos, el biol resultante lo utilizamos como líquido de riego en un experimento que consistió en la creación de cuatro recipientes en forma de miniparcels con un área de 0,32 m² donde 0,16 m² estuvo dedicado al cultivo de culantro (*Coriandrum sativum*) y 0,16 m² al cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea*). El tratamiento con los MM lo aplicamos al inicio de la siembra hasta llevar el suelo a capacidad de campo. Incluimos, como control, un tratamiento adicional que regamos, igual a capacidad de campo, únicamente con agua. Este diseño lo repetimos cuatro veces, con protocolo idéntico, pero con cambios espaciotemporales en las miniparcels para evitar sesgo previo por efecto de sitio. La cantidad de riego en cada parcela la determinamos con base en la demanda requerida para capacidad de campo, tomando en cuenta el tipo de suelo,



la infiltración y punto de marchitez permanente. Estas pruebas las llevamos a cabo antes del experimento. En todos los casos mantuvimos el suelo en capacidad de campo. Los cultivos los conservamos por el tiempo asociado a su ciclo vegetativo, alrededor de 3 meses.

Con un enfoque “antes-después” de la aplicación de los diferentes tratamientos y la cosecha, realizamos una serie de pruebas sobre el suelo que consistieron en a) incidencia de microorganismos (bacterias, actinobacterias y hongos), b) respiración de suelo, c) cuantificación química de macro y micronutrientes y de pH, d) carbono por calcinación, e) retención de agua y f) textura. Estas pruebas las desarrollamos a partir de los protocolos de trabajo del Centro de Investigaciones Agronómicas y la Unidad de Recursos Forestales de la Universidad de Costa Rica. De forma similar, con 56 muestras de las plantas cosechadas recolectadas de forma aleatoria, realizamos a) una cuantificación de indicadores morfológicos de raíz como el diámetro, largo y volumen usando el programa WinRHIZO, b) una determinación de biomasa de hojas y de raíz y c) una medición de tamaño de hojas.

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

3. Resultados

Tanto las pruebas microbiológicas de incidencia de microorganismos en el suelo como la respiración de suelo mostraron diferencias significativas entre tratamientos, el T2 presentó los valores más altos de incidencia de hongos, bacterias, actinobacterias y respiración de suelo. Con respecto al control, que no fue inoculado con el biofertilizante, observamos un aumento en la actividad microbiana en casi todos los tratamientos (**Cuadro 1**, todas las comparaciones con el control fueron significativas, pero no se muestran). De forma similar, la respiración del suelo mostró un amplio aumento con relación a los valores obtenidos para el control ($F(5,38)=33,17$; $P<0,05$). En el caso del T2 el incremento fue de un 128%, mientras que para T3 y T1, los valores aumentaron un 76% y un 6%, respectivamente.

Cuadro 1. Cambio porcentual en la actividad poblacional microbiana con respecto al tratamiento control tras el proceso de biofertilización del suelo y cosecha de las plantas estudiadas

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



Con respecto al carbono por calcinación, T2 fue el tratamiento que presentó los valores más altos tanto para la cantidad de carbono orgánico como en términos de materia orgánica. A pesar de lo anterior, para todos los tratamientos observamos un aumento de estos dos estimadores de carbono con respecto al control ($F(5,15)=33,16$; $P<0,05$ para materia orgánica y $F(5,15)=33,16$; $P<0,05$ para carbono orgánico). Sin embargo, los pH de los tratamientos T1 y T3 fueron menores que el control (T1 promedio=5,60, T2 promedio= 5,98, T3 promedio= 5,62, control promedio=5,76). Es interesante, en todo caso, observar que las diferencias son significativas ($F(4,12)=38,87$; $P<0,05$) y que efectivamente T2 moduló de forma positiva el grado de acidez del suelo, acercándolo a un pH neutro.

