

**EVALUACIÓN DE DOS RESIDUOS PECUARIOS EN LA ELABORACION DE
UN BIOFERTILIZANTE EMPLEANDO FERMENTACIÓN ANAEROBIA**

NATALIA LUCÍA ROJAS PRIETO

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
MEDELLÍN
2020**

**EVALUACIÓN DE DOS RESIDUOS PECUARIOS EN LA ELABORACION DE
UN BIOFERTILIZANTE EMPLEANDO FERMENTACIÓN ANAEROBIA**

NATALIA LUCÍA ROJAS PRIETO

Trabajo de grado para optar al Título de Magíster en Biotecnología

Director

**Oscar Alexis Muñoz Blandón
Mag. en Biotecnología
Doctor en Ingeniería**

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
MEDELLÍN
2020**

Nota de aceptación

Firma:
Nombre:
Presidente del Jurado

Firma:
Nombre:
Jurado.

Firma:
Nombre:
Jurado.

Medellín, Septiembre ____ de 2020

Medellín 5 de noviembre de 2020.

Natalia Lucía Rojas Prieto,

“Declaro que este trabajo de grado no ha sido presentado con anterioridad para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en esta o en cualquiera otra universidad”. Art. 92, párrafo, Régimen Estudiantil de Formación Avanzada.

Natalia Lucía Rojas Prieto.

A mis padres y mis tios.

Sin ellos, sus enseñanzas y su amor, no habría logrado mis metas y éxitos.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia materna y a mis padres por su apoyo incondicional, su ayuda y participación durante todo el proceso, y su confianza en mi capacidad de culminar este propósito, y que sé lo celebran conmigo desde su más infinito amor. Los amo.

A mis amigos. La familia escogida que me acompaña en cada ocurrencia.

A mi jefe Juan Miguel Escobar Roa por su plena confianza, y por ser un soporte y ejemplo para mi crecimiento tanto laboral, como personal.

A los profesores Carlos Ocampo y Oscar Muñoz, que además de ser excelentes guías, tuvieron una gran disposición para su colaboración con todos los procesos.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
1. MARCO TEÓRICO	17
1.1. BIOLOGÍA DEL SUELO	17
1.1.1. Suelo como sistema.....	17
1.1.2. Biota del suelo	17
1.1.3. Microorganismos Benéficos del Suelo	20
1.1.4. Interacción plantas-microorganismos.....	24
1.2. AGRICULTURA ORGÁNICA.....	28
1.2.1. Biofertilizantes	30
2. METODOLOGÍA	45
2.1. OBTENCIÓN DEL SUSTRATO.....	45
2.2. FERMENTACIÓN PARA OBTENCIÓN DEL BIOFERTILIZANTE ENRIQUECIDO	45
2.2.1 Características de los Fermentadores.....	45
2.2.2 Condiciones Operacionales de las fermentaciones.....	47
2.2.3 Seguimiento del pH y de la temperatura durante la fermentación	48
2.2.4 Separación y conservación de los bioles obtenidos	49
2.3. DETERMINACIÓN DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN LOS BIOLES OBTENIDOS	49
2.4. EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i> DE LA ACCIÓN DE LOS BIOLES OBTENIDOS COMO	54
BIOFERTILIZANTES.....	54
2.4.1. Establecimiento de la parcela	54
2.4.2. Diseño experimental de la evaluación del efecto fertilizante de los bioles	55
2.4.3. Evaluación de la acción de los bioles obtenidos sobre el crecimiento de	56
<i>Brachiaria decumbens cv. Basilisk</i>	56
2.4.4. Análisis estadístico de la acción de los bioles obtenidos sobre el crecimiento de	57
plantas de <i>Brachiaria decumbens cv. Basilisk</i>	57
3. RESULTADOS Y ANALISIS	58
3.1. FERMENTACIÓN PARA OBTENCIÓN DEL BIOFERTILIZANTE ENRIQUECIDO	58
3.2. DETERMINACIÓN DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN LOS BIOLES OBTENIDOS	65
3.2.1. Determinación de microorganismos de interés agrícola.....	66
3.2.2. Determinación de Coliformes totales y fecales.....	76

3.3. EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA ACCIÓN DE LOS BIOLES OBTENIDOS COMO BIOFERTILIZANTES..... 82

 3.3.1. Evaluación de la acción de los bioles obtenidos sobre el crecimiento de plantas de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*..... 83

CONCLUSIONES95

RECOMENDACIONES97

BIBLIOGRAFIA..... **¡Error! Marcador no definido.**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Interacciones de la biota del suelo.	26
Figura 2. Ecuación de la digestión anaerobia (Tarigo, et al., 2004; Rajendran y Ganti, 2019).	39
Figura 3. Cinética de crecimiento y generación de metabolitos de la digestión anaerobia (Ruiz, 2013).	42
Figura 4. Representación gráfica de los fermentadores.	46
Figura 5. Comportamiento del pH durante el proceso fermentativo, de las formulaciones. F1: 100% bovinaza, F2: 100% gallinaza, F3: 50% gallinaza y 50% bovinaza, F4: 30% gallinaza y 70% bovinaza, y F5: 70% gallinaza y 30% bovinaza.	59
Figura 6. Valores del seguimiento de la temperatura durante las fermentaciones, de las formulaciones: F1: 100% bovinaza, F2: 100% gallinaza, F3: 50% gallinaza y 50% bovinaza, F4: 30% gallinaza y 70% bovinaza, y F5: 70% gallinaza y 30% bovinaza.	62
Figura 7. Aislamiento de organismos solubilizadores de fósforo, del día 19. A) F1 y F2: Medio SMRS1. B) F1 y F2: Medio Pikovskaya. C) F1R2: Tinción Gram. D) F3 y F4R1 y F4R2, medio SMRS1. E) F4R3 y F5, medio SMRS1. F) F3, F4 y F5, medio Pikovskaya.	67
Figura 8. Aislamiento de organismos con capacidad proteolítica, en agar leche. A) F1, F2, F3: Revés. B) F1, F2, F3: Envés. C) F3, F4 y F5: Revés. D) F3, F4 y F5: Envés.	71
Figura 9. Aislamientos día 1. A) F1, F2 y F3: envés. B) F1, F2 y F3: revés. F2: Halo de hidrólisis de almidón alrededor de las colonias. C) F2: Tinción Gram. D) F4 y F5: envés. E) F4 y F5: revés.	72
Figura 10. Aislamientos en agar CMC, revelados con rojo Congo. A) Día 1 de F1, F2 y F3. B) Día 1 de F3, F4 y F5: C) Día 19 de F1, F2 y F3. D) Día 19 de F3, F4 y F5. E) Día 42 en agar CMC de F1, F2 y F3. F) Día 42 en agar CMC de F3, F4 y F5.	75
Figura 11. Aislamientos del día 1 en agar EMB. A) F1R1. B) F1R1: Tinción Gram. C) F1R3 y F2R1. D) F2R2 y F2R3. E) F3. F) F4R1 y FR2. F4R3. G) F4R3: Tinción Gram. H) F5.	77
Figura 12. Aislamientos del día 19 en agar Chromocult. A) F1 y F2. F3. B) F1 y F2: Tinción Gram. C) F4 y F5.	79
Figura 13. Seguimiento del crecimiento de las plantas. A) Tamaño del tallo. B) Plantas de pasto. C) No. de macollas.	83

Figura 14. Altura (cm) del tallo de plantas de <i>Brachiaria decumbens</i> cv. Basilisk, fertilizadas con los bioles obtenidos y sus respectivos controles. T1: 100% Bovinaza, T2: 100% Gallinaza, T3: 50/50 Gallinaza-Bovinaza, T4: 30/70 Gallinaza-Bovinaza, T5: 70/30 Gallinaza-Bovinaza, T6: Producto comercial y T7: Agua.....	85
Figura 15. Análisis de varianza para la altura del tallo del día 45 de seguimiento al crecimiento de las plantas de <i>Brachiaria decumbens</i> cv. Basilisk, fertilizadas con los bioles obtenidos y sus respectivos controles.....	86
Figura 16. Prueba de Múltiples Rangos para visualizar la significancia en la diferencia entre tratamientos, para la altura del tallo del día 45 de seguimiento. Sobre el crecimiento de las plantas de <i>Brachiaria decumbens</i> cv. Basilisk, fertilizadas con los bioles obtenidos y sus respectivos controles.	87
Figura 17. Seguimiento del número de macollas de las plantas de <i>Brachiaria decumbens</i> cv. Basilisk, fertilizadas con los bioles obtenidos y sus respectivos controles. T1: 100% Bovinaza, T2: 100% Gallinaza, T3: 50/50 Gallinaza-Bovinaza, T4: 30/70 Gallinaza-Bovinaza, 5: 70/30 Gallinaza-Bovinaza, T6: producto comercial y T7: agua.	91
Figura 18. Análisis de varianza para el número de macollas del día 45 de seguimiento al crecimiento de las plantas de <i>Brachiaria decumbens</i> cv. Basilisk, fertilizadas con los bioles obtenidos y sus respectivos controles.....	92
Figura 19. Prueba de Múltiples Rangos para visualizar la significancia en la diferencia entre tratamientos, para la altura del tallo del día 45 de seguimiento. Sobre el crecimiento de las plantas de <i>Brachiaria decumbens</i> cv. Basilisk, fertilizadas con los bioles obtenidos y sus respectivos controles.	93

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Fórmula para la preparación del biofertilizante Supermagro.	36
Tabla 2. Formulaciones de las mezclas de gallinaza-bovinaza en diferentes proporciones.	47
Tabla 3. Concentración de las sales minerales que alimentaron el sistema durante la fermentación.....	48
Tabla 4. Composición de los medios de cultivo SMRS1 y Pikovskaya.	51
Tabla 5. Composición del agar leche.....	52
Tabla 6. Composición del medio agar almidón.	52
Tabla 7. Composición del medio Carboximetilcelulosa 1%.....	53
Tabla 8. Esquema de fertilización de las plantas de <i>Brachiaria decumbens</i> cv. Basilisk..	56
Tabla 9. Determinación de microorganismos benéficos del suelo.	66
Tabla 10. Determinación de patógenos humanos y animales.....	76

RESUMEN

Ante la imperiosa necesidad de afianzar el crecimiento de los sistemas productivos agrícolas, es necesario crear alternativas que le permitan avanzar y superar las deficiencias en sus procesos como, por ejemplo, lo es la nutrición vegetal a partir del uso de fertilizantes de síntesis.

En respuesta a lo anterior, ha surgido la agricultura orgánica como una tecnología eficaz, respetuosa del medio ambiente, económica y factible de desarrollar, que incluye la producción y uso de fertilizantes de origen microbiológico, a partir de residuos agropecuarios, para nutrir plantas, controlar plagas y enfermedades de plantas, e influir positivamente en las propiedades fisicoquímicas del suelo.

En esta investigación se evaluó la combinación de dos sustratos de origen animal, en diferentes proporciones, en la elaboración de un biofertilizante tipo supermagro. Para ello, se realizó un proceso fermentativo anaerobio durante 42 días, empleando cinco combinaciones de gallinaza y bovinaza. Los bioles obtenidos fueron caracterizados en términos de biota de interés agrícola y de especies con riesgo de patogenicidad para animales y humanos.

La fermentación que empleó bovinaza como único sustrato evidenció la presencia de microorganismos solubilizadores de fósforo, a la vez que condujo a un mayor crecimiento vegetal durante los primeros 15 días de cultivo, lo que sugiere una mineralización del fósforo y posterior absorción por parte de la planta. Por su lado, la microbiota benéfica del suelo demostró tener un papel fundamental en la capacidad fertilizante de los bioles obtenidos tras las fermentaciones.

PALABRAS CLAVE: Fermentación, Biofertilizante, Biol, Microorganismos benéficos del suelo, *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*.

INTRODUCCIÓN

Colombia posee una extensión territorial de 111,5 millones de Ha en área continental, de las cuales un 39,5 % es de vocación agropecuaria (Villanueva, 2018). De esos, 44 millones de Ha sólo el 6,3 % se destina a la siembra de cultivos, mientras que el resto se utiliza para la alimentación de animales (OCDE; 2015).

El sector agrícola es influyente en la economía colombiana debido a su contribución al PIB, representando cerca del 7% de este, y cuyo valor añadido se reporta en 6.262 USD de 2010 (FAO, 2017). Este aporte se debe a la producción de materias primas para la agroindustria nacional e internacional, así como a su participación del 51,1 % en la generación de empleos en el territorio rural, el cual corresponde a cerca del 66% de municipios del país, y 33,6% de la población colombiana (OCDE Revisión de las Políticas Agrícolas: Colombia, 2015; Departamento Nacional de Planeación, 2015).

Se estima que la producción agrícola a nivel mundial, a corto plazo, llegará a unos 8200 millones de ton métricas para el 2021 (Statista Research Department, 2015). En el último año, Colombia presentó un crecimiento del 0,9% para este sector en el PIB, en comparación con el mismo periodo del año anterior (DANE, 2019). El país utiliza alrededor de 5,3 millones de Ha en producción agrícola y cuenta con una capacidad instalada de 22 millones de Ha para seguir creciendo (Departamento Nacional de Planeación, 2015).

Sin embargo, para afianzar el crecimiento, los sistemas productivos agrícolas deben evolucionar, dejando atrás las prácticas que afectan negativamente su sostenibilidad y competitividad, como lo es el manejo ineficiente de la nutrición vegetal, centralizada en el consumo de fertilizantes de síntesis.

La agricultura convencional utiliza fertilizantes minerales que aumentan los rendimientos de los cultivos, sin tener en cuenta los mecanismos de absorción de la planta, la sinergia de los nutrientes, ni la interacción entre el suelo, la planta y la atmósfera, generando alteraciones de las características físicas, químicas y biológicas del suelo alterando su fertilidad (Singh, *et al.*, 2011; González, Mosquera y Torrente, 2015).

En el mundo se consumen anualmente 187 millones de ton de fertilizantes de síntesis, la mayoría de las veces en sistemas no sostenibles de producción intensiva. Lo que conduce a un incremento en los costos de aplicación, aparición de plagas y enfermedades de plantas, o generación de resistencia de estas. Asimismo, conlleva a un incremento en la contaminación por el lavado de nutrientes, pérdida de materia orgánica, erosión del suelo, supresión de microbiota benéfica del suelo y eutrofización, entre otros (Cheng y Yingchun, 2013; Tarigo, *et al.*, 2004; González, 2015; IFA, 2018).

Para disminuir este impacto y en busca de aumentar la competitividad del sector mediante la innovación, hoy en día se desarrollan planes de manejo integrado que incitan a la disminución del uso de compuestos agroquímicos y el incremento del uso y la producción de insumos orgánicos (Cheng y Yingchun, 2013; Chauhan, Bagyaraji, Selvakumar, Sundaram, 2015; OCDE, 2015; DANE, 2019).

Dentro de esas alternativas, se ha incentivado la “agricultura orgánica” como una opción integral y sostenible para brindar competitividad técnica, ambiental y económica al sector. Especialmente, en un país donde el 87% de los productores agropecuarios hacen parte de familias de economía campesina, con Unidades Productivas Agropecuarias (UPA) de menos de 5 hectáreas (Departamento Nacional de Planeación, 2015).

La “agricultura orgánica” es una tecnología segura, eficaz, respetuosa del medio ambiente, económica y factible de desarrollar. Se basa en el aumento de la biodiversidad del suelo, la disminución del uso de fertilizantes de síntesis y pesticidas químicos, y su sustitución por insumos orgánicos (Sangakkara, 2001; Singh, Pandey y Singh, 2011; Chauhan, Bagyaraj, Selvakumar y Sundaram, 2015; Meng, *et al.*, 2017).

La agricultura orgánica incluye una serie de técnicas, entre las que se destaca la utilización de biofertilizantes, abonos líquidos preparados a base residuos orgánicos de la producción agrícola y animal, minerales y agua, que favorecen el crecimiento vegetal (Restrepo, 2001; Taringo, A.; Repetto, C.; Acosta, D., 2004; Restrepo, 2007).

Los biofertilizantes contienen microorganismos benéficos que participan en el ciclaje de nutrientes en el suelo, ya sea por la actividad enzimática o por la interacción entre ellos y su ambiente (Taringo, *et al.*, 2004; Mohammadi y Sohrabi, 2012). Estos son capaces de descomponer residuos orgánicos, aportando a la recirculación de los nutrientes, reduciendo contaminantes y controlando plagas y enfermedades de plantas. Además, influyen positivamente en las propiedades fisicoquímicas del suelo, al mediar la interacción entre los componentes bióticos y abióticos de este (Singh, *et al.*, 2011; Chauhan, *et al.*, 2015).

El Supermagro, es un biofertilizante enriquecido que ha sido utilizado en cultivos de manzana, tomate y maíz, entre otros, evidenciando resultados positivos en el crecimiento vegetal (Restrepo, 2007; Ferraz, 2010). Se basa en la transformación de heces de bovinos, macronutrientes, minerales, y agua; en nutrientes asimilables por parte de las plantas (Taringo, *et al.*, 2004; Rodrigues, Cavalcante, de Oliveira, de Sousa y Mesquita, 2009).

El uso de heces de animales como sustrato para la síntesis de biofertilizantes es

ampliamente extendido, debido a que éstas se caracterizan por contener nutrientes necesarios para la nutrición vegetal y una gran cantidad de microbiota que interviene en procesos de degradación de la materia orgánica (López, 2015; Fitriyanto, Priyadi, Suranindyah, Yusiati, Erwanto, Kurniawati y Pertiwiningrum, 2019).

La gallinaza contiene estos nutrientes en mucha mayor concentración que las heces de otras especies del sector pecuario, lo que la convierte en un fertilizante orgánico, relativamente concentrado y de rápida acción (Rosales, Bermúdez, Moronta y Morales, 2007; N A Fitriyanto, et al., 2019). Su empleo como materia prima en la elaboración de diferentes tipos de fertilizantes ha sido reportado por diversos autores, demostrando ser una fuente nutritiva idónea para las plantas, de fácil acceso y cuyo procesamiento impacta positivamente el manejo de residuos orgánicos de origen animal (Rosales, et al., 2007; FAO, 2013; Fitriyanto, et al., 2019).

Por tal razón, en esta investigación se evaluaron diferentes combinaciones de heces avícolas y bovinas, resultantes de la producción agropecuaria, en la obtención de un biol con potencial fertilizante sobre plantas de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilik*.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. BIOLOGÍA DEL SUELO

1.1.1. Suelo como sistema

El suelo es un sistema integrado conformado por agua, rocas, raíces, animales, microorganismos y otros componentes (Needelman, 2013). Se encarga de almacenar y proporcionar agua y nutrientes a las plantas, filtra y transforma contaminantes, regula gases (oxígeno y gases de efecto invernadero) y proporciona un hábitat para la biota de este, participando en el ciclaje de nutrientes, transformación y almacenamiento en formas disponibles para otros organismos y evitando su lixiviación a aguas subterráneas y superficiales (Needelman, 2013).

La comunidad vegetal y los cambios en el uso del suelo alteran la composición química y la concentración de los insumos orgánicos en este, conduciendo a alteraciones en la fertilidad del suelo. Lo que puede ser contrarrestado mediante la liberación de exudados quimioatrayentes para los descomponedores primarios y la transferencia de carbono en la rizosfera por parte de las plantas (Fu, Zou y Coleman, 2009; Rodríguez, Rothballer, Chowdhury, Nussbaumer, Gutjahr y Falter, 2019).

1.1.2. Biota del suelo

La biota del suelo se clasifica en microorganismos, mesoorganismos y macroorganismos, de acuerdo con el tamaño de las especies que la componen. Es la responsable de la descomposición de la materia orgánica y del ciclaje de nutrientes en el suelo, y es un indicador de la calidad del suelo, debido a su sensibilidad por enriquecimiento de este con compuestos químicos y metales pesados (Fu, et al., 2009). De igual forma, pueden participar como agentes biorremediadores, como es el caso de algunos hongos formadores de micorrizas

(*Glomus* sp.), bacterias (*Burkholderia* sp.) y lombrices por su participación en la reducción de la concentración de metales pesados en suelo (Ferrera y Alarcón, 2007).

La macrofauna del suelo consta de termites, hormigas, lombrices, entre otros animales, y participan activamente en los procesos de agregación del suelo, favoreciendo propiedades físicas como la estructura, la textura y la porosidad. Además de facilitar la distribución de los nutrientes en suelo (Fu, et al., 2009). Las termitas y hormigas se alimentan de celulosa mediante un proceso de digestión simbiótica con protozoarios, mientras que las lombrices se caracterizan por formar galerías al moverse a través del suelo, además de alimentarse de hongos y protozoarios, controlando la población de estos (Stout y Heal, 1967).

La micro y mesofauna del suelo juega un rol importante en la estructura de este, acelerando la reducción del volumen y la liberación de carbono y nitrógeno presentes en la materia orgánica en descomposición. Además, ayudan controlando la población de hongos y nematodos. Se caracteriza por la presencia de colémbolos, ácaros y nematodos (*Acrobeles*, *Acroboloides*, *Cephalobus*, *Plectus* y *Prismatolaimus*). Los nematodos, a su vez, son conocidos como indicadores de calidad del suelo, puesto que sus poblaciones disminuyen considerablemente con la presencia de metales pesados como Zn^{+} y Cu^{+} (Stout y Heal, 1967; Fu, et al., 2009; Rodríguez, et al., 2019).

Los microorganismos que se encuentran en el suelo están conformados por una gran variedad de agentes infecciosos como virus y diferentes especies de bacterias, hongos, protozoarios y algunos animales de orden microscópico (Sylvia, Fuhrmann, Hartel y Zuberer, 1999; Rodríguez, et al., 2019).

Las partículas virales tienen un rol secundario en el ciclaje de nutrientes, por ejemplo, los-bacteriófagos pueden controlar la población de determinadas bacterias

que habitan en los sustratos marinos, influyendo en el ciclo del carbono, la actividad enzimática y el recambio de nutrientes en el suelo (Kuzyakov y Mason, 2018).