El nivel de Ca^{2+} aumentó significativamente en T2 con respecto a los otros tratamientos y al control ($t=-33,03$; $P<0,05$). De forma similar, la capacidad de intercambio de cationes efectiva (CICE) mostraron niveles significativamente mayores asociados a T2 ($t=-53,81$, $P<0,05$). Los niveles de P^{+5} , Fe^{3+} y Zn^{2+} fueron significativamente más bajos en el control que en cualquier de los tratamientos ($t=-39,12$, $P<0,05$), a pesar de que T3 fue el que mostró los valores más altos. De forma interesante, los niveles de K^{+} y Mg^{2+} no variaron significativamente entre el control y los tratamientos. Finalmente, ni la capacidad de retención de agua, ni la textura general del suelo en sus componentes granulométricos fueron diferentes entre tratamientos ($F(5,30)=1,06$; $P=0,28$ para la primera y $F(5,20)=0,46$; $P=0,80$ para porcentaje de arenas entre tratamientos).

El diámetro promedio de raíz y el volumen total de raíces no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguno de los dos tipos de planta estudiados en este trabajo ($F(4,12)=0,27$; $P=0,89$ para diámetro en espinaca y $F(4,12)=7,71$; $P=0,10$ para diámetro en culantro). A pesar de ello, observamos una tendencia en T2 y T3 a desarrollar raíces con diámetros más grandes con respecto a los controles respectivos para ambos cultivos. De forma interesante, tanto la longitud total como el área total de las raíces fueron significativamente diferentes en las plantas de culantro, pero no en las de espinaca con respecto a los controles ($F(4,12)=6,89$; $P<0,05$ para longitud en culantro y $F(4,12)=3,55$; $P=0,12$ para longitud en espinaca). En estos casos, fueron precisamente T1 para la longitud total y T1/T3 para el área total, los dos tratamientos que presentaron los valores más altos.

Por su parte, el ancho y el largo promedio de las hojas de culantro y espinaca mostraron diferencias significativas muy obvias entre los diferentes tratamientos y los controles (**Figura 1**, $P<0,05$ para cada comparación de tratamientos dentro de cada categoría de medición). Con respecto a estos indicadores, T2 fue el tratamiento que presentó los valores más altos de crecimiento foliar, al mostrar hasta un 200% de aumento en las hojas de espinaca y un 150% en las hojas de culantro con respecto a los controles. A pesar de lo anterior, para todos los tratamientos observamos un aumento de tamaño considerable con respecto a los controles (**Cuadro 2**).

La biomasa promedio del tallo y de la raíz (las dos secciones de la planta estudiadas) en los dos tipos de plantas estudiados mostraron diferencias significativas entre tratamientos (no se muestra). Para ambas plantas T2 fue el tratamiento que presentó los valores más bajos de biomasa, lo cual estuvo principalmente asociado con la mayor pérdida de fluidos tras el proceso de secado. El peso seco promedio para ambas plantas mostró aumentos considerables de hasta un 1000% para T2 en espinaca y hasta un 350% para T2 en culantro con respecto a los controles respectivos (**Cuadro 3**).



Cuadro 2. Aumento porcentual de la longitud y el ancho de las hojas con respecto a los tratamientos control establecidos en el presente proyecto

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

Cuadro 3. Cambio porcentual en el peso seco promedio de ambas plantas estudiadas con respecto al control respectivo

Tratamiento	Aumento en el peso seco promedio de la planta de espinaca (%)	Aumento en el peso seco promedio de la planta de culantro (%)
T1	138,8	28,1
T2	1 086,5	345,4
T3	186,2	194,3

La cantidad de carbono orgánico mostró una relación positiva fuerte con el área de las hojas para ambos tipos de planta ($R^2= 0,998$ para culantro y $0,991$ para espinaca). Esta relación se observó en el gradiente de tratamientos Control-T1-T3-T2. Lo anterior también lo observamos cuando hicimos la relación entre el carbono orgánico y la biomasa ($R^2= 0,98$ para culantro y $0,96$ para espinaca, **Figura 2**). De forma interesante tanto la incidencia de actinobacterias, medida en unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo, como la respiración del suelo mostraron una serie de correlaciones positivas con el tamaño de hojas y la biomasa de las plantas estudiadas (**Cuadro 4**).