Las bacterias más comunes en el suelo pertenecen al género *Bacillus*, que son bacilos Gram positivos, y las Proteobacterias, como las *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Enterobacter*, etc. y Betaproteobacterias, como *Burkholderia* y *Achromobacter*, que son Gram negativas (Ramakrishna, Yadav y Li, 2019; Rodríguez, et al., 2019).

La población bacteriana varía de acuerdo con el tipo de cultivo, tipo de suelo y características de calidad de este. Tiene un gran potencial como agentes promotores de crecimiento vegetal (PGPR), y permiten mantener el equilibrio de poblaciones de otros microorganismos, como hongos filamentosos (Chauhan, Bagyaraj, Selvakumar y Sundaram, 2015; Ramakrishna, et al., 2019; Rodríguez, et al., 2019).

Los hongos juegan un rol en la descomposición primaria y secundaria de la materia orgánica preformada por la macrofauna del suelo, mediante la síntesis de enzimas que le permiten realizar una digestión externa, seguida de la absorción de nutrientes (Ferrera y Alarcón, 2007; Ramakrishna, et al., 2019).

Dentro de las características catalíticas de los hongos se pueden destacar enzimas capaces de degradar compuestos carbonados que se encuentran comúnmente en los tejidos vegetales que componen la materia orgánica tales como celulosa, ácidos orgánicos, grasas, glicerol y proteínas (Ferrera y Alarcón, 2007).

Por su parte, los protozoarios son depredadores de bacterias y hongos que controlan las poblaciones de dichos organismos, a la vez que intervienen en las interacciones que estas poblaciones ejercen en el sistema (Stout y Heal, 1967).

Las algas participan en la mineralización del carbono, proporcionando algunos nutrientes y reduciendo el pH del suelo, lo que induce la actividad microbiana del suelo, y el crecimiento de las plantas (Salwan y Hamza, 2020).

A su vez, las algas aportan diferentes metabolitos, minerales y fitohormonas que aportan al crecimiento de las plantas, y mejoran las propiedades biológicas del suelo, reduciendo el uso de productos químicos en la producción vegetal (Pérez, Madruga, López y Reyes, 2020).

1.1.3. Microorganismos Benéficos del Suelo

Los microorganismos benéficos del suelo se encargan de solubilizar los macronutrientes y micronutrientes que se encuentran en la atmósfera y en el suelo, facilitando la disponibilidad de estos por parte de los organismos que habitan en esta matriz (Singh, et al., 2011). También participan en la desintoxicación de suelos ocasionada por pesticidas, sintetizan hormonas de crecimiento vegetal y de regulación de estrés vegetal. Además, cuentan con un potencial en la acción represora o inhibidora de fitopatógenos por la producción de antibióticos, hidrólisis de moléculas de los patógenos, síntesis de quitinasas, entre otros (Chauhan, et al., 2015; Rodríguez, et al., 2019).

Dentro de estos microorganismos se destacan los que solubilizan fósforo, los que se encargan de la degradación de proteínas a través de la síntesis de proteasas, y de la degradación de compuestos carbonados complejos como la celulosa y el almidón.

- ***Microorganismos Solubilizadores de Fósforo (PSM)***

La solubilización del fósforo en el suelo consiste en la liberación de este elemento, mediante la reversión de las reacciones de precipitación. Está mediada por la acción

de bacterias pertenecientes a los géneros *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, y *Pantotea* y hongos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium* (Patiño y Sanclemente, 2014).

La solubilización de fósforo por microorganismos sucede mediante la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, que actúan sobre el fósforo inorgánico y la liberación de protones durante la asimilación de NH_4^+ , que convierten el fósforo insoluble en fosfatos solubles para las plantas (HPO_4^{2-} y H_2PO_4) (Acevedo, et al., 2014; Gopalakrishnan, Sathya, Vijayabharathi, Kumar, Laxmipathi, y Lakshmanan, 2015; Patiño y Sanclemente, 2014; Wang, et al., 2015).

La acción de los ácidos orgánicos sobre la solubilización del fósforo ocurre por tres mecanismos: 1) Reducción del pH, donde la disociación de los ácidos orgánicos libera protones que reducen el pH del suelo, conllevando a la disolución de los minerales fosfóricos. 2) Quelación, donde los componentes aniónicos de los ácidos orgánicos se intercambian por el grupo ortofosfato (de los fosfatos de Ca^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+}), liberando el fosfato en el suelo. 3) Adsorción: los componentes aniónicos de los ácidos orgánicos adsorben el fósforo y lo desplazan a través del suelo (Patiño y Sanclemente, 2014).

La solubilización del fósforo orgánico también se puede dar mediante la síntesis de enzimas como fosfatasa ácida, fosfohidrolasas, fitasa, fosfonoacetato hidrolasa, D- α -glicerofosfatasa, entre otras (Sylvia, et al. 1997; Gopalakrishnan, et al., 2015).

- ***Microorganismos degradadores de proteínas***

Los microorganismos degradadores de proteínas se caracterizan por sintetizar proteasas, que hidrolizan los enlaces peptídicos liberando diversos aminoácidos

que pueden ser asimilados por la biota presente en el suelo (Sylvia et al., 1991 y Sattar, et al., 2019).

Las proteasas pueden ser sintetizadas por diversos microorganismos como hongos, pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus* (Sattar, et al., 2019) y bacterias ácidolácticas, como *Lactococcus lactis* (Smid, et al., 1991).

Dentro de las proteínas degradadas por este último grupo de microorganismos, se encuentra la caseína, un complejo proteico y principal componente de la leche bovina (Sattar, Bibi, Kamran, Aman y Ali, 2019; Smid, Poolman y Konings, 1991; Lima, et al., 2020).

Las bacterias ácidolácticas cuentan con un sistema proteolítico para la utilización de las proteínas por parte de la célula, compuesto por 1) peptidasas de degradación extracelular, unidas a la pared celular, que actúan sobre la caseína, oligopéptidos y péptidos; 2) transportadores que llevan los péptidos a la célula; y 3) peptidasas intracelulares que degradan los péptidos en aminoácidos cortos, los cuales, se pueden convertir en aldehídos, alcoholes y ésteres (Liu, Bayjanov, Renckens, Nauta, Siezen, 2010).

En este sistema, hidrolizan los péptidos de la leche generando aminoácidos, que posteriormente se catabolizan mediante reacciones de descarboxilación, desaminación, transaminación, desulfuración o hidrólisis de cadenas laterales, generando amoníaco, aminas, aldehídos, fenoles y alcoholes. Finalmente, reducen los aldehídos a alcoholes u oxidan los ácidos carboxílicos (Rey, 2009).

- ***Microorganismos Celulolíticos y Amilolíticos***

Algunos animales, como nematodos, artrópodos y moluscos, juegan un rol en los procesos de degradación de la celulosa junto con los microorganismos celulolíticos, los cuales sintetizan las enzimas involucradas en la degradación de la pared celular vegetal (Vilanova, et al., 2012).

Entre los microorganismos celulolíticos se incluyen bacterias como, *Clostridium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*; y hongos como, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria* (Sylvia, et al. 1997; Talia, Sede, Campos, Rorig, Principi, Tosto, Hopp, Grasso y Cataldi, 2012).

Los hongos más representativos implicados en la degradación de celulosa pueden clasificarse en hongos de podredumbre parda, los cuales degradan la celulosa y hemicelulosa dejando de lado la lignina y compuestos fenólicos, y hongos de podredumbre blanca que degradan todos los compuestos asociados a la celulosa (Sylvia, et al. 1997).

La celulosa se degrada por acción de las enzimas hidrolasa denominadas como endo- β -1,4-glucanasa o carboximetil celulasa-CMCasa y exo- β -1,4-glucanasa (Sylvia, et al. 1997; Vilanova, et al., 2012). La hemicelulosa se degrada por la acción de enzimas xilanasas que se encargan de transformar la hemicelulosa en xilanos; y enzimas β -glucosidasas que hidrolizan los productos de las anteriores en monómeros (Vilanova, et al., 2012).

Por su lado, la degradación de la lignina, corre por cuenta de los hongos de podredumbre blanca y algunas cepas bacterianas específicas (*Streptomyces* sp.) las cuales sintetizan enzimas ligninolíticas como lo es la lacasa (Lac), lignino peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), que se encargan de la oxidación de la molécula, seguido de la actividad de algunas cepas bacterianas como *Pseudomonas putida* y *Rhonomococcus jostii* que despolimerizan el producto anterior a compuestos aromáticos como ácido gálico o ácido ferúlico (Lv, et al., 2014). Las

sustancias pécticas se degradan por acción de las enzimas pectinasas, producidas por organismos simbiotes de las raíces como el hongo *Glomus* sp. o la bacteria *Rhizobium* sp. (Sylvia, et al. 1997).

El almidón se degrada por la acción de enzimas extracelulares denominadas amilasas (α 1-4 exoglucanasa o α 1-4 endoglucanasa) que hidrolizan los enlaces α 1-4 de la amilosa o la amilopectina, generando maltosa que por acción de la maltasa produce dos unidades de glucosa que pueden entrar a la glicolisis (Sylvia, et al. 1997).

1.1.4. Interacción plantas-microorganismos

El fósforo es un elemento esencial en la nutrición de las plantas, puesto que participa en la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos, membranas celulares y moléculas de energía como ATP y NADPH (Acevedo, et al., 2014). Este elemento representa aproximadamente hasta el 0,8 % del peso seco de una planta, pero sólo el 0,1 % se encuentra disponible en el suelo para éstas (Gopalakrishnan, et al., 2015),

Lo anterior se debe a que este elemento suele precipitarse al unirse con iones quelantes como hierro (Fe^+) y aluminio (Al^+) y calcio (Ca^+), o reacciona con la arcilla presente en el suelo. También influye la compactación, aireación, humedad, temperatura, textura y presencia de otros microorganismos del suelo (Acevedo, et al., 2014; Gopalakrishnan, et al., 2015; Wang, Liu, Zhai, Zhang, Ren, Fan, Liu, 2015).

Las proteínas son un componente importante de los residuos orgánicos del suelo, entre estas se destaca la caseína como una importante fuente de nitrógeno orgánico de los cultivos (Sylvia et al., 1991 y Lima, Casanova, Nogueira, Novaes y Fernandes, 2020).

La pared celular de las plantas está compuesta por diversas moléculas carbonadas como la celulosa que se encuentra entrelazada con moléculas de lignina y hemicelulosa, formando una malla que se une a moléculas de pectina y azúcares como la ramnosa (Sylvia, et al. 1997; Ferrera y Alarcòn, 2007; Vilanova, Marco, Domínguez, Genovés, Sentandreu, Bataller, Ramón y Porcar, 2012). El almidón también es un polisacárido representativo en las células vegetales pues es un polímero de almacenamiento energético de las plantas (Sylvia, et al. 1997; Ferrera y Alarcòn, 2007).

Las raíces de las plantas se encargan de la absorción de nutrientes y agua del suelo. A su vez, aportan a la red alimentaria del suelo por medio de la rizosfera, condicionando el ambiente de esta, al liberar cerca del 40 % del carbono fijado a través de las raíces. En esta zona, comparten su hábitat con diferentes organismos como bacterias, hongos y arqueas, entre otros (Fu, Zou, Coleman, 2009) (Rodríguez, et al., 2019).

Estos organismos cuentan con la capacidad de metabolizar materia orgánica, poniendo a disposición de las plantas los nutrientes necesarios para su desarrollo y crecimiento (Fu, et al., 2009; Rodríguez, et al., 2019).

- ***Microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGPR)***

Las bacterias tienen un gran potencial como agentes promotores de crecimiento (PGPR), enriqueciendo la respuesta de las plantas a condiciones de estrés ya sea por causas bióticas o abióticas e incrementando características de resistencia a las mismas (Chauhan, Bagyaraj, Selvakumar y Sundaram, 2015; Ramakrishna, et al., 2019; Rodríguez, et al., 2019).

Por otro lado, los hongos son capaces de estimular la síntesis de algunos reguladores de crecimiento vegetal como auxinas, citocinas, giberelinas, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, entre otros (Ferrera y Alarcón, 2007).

Una vez los protozoarios se alimentan de la microbiota, liberan nitrógeno mineral al suelo, que es parcialmente utilizado por las plantas para su crecimiento, potenciando la liberación de carbono en la rizosfera (Kuzyakov y Mason, 2018).

En la Figura 1 se pueden evidenciar las interacciones de la biota presente en el suelo.

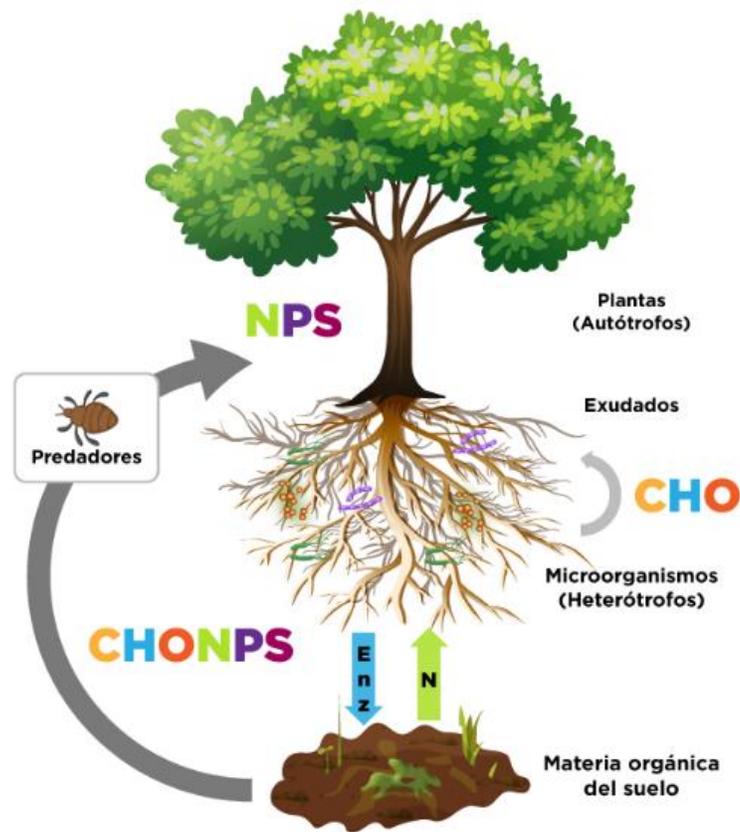


Figura 1. Interacciones de la biota del suelo.

Las raíces de las plantas liberan exudados (DOM) a la rizosfera, estimulando el crecimiento microbiano y la producción de enzimas (Enz), lo que conduce a la

mineralización de Nitrógeno (N) a partir de la materia orgánica del suelo (SOM), y su incorporación a los microorganismos. Por su lado, los animales depredadores se alimentan de los microorganismos liberando el N mineral que es absorbido por las plantas, estimulando su crecimiento y el desarrollo de sus raíces retroalimentando así, la liberación de Carbono (C) orgánico en la rizosfera. Además, los virus infectan y lisan las células microbianas liberando el N de estas a la rizosfera quedando disponible para las plantas retroalimentando la liberación de C en la misma. Por su parte el Fósforo (P) se incorpora al ADN y ARN viral (Kuzyakov y Mason, 2018).

Las rizobacterias y bacterias libres en el suelo pueden tener una actividad promotora de crecimiento vegetal (PGPR), se reconocen por su capacidad de soportar el crecimiento de las plantas, con el fin de mejorar su productividad (Chauhan, et al., 2015).

Las PGPR se pueden establecer de forma extracelular en el rizoplano (e-PGPR), o en los espacios intercelulares de la corteza de la raíz (endófitas: i- PGPR). En estas se incluyen bacterias conocidas comercialmente de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia* (Singh, et al., 2011; Chauhan, et al., 2015; Gopalakrishnan, et al., 2015; Rodríguez, et al., 2019).

La promoción del crecimiento puede darse por la estimulación de la síntesis de sustancias que inducen al crecimiento vegetal como ácido indol acético, citoquinas y giberelinas. A su vez, facilitan la absorción de nutrientes, limitan o impiden el desarrollo de microorganismos fitopatógenos y sintetizan antibióticos y sideróforos (Singh, et al., 2011; Chauhan, et al., 2015; Gopalakrishnan, et al., 2015).

La solubilización y absorción de nutrientes como nitrógeno (N₂), fósforo (P), hierro (Fe⁺), potasio (K⁺), magnesio (Mg⁺²), entre otros, es uno de los mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal y se induce mediante la disminución del pH

con la producción de ácidos orgánicos o la estimulación de la bomba de protones ATPasa (Rodríguez, et al., 2019).

La principal fuente de nitrógeno inorgánico viene dada a partir de la simbiosis entre plantas leguminosas y bacterias del género *Rhizobium*, mediante la formación de nódulos en la raíz en los que se da el proceso de fijación (Chauhan, et al., 2015; Gopalakrishnan, et al., 2015; Rodríguez, et al., 2019).

El fósforo que se torna disponible en el suelo para el consumo de las plantas por la acción de las bacterias solubilizadoras de fósforo, que lo transforman en HPO_4 , mediante acidificación o síntesis de quelantes o de sideróforos (Acevedo, et al., 2014; Chauhan, et al., 2015; Wang, et al., 2015; Rodríguez, et al., 2019).

Algunas bacterias son capaces de producir sideróforos, moléculas de bajo peso molecular solubles en agua, capaces de secuestrar el Fe^{+3} presente en el suelo reduciéndolo a Fe^{+2} en las PGPR, o los sideróforos pueden formar complejos con metales pesados, lo que lleva a reducir el estrés de las plantas frente a los mismos (Gopalakrishnan, et al., 2015).

Algunos especímenes como por ejemplo *Streptomyces* sp., tienen como actividad secundaria el control biológico evitando el desarrollo de enfermedades en plantas (Rodríguez, et al., 2019), mecanismos indirectos de actividad PGPR que pueden consistir en la síntesis en enzimas que actúan sobre la pared celular de hongos o sobre diferentes tejidos celulares de insectos (Chauhan, et al., 2015).

1.2. AGRICULTURA ORGÁNICA

La agricultura orgánica se puede entender como la producción respetuosa del ambiente de un cultivo agrícola sin recurrir a productos químicos de origen

antropogénico (Connor, 2018; Meng, Quiao, Wu, Smith y Scott, 2017), con lo que se pretende mantener la integridad del ecosistema y disminuir el riesgo de afecciones a humanos y animales, utilizando los ciclos ecológicos de la biodiversidad del suelo (Meng, et al., 2017).

Es un conjunto de prácticas en la que se aprovechan los recursos naturales, en su totalidad, para favorecer los procesos productivos agrícolas por medio del uso de fertilizantes orgánicos y permiten la disminución del uso de insumos agropecuarios de origen químico, que conllevan a un impacto negativo en el ambiente (Singh, et al., 2011; Chauhan, et al., 2015).

Entre dichas técnicas se destaca el incremento de la diversidad biológica benéfica del suelo, el estímulo de las interacciones ecológicas de la misma y la reducción el uso de fertilizantes y pesticidas químicos, lo que representa un menor impacto sobre el ambiente (Singh, et al., 2011; de Ponti, et al., 2012). A su vez, la agricultura orgánica mitiga y permite la adaptación al cambio climático generando resistencia de las plantas al estrés dado por la variabilidad climática (Azadi, Schoonbeek, Mahmoudi, Derudder, De Mayer y Wtlox, 2011).

Aunque la utilización de insumos sintéticos con el fin de potenciar los rendimientos de producción agrícola, genera rendimientos considerablemente mayores en comparación con la agricultura orgánica, esta última presenta múltiples ventajas respecto a los procesos ambientales y ecosistémicos, como lo son la reducción de emisiones de NO_2 y NO_3 y mayores rendimientos en épocas de sequía que se comprenden de 7 a 90 % más altos que los de cultivos tradicionales (Azadi, et al., 2011; De Ponti, et al., 2012; Meng, et al., 2017).

De igual forma se reconoce que en los cultivos orgánicos la resistencia a plagas y enfermedades se incrementa. Esto se debe a que se potencia el establecimiento de la microbiota y se incrementa la biodiversidad, estimulando la interacción con

organismos controladores naturales y la generación de resistencia por parte de las plantas (Azadi, et al., 2011; Singh, et al.; 2011).

Procesos como la rotación de cultivos, el uso de enmiendas orgánicas y labores de labranza reducidas, mejoran la estructura del suelo y por ende su fertilidad. Al no utilizar pesticidas, no decrece la macrofauna encargada de la estabilizar los agregados del suelo, y se mantiene una alta carga de materia orgánica. Esto incrementa la capacidad de retención de agua hasta en un 100 %, permitiendo el ahorro de energía en riego (Azadi, et al., 2011; Singh, et al., 2011; Meng, et al., 2017).

En el largo plazo, la agricultura tradicional termina ocasionando menores rendimientos y mayores costos de producción, debido a un incremento de la demanda energética para contrarrestar las alteraciones de las características físicas, químicas y fértiles del suelo (Singh, et al., 2011; Meng, et al., 2017).

1.2.1. Biofertilizantes

El crecimiento y desarrollo de las plantas es el resultado de la generación de compuestos carbonados a partir de la energía solar mediante la fotosíntesis y la asimilación de sustancias como agua y minerales esenciales (nutrientes) que son absorbidos del suelo por las raíces más jóvenes de la planta. Su biodisponibilidad depende de la microbiota presente en la rizosfera (Mohammadi y Sohrabi, 2012).

Los nutrientes pueden clasificarse, de acuerdo con la demanda de cada especie vegetal, en macronutrientes cuando pertenecen a la parte estructural de la biomasa vegetal y su demanda es relativamente alta; y los micronutrientes cuando se requieren en menor cantidad y participan activamente como cofactores del metabolismo vegetal (Restrepo, 2001).

Estos se integran a los sistemas productivos mediante el uso de fertilizantes que pueden ser de origen industrial o de origen orgánico, como residuos de procesos productivos agropecuarios, como los abonos orgánicos fermentados y los biofertilizantes. Los últimos son una alternativa al uso de productos agroquímicos en cultivos productivos (Restrepo, 2001; Tarigo, Repto y Acosta, 2004; Meng, et al., 2017).

- ***Definición y utilidad de los biofertilizantes***

Los biofertilizantes son abonos líquidos (bioles) preparados a base de heces de animales, agua fresca, nutrientes y minerales que sufren un proceso de fermentación anaerobia (Restrepo, 2001; Tarigo, et al., 2004). Favorecen el crecimiento vegetal, ya sea por acción enzimática de microorganismos vivos, o por las interacciones benéficas de los microorganismos benéficos del suelo, como fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo, celulolíticos, u otros (Mohammadi y Sohrabi, 2012).

De acuerdo con la normativa colombiana, los biofertilizantes pueden corresponder a bioabonos o a un inoculante biológico. Entendiéndose el primero como, un producto elaborado a partir de materiales orgánicos compostados, y el segundo como un producto que contiene microorganismos viables, capaces de actuar directa o indirectamente sobre las plantas, elevando su productividad, mediante el aporte de carbono orgánico, fijación de nitrógeno, solubilización de fosforo, absorción de nutrientes, degradación de materia orgánica o promoción de crecimiento vegetal (Resolución No. 068370, 2020).

Los biofertilizantes contienen microorganismos eficientes (benéficos del suelo) que ayudan a activar el equilibrio nutricional de las plantas mediante la captación de nutrientes (Alfa, Adie, Igboro, Oranusi, Dahunsi y Akali, 2014), también activan los

mecanismos de defensa de las plantas, favoreciendo la síntesis de compuestos como ácidos orgánicos, hormonas de crecimiento, sustancias químicas antagónicas, vitaminas, minerales, coenzimas, biomoléculas, entre otros (Singh, et al., 2011; Chamorro, 2015; Chauhan, et al., 2015).

Usualmente consta de residuos orgánicos de la producción agrícola y animal, en minerales biodisponibles para la asimilación por parte de las plantas, mediada por la acción de microorganismos; lo cual conlleva a la nutrición de la planta y a la protección de esta, mediante el aumento de su resistencia (Restrepo, 2007; Mohammadi y Sohrabi, 2012; Wang, et al., 2015).

- ***Preparación de biofertilizantes***

La preparación de biofertilizantes consiste en el aislamiento y selección de los organismos activos, la selección del material portador de los organismos de interés (matriz), la selección del método de propagación del organismo de interés, las pruebas de evaluación de su eficacia y limitaciones en pequeña escala y las pruebas de evaluación a gran escala (Mohammadi y Sohrabi, 2012).

De acuerdo con lo anterior, durante la preparación de biofertilizantes se debe tener en cuenta el perfil de crecimiento microbiano, las condiciones óptimas de crecimiento microbiano, la formulación del inóculo y el método de aplicación y almacenaje (Mohammadi y Sohrabi, 2012).

Su elaboración en campo se realiza en recipientes de plástico oscuro para evitar reacciones que intervengan durante el proceso, y cerrados para evitar la afección del proceso por factores ambientales desfavorables. Estos tanques se ubican en zonas protegidas del sol y la lluvia (bajo techo) (Restrepo, 2001).

Se requiere un inóculo microbiológico que usualmente consiste en heces de animales de producción pecuaria (bovinos, caprinos, aves de corral), las cuales idealmente deben ser frescas y provenir de animales que hayan sido tratados recientemente con antibióticos o antiparasitarios. También se utiliza agua preferiblemente no tratada, que puede ser agua lluvia o de algún afluente natural (Restrepo, 2001; Galindo, Jerónimo, Spaans y Weil, 2007).

Tras una fermentación que puede durar entre 30 y 90 días, los fertilizantes enriquecidos con sales minerales pueden ser aplicados de forma foliar en las horas en que se da la apertura de las estomas de las plantas, de abajo hacia arriba; o directamente en el suelo asegurándose de cubrir la superficie (Chamorro, 2015).

Durante la fermentación se da la estabilización de la materia orgánica, lo que permite mayor disponibilidad de nutrientes, en comparación con residuos no tratados (Alfa, et al., 2014).

- ***Heces de bovinos como inóculo microbiano de biofertilizantes***

Los rumiantes son animales herbívoros en cuyo intestino anterior (el rumen) se digieren y absorben grandes cantidades de material vegetal, convirtiéndolo en productos alimenticios asimilables como ácidos grasos (ácido acético, propiónico y butírico), gases (CO_2 y CH_4) y aminoácidos (a partir de amoníaco o urea) (Montalbetti, 2009; Jami y Mizrahi, 2012).

El rumen es una cámara anaerobia en la que habita una microbiota conformada por bacterias (95 % de la población microbiana), protozoarios (20-40 % de la población microbiana), archaeas y hongos (8 % de la población microbiana), que se encargan de fermentar y degradar el material vegetal (Montalbetti, 2009; Jami y Mizrahi, 2012), de las cuales las bacterias y hongos son liberados en las heces de estos

animales.

Estos organismos interactúan por sintrofia, donde los subproductos y residuos del metabolismo de algunos organismos son el sustrato de otros, para desarrollar sus procesos metabólicos (Montalbetti, 2009).

La microbiota proveniente del rumen tiene una vida media corta, están adaptados a una temperatura de 1 °C más alta que la temperatura corporal del animal (38 °C) y son muy sensibles a cambios abruptos de la misma, además, el pH del rumen oscila entre 5,4 y 7 lo que le permite establecerse en dichos rangos (Czerkawski, 1986; Montalbetti, 2009).

La microbiota del rumen es liberada en las heces, junto con nutrientes disponibles para las plantas, favoreciendo el ciclaje de nutrientes en el suelo, incrementando la retención de humedad y regulando su temperatura (López, 2015).

- ***Heces de gallinas como inóculo microbiano de biofertilizantes***

Dentro de los residuos provenientes de la industria avícola, y puntualmente de gallinas, se encuentra una fracción orgánica (gallinaza) conformada por heces, orina, una porción no digerida de alimentos, microbiota entérica, plumas y huevos rotos (Carhuancho, Ramírez y Guerrero, 2015; López, 2015).

La gallinaza se caracteriza por contener abundantes concentraciones de compuestos nitrogenados y carbonados, siendo una gran fuente de éstos para las plantas. También contiene P y K, nutrientes útiles en los procesos metabólicos de las plantas y que juegan un rol significativo en el balance osmótico de las mismas (López, 2015).

Diversas estrategias son utilizadas para el manejo de estos residuos, entre las que se destaca la incineración, la cual ocasiona la liberación de gases de efecto invernadero con considerable grado de toxicidad como los NO_x y el SO₂ a la atmósfera (Carhuancho, et al, 2015).

También estos residuos pueden ser estabilizados mediante técnicas como el compostaje o la digestión anaeróbica para su uso como biofertilizantes. En el primer caso, no solo se requiere idóneamente de una infraestructura y cuidado periódico, sino que además se libera una gran cantidad de amonio (NH₄) a la atmósfera; mientras que tras la digestión anaerobia se obtiene un fertilizante abundante en compuestos nitrogenados (Carhuancho, et al, 2015).

La gallinaza debe ser estabilizada mediante fermentación, con el fin de reducir su pH, que oscila entre 7 y 9, reducir la carga microbiana y solubilizar algunos de los nutrientes presentes en esta, ya que las gallinas absorben únicamente el 30 % del alimento que se les suministra y aún se debe procesar el 60 % restante (Estrada, 2005; López, 2015).

- ***Supermagro***

Los biofertilizantes orgánicos se consideran enriquecidos al suplementar con minerales como sales, calcio o cenizas, requeridos por las especies vegetales. De esta manera, se superan las carencias nutricionales que se presentan en algunos casos con los biofertilizantes no enriquecidos, asegurando una nutrición vegetal adecuada y balanceada (Restrepo 2001; Restrepo, 2007).

El Supermagro es la formulación de un fertilizante ideado por el técnico agrícola Delvino Magro para la fertilización de un cultivo de manzanas en Rio Grande del Sur en Brasil (Tarigo, et al., 2004). Proviene de una fermentación anaerobia en medio líquido y ha sido utilizado como referencia para su uso en cultivos de tomate y maíz,

realizando algunas modificaciones en los elementos, de acuerdo con los requerimientos nutricionales de cada especie vegetal (Restrepo, 2007; Ferraz, 2010; Tarigo, et al., 2004).

El Supermagro puede ser utilizado en cultivos de ciclo corto como hortalizas, cultivos anuales, cultivos de plantas perennes y follajes, cultivos ornamentales y frutales, así como para la recuperación de plantas a causa de factores climáticos (López, 2015).

Preparación del Supermagro

En la tabla 1 se pueden evidenciar la edición cronológica de los componentes del Supermagro para un tanque de 200 L al cual se le conecta una botella con agua (válvula de gases) a través de una manguera, formulación propuesta por Restrepo en su trabajo de 2007 (Restrepo, 2001; Tarigo, et al. 2004; Restrepo, 2007; Llamas, Espinoza, Flores, J. y Flores, R., 2015). Dicha formulación puede ser modificada para la generación de un nuevo biofertilizante enriquecido (Restrepo, 2007; Ruiz, 2013).

Tabla 1. Fórmula para la preparación del biofertilizante Supermagro.

Día	Ingredientes	Minerales
1	Recipiente plástico 200L. 50 kg de heces de vaca. 70 L de agua limpia. 2 L de leche o suero de leche. 1 L de melaza o 2 L de jugo de caña.	NA
4 y 7	0,2 Kg de roca fosfatada. 0,1 Kg de ceniza. 2 L de leche o suero de leche.	1 Kg Sulfato de Zinc.
10 y 19		1 Kg Cloruro de Calcio.
13, 16 y 22		1 Kg Sulfato de Magnesio.
25		0,05 Kg de Cloruro de Cobalto.

28	1 L de melaza o 2 L de jugo de caña.	0,1 Kg de Molibdato de sodio.
31 y 34		0,75 Kg de Borax.
37		0,3 Kg de Sulfato Ferroso.
40		0,3 Kg de Sulfato de Cobre.
Completar el volumen de 180 L con agua limpia y dejar reposar 10 a 15 días, hasta que dejan de salir gases por la válvula.		
El biofertilizante debe ser añejado, en un periodo de 2 a 3 meses, a una temperatura ambiental de 30 a 38°C		

La determinación organoléptica de la calidad del biofertilizante se basa en un olor agradable de fermentación alcohólica (no a putrefacción), y un color ámbar translúcido con sedimento. En ocasiones, en biofertilizantes que han sufrido una fermentación adecuada, se pueden identificar una nata de color blanco (biofertilizante maduro y listo para su uso), o nata de color verde acompañada de espuma (biofertilizante inmaduro, que requiere más tiempo de reposo, antes de uso) (Restrepo, 2007).

La aplicación del Supermagro se realiza de 3 a 7 L por cada 100 L de agua, en una relación de 3 o 7 % (Restrepo, 2007) y en intervalos entre 3 o 4 días (Restrepo, 2001; Tarigo, et al., 2004).

Composición del sustrato a fermentar para la obtención de Supermagro

Cada uno de los elementos que componen el Supermagro juega un rol en la transformación de la materia orgánica y el ciclaje de nutrientes (Restrepo, 2007). Los componentes del sustrato de dicha formulación se pueden agrupar en tres fuentes: una fuente proteica y energética, una fuente mineral y una fuente de materia orgánica las cuales serán transformadas por microorganismos en un medio líquido (agua) (Ruiz, 2013).

El agua es la matriz en la que ocurren las reacciones bioquímicas y se establece la creciente biomasa (Restrepo, 2007). La fuente proteica y energética proviene de la leche y la melaza, componentes nutritivos fuente tanto de macronutrientes como carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, y micronutrientes como calcio, hierro y manganeso, entre otras, como carbohidratos, proteínas, vitaminas y grasas, y son precursores de otros compuestos orgánicos que se sintetizan durante la fermentación del preparado (Restrepo, 2007; Ruiz, 2013).

Esta fuente se puede enriquecer utilizando otros componentes de origen orgánico como sangre, hígado, restos de pescado, etc., que cumplen la misma función que los anteriores (Ruiz, 2013; Llamas, et al., 2015).

La fuente mineral está constituida por minerales y elementos traza (micronutrientes) que se integran a la fermentación mediante las sales minerales y las cenizas (Restrepo, 2007). La fuente de materia orgánica está compuesta por el inóculo microbiano, el cual ingresa al sistema como heces de vaca, está constituido por bacterias (*Bacillus subtilis*), protozoarios y hongos, de orden anaerobio facultativo y anaerobio estricto (Restrepo, 2007; Ruiz, 2013).

Estos microorganismos se encargan de metabolizar los elementos en el caldo tales como la celulosa presente en los residuos vegetales, las proteínas y las grasas, ya sea en ausencia total o parcial de oxígeno (Restrepo, 2007; Ruiz, 2013).

Fermentación para la obtención de Supermagro

El proceso de transformación de la materia orgánica del preparado Supermagro está mediado por la microbiota presente en la misma, donde las bacterias degradan moléculas complejas en ácidos volátiles y moléculas simples (Czerkawski, 1986; Montalbetti, 2009; Jami y Mizrahi, 2012); mientras que los hongos, actúan sobre

pared celular vegetal mediante una hidrólisis, liberando un complejo celulósico y produciendo ácidos grasos volátiles, gases y pequeñas cantidades de etanol y lactato (Montalbetti, 2009).

La ruta fermentativa que cursa la materia orgánica bajo condiciones de anaerobiosis se conoce como la digestión anaerobia, en la que se distinguen diversas etapas que ocurren en simultáneo dentro del sistema: una hidrólisis, una acidogénesis, una acetogénesis y finalmente una metanogénesis; dando como resultado la transformación de la materia orgánica en compuestos orgánicos volátiles como CO₂, CH₄ y biomasa (Figura 2).

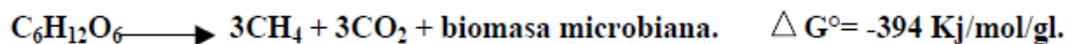


Figura 2. Ecuación de la digestión anaerobia (Tarigo, et al., 2004; Rajendran y Ganti, 2019).

En la primera etapa ocurre una hidrólisis de compuestos orgánicos no disponibles tales como grasas, proteínas y carbohidratos, liberando compuestos orgánicos solubles como ácidos grasos, aminoácidos, azúcares y agua. Está mediada por enzimas extracelulares sintetizadas por los microorganismos aerobios y bacterias anaerobias facultativas como las enterobacterias, entre otras (Czerkawski, 1986; Tarigo, et al., 2004; Ruiz, 2013).

Los lípidos presentes en la materia orgánica contienen ácidos grasos unidos a glicerol (glucolípidos y fosfolípidos) y triglicéridos (Marín, et al, 2010) y pueden ser metabolizados por lipólisis o por biohidrogenación.

La lipólisis ocurre por medio de lipasas, galactolipasas y fosfolipasas de origen bacteriano y protozoario. Éstas, hidrolizan los ácidos grasos esterificados en triglicéridos (liberando ácidos grasos y glicerol), glucolípidos (liberando galactosa) y fosfolípidos (Montalbetti, 2009; Marín, et al, 2010).

Por su parte la biohidrogenación, mediada por bacterias celulolíticas, consiste en la reducción de los enlaces dobles en ácidos grasos insaturados como el ácido linoleico y el ácido linolénico, formando ácido esteárico. (Czerkowski, 1986; Montalbetti, 2009; Marín, et al, 2010). Los compuestos nitrogenados como proteínas y urea son degradados en amoníaco y ácidos grasos (Czerkowski, 1986; Montalbetti, 2009).

Los carbohidratos de la materia orgánica son estructuras compuestas por pentosas, hexosas o azúcares que pueden estar acompañados de ácidos y aminas, dentro de los que se encuentran carbohidratos estructurales como la celulosa y la hemicelulosa, y no estructurales como son azúcares solubles simples, fructosa y almidón (Czerkowski, 1986; Montalbetti, 2009).

Las pectinasas son enzimas que remueven sustancias pépticas presentes en la estructura de la celulosa de la pared celular; mientras que esta última es degradada por microorganismos celulíticos y hemicelulolíticos que a través de las enzimas celulasa y hemicelulasa produciéndose ácido acético y H_2 (Czerkowski, 1986; Sylvia, et al. 1997; Montalbetti, 2009; Vilanova, et al., 2012). Por su lado, dentro de las enzimas que participan en la degradación de azúcares no estructurales como el almidón en ácidos grasos volátiles, se encuentran las amilasas y la enzima amilo 1-6 glucosidasa (Czerkowski, 1986; Montalbetti, 2009).

Las moléculas de glucosa obtenidas en estas fases son degradadas por la glucólisis hasta ser convertida en ácido pirúvico, el cual posteriormente puede producir diversos compuestos, de acuerdo con la vía de degradación: propionato, acetato y dióxido de carbono, o butirato; compuestos que pueden ser utilizados por bacterias metanogénicas para reducir dióxido de carbono en metano (Czerkowski, 1986).

A continuación, ocurre la etapa acidogénica, en la que organismos aerotolerantes como las bacterias lácticas fermentan la glucosa a ácido láctico, y algunos organismos anaerobios estrictos se encargan de la producción de ácidos orgánicos como acético y propiónico y ácido butírico a partir del ácido láctico resultante de la degradación de los lípidos (Campos, et al., 2005; Marín, et al, 2010; Ruiz, 2013), a partir de los productos de la fase anterior.

Dentro de esta fase se destacan organismos de los géneros *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y Enterobacterias (Campos, et al., 2005).

En la etapa de la acetogénesis, la galactosa proveniente de la degradación de los lípidos es fermentada a ácido acético, CO₂ y H⁺ (Marín, et al, 2010), por actividad de organismos anaerobios facultativos y estrictos, donde predominan organismos del género *Clostridium*, *Syntrophobacter wolinii* (descompone el ácido propiónico), *S. wolfei* (descompone el ácido butírico). Algunos de esos organismos, las bacterias homoacetogénicas, pueden producir ácido acético a partir de CO₂ y H⁺, dentro de las que se encuentran *Acetobacterium*, *Clostridium* y *Eubacterium* (Tarigo, et al., 2004; Campos, et al., 2005; Ruiz, 2013).

Finalmente, en la etapa metanogénica las bacterias con el mismo nombre utilizan el ácido acético (bacterias metanogénicas acetoclásticas como *Methanosarcina* y *Methanotherix*), o el Hidrógeno mezclado con CO₂ (bacterias metanogénicas hidrogeniofilas: *Methanobacterium* y *Methanococcus*) para producir gas metano (CH₄) a partir de la reducción del CO₂ (Czerkawski, 1986; Campos, et al., 2005; Ruiz, 2013).

Al tratarse de un proceso de múltiples etapas que ocurren en simultáneo es importante resaltar que dichas etapas se sobrelapan, alterando la composición de metabolitos primarios, secundarios, de la biomasa y de la actividad degradadora de

los microorganismos a lo largo de la fermentación, lo cual se puede ver representado en la Figura 3 (Ruiz, 2013).

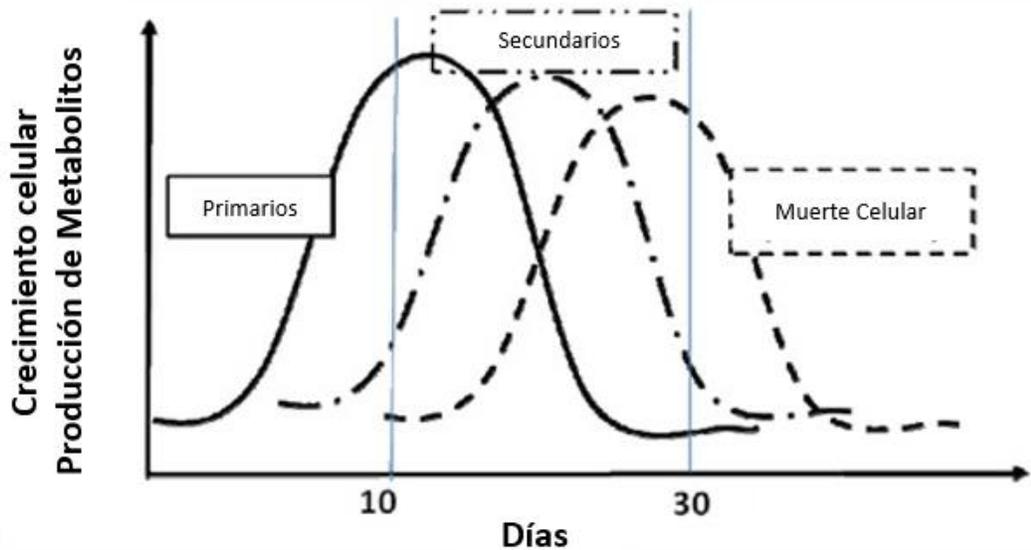


Figura 3. Cinética de crecimiento y generación de metabolitos de la digestión anaerobia (Ruiz, 2013).

A pesar de reconocerse la presencia de la biota benéfica para el suelo y sus ventajas en la fertilización del suelo, aún existe una latente preocupación relacionada con la seguridad del uso de estos fermentados debido a la presencia y, en algunos casos, la alta concentración de microorganismos patógenos como *E. coli* y especies de *Salmonella* y *Shigella*, entre otros, los cuales pueden o no afectarse tras el proceso fermentativo (Alfa, et al., 2014).