Finalmente, a partir de un análisis de componentes principales (PCA) encontramos que la incidencia de actinobacterias fue el principal determinante en la dirección y magnitud de los cambios con respecto a los controles. Este factor junto con la retención de agua y el porcentaje de arcillas fueron los tres primeros componentes que explican la variabilidad en el set de datos completo con alrededor de un 99% de la variación acumulada.

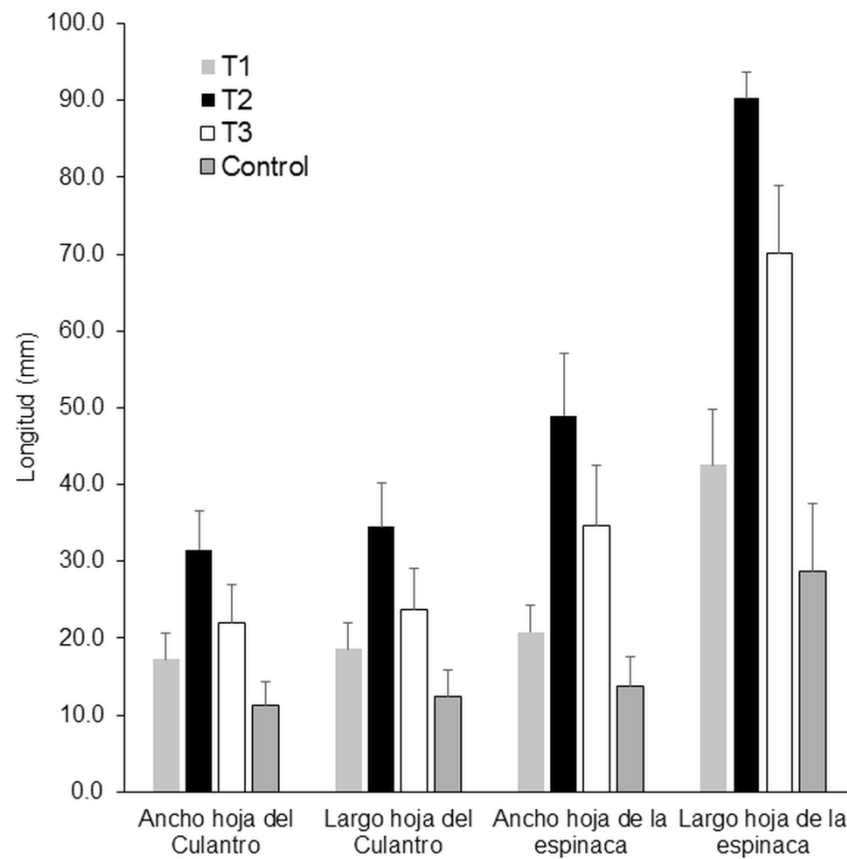


Figura 1. Ancho y largo de las hojas de culantro y espinaca para cada tratamiento tras la cosecha, según el presente estudio.

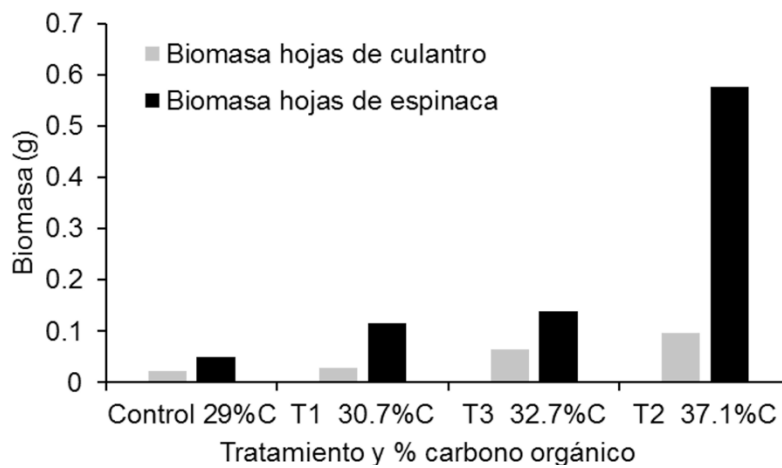


Figura 2. Comportamiento del porcentaje de carbono orgánico y biomasa de las hojas a partir del presente estudio.