Condiciones operacionales de la fermentación para la obtención de Supermagro

Los valores óptimos de pH para que se dé el correcto proceso fermentativo del Supermagro se encuentran entre 6,6 y 7,6, donde valores por debajo del límite inferior de pH indican un proceso de fermentación incompleto y se inhibe la actividad

microbiana, mientras que a valores de pH muy altos los productos de la fermentación se alteran siendo dióxido de azufre (SO₂) e hidrógeno (H⁺) (Czerkowski, 1986; Ruiz, 2013).

Dichos valores óptimos están mediados por la actividad extendida de las enterobacterias presentes en la fase de hidrólisis y que producen ácido butírico: y de las bacterias ácidolácticas de la fase de acetogénica que generan ácido acético, en mucha mayor cantidad que el ácido láctico producto metabólico de las bacterias ácidolácticas de la fase de acidogénica (Ruiz, 2013).

En cuanto a la temperatura el proceso idealmente debe operar entre 30 a 38 °C, siendo este último valor el que emula el ambiente ruminal alcanzando una mayor actividad microbiana (Czerkowski, 1986; Tarigo, et al. 2004; Montalbetti, 2009). Sin embargo, debido a que durante esta fermentación intervienen bacterias mesófilas (4 a 40 °C) y termófilas (35 a 65 °C), el proceso puede suceder a diferentes temperaturas ambientales medias comprendidas entre 18 y 55 °C (Restrepo, 2007; Ruiz, 2013).

Por su lado, el tiempo de retención puede variar de acuerdo con los requerimientos nutricionales de la especie vegetal sobre la que se utilizará el Supermagro, y de acuerdo con la temperatura de operación (temperatura ambiental cercana a 30°C), por lo que se recomiendan períodos medios entre 30 y 45 días. De igual forma, se han reportado periodos de retención de 14 días a una temperatura ambiental de 30°C y 90 días a una temperatura ambiental de 18°C (Restrepo, 2001; Tarigo, et al., 2004; Restrepo, 2007; Ruiz, 2013).

Composición del biofertilizante Supermagro

Las sustancias que se producen tras la fermentación pueden ser fácilmente absorbidas por las hojas y raíces de las plantas limitando el establecimiento de

plagas y el desarrollo de enfermedades (Restrepo, 2001), induciendo la generación de resistencia de las plantas contra plagas y enfermedades e inhibiendo la generación de esporas de organismos patógenos. También puede contener organismos con un comportamiento antagonista hacia agentes causales de enfermedades (Tarigo, et al., 2004; Ferraz, 2010).

A su vez, compuestos como el ácido fólico, provitamina A, vitaminas C y E, α -amilasa, aminoácidos y ácidos orgánicos favorecen la nutrición de las plantas (Restrepo, 2001).

Tras la fermentación el contenido de carbono en la materia orgánica se reduce considerablemente, ya que este es liberado a la atmósfera en forma de dióxido de carbono (CO_2) o metano (CH_4) y facilitando el flujo de esta molécula en el suelo e incrementando el contenido de otros nutrientes como el nitrógeno, potenciando la relación C:N (Ferraz, 2010; Ruiz, 2013).

El complejo de vitamina B sintetizado por los microorganismos del preparado, contiene diversas vitaminas como las vitaminas B1 y B3 que juegan un rol como cofactores en el metabolismo de carbohidratos y en la función respiratoria; las vitaminas B5 y B2 son precursores de la coenzima A y de la coenzima FAD, respectivamente (Restrepo, 2001).

2. METODOLOGÍA

2.1. OBTENCIÓN DEL SUSTRATO

Los sustratos para la elaboración del biofertilizante se obtuvieron de un predio que pertenece a la finca El Rosal, registro ICA 257800153, dedicada a ceba de bovinos y pollos de engorde.

Ubicado en el municipio de Sasaima, ubicado a 80 Km de Bogotá, en el departamento de Cundinamarca, Colombia. Se encuentra a una altura de 1.150 msnm, y cuenta con una temperatura media anual aproximada de 22°C (Alcaldía de Sasaima, 2017).

Los sustratos seleccionados para la investigación fueron heces de bovino, denominada bovinaza y una mezcla de heces de aves de corral (pollos de engorde) y cama compuesta de viruta, denominada gallinaza.

Las heces de bovino se recolectaron con una pala en los corrales destinados a la alimentación controlada y manipulación de los animales; y la gallinaza fue recolectada con una pala de las naves en que habitan los pollos de engorde.

2.2. FERMENTACIÓN PARA OBTENCIÓN DEL BIOFERTILIZANTE ENRIQUECIDO

Se realizó un proceso de fermentación anaerobia para la producción del biofertilizante, empleando diferentes proporciones de los sustratos seleccionados.

2.2.1 Características de los Fermentadores

Las fermentaciones se realizaron en tanques fermentadores que operaron como lote alimentado, por un periodo de 42 días. Los tanques se ubicaron en una zona parcialmente protegida de la lluvia y la luz directa del sol.

Los fermentadores se construyeron basándose en las recomendaciones dictadas en el trabajo de Chamorro (Chamorro, 2015). Estos consistieron en recipientes de plástico negro con una capacidad total de diez Litros (10 L), cuyo volumen efectivo de trabajo (VET) fue de 70%, correspondiendo a un volumen de siete Litros (7 L). La tapa de los recipientes fue sellada con silicona para asegurar la anaerobiosis del sistema.

Para hacer el seguimiento de la emisión de los gases producidos durante la fermentación, los fermentadores se conectaron, por medio de una manguera, a otro recipiente plástico que contenía agua. Allí, el extremo de la manguera está sumergido, lo que asegura el no ingreso de aire al proceso. En la parte inferior frontal del fermentador se adecuó una manguera de salida para la toma de muestras (Figura 4).



Figura 4. Representación gráfica de los fermentadores.

2.2.2 Condiciones Operacionales de las fermentaciones

Las fermentaciones se elaboraron con el fin de evaluar cinco formulaciones diferentes (tabla 2), en las que se varió la concentración de los sustratos seleccionados. Las formulaciones se realizaron por triplicado, evaluándose un total de 15 ensayos.

Tabla 2. Formulaciones de las mezclas de gallinaza-bovinaza en diferentes proporciones.

Formulación	Gallinaza (%)	Bovinaza (%)
F1	0	100
F2	100	0
F3	50	50
F4	30	70
F5	70	30

Inicialmente se diluyeron 1750 g de sustrato en 2800 mL de agua y se añadieron de 40 mL de melaza, 14 mL de leche, 3,5 g de ceniza y 7 g de roca fosfórica. Durante los siguientes 18 días de fermentación, cada tres días se incorporó al sistema una sal mineral específica a una concentración variable (tabla 3), y además se adicionó melaza, leche, ceniza y roca fosfórica en la misma proporción que el día inicial. Siempre, después de la adición de los componentes, cada mezcla se homogenizó manualmente, durante aproximadamente 10 minutos, utilizando un agitador para cada tanque.

Tabla 3. Concentración de las sales minerales que alimentaron el sistema durante la fermentación.

Día	Sal mineral
4	60 g de Sulfato de Zinc
7	40 g de Sulfato de Magnesio
10	16 g de Sulfato de Manganeso
13	20 g de BORAX
16	20 g de BORAX
19	16 de Sulfato Ferroso Completar volumen hasta 7 L con agua

El día 19 de fermentación se completó el volumen hasta alcanzar el VET de 7 L, con agua sin tratar. Lo anterior, de acuerdo con la fórmula de SuperMagro, propuesta por Tarigo y compañía en su trabajo de 2004 (Restrepo, 2001; Tarigo, *et al.* 2004; Restrepo, 2007; Llamas, *et al.*, 2015). Posteriormente el sistema se dejó en reposo durante 23 días más, completando el ciclo fermentativo de 42 días (Chamorro, 2015).

2.2.3 Seguimiento del pH y de la temperatura durante la fermentación

Se realizó la medición de pH y de temperatura durante el proceso de fermentación. Para esto, se tomaron muestras de 5 mL del sobrenadante de cada una de las formulaciones y sus respectivas réplicas. Estas muestras se recolectaron previo a la adición de cada una de las sales minerales al sistema, hasta el día 19 de la fermentación. La última muestra fue tomada el día 42 de la fermentación, a partir de los bioles obtenidos.

La medición del pH se realizó mediante papel indicador universal para pH marca FILTER-LAB®, referencia 911R, cuya lectura se basó en la escala de color indicada

en la etiqueta del papel. Por su lado, la temperatura se midió empleado termómetros de varilla marca BRAND®.

2.2.4 Separación y conservación de los bioles obtenidos

Se realizó la separación de los bioles resultantes del proceso de fermentación, para su caracterización y una posterior evaluación de su efecto en el crecimiento vegetal sobre plantas de pasto *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*.

La separación se realizó mediante una filtración, empleando un colador de tela para separar la fase líquida, el filtrado, de la sólida, el concentrado. A continuación, la fase líquida se almacenó en una botella de plástico y se conservó a 4°C y en ausencia de luz, hasta su posterior uso.

2.3. DETERMINACIÓN DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN LOS BIOLES OBTENIDOS

Se realizó una caracterización microbiológica de los bioles obtenidos tras el proceso de fermentación, para determinar la presencia de microbiota con potencial interés agrícola, y de microorganismos potencialmente patógenos para humanos y animales.

Los análisis microbiológicos se realizaron a partir de muestras que fueron recolectadas de cada una de las fermentaciones evaluadas, el día 1 (muestra 1), el día 19 (muestra 2), y el día 42 (muestra 3) de la fermentación.

2.3.1 Determinación de microorganismos de interés agrícola

Se procedió a la determinación de la presencia de microorganismos solubilizadores de fósforo, bacterias degradadoras de caseína y bacterias hidrolíticas de compuestos carbonados (almidón y celulosa).

Para estas pruebas se realizaron tres diluciones seriadas en base diez (10^{-3}) en agua peptonada estéril al 0,1% (p/v), siguiendo lo reportado por Becerra, *et al.*, 2011 (Becerra, Quintero, Martínez y Matiz; 2011).

Posteriormente, las muestras se sembraron mediante estría, y por triplicado, obteniéndose tres aislamientos por cada tanque (replica) y, por lo tanto, nueve aislamientos por cada formulación. Se realizaron en medios de cultivo selectivos y diferenciales, específicos para cada uno de los grupos microbianos estudiados, lo que permitió evidenciar la síntesis de compuestos hidrolíticos y enzimas catabólicas; y se incubaron a 28 °C por 7 días (Wang, *et al.*, 2015).

- ***Microorganismos solubilizadores de Fósforo***

Se procedió a la determinación de la capacidad de algunas bacterias presentes en los bioles obtenidos de solubilizar el fósforo, disponiéndolo para su absorción por parte de las plantas; siendo esta una característica de interés para la generación del biofertilizante.

Esta evaluación se basó en la determinación de la síntesis de ácidos orgánicos y de enzimas hidrolíticas, empleando los medios de cultivo SMRS1 (con pH ajustado a 7) y Pikovskaya, que se presentan en la Tabla 4 (Rivera-Cruz, Trujillo y Alejo, 2010; Becerra, *et al.*, 2011; Acevedo, *et al.*, 2014; Wang, *et al.*, 2015).

Tabla 4. Composición de los medios de cultivo SMRS1 y Pikovskaya.

SMRS1 (g/L)		Pikovskaya (g/L)	
Sulfato de amonio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	0,5	Sulfato de amonio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	0,5
Cloruro de Potasio (KCl)	0,2	Cloruro de Potasio (KCl)	0,2
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	0,3	Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	0,3
Sulfato de Manganeso (MnSO ₄)	0,00 4	Sulfato de Manganeso (MnSO ₄)	0,00 4
Sulfato de Hierro Heptahidratado (FeSO ₄)	0,00 2	Sulfato de Hierro Heptahidratado (FeSO ₄)	0,00 2
Cloruro de Sodio (NaCl)	0,2	Cloruro de Sodio (NaCl)	0,2
Fosfato Tricálcico (Ca ₃ (PO ₄) ₂)	5	Fosfato Tricálcico (Ca ₃ (PO ₄) ₂)	5
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	10	Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	10
Extracto de levadura:	0,5	Extracto de levadura	0,5
Púrpura de bromocresol	0,1	-	
Agar-agar	15	Agar-agar:	15

Tras la incubación, y siguiendo el método indicado por Rivera Cruz , se procedió a la identificación de halos de solubilización de fósforo en los dos medios de cultivo; y a la identificación de cambio de coloración del medio SMRS1, como lo indica Becerra (Rivera-Cruz, *et al.* en 2010; Becerra, *et al.* en 2011).

- ***Bacterias degradadoras de caseína.***

La degradación de caseína ilustra sobre la presencia de enzimas proteasas de origen microbiano en los bioles obtenidos.

Se determinó empleando agar leche ajustado a 7,2 unidades de pH, como medio de cultivo (Tabla 5). Identificando un halo de hidrólisis >5 mm de diámetro, alrededor de las colonias que crecen en el medio (Correa, 2018 y Ruiz, 2018).

Tabla 5. Composición del agar leche.

Agar leche (g/L)	
Peptona	5
Extracto de levadura	3
Dextrosa	1
Leche descremada en polvo	25
Agar-agar	15

- ***Microorganismos degradadores de almidón.***

La hidrólisis de almidón indica la presencia de microorganismos productores de enzimas amilasa en los bioles obtenidos.

Esta hidrólisis se determinó de acuerdo con lo reportado por Buitrago y colaboradores, utilizando como medio de cultivo agar almidón (tabla 6), el cual consiste en 10 g de almidón por litro a un pH de 7, 2. Luego de la incubación, se reveló la generación de halos de hidrólisis de almidón, añadiendo unas gotas de lugol (yodo) al medio, donde se consideró positiva la degradación en halos de hidrólisis > 5 mm (Buitrago, Sánchez y Guerrero en 2014).

Tabla 6. Composición del medio agar almidón.

Agar almidón (g/L)	
Extracto de carne	3
NaCl	6
Almidón	2
Agar-agar	15

- ***Microorganismos degradadores de celulosa.***

Con el medio Carboximetilcelulosa (CMC) 1% (p/v) a pH 7 (tabla 7) se determinó la actividad celulolítica, así como la capacidad de algunas bacterias de utilizar los subproductos de esta catálisis (Vilanova, *et al.*, 2012).

Se empleó la técnica de determinación de la actividad celulolítica utilizada (presencia de endoglucanasas), reportada por Talia y colaboradores (Talia *et al.*, 2012). Consiste en la adición de una gota de rojo Congo sobre las colonias que crecieron en el medio. A continuación, se incubaron por 15 minutos y posteriormente se les adicionó una gota de NaCl 1M. Finalmente, se procedió a identificar la presencia de un halo de hidrolisis alrededor de las colonias.

Tabla 7. Composición del medio Carboximetilcelulosa 1%.

Carboximetilcelulosa 1% (g/L)	
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	1,67
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	0,87
Cloruro de Sodio (NaCl)	0,05
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ ×7H ₂ O)	0,1
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	0,04
Cloruro de Hierro (FeCl ₂)	0,004
Molibdato de sodio (Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O)	0,005
Biotina	0,01
Ácido nicotico	0,02
Ácido pantoténico	0,01
Cloruro de amonio (NH ₄ Cl):	1
Agar-agar	15

- ***Coliformes totales y fecales***

En los bioles obtenidos, se determinó la presencia de bacterias entéricas potencialmente patógenas de humanos y animales, de acuerdo con las técnicas establecidas por el Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater, 2017.

Para lo anterior se realizaron siembras por estría de las diluciones seriadas, en los medios Eosina y azul de metileno (EMB), y en el medio cromógeno Chromocult. Posteriormente los cultivos se incubaron a 35 °C durante 24 horas.

Luego de la incubación, en agar EMB se procedió a la determinación de la presencia de colonias negro a verde metálico, las cuales se identifican como *Escherichia coli*; colonias grandes y mucoides, las que se identifican presuntivamente como *Klebsiella* sp. o *Enterobacter* sp.; colonias grises claro a color crema o incoloras, las que se identifican presuntivamente como *Salmonella* sp., *Proteus* sp., o *Shigella* sp.; o colonias irregulares e incoloras que se identifican presuntivamente como *Pseudomonas* sp. (BD EMB, 2013).

En el agar Chromocult se determinó la presencia de organismos entéricos, identificándose las coliformes totales como colonias salmón a rojo, y que pueden corresponder a especies como *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., o *Klebsiella* sp. A su vez, se identificaron las coliformes fecales como colonias morado a azul que corresponden a *Escherichia coli*; y por su lado se determinó la presencia de colonias incoloras que corresponden a *Pseudomonas* sp. (Merck, 2014).

2.4. EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA ACCIÓN DE LOS BIOLES OBTENIDOS COMO BIOFERTILIZANTES

Se evaluó el efecto fertilizante de los bioles obtenidos sobre el crecimiento de pasto *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*

2.4.1. Establecimiento de la parcela

La evaluación del efecto fertilizante de los bioles obtenidos se realizó mediante experimentos *in vivo*, utilizando plantas sembradas en bolsas de siembra (o de

vivero) de un tamaño de 15*20cm y ubicadas en una parcela de 2 m de ancho y 3,5 m de largo.

Cada bolsa de siembra contenía 4 Kg de turba estéril marca Pindstrup Plus Orange© como sustrato, y 30 semillas del pasto *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*, previamente escarificadas con ayuda de una lija de agua No. 80.

Las aplicaciones de las soluciones fertilizantes se iniciaron una vez las plantas de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk* germinaron y formaron plántulas, determinado por la aparición de las hojas primarias. Estas se repitieron cada quince días por un periodo de tiempo de 45 días

Para cada bolsa de pasto se aplicaron 100 mL de la solución correspondiente, directamente en el sustrato (drench). Inicialmente la concentración fue de 0,5 mL/L, que se realizó tomando 0,5 mL del biol filtrado y se diluyó en 1000 mL de agua mineral. Una vez se apreció la aparición de las hojas verdaderas, la concentración se incrementó a 0,75mL/L, la cual se logró diluyendo 0,75 mL del biol filtrado en 1000 mL de agua mineral.

2.4.2. Diseño experimental de la evaluación del efecto fertilizante de los bioles

Para la evaluación del efecto fertilizante de los bioles, se realizó un ensayo compuesto por siete tratamientos, cada uno de ellos con cuatro repeticiones, resultando en un total de 28 unidades experimentales.

En los tratamientos se evaluaron los bioles obtenidos en las formulaciones (T1 a T5). Para el control positivo se utilizó un fertilizante orgánico comercial (T6), y como control negativo se adicionó agua sin fertilizante (T7) (tabla 8).

El experimento consistió en un diseño completamente al azar, en el que se contemplaron dos hipótesis estadísticas: la hipótesis nula indica que al menos uno de los tratamientos es diferente, y la hipótesis alterna indica que todos los tratamientos son iguales.

Tabla 8. Esquema de fertilización de las plantas de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*.

Tratamiento	Fertilizante
T1	Biol obtenido de sustrato de bovinaza 100% (F1)
T2	Biol obtenido de sustrato con gallinaza 100% (F2)
T3	Biol obtenido de sustrato Gallinaza-Bovinaza 50/50 (F3)
T4	Biol obtenido de sustrato con Gallinaza-Bovinaza 30/70 (F4)
T5	Biol obtenido de sustrato con Gallinaza-Bovinaza 70/30 (F5)
T6	NPK comercial Tropical CIS-NPK®
T7	agua (sin fertilizante comercial ni biol obtenido)

2.4.3. Evaluación de la acción de los bioles obtenidos sobre el crecimiento de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*

La acción fertilizante de los bioles sobre el desarrollo vegetal de *Brachiaria* sp. se determinó mediante la medición de la longitud del tallo (cm), y el recuento del número de macollas producidas en cinco plantas, escogidas al azar en cada unidad experimental (Chamorro, 2015).

Estas mediciones se realizaron durante un periodo productivo de 45 días, en los cuales se tomaron los datos en tres momentos: día 15, día 30 y día 45 después de la siembra, debido a que en este periodo las plantas se encuentran en la fase de desarrollo vegetativo (De Souza, 1995).

2.4.4. Análisis estadístico de la acción de los bioles obtenidos sobre el crecimiento de plantas de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*

Las pruebas estadísticas se realizaron, empleando el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI Versión 16.1.15 (32-bits).

Los resultados de la longitud del tallo y el número de macollas fueron examinados mediante un análisis de varianza ANOVA. Las comparaciones entre las medias de los tratamientos se realizaron mediante una prueba F de Fisher con un nivel de confianza de 95%.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. FERMENTACIÓN PARA OBTENCIÓN DEL BIOFERTILIZANTE ENRIQUECIDO

En esta investigación se evaluaron diferentes formulaciones en la obtención de un biol con potencial fertilizante, empleando combinaciones de heces avícolas y bovinas, resultantes de la producción agropecuaria.

Es conocido el uso de heces de bovinos en la generación de biofertilizantes enriquecidos de uso agrícola, como el Supermagro (Sangakkara, 2001; Chauhan, et al., 2015; Grover et al., 2015). También se ha evaluado la gallinaza como fuente alternativa de nutrientes para plantas, luego de su estabilización (FAO, 2013; Chan, Santos, García, 2016).

La combinación de diferentes sustratos animales también ha sido evaluada. Fitriyanto y compañía, evaluaron la calidad de un biofertilizante líquido compuesto por heces de cabra y diferentes proporciones de heces de pollo, obteniéndose resultados favorables tras la fermentación aerobia de estas (Fitriyanto, Priyadi, Suranindyah, Yusiati, Erwanto, Kurniawati y Pertiwiningrum, 2016).

Para esta investigación, se combinaron heces de bovino y gallinaza en proporciones de 100-0, 70-30, 50-50, 30-70 y 0-100 %, respectivamente. Las cinco formulaciones se sometieron a un proceso de fermentación anaerobia durante 42 días.

Se realizó el seguimiento a la temperatura y el pH a lo largo de los 42 de la fermentación. Los dos valores se registraron a partir de los bioles obtenidos, antes de la adición de las sales, es decir, cada tres días a partir del día 1. El último valor se tomó el último día de la fermentación, el día 42.

Lo anterior se realizó basándose en la premisa de que el pH es un indicador del seguimiento del proceso fermentativo (Sarma, et al., 2013), ya que, durante la hidrólisis y durante la asimilación de proteínas, se liberan iones hidrógeno y se producen ácidos, que conducen a la reducción de este parámetro (Patiño Torres, et al., 2014).

A la vez, la temperatura influye en la actividad de los microorganismos involucrados en el proceso de fermentación, donde las temperaturas óptimas rondan los 30 °C (Chenbing, Zhang, Han, Shanshan, Liyuan, Guanzhou y Weimin, 2019).

El pH se registró con ayuda de papel tornasol, revelador de pH, y a partir del sobrenadante de cada una de las fermentaciones. Mientras que la temperatura se registró introduciendo el termómetro directamente en la fermentación.

En la Figura 5 se presenta el comportamiento del pH para las cinco formulaciones, durante los 42 días de fermentación.

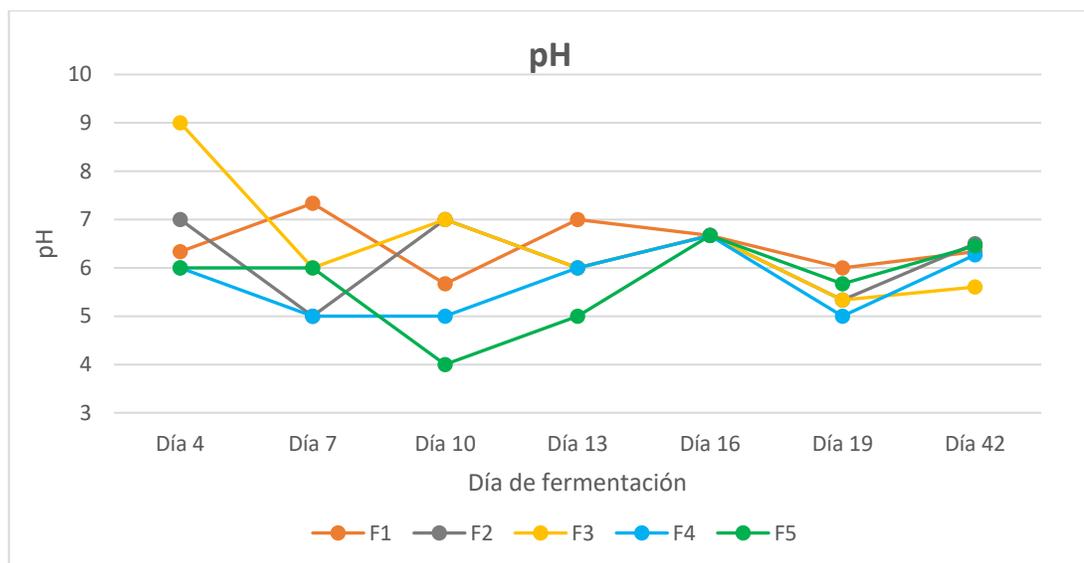


Figura 5. Comportamiento del pH durante el proceso fermentativo, de las formulaciones. F1: 100% bovinaza, F2: 100% gallinaza, F3: 50% gallinaza y 50% bovinaza, F4: 30% gallinaza y 70% bovinaza, y F5: 70% gallinaza y 30% bovinaza.

A lo largo de las fermentaciones, los valores de pH durante el proceso fermentativo oscilaron entre 5 y 7 para todas las formulaciones evaluadas; exceptuando dos valores que alcanzaron unidades de 9 y 4.

Teniendo en cuenta el comportamiento del pH a lo largo del proceso de digestión anaerobia, en términos generales, los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia tienen una actividad óptima a pH entre 6 y 8 unidades (FAO, 2011). Donde en las dos primeras fases, la hidrólisis y la acidogénesis, se generan iones H^+ y ácidos (orgánicos y volátiles), lo que conlleva a la disminución del valor de pH (Carhuancho, et al., 2015; Cavalcante, Coelho, de Luna Souto, Ferreira, Soares de Lima, Raj, da Silva Ferreira y Beckmann, 2019).

A continuación, en la tercera fase, la acetogénesis, se producen acetato, hidrógeno y dióxido de carbono. Finalmente, en la metanogénesis, la cuarta y última etapa de la digestión, se producen metano y dióxido de carbono, lo cual ocurre en valores entre 6,5 y 7,5 (Carhuancho, et al., 2015; Cavalcante, et al., 2019).

De acuerdo con lo anterior, se puede inferir que a lo largo de las fermentaciones ocurrieron procesos de degradación de los sustratos, efectuándose las fases de la digestión anaerobia (Cavalcante, et al., 2019). Lo anterior tiene como consecuencia la síntesis de ácidos orgánicos y ácidos grasos volátiles, mediados por la actividad microbiana, cuando el pH se encontraba entre 5,5 y 6,5. En la síntesis de acetatos y metano al alcanzar pH cercanos a las 7 unidades de pH (González y Longoria, 2005).

De igual forma, es necesario destacar que cuando se presentaron valores de pH por debajo de las 6 unidades, se pudo deber a que el proceso no había logrado la fase metanogénica en ese momento, puesto que esta fase es la etapa limitante del

proceso, debido a la sensibilidad de la microbiota responsable de la misma; y para que se logre, el pH debe encontrarse lo más cercano a la neutralidad (FAO, 2011).

De acuerdo con Sarma y colaboradores, el pH permite realizar el seguimiento de la transformación del sustrato en biomasa y metabolitos, en cultivos tipo lote alimentado, en los que la alimentación no depende de la medición de parámetros directos; como es el caso del presente trabajo (Sarma, et al., 2013).

Lo anterior se debe a que el pH aportó información útil para la alimentación adecuada del sistema, debido a que este tiende a variar a lo largo del proceso fermentativo. Indica el consumo de los componentes del medio al disminuir los valores de pH y continuando con el incremento de este, a causa de la presencia de una fuente de carbono limitante, lo cual genera el requerimiento de una fuente alternativa de dicho elemento cuando este se agota; o debido a la producción de iones amonio, provenientes del catabolismo de las proteínas; o a un aumento de la solubilización de gases como CO₂, debido al aumento en la temperatura (FAO, 2011; Sarma, et al., 2013).

Respecto al seguimiento de la temperatura de las diferentes formulaciones, se observó un incremento en los primeros 7 días, continuando con una disminución hacia el día 13, para luego incrementarse para el 19 de las fermentaciones (Figura 6).

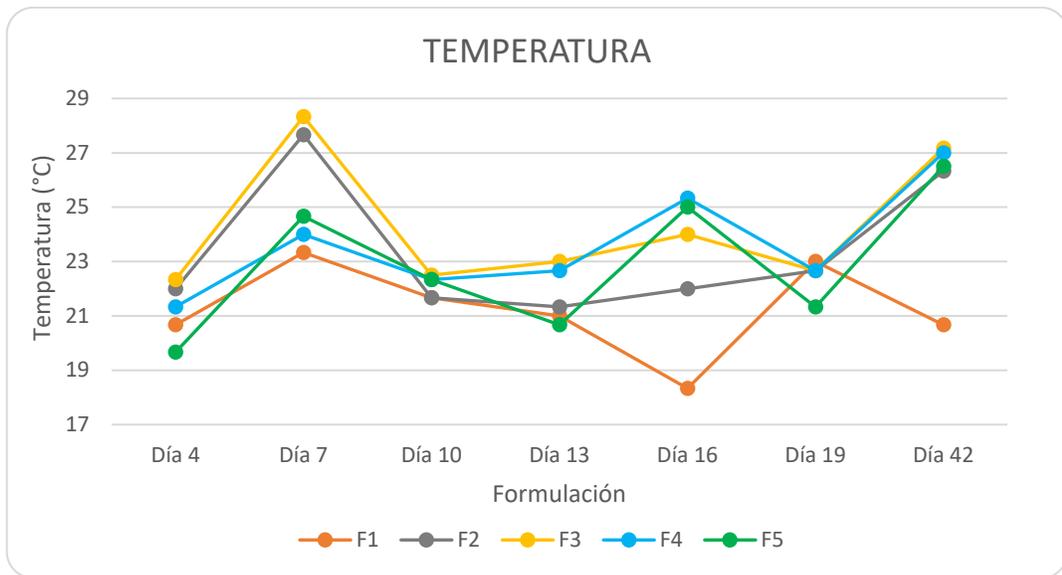


Figura 6. Valores del seguimiento de la temperatura durante las fermentaciones, de las formulaciones: F1: 100% bovinaza, F2: 100% gallinaza, F3: 50% gallinaza y 50% bovinaza, F4: 30% gallinaza y 70% bovinaza, y F5: 70% gallinaza y 30% bovinaza.

Lo anterior se puede deber a que la temperatura dicta la velocidad de crecimiento de los microorganismos involucrados en los procesos fermentativos y, por lo tanto, la velocidad de la digestión mediada por los mismos (FAO, 2011).

Este incremento de la temperatura podría deberse a un incremento en la actividad metabólica de los microorganismos, debido a que aumenta la solubilidad de sales, facilitando su captación por la microbiota, a la vez que se presenta una reducción de la viscosidad del medio, facilitando la captación de nutrientes por parte de las células (FAO, 2011). También se reduce la solubilidad de gases, favoreciendo la liberación de gases que inhiben el crecimiento microbiano, como NH_3 y H_2S (Espinosa, Domaschko, Robles, Durán, Hernández y Bombardiere, 2010).

Olaya y González indican que a lo largo de la digestión anaerobia se presentan diferentes rangos de temperatura, interviniendo en la presencia y actividad microbiana de la digestión, donde se reconocen tres grupos microbianos de acuerdo con la temperatura, los psicrófilos ($<25^\circ\text{C}$), los mesófilos (25 a 45°C) y termófilos

(45 a 65°C) (Olaya y González, 2009). Y, de igual forma Espinoza y colaboradores, afirman que la temperatura ideal para un proceso adecuado de fermentación anaerobia debe encontrarse entre 30 a 35°C para la fase mesofílica, la cual comprende las tres primeras etapas de la digestión anaerobia y parcialmente la cuarta; y entre 45 a 57°C para la fase termófila, la cual corresponde exclusivamente a la metanogénesis (Espinoza, et al., 2010; Cavalcante, et al., 2019).

A pesar de que los valores de temperatura obtenidos a lo largo de las formulaciones son menores a los ideales, reportados por Cavalcante y Espinoza; el comportamiento evidenciado demuestra la actividad metabólica de los microorganismos psicrófilos presentes en estas formulaciones (Espinoza, et al., 2010; FAO, 2011).

Un ejemplo es el mencionado por Chenbing y compañía, quienes indican que a temperaturas entre 5 y 20°C, existe la presencia de genes que intervienen en la desnitrificación, y cuya síntesis se reduce a temperaturas altas, por la falta de compuestos carbonados donadores de electrones, que son consumidos por la gran cantidad de microbiota en el medio (Chenbing, et al., 2019).

Sin embargo, se destaca una diferencia representativa en las temperaturas obtenidas de la formulación 1 compuesta exclusivamente por bovinaza, en los días 16 y 42, correspondientes a 18 y 21°C, respectivamente, al compararlas con las demás formulaciones, en el mismo periodo de tiempo.

Esto se puede deber a que la microbiota propia en el rumen, la cual está involucrada en los procesos de degradación de la materia orgánica, no se haya logrado establecer y por lo tanto su actividad metabólica se haya visto alterada, debido a que esta requiere de una temperatura optima cercana a los 38°C (Czerkawski, 1986).

Lo anterior, se basa en lo reportado por Singh y compañía, quienes afirman la necesidad de asegurar las condiciones óptimas de crecimiento de los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia, entre las que se incluyen la concentración de oxígeno, la humedad, el pH y la temperatura, entre otros (Singh, Pandey y Singh., 2011).

A su vez es importante mencionar, que en el presente trabajo no se presentaron valores de temperatura cercanos o superiores a los 55°C, en las fermentaciones. Esto indica que el proceso no alcanzó la fase termófila y, al compararlo con el comportamiento observado en el pH, donde no evidenciaron valores superiores a las 7 unidades; es probable que la fase metanogénica se haya cumplido parcialmente, ya que a pesar de que la mayoría de microorganismos asociados a esta fase son termófilos, Liu y compañía demuestran la presencia de bacterias metalogénicas a temperatura media (Espinoza, et al., 2010; FAO, 2011; Liu, Klose y Conrad, 2018).

Por otro lado, teniendo en cuenta lo indicado por Ruiz y Rodrigues, y sus respectivos colaboradores, la temperatura ambiental influye en el desarrollo de la fermentación Supermagro (Ruiz, 2013; Rodrigues, Garrido, da Silva, Simões, Silva y Amorim, 2019). Estos autores han reportado que en regiones donde la temperatura es alta, el proceso se completa entre 15 a 30 días, mientras que, en regiones con temperaturas relativamente bajas, la digestión se puede completar en un tiempo de 45 días o más (Rodrigues, et al., 2019).

De acuerdo con lo anterior, y teniendo en cuenta que la temperatura media ambiental durante el periodo en que se realizaron las fermentaciones fue de 24,14°C (IDEAM, 2017) , es probable que el tiempo de retención, periodo de tiempo en que se desarrolló el presente estudio y que correspondió a 42 días, haya sido insuficiente para asegurar el cumplimiento total de todas las fases involucradas en el proceso de digestión anaerobia. Esto coincide con lo reportado Olaya y González,

quienes indican que el tiempo de retención ideal para que la digestión anaerobia se logre bajo condiciones de temperatura psicrófilicas, es superior a 100 días (Olaya y González, 2009).

3.2. DETERMINACIÓN DE LA MICROBIOTA PRESENTE EN LOS BIOLES OBTENIDOS

En esta investigación, se realizó la determinación de la microbiota presente en los bioles obtenidos, en términos de microorganismos de interés agrícola y de aquellos potencialmente patógenos entéricos para humanos y animales.

Los biofertilizantes se caracterizan por contener nutrientes esenciales para las plantas y a su vez cuentan con microorganismos que promueven su crecimiento y aumentan la disposición de los nutrientes en el suelo. La obtención de estos biofertilizantes se basa en la descomposición de la materia orgánica, mediada por la acción de microorganismos, bajo condiciones ideales de temperatura, pH, entre otros (Cavalcante, et al., 2019; Asadu, Ike, Onu, Egbuna, Onoh, Mbah y Eze, 2020).

Por su parte, se ha reportado la presencia de diferentes organismos patógenos de humanos y animales en los biofertilizantes. Algunos de estos organismos pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, dentro de los que se destacan parásitos y parásitos oportunistas como *E. coli*, *Salmonella* y *Enterobacter*, que pueden causar enfermedades gastrointestinales (Alfa, et al., 2014; Blake, 2020).

Para ambos tipos de microorganismos, se realizaron análisis microbiológicos a partir de tres muestras recolectadas de las fermentaciones evaluadas, el día 1, el día 19 y el día 42 de la fermentación. Se realizaron diluciones seriadas en base diez, que posteriormente se sembraron en medios de cultivo selectivos y diferenciales.

3.2.1. Determinación de microorganismos de interés agrícola

La determinación de microorganismos de interés agrícola se realizó mediante la identificación de la actividad de bacterias y hongos solubilizadores de fósforo, bacterias degradadoras de caseína y bacterias hidrolíticas almidón y celulosa. La Tabla 9 presenta la presencia (+) o ausencia (-) de estos microorganismos en las diferentes formulaciones. En términos generales, se determinó la presencia de microorganismos con actividad amilolítica, proteolítica y solubilizadores de fósforo.

Tabla 9. Determinación de microorganismos benéficos del suelo.

Formulación	Solubilizadores de Fósforo - SMRS1	Solubilizadores de Fósforo - Pikovskaya	Degradación de Caseína - Leche	Hidólisis de Almidón - Almidón	Degradación de Celulosa - CMC1
F1	+	+	-	-	-
F2	-	-	-	+	-
F3	-	-	-	-	-
F4	-	-	-	-	-
F5	-	+	-	-	-

Microorganismos solubilizadores de fósforo

Se determinó la presencia de microorganismos solubilizadores de fosforo en los bioles obtenidos, por medio de la identificación de la síntesis de ácidos orgánicos o de presencia de enzimas hidrolíticas, observando un halo de solubilización y cambio de coloración en el medio a amarillo en el medio de cultivo SMRS1, y observando un halo de solubilización de fosforo en el medio Pikovskaya.

En la formulación 1, en el día 19 de la fermentación, se observa un ligero cambio de coloración del medio SMRS1 a amarillo, lo que da indicios de la producción de ácidos orgánicos y/o volátiles (Figura 7A). El crecimiento macroscópico se caracteriza por contar con colonias aterciopeladas, secas, pegadas al medio y con bordes irregulares.

Esto se corrobora con la aparición de un halo de solubilización muy delgado en el medio Pikovskaya en la formulación 1 (Figura 7B), acompañado de colonias blancas secas y de bordes irregulares. En la Figura 7C, se observa el resultado de la coloración Gram, indicando la presencia de una bacteria filamentosa Gram positiva.

Por su lado, en la Figura 7D y 7E se observan los aislamientos de las formulaciones 3, 4, y 5, en medio SMRS1, donde no se observa crecimiento de microorganismos, ni halo de solubilización o cambio de coloración en el medio a amarillo.

Finalmente, en la Figura 7F, se visualizan los aislamientos de las formulaciones 4 y 5, en el medio Pikovskaya, donde se determina el crecimiento de bacterias color crema, opacas y de bordes irregulares, sin embargo, no se identifica un halo de solubilización de fósforo.

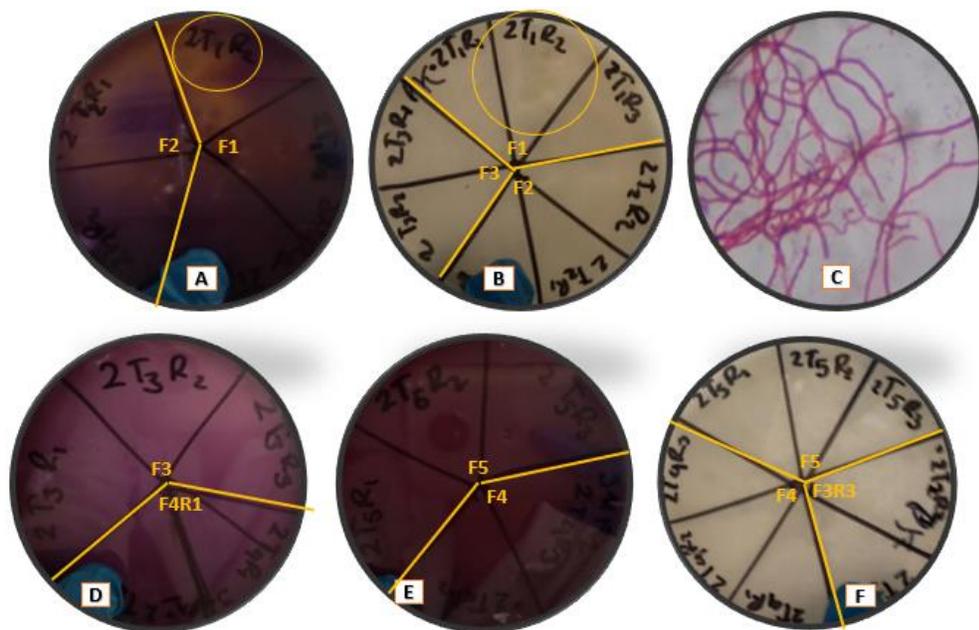


Figura 7. Aislamiento de organismos solubilizadores de fósforo, del día 19. A) F1 y F2: Medio SMRS1. B) F1 y F2: Medio Pikovskaya. C) F1R2: Tinción Gram. D) F3 y F4R1 y F4R2, medio SMRS1. E) F4R3 y F5, medio SMRS1. F) F3, F4 y F5, medio Pikovskaya.

Patiño Torres y colaboradores mencionan asociaciones de las plantas con microorganismos capaces de solubilizar (disponer), mineralizar e inmovilizar los

ortofosfatos presentes en el suelo, lo cual se hace necesario debido a la poca concentración de este elemento en su forma disponible en el suelo, a causa de la precipitación de este por moléculas quelantes como aluminio (Patiño Torres, et al., 2014).

Dentro de estos microorganismos se destacan diversas bacterias como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Klebsiella* y *Agrobacterium*, entre otras. Y hongos, como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium* (Acevedo, et al., 2014).

Sin embargo, Wang y colaboradores reportan en su trabajo que los microorganismos en mención se pueden ver afectados por relativamente altas concentraciones de sal, presente en las heces de bovino compostado, lo cual da paso al establecimiento de actinomicetos y hongos halotolerantes (Wang, et al., 2015).

Lo anterior, podría explicar la presencia de la bacteria filamentosa, asociada al cambio de coloración del medio SMRS1, lo cual se debe a la síntesis de ácidos orgánicos, provenientes de la respiración oxidativa, lo que conlleva a reducir el pH del suelo y favorece la disolución de los minerales fosfóricos; o ya sea porque los componentes aniónicos de los ácidos orgánicos se intercambian por el ortofosfato quelado, liberándolo en la solución del suelo.

También el pH se puede reducir por la liberación de iones hidrógeno durante la asimilación del NH_4^+ , como parte de la degradación de la materia orgánica (Patiño Torres, et al., 2014; Wang, et al, 2015). Esta bacteria filamentosa cuenta con las características morfológicas macro y microscópicas de un Actonimiceto, se caracterizan por presentar una morfología similar a un micelio delgado no septado, suelen ser saprofitos por lo que se encuentran de forma natural en el suelo, y habitan en ambientes mesofílicos creciendo entre 25 y 30°C, correspondiendo a las

características del ejemplar observado en los resultados del presente trabajo (Asadu, et al., 2020).