4. Discusión

Los resultados fueron consecuentes con la bibliografía en el sentido de que los índices biológicos y químicos indican un mejoramiento de la dinámica del suelo. El aumento en las colonias microbianas en todos los tratamientos permitió aumentar los porcentajes de materia orgánica y respiración de suelo, de forma similar a la experiencia de [Castro et al., \(2015\)](#) para un sistema productivo de tomate-soya en invernadero. Mucho más interesante que lo anterior resulta el hecho que T2 tuvo un incremento de un 128% en respiración de suelo con respecto al control. Lo anterior quizás puede estar relacionado con una alta actividad micorrícica (a pesar de que se necesitaría estudiar este fenómeno específicamente) potenciando la movilización de fósforo, que ha sido observado como una señal que favorece a su vez el crecimiento de microorganismos en el suelo ([Teklay, Nordgren & Malmer, 2006](#)). La observación anterior también podría explicar los niveles más altos de carbono en T2 y de fósforo en los tratamientos experimentales. En todo caso, ha sido precisamente esta presencia de microorganismos el factor más importante para explicar la variabilidad en los datos y el efecto a nivel fenotípico.

Cuadro 4. Comportamiento de diferentes relaciones de parámetros estudiados a partir de correlaciones realizadas en el gradiente Control-T1-T3-T2

Correlación realizada	Coefficiente de correlación R^2	Ecuación de ajuste lineal
Actinobacterias vs Tamaño hojas culantro	0,93	HC = 12,83*Ac - 46,99
Actinobacterias vs Tamaño hojas espinaca	0,89	HE = 29,41*Ac - 113,09
Actinobacterias vs Biomasa hojas culantro	0,92	BC = 0,049*Ac - 0,211
Actinobacterias vs Biomasa hojas espinaca	0,99	BE = 0,37*Ac - 1,75
Respiración de suelos vs Tamaño de hojas de culantro	0,96	HC = 0,044*RS - 0,21
Respiración de suelos vs Tamaño de hojas de espinaca	0,99	HE = 0,11*RS - 9,39
Respiración de suelos vs Biomasa de hojas de espinaca	0,89	BE = 0,0011*RS - 0,32
Hongos vs Biomasa de hojas de espinaca	0,80	BE = 0,47*Ho - 1,45
Hongos vs Biomasa de hojas de culantro	0,84	BC = 0,071*Ho - 0,20

Los valores de pH de los tratamientos T1 y T3 fueron menores que el control. Es interesante observar que las diferencias son significativas y que T2 fue el tratamiento que reguló de mejor forma el pH. Si bien lo anterior era esperado ya que en la bibliografía se dice que el tratamiento aplicado con MM tiende a mantener su neutralidad o equilibrio ([Castro et al., 2015](#)), los niveles esperados con el uso de MM parecen ondular entre 5,7 y 6,0 ([Campo-Martínez et al., 2014](#)). Esta observación también coincidió con los resultados encontrados en el presente estudio.



Una de las hipótesis de partida era que, a partir de un proceso de biofertilización, al aumentar la complejidad de la microbiota en la matriz edáfica, se aumentaría el grado de partícula en el suelo. Este proceso es favorecido por una serie de polisacáridos producidos por los mismos microorganismos y por las propias hifas de los hongos. Sin embargo, un proceso que valdría la pena estudiar en detalle en estudios posteriores es el hecho de que los hongos endomicorrícicos tienen la capacidad de producir glomalina y, por medio de procesos cohesivos, aumentar el tamaño de las partículas en el suelo (Haddad & Sarkar, 2012) y con ello aumentar el grado de retención de agua (Augé, Stodola, Tims & Saxton, 2001). Sin embargo, en el presente estudio ni la capacidad de retención de agua ni la textura de los suelos mostraron diferencias con respecto al control. Si bien este estudio fue basado en experimentación a corto tiempo y, por tanto, presenta limitaciones propias a nivel temporal, este mismo hecho apunta en la dirección de establecer un experimento de mayor duración con el que se pueda reevaluar la hipótesis anteriormente mencionada.

La bibliografía muestra que el diámetro y estructura de algunas plantas dependen parcialmente del tipo de textura de suelo, así como de la frecuencia y tiempo de riego (Callejas-Rodríguez et al., 2012), por lo cual, al no existir diferencias entre tratamientos a nivel de la parte física estructural del suelo y en relación con el patrón de riego, es poco probable que se noten cambios representativos en el diámetro y volumen de raíces. A pesar de ello, se observaron diferencias a este nivel. De forma interesante, tanto la longitud total como el área total de las raíces fueron significativamente diferentes en las plantas de culantro, pero no en las de espinaca con respecto a los controles. Estos resultados se encuentran dentro de los parámetros esperados, ya que la presencia de microorganismos benéficos alrededor de la raíz establece y acelera procesos bioquímicos que influyen sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Reyes & Valery, 2007).

El hecho de que el tamaño de las hojas para los dos cultivos estudiados haya sido significativamente mayor que lo documentado para los controles es relevante. Desde el punto de vista productivo esto demuestra que los tratamientos experimentales funcionaron, pero la implicación ingenieril es mucho más amplia. Este resultado nos ofrece argumentos para demostrar que la aplicación de MM no solamente aumenta la dinámica microbiana del suelo, sino que modifica la estructura vertical de las plantas, lo cual en el caso de la ingeniería de biosistemas puede ser un objetivo trazado para un fin específico. Por ejemplo, si a partir de estudios posteriores se demuestra que son las micorrizas las responsables primarias de este efecto, como ha sido documentado en otros estudios (Smith, John, Smith & Bromley, 1986), esto generaría una directriz para enfoques posteriores.

Por su parte, la implicación de los resultados de biomasa es que T2 fue el tratamiento que tuvo el impacto más grande sobre el desarrollo de las plantas al favorecer un aumento en el peso seco total y en la cantidad de agua en estas mismas. Es natural pensar que, en el caso de la biomasa de la planta, este valor tienda a aumentar al incrementarse la presencia de grupos responsables del reciclaje de nutrientes en el suelo (Núñez, 2014). Desde ese punto de vista, los resultados de nuevo encajan con los estudios, sin embargo, cuando se valora el hecho de que el aumento biomásico con respecto al control ha sido en valores tan altos como 1000% y 350% para espinaca y culantro, es posible tener un argumento de comparación sobre el efecto real de la aplicación de MM con tiempo de retención adecuado versus otros tiempos de retención y los controles respectivos. Nuestros resultados indican que el tiempo de retención que optimizó la presencia de hongos fue el más efectivo para observar efecto fenotípico significativo a nivel de la planta.



De forma similar, el tratamiento experimental más pobre, es decir, el que mostró resultados más similares al control, fue T1, en donde las bacterias fueron el grupo dominante. Es así que los resultados obtenidos acá son relevantes para aplicaciones ingenieriles que requieran un aumento biomásico rápido y para comprender que no se trata únicamente de la aplicación de los MM, sino de la selección del tiempo de retención en biorreactor adecuado para la aplicación buscada.