De acuerdo con lo observado y con Asudu y compañía, los actinomicetos son bacterias que participan en diversos procesos como la mineralización y fijación de nitrógeno, la degradación y descomposición de carbohidratos complejos como la lignina y la celulosa, y la solubilización de fósforo (Asadu, et al., 2020).

La formación de un halo muy pequeño de solubilización en el caso del medio Pikivskaya, se puede deber a que como lo indican Kumar y Rai, el establecimiento de la microbiota se ve fuertemente afectado por diversas variables fisicoquímicas como por ejemplo el clima o la composición del sustrato, cuando esta es introducida al sistema, como fue el caso del presente trabajo (Kumar y Rai, 2020).

Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos y lo asegurado por Asadu y compañía, quienes mencionan que los biofertilizantes son sustancias que contienen nutrientes esenciales para las plantas y microorganismos que promueven el crecimiento de la planta aumentando la disposición de los nutrientes en el suelo. Es posible determinar la presencia y acción de algunos organismos que participan activamente en la descomposición de la materia orgánica (Asadu, et al., 2020).

En las formulaciones 2, 3, 4 y 5, donde no se identificó halo de solubilización y cambio de coloración en el medio en medio SMRS1, ni halo de solubilización de fosforo en medio Pikovkaya, se evidenció el crecimiento de algunos microorganismos en el medio, lo cual se puede deber a que estos organismos son capaces de utilizar los componentes del medio como fuente de nutrientes, pero que no generan ácidos o enzimas involucradas en la solubilización de fósforo (Mandigan, Martinko, Bender, Buckey y Stahl, 2015).

La presencia de microorganismos solubilizadores de fósforo sugiere que, en el biol obtenido de la formulación 1 se encuentran los elementos necesarios para

solubilizar este elemento en el suelo que se fertilizará con dicha formulación; disponiéndolo para la absorción y nutrición de las plantas.

Por su lado, en los días 1 y 42, no se evidenció crecimiento de microorganismos presuntamente solubilizadores de fósforo.

Microorganismos degradadores de caseína

Se determinó la presencia de microorganismos proteolíticos, empleando agar leche, determinando la presencia de un halo de hidrólisis alrededor de las colonias formadas, que tuviesen un diámetro > 5 mm (Correa, 2018 y Ruiz, 2018).

No se evidenció la presencia un halo de hidrólisis alrededor de las colonias obtenidas, demostrando la ausencia de microorganismos con actividad proteolítica. En la Figura 8, se observa el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos, como colonias con bordes definidos de color blanco y tamaño pequeño, colonias de color crema y con bordes en forma de roseta de tamaño grande Figura 8A y 8B. También se identifica la presencia de un hongo filamentoso algodonoso, de coloración blanca (Figura 8C y 8D).

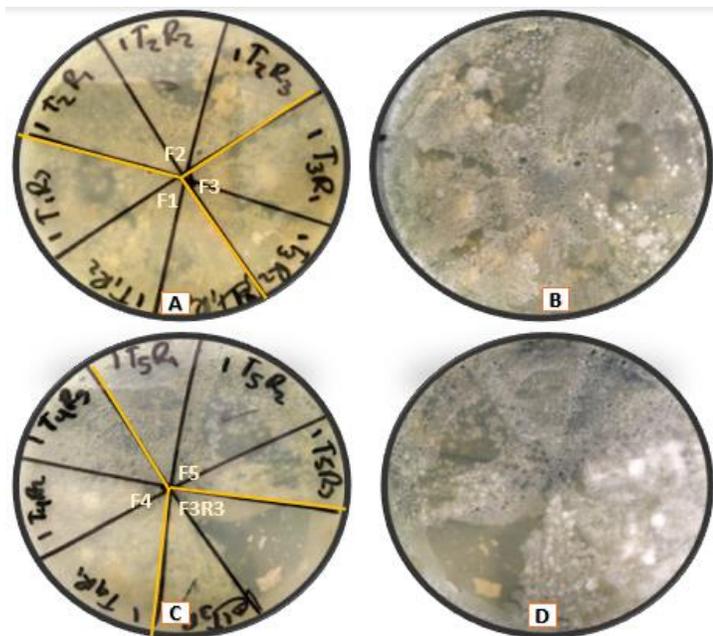


Figura 8. Aislamiento de microorganismos en agar leche. A) F1, F2, F3: Revés. B) F1, F2, F3: Envés. C) F3, F4 y F5: Revés. D) F3, F4 y F5: Envés.

Sin embargo, ninguno de los aislamientos indica contar con una actividad proteolítica, demostrando que estos organismos son capaces de utilizar los componentes del medio, como los son el extracto de levadura, la peptona o la dextrosa, como fuente de nutrientes (Mandigan, Martinko, Bender, Buckey y Stahl, 2015).

La degradación de caseína ilustra sobre la presencia de enzimas proteasas de origen microbiano en los bioles obtenidos. Sin embargo, en el presente trabajo, no se evidencia la presencia de estas enzimas (Ruiz, 2018).

Microorganismos amilolíticos

Se determinó la presencia de bacterias amilolíticas, mediante la técnica de revelación con Lugol, añadiendo una gota de este reactivo sobre las colonias

obtenidas a partir de los bioles producto de las fermentaciones, con el fin de revelar en halo de hidrólisis. En la Figura 9, se evidencian los aislamientos obtenidos del día 1, en el medio de cultivo agar almidón, tras su respectiva revelación con Lugol.

En la Figura 9A y 9B, se observa el envés y el revés de los aislamientos obtenidos, de las formulaciones 1, 2 y 3. En esta se puede evidenciar la presencia de diferentes microorganismos, entre los que predominan bacterias color crema y de bordes irregulares. A su vez, se determina la formación de un halo de hidrólisis de almidón, alrededor de unas colonias de bacterias pequeñas blancuecinas, demostrando la presencia de bacterias amilolíticas. Por su lado, en la Figura 9C se contempla el resultado de la tinción Gram, en la que se identifica la presencia bacilos tanto Gram positivos como de bacilos Gram negativos.

Finalmente, en la Figura 9D y 9E, se observa el envés y el revés de los aislamientos obtenidos, de las fermentaciones 3, 4 y 5, donde no se evidencia la presencia de microorganismos amilolíticos, pero si se destaca la presencia de un hongo filamentoso blanco, y colonias medianas color crema.

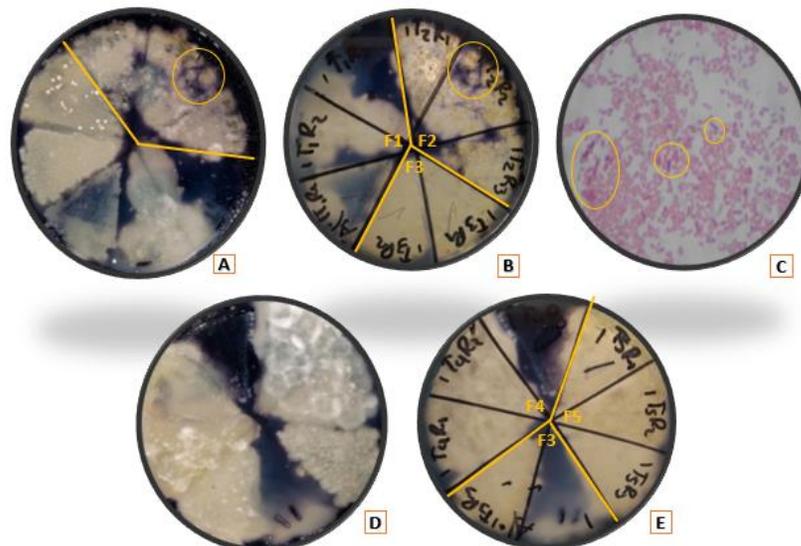


Figura 9. Aislamientos día 1. A) F1, F2 y F3: envés. B) F1, F2 y F3: revés. F2: Halo de hidrólisis de almidón alrededor de las colonias. C) F2: Tinción Gram. D) F4 y F5: envés. E) F4 y F5: revés.

La hidrólisis del almidón que se evidencia en F2, en el día 1, indica que en esta formulación hubo presencia de microorganismos que sintetizan y utilizan las enzimas α y β amilasa, y/o la enzima amiloglucosidasas (Buitrago, et al., 2014; Bahatt, Prajapati, Patel y Trivedi, 2020; Gaenssle, van der Maarel, Jurak, 2020), con el fin de degradar la molécula de almidón, la cual está formada por cadenas lineales con ramificaciones conformadas por moléculas de glucosa unidas por los enlaces α -1,4 y α -1,6 entre sí (Gaenssle, et al., 2020).

En los resultados se observa la presencia de bacilos Gram positivos (de color violeta) que podrían corresponder a *Bacillus* o *Lactobacillus* (Tejera-Hernández, Rojas-Badía y Heydrich-Pérez, 2011). También se observan bacilos Gram negativos (de color rosado) los cuales podrían corresponder a especímenes de *Pseudomonas* (Pratap, et al. 2016).

De acuerdo con lo anterior, Buitrago y compañía aseguran que estos microorganismos pueden corresponder a bacterias de géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*., además de algunos actinomicetos (Buitrago, et al., 2014). Lo que se corrobora con Bahatt y sus compañeros, quienes aseguran que *Bacillus lichenformis*, *Bacillus staerothermophilus* y *Bacillus amyloliquefaciens*, son cepas utilizadas para la producción de amilasas industrialmente (Bhatt, et al., 2020).

Por su lado, Xu y colaboradores, reportan la actividad amilolítica de diferentes especies de *Lactobacillus*, bacterias lácticas que son capaces de degradar el almidón además de fermentar moléculas de glucosa transformándolas en ácido láctico (Xu, Zhou, Tang, Li, Chen, Zhang, Zhang, 2020).

En las otras formulaciones, diferentes a F2 el mismo día, no se identificó el crecimiento de microorganismos con actividad amilolítica, a pesar de que, sí se evidencia el crecimiento de algunos microorganismos en el medio. Lo cual se puede deber a que estos organismos son capaces de utilizar los componentes del medio,

como los son el extracto de carne y el cloruro de sodio, como fuente de nutrientes (Mandigan, Martinko, Bender, Buckey y Stahl, 2015).

La presencia de bacterias amilolíticas en el biol obtenido de la formulación 2, sugiere que en este fertilizante se encuentran organismos capaces de hidrolizar y por lo tanto de degradar la molécula de almidón, liberando polímeros cortos, dímeros y monómeros de azúcares, dejándolos disponibles para el consumo y establecimiento de la microbiota que habita en la rizosfera, así como para la absorción y nutrición por parte de las plantas.

Microorganismos celulolíticos

Se determinó la presencia de microorganismos degradadores de celulosa, empleando la técnica de detección de enzimas endoglucanasas (Talia *et al.*, 2012), añadiendo una gota de rojo Congo sobre las colonias que crecieron en el medio, y posteriormente, incubando las cajas nuevamente por 15 minutos. Finalmente, se añadió una gota de NaCl 1M. En la Figura 10, se observan los crecimientos de los aislamientos en agar CMC.

Tras la incubación, se observó crecimiento de los aislamientos de las formulaciones 1, 2 y 3, en el día 1 de la fermentación; donde se identificaron colonias bacterianas de diferente tipo, unas de color crema pequeñas y de bordes definidos, otras de color crema y medianas; y otras de color blanco con una apariencia seca y pegadas al medio. En las Figuras 10A y 10B se observan las colonias luego de la revelación con rojo Congo, demostrando que no se identifica la presencia de halos de hidrólisis de celulosa.

Por su parte, el día 19 de la fermentación (día dos de muestreo), se identificó el crecimiento de los aislamientos de las formulaciones 1, 2 y 3; predominando la

presencia de colonias grandes, blancas y de bordes irregulares, así como la de colonias blancas, grandes y de apariencia seca y filamentosa. En la Figura 10C y 10D, se observan las colonias luego de la revelación con rojo Congo, demostrando que no se identifica la presencia de halos de hidrólisis de celulosa.

Finalmente, en el día 42 de la fermentación, se identificó el crecimiento de un hongo filamentoso de coloración verde oliva con borde blanco, y una colonia blanca y seca de borde irregular y gran tamaño, aparentemente se trata de microorganismos contaminantes. En la Figura 10E y 10F, se observan los crecimientos de los aislamientos en agar CMC, correspondientes al día 42 de la fermentación (día tres de muestreo), luego de la revelación con rojo Congo, demostrando que no se identifica la presencia de halos de hidrólisis de celulosa.

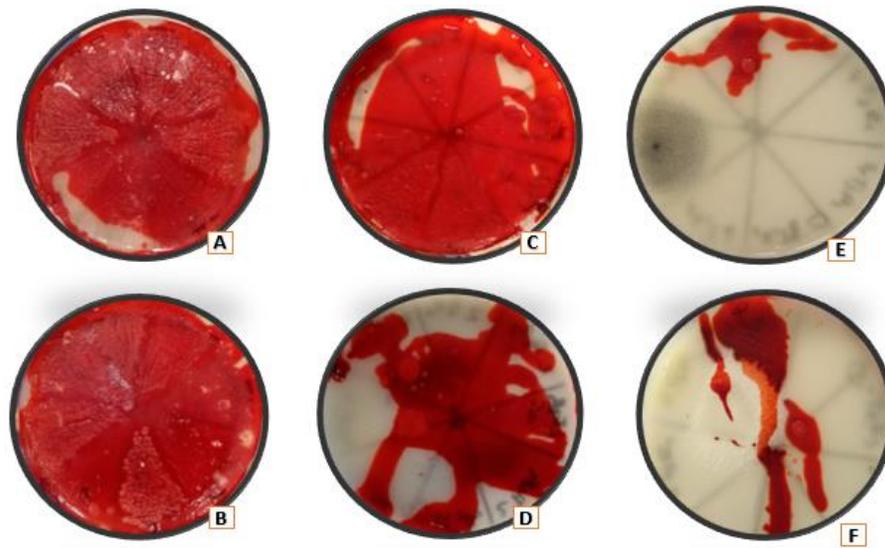


Figura 10. Aislamientos en agar CMC, revelados con rojo Congo. A) Día 1 de F1, F2 y F3. B) Día 1 de F3, F4 y F5: C) Día 19 de F1, F2 y F3. D) Día 19 de F3, F4 y F5. E) Día 42 en agar CMC de F1, F2 y F3. F) Día 42 en agar CMC de F3, F4 y F5.

No se evidenció la presencia de microorganismos con actividad celulolítica, a pesar de que se encontraron otros microorganismos en el medio, indicando que estos

pueden utilizar cualquiera de los componentes del medio como fuente de nutrientes (Mandigan, Martinko, Bender, Buckey y Stahl, 2015).

La degradación de celulosa demuestra la presencia de enzimas glucanasa y otras enzimas oxidasas, que permiten hidrolizar la compleja molécula de celulosa, liberando polímeros cortos, dímeros y monómeros de azúcares, disponiéndolos en el suelo. Sin embargo, en el presente trabajo no se evidencia la presencia de estas enzimas en los bioles obtenidos.

3.2.2. Determinación de Coliformes totales y fecales

Se determinó la presencia de bacterias patógenas entéricas de humanos y animales. Consistió en la determinación de la presencia de coliformes, sembrando las muestras obtenidas de los bioles en medios de cultivo selectivos y diferenciales.

En la tabla 10, se visualiza la presencia de coliformes totales y fecales, presuntivos patógenos entéricos de humanos y animales. Demostrando la presencia de diferentes especies de enterobacterias en las formulaciones. A partir de la muestra del día 1 y en el medio EMB, se identifica el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos.

Tabla 10. Determinación de patógenos humanos y animales.

Formulación	<i>E. coli</i>	<i>Citrobacter, Enterobacter o Klebsiella.</i>	<i>Salmonella</i>
F1	-	+	-
F2	-	+	-
F3	-	-	-
F4	-	-	+

F5	-	-	-
----	---	---	---

En la formulación 1 se determinó la presencia de colonias rosadas y mucosas (Figura 11A), las cuales, al realizarse la tinción Gram, demuestra la morfología de bacilos Gram negativos (Figura 11B). También se identifica el crecimiento de organismos contaminantes, un hongo algodonoso de coloración blanca y unas colonias grandes, secas y con bordes puntiagudos (Figura 11C).

Por su lado, en la formulación 2 se identifica el crecimiento de colonias rosado fuerte y mucosas en medio EMB (Figura 11D). Mientras que en la formulación 3 se observa la ausencia de crecimiento microbiano (Figura 11E). En la formulación 4, se identificó el crecimiento de colonias grises medianas en el mismo medio de cultivo (Figura 11F). A las que se les realizó su coloración de Gram, identificando la presencia de bacilos Gram negativos (Figura 11G). Finalmente, en la formulación 5, al igual que en la 3, se observa la ausencia de crecimiento microbiano (Figura 11H).

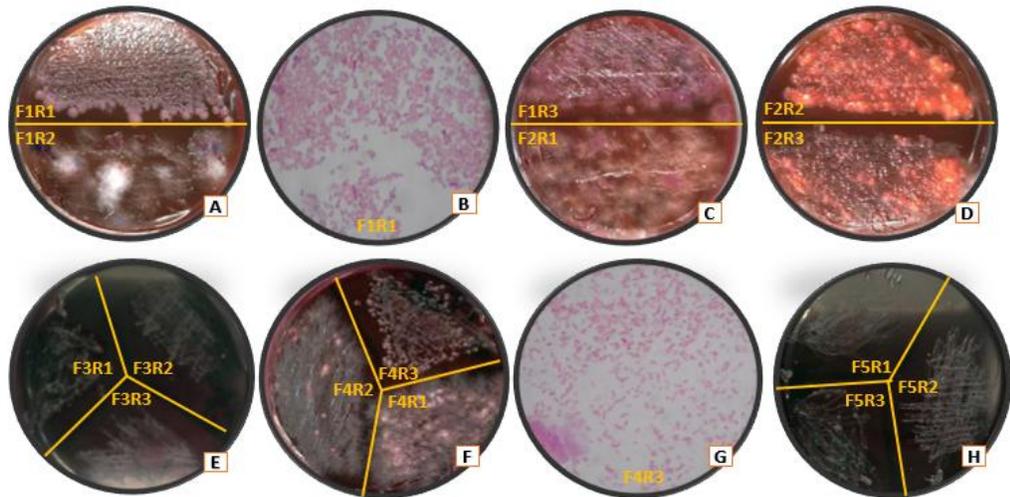


Figura 11. Aislamientos del día 1 en agar EMB. A) F1R1. B) F1R1: Tinción Gram. C) F1R3 y F2R1. D) F2R2 y F2R3. E) F3. F) F4R1 y FR2. F4R3. G) F4R3: Tinción Gram. H) F5.

Según el inserto del medio EMB de BD™. La morfología de las colonias descritas en las formulaciones 1 y 2, podría corresponder organismos patógenos entéricos de humanos y animales, de tipo coliformes o no coliformes, tales como *Citrobacter*, *Enterobacter*. y *Klebsiella*. Mientras que, la morfología de las colonias descritas en la formulación 4, indica el crecimiento presuntivo de *Salmonella* (BD™, 2013).

Lo anterior se debe a que las bacterias presentes en el medio EMB tienen la capacidad de fermentar lactosa o sacarosa, los azúcares fermentables que componen el medio.

Las bacterias que pertenecen al grupo de los coliformes (fermentadores de lactosa) producen colonias de color negro azulado y *E. coli* presenta una coloración verde metálico. Por su lado, *Salmonella* y *Shigella* (fermentadoras de sacarosa) presentan colonias incoloras (BD™, 2013).

La ausencia de crecimiento en las formulaciones 3 y 5, se puede deber a que la microbiota presente en las muestras no tiene la capacidad de crecer en el medio de cultivo EMB. Debido a que el medio el medio cuenta con los colorantes azul de metileno y eosina, los cuales inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas, es probable que en las formulaciones primara la presencia de organismos Gram positivos (BD™, 2013).

Por otro lado, en la muestra en medio Chromocult correspondiente al día 19 se encontró que las formulaciones 1 y 2 presentaron crecimiento de colonias rosado asalmonado, de tamaño grande y secas (Figura 12A). Al observarlas al microscopio, se evidencia la presencia de bacilos Gran negativos (Figura 12B), mientras que en las formulaciones 3, 4 y 5, es clara la ausencia de crecimiento bacteriano, y se identifica el crecimiento contaminante de un hongo algodonoso de coloración blanca (Figura 12C).

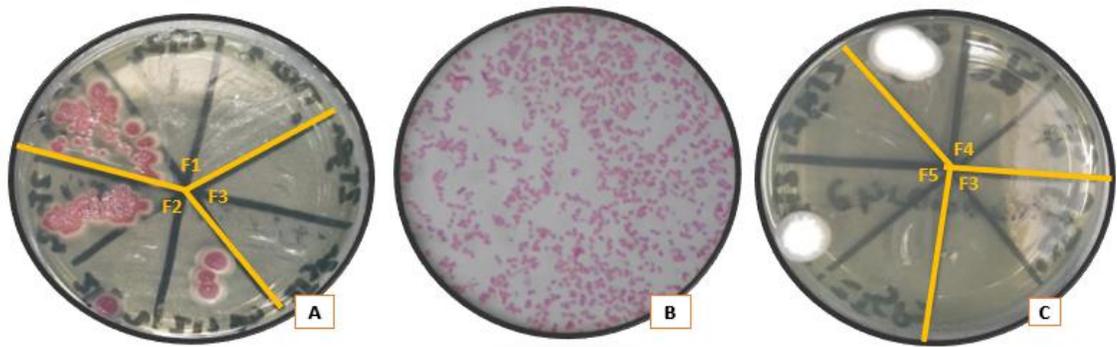
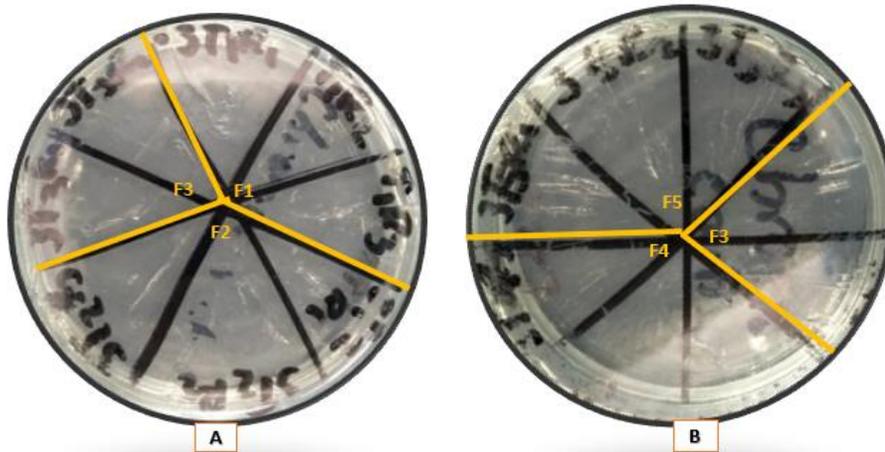


Figura 12. Aislamientos del día 19 en agar Chromocult. A) F1 y F2. F3. B) F1 y F2: Tinción Gram. C) F4 y F5.