Las actinobacterias poseen un amplio margen de beneficios entre los cuales se encuentran el mejoramiento del crecimiento vegetal y la producción de compuestos bioactivos con actividad antagonista contra microorganismos patógenos, y estos son los principales productores de antibióticos (Franco-Correa, 2009). Este comportamiento fue un parámetro que observamos en la experimentación al documentar la disminución en la presencia de plagas. En particular, el gusano cortador de hojas no se presentó en las plantas de T2 (no comunicado antes) durante los primeros 45 días, permitiendo regular el uso de plaguicidas, logrando aportes al ambiente y la economía agrícola (Julca-Otiniano, Meneses-Florián, Blas-Sevillano & Bello-Amez, 2006). Sin embargo, vale la pena recordar que la incidencia de actinobacterias en el suelo es dependiente de la microbiota total de este (Žifčáková, Větrovský, Howe & Baldrian 2015) y, por tanto, este parámetro en realidad por sí solo no indica tanto como sí lo hace dentro de un consorcio microbiano. En este sentido, aun cuando nuestros resultados indicaron que la incidencia de actinobacterias fue el principal componente de investigación y explica la variabilidad de los datos, este tópico en realidad requiere de experimentación puntual para poder ser evaluado más fielmente.

5. Conclusiones

En resumen, con base en los resultados obtenidos, el efecto de MM sobre sistemas edáficos productivos parece ser altamente beneficioso. Este efecto, no solamente se refleja en cambios a nivel de suelo, sino en la respuesta de las plantas ante una dinámica más acelerada de microorganismos beneficiosos. La movilidad de elementos químicos y los cambios en la estructura y características del suelo parecen necesitar de más tiempo que lo estudiado en este trabajo, pero los cambios fenotípicos significativamente notables aun en ciclos productivos cortos son importantes insumos para pensar en el potencial de la biofertilización para aplicaciones de ingeniería de biosistemas. Este trabajo apenas expuso la punta del *iceberg*, que, con más estudio, por ejemplo, de ensayos en blanco del líquido en el biorreactor sin los MM, podría demostrar aplicaciones más versátiles y tecnificadas para ayudar a los procesos de sostenibilidad que permean el ejercicio profesional moderno alrededor de los procesos de fertilización y la necesaria producción de alimentos más sanos y con huellas de carbono menores.

6. Agradecimientos

Extendemos un agradecimiento a Ana Tapia de la Sede del Atlántico de la Universidad de Costa Rica en Turrialba, por su apoyo en la etapa experimental. De la misma manera a Pedro Rojas y Randall Valverde, en la Unidad de Recursos Forestales del Instituto de Investigaciones en Ingeniería, por su apoyo en la etapa de laboratorio. Secciones de este estudio fueron apoyadas con fondos del proyecto 731-B5-059 de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica. A la Revista y personas revisoras anónimas, por sus oportunos comentarios.