En este medio las bacterias entéricas de tipo coliforme, es decir que son capaces de fermentar la lactosa entre 35 y 48°C, se observan como colonias de color rojo a salmón, debido a la actividad de la enzima β -D-galactosidasa, la que actúa sobre el sustrato Salmon-GAL del medio y el IPTG, resultando en colonias con coloración rosada a rojo (Lange, Strathmann y Oßmer, 2013; Merck, 2014). Estas bacterias, pueden corresponder a cepas de *Citrobacter* o *Enterobacter*, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el medio EMB (Merck, 2014).

La ausencia de crecimiento en las formulaciones 3, 4 y 5, se debe a las características propias del medio, al tratarse de un medio de cultivo cromógeno. De acuerdo con Lange y colaboradores, la presencia de Tergitol®7 en el medio, inhibe el crecimiento de la microbiota Gram positiva y parte de la Gram negativa que no es de interés. Indicando que la microbiota presente en las formulaciones puede tratarse de organismos inhibidos por el antibiótico en mención. A su vez, es probable que estos organismos, sean incapaces de utilizar los sustratos Salmon-GAL (6-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosido), IPTG (isopropil-bD-tiog-alactopiranosido), o X-glucuronida, por la ausencia de la enzima D-galactosidasa (Lange, et al., 2013; Merck, 2014).

Finalmente en la muestra del día 42 (Figura 13 A y 13B), no se identificaron organismos potencialmente patógenos entéricos de humanos y animales, indicando que durante el proceso la microbiota indeseable se reduce o elimina en su totalidad,



corroborando lo

indica López, quien afirma la necesidad de estabilizar las heces de animales previo a su utilización como fertilizantes, lo que se puede lograr mediante una fermentación, debido a la presencia de microorganismos perjudiciales para la salud de humanos y animales (López, 2015).

Figura 13. Ausencia de crecimiento tras los aislamientos de los bioles del día 42 en agar Chromocult. A) F1 y F2. F3. B) F4 y F5.

En general, el comportamiento de los aislamientos obtenidos, indica que a lo largo de la fermentación se encuentran colonias de microorganismos que pueden ser patógenos entéricos para humanos y animales, las cuales posiblemente correspondan a especies de los géneros *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, o *Klebsiella*. Estas especies pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, las cuales son bacterias Gram negativas y de morfología bacilar (Blake, 2020).

La presencia de *Salmonella* sp. se ha reportado anteriormente en las heces de gallinas por Soria y compañía, reportándose en mayor medida las especies *Sechwarzengrund* y *Enteritidis*. Lo cual soporta la presunción de presencia de esta

bacteria en las heces de gallina (Soria, Soria, Bueno, Godano, Gómez, ViaButron, Padin y Rogé, 2017).

Salmonella entérica tiene múltiples serovares, siendo *typhimurium* uno de los más representativos, por ser el responsable de enfermedades gastrointestinales en animales endotermos y se caracteriza por presentar una sintomatología que incluye fiebre, diarrea, dolor abdominal, y en ocasiones puede ocasionar vómito (Payen, de la Gándara, Cointe, Massiot, Bidet, Weill, Bonacorsi, 2020).

De acuerdo con Lien y colaboradores, *Citrobacter* sp. es un grupo de bacterias que habitan en el tracto gastrointestinal de animales endotermos, por lo que se consideran patógenos oportunistas de personas inmunocomprometidas y neonatos (Lien, Lee, Chien, Huang, Lu, Chang, 2018).

Al igual que *Citrobacter* y *Klebsiella*; *Enterobacter* habita en el ambiente (suelo y agua), y el tracto intestinal de endotermos, y puede presentar un comportamiento como patógeno oportunista como patógeno hospitalario, causando infecciones urinarias o respiratorias en personas inmunocomprometidas (Blake, 2020). Se caracterizan por ser bacterias aerobias y móviles, que crecen como colonias grandes y mucosas, como es el caso de *Klebsiella* (Blake, 2020).

Finalmente, *Klebsiella* sp. se diferencia de las anteriores por la presencia de una cápsula compuesta por polisacáridos, que protegen las células de las condiciones ambientales (Ungyarsky, 2017). De acuerdo con Ungyarsky, *Klebsiella* se asocia a infecciones hospitalarias, al igual que *Enterobacter*, ocasionando afecciones como neumonía, infecciones urinarias e infecciones quirúrgicas, sin embargo, habita comúnmente en el intestino de endotermos, sin representar ningún peligro para salud y suelen ser liberadas en las heces (Ungyarsky, 2017).

La presencia y liberación de estos organismos en las heces de los animales, podría explicar la presencia de estos en las fermentaciones, durante este proceso. Por su lado, la ausencia de estos organismos al finalizar la fermentación puede estar relacionada con los cambios ocurridos a lo largo de esta, tales como la síntesis de ácidos orgánicos, producto de la degradación de la materia orgánica o la reducción de oxígeno disponible en el medio como producto de la digestión anaerobia (Cavalcante, 2019).

3.3. EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA ACCIÓN DE LOS BIOLES OBTENIDOS COMO BIOFERTILIZANTES

Se evaluó el efecto fertilizante de los bioles obtenidos, sobre el crecimiento de pasto *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk.

Los biofertilizantes enriquecidos con sales minerales contienen mayor concentración de algunos minerales en comparación con los residuos utilizados como materia seca. Se ha demostrado que estos se utilizan, entre otras actividades, como sustancias nutritivas para las plantas, consistiendo en un material soluble disuelto (heces reducidas hasta un 6,5%) en 89,4% de agua. Cuentan con un gran potencial para suplir la nutrición realizada con fertilizantes de síntesis (Cavalcante, 2019).

La evaluación de la acción fertilizante de los bioles obtenidos tras las fermentaciones, se realizó sobre plantas del pasto *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*. Se emplearon dos controles que consistieron en el uso de fertilizante sintético (NPK) y uso de agua. Se determinó la altura del tallo y el número de macollas, como variables respuesta del crecimiento y desarrollo de las plantas.

3.3.1. Evaluación de la acción de los bioles obtenidos sobre el crecimiento de plantas de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*

El crecimiento de las plantas de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk* inoculadas con los bioles obtenidos a partir de las diferentes formulaciones de biofertilizantes. Se realizó utilizando un diseño de bloques al azar, en el que se midió el crecimiento de las plantas de *Brachiaria decumbens* en términos de tamaño del tallo y número de macollas, cada quince días por un periodo de 45 días después de la siembra de las semillas (Figura 14).



Figura 14. Seguimiento del crecimiento de las plantas. A) Tamaño del tallo. B) Plantas de pasto. C) No. de macollas.

Según De Souza, y de acuerdo con el desarrollo del meristema apical de *Brachiaria decumbens* c.v. *Basilisk*, se pueden definir seis fases de desarrollo: la primera es la fase vegetativa, en la que se evidencia un gran crecimiento de los tejidos, una alta tasa de respiración celular, y la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos. La segunda, es la fase de transición entre el desarrollo vegetativo y reproductivo, donde inicia la maduración de los tejidos, por lo que los procesos metabólicos ocurren considerablemente más lento y son más uniformes. Esta fase se denomina de iniciación del racimo y ocurre 10 a 15 días después de la emergencia del tallo. Posteriormente, ocurren las fases de iniciación de la espiga (día 21 después de la emergencia del tallo), fase de diferenciación de la espiga (día 26 después de la

emergencia del tallo), fase de inflorescencia (día 59 después de la emergencia del tallo), y fase de maduración de la semilla (De Souza, 1995).

Por lo anterior, el periodo de tiempo de crecimiento evaluado corresponde al desarrollo vegetativo de las plantas del pasto *Brachiaria decumbens* c.v. *Brasilisk*,

Efecto de los bioles sobre la altura del tallo

Se evaluó el efecto fertilizante de los bioles obtenidos tras las fermentaciones, sobre el crecimiento de pasto *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*.

El tallo y la hoja de pastos de forraje, como es el caso de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*, se evalúan en la ganadería en una relación hoja:tallo, para determinar la acumulación de la materia seca en las hojas, haciendo posible determinar la proporción de compuestos asimilados y destinados a las hojas, demostrando ser un indicio indirecto del tamaño de estas (Atencio, Tapia, Mejía y Cadena, 2014).

Por su lado, las macollas son un indicio del desarrollo de la planta, puesto que corresponden a un conjunto de tallos unidos por la base, y se considera material vegetativo de los pastos debido a que la generación de hojas induce a la generación de raíces independientes. Estas aparecen cuando las plantas presentan entre dos y tres hojas, a partir de las yemas secundarias de la planta (INATEC, s.f.).

El efecto fertilizante de los bioles obtenidos, se evaluó mediante su aplicación de plantas sembradas en bolsas, utilizando los bioles obtenidos a una concentración de 0,75mL/L, durante un periodo de 45días.

En la Figura 15 se presenta el comportamiento de la altura del tallo de las plantas de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*, fertilizadas con los bioles obtenidos y sus respectivos controles, que se realizó durante 45 días desde el momento de siembra.

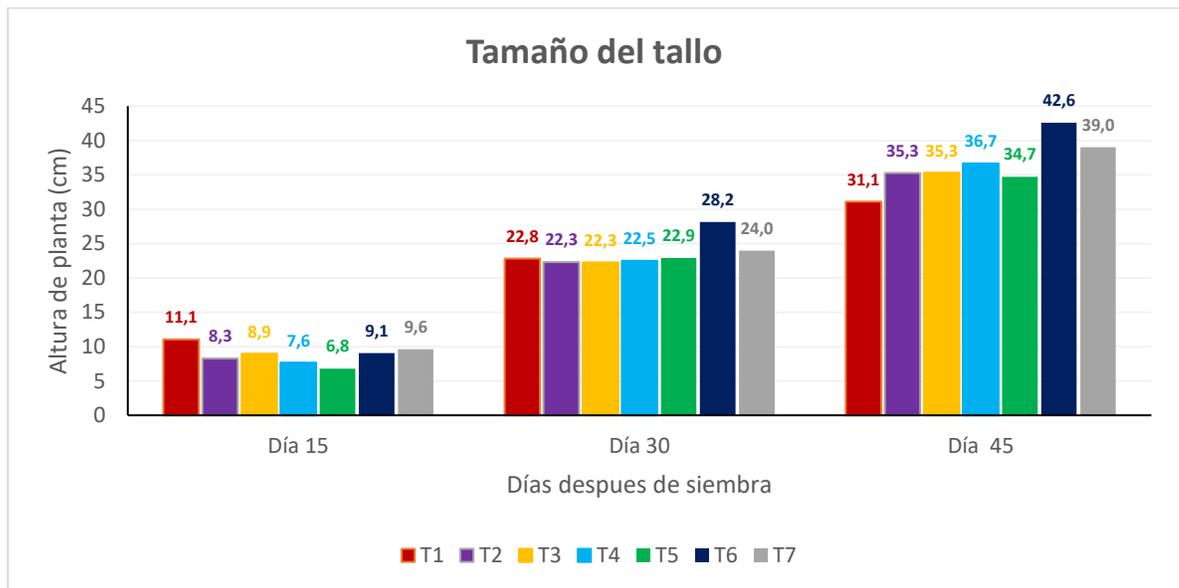


Figura 15. Altura (cm) del tallo de plantas de *Brachiaria decumbens* cv. *Bailisk*, fertilizadas con los bioles obtenidos y sus respectivos controles. T1: 100% Bovinaza, T2: 100% Gallinaza, T3: 50/50 Gallinaza-Bovinaza, T4: 30/70 Gallinaza-Bovinaza, T5: 70/30 Gallinaza-Bovinaza, T6: Producto comercial y T7: Agua.

Durante el experimento se observó el incremento en la altura del tallo durante el paso de los días evaluados en todos los tratamientos, correspondiente al crecimiento natural de la planta. Para el final del ensayo, se evidenció que la altura del tallo fue mayor en el tratamiento con el producto comercial Tropical CIS-NPK® (T6) y el tratamiento sin aplicación (T7), en comparación con los bioles obtenidos.

Para el día 15 se observa que el tratamiento 1, que corresponde a la fertilización con el biol obtenido de la formulación compuesta por bovinaza 100% ($n=11,1\text{cm}$), presentó una mayor influencia sobre el crecimiento de las plantas, en términos de altura del tallo, en comparación con los demás tratamientos y los controles. Las plantas correspondientes a los demás bioles presentaron una altura inferior al tratamiento sin aplicación.

Por su parte, para el día 30, tanto las plantas que recibieron el fertilizante comercial (T6: 28,2 cm), como aquellas sin fertilizante (T7: 24,0 cm), presentaron valores superiores a los tratamientos de fertilización con los bioles obtenidos evidenciando una altura del tallo muy similar entre sí, entre 22 y 23 cm.

Finalmente, para el día 45 de seguimiento, las plantas presentaron un comportamiento similar al observado en día 30, con los tratamientos control ejerciendo un mayor efecto sobre el crecimiento vegetal que los bioles obtenidos durante la investigación.

En la Figura 16 se presenta el análisis de varianza para la altura del tallo (cm) y la significancia estadística para cada uno de los tratamientos evaluados.

Tabla ANOVA para Altura del tallo por Tratamientos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	304,115	6	50,6859	3,35	0,0179
Intra grupos	318,099	21	15,1475		
Total (Corr.)	622,214	27			

Figura 16. Análisis de varianza para la altura del tallo del día 45 de seguimiento al crecimiento de las plantas de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*, fertilizadas con los bioles obtenidos y sus respectivos controles.

De acuerdo con el ANAVA, con un R^2 que explica el 99,52% de la variabilidad de la altura del tallo, como resultado de la fertilización del pasto *B. decumbens*, los tratamientos evaluados tuvieron influencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) sobre el crecimiento de la planta.

La Figura 17 presenta la prueba de múltiples rangos para la altura del tallo en los diferentes tratamientos. Se puede observar que no hubo diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de las plantas correspondientes a los tratamientos fertilizados con los bioles obtenidos (T1 a T5). Aunque el tratamiento sin aplicación (T6) fue superior a los anteriormente mencionados, solo

hubo significancia estadística respecto al tratamiento con bovinaza como sustrato exclusivo (T1). Las plantas donde se aplicó fertilizante comercial (T7), presentaron un crecimiento significativamente mayor a los bioles ensayados durante la investigación, mas no respecto al control sin aplicación (T6).

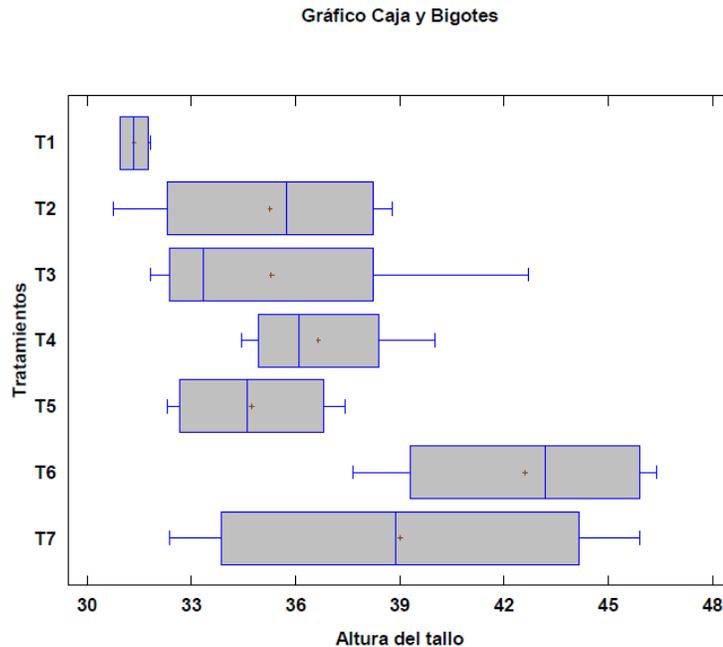


Figura 17. Gráfico de cajas y bigotes para visualizar la significancia en la diferencia entre tratamientos, para la altura del tallo del día 45 de seguimiento. Sobre el crecimiento de las plantas de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*, fertilizadas con los bioles obtenidos y sus respectivos controles.

Se puede observar que, en el presente estudio no se evidencia una acción fertilizante a partir de los bioles obtenidos, en comparación con el producto comercial, ni con el tratamiento sin aplicación.

A pesar de lo anterior, al comparar únicamente el efecto de los bioles obtenidos, el crecimiento fue mayor en aquellas formulaciones donde la combinación de gallinaza y heces de bovino fue de 50/50, 30/70 y 70/30, respectivamente, demostrando tener mejor efecto en comparación con las formulaciones cuyos sustratos consistían exclusivamente en un tipo de residuo animal (T1 y T2).

Sin embargo, para el día 15 de seguimiento, se observa en el tratamiento F1, que corresponde a la fertilización con el biol obtenido de la formulación compuesta por bovinaza 100%, una mayor influencia sobre el crecimiento de las plantas, en términos de tamaño del tallo, en comparación con los demás tratamientos y los controles (n=11,1cm).

El efecto sobre el crecimiento (tamaño del tallo) de las plantas observado el día 15, en el tratamiento realizado con bovinaza 100% (T1), es mayor en comparación con los demás tratamientos. Este corresponde a la formulación de Supermagro, la cual se ha reportado como una solución que otorga propiedades protectoras, hormonales y nutricionales en hortalizas, cultivos anuales, cultivos de plantas perennes, follajes, cultivos ornamentales y frutales, siendo tan eficiente como para suplementar la nutrición sintética en estas (Tarigo, et al., 2004; López, 2015; Cavalcante, 2019).

También Cavalcante y compañía resaltan los efectos del uso de Supermagro en la concentración de macronutrientes como fósforo, en un cultivo de maracuyá (Cavalcante, Rodrigues, Diniz, Fernandes, do Nascimento y de Oliveira, 2011). Lo anterior se debe a que cada componente del Supermagro juega un rol en la nutrición de las plantas, aportando proteínas, energía, minerales y materia orgánica. Esto se logra por la transformación de dichos componentes mediada la actividad de los microorganismos (Ruiz, 2013).

De acuerdo con lo anterior, la actividad de T1 sobre el crecimiento de las plantas a lo largo de los primeros 15 días, se puede deber a la presencia de microorganismos solubilizadores de fósforo como podrían ser bacterias de tipo *Bacillus* o *Pseudomonas*, como se observó en los resultados de determinación de estos.

Estos organismos generan diferentes ácidos orgánicos, conduciendo a la reducción del pH del suelo y favoreciendo la disolución de los minerales fosfóricos. También

los componentes aniónicos de los ácidos orgánicos se intercambian por el fosfato cuando este se encuentra quelado, liberándolo del aluminio o el hierro que impide su solubilidad, y dejándolo disponible para el consumo por las plantas (Alfa, et al., 2014; Patiño Torres, et al., 2014; Wang, et al, 2015).

El fósforo es un elemento determinante en el crecimiento y la división celular, particularmente de las raíces y los tejidos meristemáticos de los pastos, ya que hace parte de la composición de los ácidos nucleicos y los fosfolípidos. Además, es un constituyente de los sistemas encargados de la obtención, almacenamiento y transferencia de energía (NADPH y ATP), y participa en la respiración celular mediante la fosforilación oxidativa (Bernal y Espinoza, 2003; Fernández, 2007).

Teniendo en cuenta que las raíces de las plantas no son capaces de absorber grandes cantidades de fósforo, es necesario que el sistema radicular se encuentre ampliamente colonizado por bacterias promotoras de crecimiento vegetal, para facilitar la absorción de este elemento por parte de las plantas (Fernández, 2007).

Esto se relaciona con lo expresado por Mayer y compañía, es claro que la gran diversidad de microbiota presente en el suelo, y sus complejas interacciones puede influir en el establecimiento y desarrollo de los microorganismos presentes en los suelos y, por lo tanto, sobre su actividad como fertilizante. Destacando el desconocimiento de posibles efectos sinérgicos entre los organismos que componen los biofertilizantes mixtos, y los organismos presentes en el suelo, y la importancia de su estudio (Mayer et al., 2010; Cheng y Yingchun, 2013).

A su vez, es importante destacar lo asegurado por Mohammadi y compañía y Singh y compañía, quienes afirman que los biofertilizantes al contener organismos vivos requieren de cuidados especiales durante su almacenamiento y aplicación, además de que su desempeño dependerá del establecimiento de los microorganismos en el sustrato y este, a su vez, depende de las condiciones óptimas de crecimiento de los organismos, entre los que se incluyen la concentración de oxígeno, la humedad, el

pH y la temperatura, entre otros (Singh, Pandey y Singh., 2011; Mohammadi y Sohrabi, 2012).