7. Referencias

- Augé, R. M., Stodola, A. J., Tims, J. E., & Saxton, A. M. (marzo, 2001). Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant-Soil Relationships*, 230(1), 87-97. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1004891210871>
- Brem, A. & Ivens, B. (octubre, 2013). Do Frugal and Reverse Innovation Foster Sustainability? Introduction of a Conceptual Framework. *Journal of Technology Management for Growing Economies*, 4(2), 31-50. doi: <http://doi.org/10.15415/jtmge.2013.42006>
- Callejas-Rodríguez, R., Rojo-Torres, E., Benavidez-Zabala, C. & Kania-Kuhl, E. (enero/febrero, 2012). Crecimiento y distribución de raíces y su relación con el potencial productivo de parrales de vides de mesa. *Agrociencia*, 46(1), 23-35.
- Castro, L., Murillo, M., Uribe, L., & Mata, R. (diciembre, 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.
- Campo-Martínez, A., Acosta-Sánchez, R. L., Morales-Velasco, S. y Prado, F. A. (marzo, 2014). Evaluación de microorganismos de montaña (MM) en la producción de acelga en la Meseta de Popayán. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(1), 79-87.
- Chiari, P. F. (2015). Efecto de las raciones verdes inoculadas con microorganismos de montaña en la producción y calidad de leche caprina (Tesis de maestría). Escuela de Posgrado del CATIE, Costa Rica.
- Franco-Correa, M. (diciembre, 2009). Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Revista Peruana de Biología*, 16(2), 239-242. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v16i2.213>
- Haapala, R. A., Zhao, F., Camelio, J., Sutherland, J. W., Skerlos, S. J., Dornfeld, D. A., Jawahir, I. S., Clarens, A. F. & Rickli, J. L. (julio, 2013). A Review of Engineering Research in Sustainable Manufacturing. *Journal of Manufacturing Science and Engineering*, 135(4), 041013. doi: <https://doi.org/10.1115/1.4024040>
- Haddad, M., & Sarkar, D. (setiembre, 2012). Glomalin, a newly discovered component of soil organic matter: Part I - Environmental significance Glomalin, a newly discovered component of soil organic matter : Part I — Environmental significance. *Environmental Geoscience*, 10(3), 91-8. doi: <http://doi.org/10.1306/eg.05020303004>
- Julca-Otiniano, A., Meneses-Florián, L., Blas-Sevillano, R., & Bello-Amez, S. (abril, 2006). La materia orgánica, importancia y experiencias de su uso en la agricultura. *Idesia*, 24(1), 49-61. doi: <https://doi.org/10.4067/S0718-34292006000100009>
- Kalema, J. & Chacón, M. (2010). Organic Fertilizers and Bio-ferments. Uganda: Agro Eco Louis Bolk Institute, Eastern Africa Branch.



- Kondo S. (2015). *Producción agroecológica: Agricultura orgánica I. Documento técnico de PROPA-Oriente*. MAG, El Salvador. Recuperado de https://www.jica.go.jp/project/elsalvador/0603028/pdf/production/booklet_01.pdf
- Martínez-Trujillo, M., & García-Rivero, M. (abril, 2012). Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 55-73.
- Núñez, F. (marzo, 2014). Efectos de la costra microbiótica en algunas propiedades del suelo en el sur de la quebrada Los Barrancos, Valle de Quíbor, Venezuela. *Investigaciones Geográficas*, 2014(84), 5-19. doi: <https://doi.org/10.14350/rig.33959>
- Reyes I., & Valery, A. (diciembre, 2007). Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. *Bioagro*, 19(3), 117-126.
- Ruiz-Altisent, M. (1991). La ingeniería de los biosistemas: Un reto para el futuro. En L. Rallo Romero & F. Nuez Viñals (Eds.), *La horticultura española en la C.E.* (pp. 245-247). España: Ediciones de Horticultura.
- Smith, S. E., St John, B. J., Smith, F. A., & Bromley, J. L. (junio, 1986). Effects of mycorrhizal infection on plant growth, nitrogen and phosphorus nutrition in glasshouse-grown *Allium cepa* L. *New Phytologist*, 103(2), 359-373. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1986.tb00622.x>
- Suchini, J. G. (marzo 2012). Innovaciones agroecológicas para una producción agropecuaria sostenible en la región del Trifinio. *Serie Técnica # 104*. CATIE, Costa Rica. Recuperado de <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A10933e/A10933e.pdf>
- Tencio-Camacho R. (2013). *Uso de microorganismos benéficos en la agricultura orgánica o ecológica en Costa Rica. Documento técnico sobre agricultura sostenible*. DRCO-MAG, Costa Rica. Recuperado de: <http://drco-mag.yolasite.com>.
- Teklay, T., Nordgren, A., & Malmer, A. (enero, 2006). Soil respiration characteristics of tropical soils from agricultural and forestry land-uses at Wondo Genet (Ethiopia) in response to C, N and P amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(1), 125-133. doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.04.024>
- Wittmann, C., & Liao, J. (2017). *Industrial Biotechnology: Microorganisms*. Alemania: Wiley VCH. doi: <https://doi.org/10.1002/9783527807833>
- Žifčáková, L., Větrovský, T., Howe, A., & Baldrian, P. (octubre, 2015). Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter. *Environmental microbiology*, 18(1), 288-301. doi: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13026>