Asimismo, se podría intuir que la presencia de subproductos del metabolismo microbiano como los ácidos orgánicos pueden acumularse en el sistema, a tal punto que puede inhibir el crecimiento y establecimiento de la biota presente, así como su actividad benéfica en el ciclaje de nutrientes (Sarma, et al., 2013; Cavalcante, et al., 2019).

Lo anterior, también podría explicar la diferencia determinada a partir de los resultados obtenidos en el día 15 y el día 45, donde se evidencia un efecto negativo en el crecimiento de las plantas tratadas con la aplicación de esos bioles, teniendo en cuenta que T6 es significativamente mayor a T1.

A su vez, es posible inferir que la concentración de aplicación de los biofertilizantes fue inadecuada para evidenciar una actividad fertilizante sobre las plantas, considerando lo expuesto por Rodrigues y compañía, quienes indican que en los biofertilizantes es posible la presencia de sustancias inhibitorias o tóxicas, demostrando que tras una única aplicación del fertilizante Supermagro, a altas concentraciones, se generó toxicidad y se evidenciaron síntomas de deficiencia de nitrógeno, 70 días después de la siembra de plantas de maracuyá (Rodrigues, et al., 2009).

Al mismo tiempo Carhuancho y compañía, mencionan la presencia de sustancias fitotóxicas en altas concentraciones en fertilizantes líquidos a base de gallinaza, lo que, sumado a valores de pH bajos, limita la absorción de determinados nutrientes por la planta (Carhuancho, et al., 2015).

Efecto de los bioles sobre el número de macollas

El seguimiento del número de macollas en las plantas de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*, fertilizadas con los bioles obtenidos y sus respectivos controles, que se realizó durante 45 días se observa en la Figura 18.

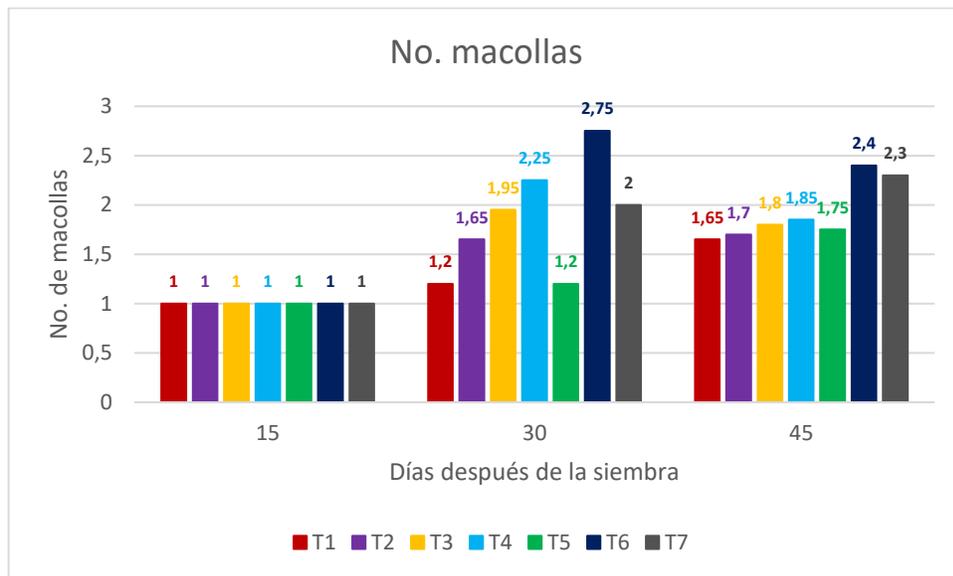


Figura 18. Seguimiento del número de macollas de las plantas de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*, fertilizadas con los bioles obtenidos y sus respectivos controles. T1: 100% Bovinaza, T2: 100% Gallinaza, T3: 50/50 Gallinaza-Bovinaza, T4: 30/70 Gallinaza-Bovinaza, 5: 70/30 Gallinaza-Bovinaza, T6: producto comercial y T7: agua.

A lo largo del periodo de tiempo evaluado, el número de macollas en todos los tratamientos fue similar, encontrándose entre 1 y 2 unidades, por lo que no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos con relación a esta variable.

En la Figura 19 se presenta el análisis de varianza para el número de macollas, y la significancia estadística para cada uno de los tratamientos evaluados.

Tabla ANOVA para No. macollas por Tratamientos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,517143	6	0,0861905	0,42	0,8574
Intra grupos	4,31	21	0,205238		
Total (Corr.)	4,82714	27			

Figura 19. Análisis de varianza para el número de macollas del día 45 de seguimiento al crecimiento de las plantas de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*, fertilizadas con los bioles obtenidos y sus respectivos controles.

De acuerdo con el ANAVA, con un R^2 que explica el 91,19% de la variabilidad del número de macollas, como resultado de la fertilización del pasto *B. decumbens*, los tratamientos evaluados no tuvieron influencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) sobre el crecimiento de la planta.

La figura 20 presenta la prueba de múltiples rangos para el número de macollas en los diferentes tratamientos. Se puede observar que no hubo diferencia estadísticamente significativa en el desarrollo de macollas correspondientes a los tratamientos fertilizados con los bioles obtenidos (T1 a T5), a la fertilización comercial (T6), ni al riego exclusivamente con agua.

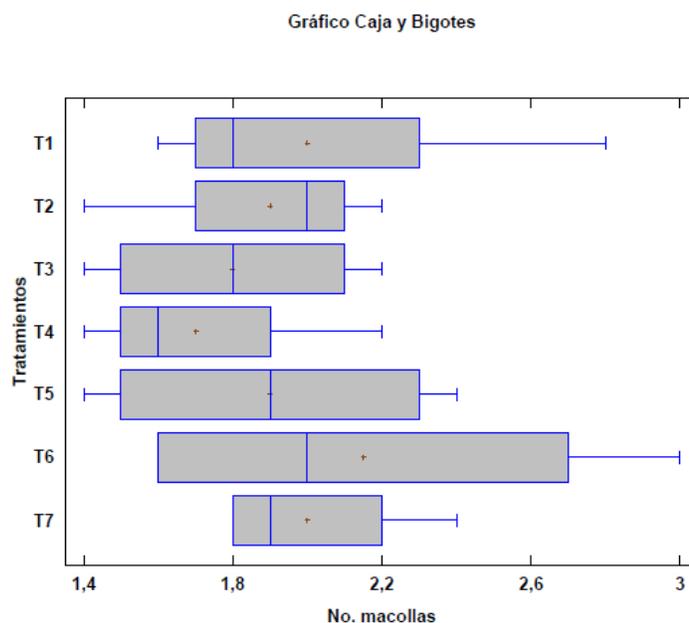


Figura 20. Gráfico de caja y bigotes para visualizar la significancia en la diferencia entre tratamientos, para la altura del tallo del día 45 de seguimiento. Sobre el crecimiento de las plantas de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*, fertilizadas con los bioles obtenidos y sus respectivos controles.

Según De Souza, y de acuerdo con el desarrollo del meristema apical de *Brachiaria decumbens* c.v. *Basilisk*, se pueden definir seis fases de desarrollo: la primera es la fase vegetativa, en la que se evidencia un gran crecimiento de los tejidos, una alta tasa de respiración celular, y la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos. La segunda, es la fase de transición entre el desarrollo vegetativo y reproductivo, donde inicia la maduración de los tejidos, por lo que los procesos metabólicos ocurren considerablemente más lento y son más uniformes. Esta fase se denomina de iniciación del racimo y ocurre 10 a 15 días después de la emergencia del tallo.

Posteriormente, ocurren las fases de iniciación de la espiga (día 21 después de la emergencia del tallo), fase de diferenciación de la espiga (día 26 después de la emergencia del tallo), fase de inflorescencia (día 59 después de la emergencia del tallo), y fase de maduración de la semilla (De Souza, 1995).

A su vez, Villalobos y WingChing indican que, en el caso de los pastos, es común encontrar un punto de compensación por sucesión en la aparición de una hoja nueva y la senescencia o muerte de una hoja madura, lo que conlleva a la acumulación de hojas que corresponde a estructuras de la planta senescentes. Por lo anterior, es posible relacionar la generación de macollas, directamente con el crecimiento de la planta (Simoni, Hoffmann, Junior, Jonason, Gomes, Fernandes, Botin y Cordeiro de Paula, 2014; Villalobos y WingChing, 2019).

A su vez Colabelli y colaboradores indican que, a pesar de que la formación de las macollas ocurre desde la aparición de la 3 a 5 hoja, esta puede verse influenciada por diferentes factores tanto nutritivos como climáticos. Por ejemplo, la aparición de macollas se ve fuertemente estimulada por una fertilización, principalmente nitrogenada; mientras que la generación de macollas se restringe a causa de una deficiencia hídrica en las plantas, así como por una reducción en la capacidad de captación de luz por la planta, debido a una cubierta vegetal muy densa lo que inhibe la formación de hojas y la elongación de la planta, procesos directamente relacionados con la formación de macollas (Colabelli, Agnusdei, Mazzanti y Labreveux, 1998).

Sin embargo, la nutrición, el riego y las variables climáticas posiblemente no influyeron en el desarrollo de macollas en el presente trabajo, puesto que la fertilización con los bioles obtenidos, no dista con la que ofrece el producto comercial; y a su vez estas no difieren de los resultados del riego exclusivo con agua.

Lo anterior indica que, para esta investigación, el número de macollas no fue un factor determinante que pudiese evidenciar el efecto de la actividad fertilizante de los bioles obtenidos.

CONCLUSIONES

- El seguimiento del pH en la fermentación anaerobia realizada en esta investigación evidenció un comportamiento acorde a la dinámica metabólica de este tipo de procesos, al permanecer en un rango entre 5 y 7 unidades de pH.
- El seguimiento de la temperatura en la fermentación anaerobia realizada en esta investigación evidenció la degradación de la materia orgánica que componía los sustratos, la cual probablemente esta mediada por la actividad hidrolítica y enzimática de microorganismos presentes en las respectivas formulaciones.
- En el presente trabajo, se determinó la presencia de bacterias solubilizadores de fósforo y bacterias con actividad amilolítica, evidenciando la presencia de estos microorganismos benéficos del suelo, durante el proceso de síntesis de un biofertilizante.
- Fue posible determinar la presencia de bacterias entéricas presuntamente patógenas de humanos y animales al comienzo de las fermentaciones, y su posterior ausencia al finalizar estos procesos. Lo que señala que el proceso fermentativo regula la carga microbiológica indeseable que puede representar un riesgo en estos productos.
- En el presente trabajo, los bioles obtenidos tras las fermentaciones, no presentaron un efecto fertilizante sobre el crecimiento y desarrollo de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilik*, en comparación con la fertilización con el fertilizante comercial y el riego exclusivamente con agua.
- La fertilización con la formulación compuesta por bovinaza como único sustrato, fue el único tratamiento donde se evidenció presencia de

organismos solubilizadores de fósforo, e indicó un mayor crecimiento vegetal para el día 15 después de la siembra, lo que significa que probablemente hubo mineralización de las fuentes fosfóricas presentes, lo que puede favorecer el desarrollo radicular y posterior crecimiento de las plantas, durante el primer estadio de la planta.

- De acuerdo con los resultados observados en el presente trabajo se puede concluir que, el desarrollo de los diferentes grupos de microorganismos de interés agrícola es indispensable para que los bioles presenten una capacidad fertilizante de plantas.

RECOMENDACIONES

- Es recomendable realizar un control sobre la temperatura del proceso, con el fin de asegurar valores cercanos a los óptimos reportados en la literatura, y así lograr un proceso de fermentación más eficiente.
- Para futuros trabajos se recomienda realizar un seguimiento microbiológico más constante durante las fermentaciones, por ejemplo, cada vez que se alimenta el sistema. A su vez, se sugiere realizar el recuento microbiano, así como realizar los aislamientos en cajas de Petri individuales, es decir, un aislamiento por caja.
- Para trabajos futuros, en los que se analice la actividad de biofertilizantes, es recomendable que esta evaluación ocurra durante periodos de tiempo muy extensos, permitiendo así el establecimiento de la microbiota inoculada en el sustrato. A su vez, se recomienda realizar un seguimiento del proceso de transformación del sustrato, antes y después de la fermentación.
- Para dar continuidad al entendimiento de la actividad de los biofertilizantes evaluados en el presente trabajo, es recomendable analizar la actividad en plantas establecidas en un sustrato diferente a la turba.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo, E., Galindo-Castañeda, T., Prada, F., Navia, M., Mauricio, H., y Romero. (2014). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. *Applied Soil Ecology*. 80, 26-33.
2. Ai, C., Yan, Z., Zhou, H., Hou, S., Chai, L., Qiu, G., & Zeng, W. (2019). Metagenomic Insights into the Effects of Seasonal Temperature Variation on the Activities of Activated Sludge. *Microorganisms*, 7 (12). 713. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120713>
3. Alcaldía de Sasaima. (2017). *Alcaldía de Sasaima - Cundinamarca. Nuestro municipio. Geografía*. Sasaima, Cundinamarca.: Recuperado de: http://www.sasaima-cundinamarca.gov.co/informacion_general.shtml#geografía
4. Alfa, M. I., Adie, D.B., Igboro, S. B., Oranusi, U. S., Dahunsi, S. O., Akali, D. M. (2014). Assessment of biofertilizer quality and health implications of anaerobic digestion effluent of cow dung and chicken droppings. *Renewable Energy*. 63, 681-686. doi: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.09.049>.
5. Asadu, C. O., Ike, I. S., Onu, C. E., Egbuna, S. O., Onoh, M., Mbah, G. O., Eze, C. N. (2020). Investigation of the influence of biofertilizer synthesized using microbial inoculums on the growth performance of two agricultural crops. *Biotechnology Reports*. Volume 27. ISSN 2215-017X. doi: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00493>.

6. Atencio, L. M., Tapia, J. J., Mejía, S. L., Cadena, J. (2014). Comportamiento fisiológico de gramíneas forrajeras bajo tres niveles de humedad en condiciones de casa malla. *Temas Agrarios*. Vol. 19:(2). (245 - 259).
7. Azadi, H, Schoonbeek, Mahmoudi, H., Derudder, B., De Maeyer, P. y Witlox, F. (2011). Organic agriculture and sustainable food production system: Main potentials. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 144 (1), 92-94. ISSN 0167-8809. doi: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.08.001>.
 - a. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167880911002805>)
8. Barbaro, L. A., Karlanian; M. A., Imhoff S., Morisigue D. E. (2011). Caracterización de la turba subtropical del departamento Islas del Ibicuy (Entre Ríos, Argentina). *Agriscientia*. vol. 28 (2): 137-145. Recuperado de:https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/75746/CONICET_Digital_Nro.2399f261-f8e5-4313-9db0-cbefa4ff444d_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
9. BD™. (2013) EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified. PA-254014.06.
10. Bernal, J., Espinosa, J. (2003). *Manual de Nutrición y Fertilización de Pastos*. International Plant Nutrition Institute. Recuperado de: https://www.academia.edu/6676325/MANUAL_DE_NUTRICION_Y_FERTILIZACION_DE_PASTOS
11. Becerra, J., Quintero, D., Martínez, M., Matiz, A. (2011). Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5 (2), 195-208. doi: <https://doi.org/10.17584/rcch.2011v5i2.1265>

12. Bhatt, B., Prajapati, V., Patel, K., Trivedi, U. (2020). Kitchen waste for economical amylase production using *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Volume 26. ISSN 1878-8181. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101654>.
13. Blake, S. M. M. (2020). Enterobacter. Salem Press Encyclopedia of Health.
14. Buitrago, S. M., Sánchez, E. M., Guerrero, H. J. (2014). Aislamiento de microorganismos amilolíticos, celulolíticos y ligninolíticos a partir del suelo de humedales de Bogotá. *Revista SENNOVA*, 1 (1), 148-155.
15. Cáceres, D., Argentina, Ministerio de Economía y Producción. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. (2003). *Catálogo de Tecnologías para Pequeños Productores Agropecuarios. Proyecto de Desarrollo de Pequeños Productores Agropecuarios (PROINDER)*. ISBN: 987-9184-33-5. Recuperado de: <http://www.buscagro.com/biblioteca/tecnologias/catalogo/acerca/index.htm>
16. Campos, E., Elias, X., Floats, X. (2005). *Procesos biológicos: la digestión anaerobia y el compostaje*. Ediciones Díaz de Santos. ProQuest Ebook Central. <https://ebookcentral-proquest-com.ezproxy.unbosque.edu.co/lib/bibliobosquesp/detail.action?docID=3201442>.
17. Carballo Méndez, Fernando de Jesús, Rodríguez Ortiz, Juan Carlos, García Hernández, José Luis, Alonso Alcalá Jáuregui, Jorge, Preciado Rangel, Pablo, Rodríguez Fuentes, Humberto, y Villarreal Guerrero, Federico. (2017). Effect of poultry manure and biosolid mixed with European turbe for cucurbit seedling production. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad*

Nacional de Cuyo, 49(2), 193-202. Recuperado de:
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1853-86652017000200014&lng=en&tlng=en.

18. Carhuacho, F., Guerrero, J., y Ramirez, J. (2012). Aprovechamiento del Estiércol de Gallina para la Elaboración de Biol en Biodigestores tipo Batch como Propuesta al Manejo de Residuo Avícola. *XIX Simposio Peruano de Energía Solar y del Ambiente (XIX-SPES)* (págs. 12-17,11). Perú: Puno.
19. Carhuacho, F., Ramírez, J., Guerrero, J. (2015). *Gestión Ambiental de Residuos Avícolas Mediante Digestión Anaerobia para la Producción de Fertilizantes Orgánicos Líquidos*. *Anales Científicos*. 76 (1), 125-132. ISSN 2519-7398. [doi: ISSN 0255-0407](https://doi.org/10.15389/issn0255-0407).
20. Cavalcante, L. F., Bezerra, F. T. C., Souto, A. G. d. L., Bezerra, M. A. F., de Lima, G. S., Gheyi, H. R., . . . Beckmann-Cavalcante, M. (2019). Biofertilizers in horticultural crops. *Comunicata Scientiae*, 10(4), 415-428. [doi:http://dx.doi.org.ezproxy.unbosque.edu.co/10.14295/CS.v10i4.3058](http://dx.doi.org.ezproxy.unbosque.edu.co/10.14295/CS.v10i4.3058)
21. Cavalcante, Lourival F., Rodrigues, Artenisa C., Diniz, Adriana A., Fernandes, Pedro D., do Nascimento, José A. M., de Oliveira, Francisco A. (2011). Micronutrientes e sódio num solo cultivado com maracujazeiro amarelo, com a aplicação de biofertilizante supermagro e potássio. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 6(3),376-382.[fecha de Consulta 17 de Julio de 2020]. ISSN: 1981-1160. Recuperado de:
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1190/119021236002>
22. Chamorro, L. I. (2015). Evaluación de la Aplicación de Caldo Supermagro en una Sistema Silvopastoril Intensivo de Trópico Alto de Nariño. (Trabajo de

Grado modalidad de Diplomado en Agroecología como requisito parcial para optar al título de Zootecnista). San Juan de Pasto. Colombia.

23. Chan, I., Santos, J., García, A. (2016). *Innovaciones tecnológicas en sistemas agrícolas de productores rurales de la localidad de San José Oriente, Hoctún, Yucatán, México*. Bioagrocencias. Innovaciones en sistemas agrícolas. Volumen 9, (1). p. 44-55.
24. Chauhan, H., Bagyaraj, D. J., Selvakumar, G., y Sundaram, S. P. (2015). Novel plant growth promoting rhizobacteria - Prospects and potential. *Applied Soil Ecology*, 95, 38-53. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.05.011>.
25. Chenbing A., Zhang, Y., Han, Z., Shanshan H., Liyuan, C., Guanzhou, Q. y Weimin, Z. (2019). Metagenomic Insights into the Effects of Seasonal Temperature Variation on the Activities of Activated Sludge. *Microorganisms*. 7, 713. doi:[10.3390/microorganisms7120713](https://doi.org/10.3390/microorganisms7120713)
26. Cheng, H., Yingchun, Q.(2013). Long-term effective microorganisms application promote growth and increase yields and nutrition of wheat in China. *European Journal of Agronomy*. 46, 63-67. ISSN 1161-0301. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2012.12.003>.
27. Connor, D. (2018). Organic agriculture and food security: A decade of unreason finally implodes. *Field Crops Research*. 225. 128-129. ISSN 0378-4290. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2018.06.008>.
28. Correa, Y. (2018). Identificación y Evaluación Proteolítica de Hongos Queratinolíticos Aislados de Suelos de Granja de Bovinos, en abril del 2014 en Lima-Perú. (Trabajo de Grado para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología). Lima. Perú.

29. Czerkawski, J. W. (1986). An Introduction to Rumer Studies. CHAPTER 7 - The Rumen as an Ecological System. *Pergamon*. Pages 107-125. ISBN 9780080254869. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-025486-9.50016-5>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080254869500165>).
30. DANE. (2019). Boletín Técnico Producto Interno Bruto (PIB) - I Trimestre de 2019. (COM-030-PD-001-r-004 V8). Recuperado de: <http://www.dane.gov.co/index.php/estadisticaspor-tema/cuentas-nacionales/cuentas-nacionales-trimestrales>.
31. De Ponti, T., Rijk, B., van Ittersum, M. (2012). *The crop yield gap between organic and conventional agriculture*. *Agricultural Systems*. 108, 1-9. ISSN 0308-521X, doi: <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2011.12.004>. }
32. De Souza, M. A. (1995). Fenología e Morfología Reproductivas de Ecótipos de *Brachiaria* spp. Dissertação para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Universidade de São Paulo. Recuperado de: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11136/tde-20191108-111336/publico/SouzaMarcoAntonio.pdf>
33. Departamento Nacional de Planeación. (2015). El Campo Colombiano: un Camino Hacia el Bienestar y la Paz. Misión para la Transformación del Campo. Colombia. Recuperado de: <https://colaboracion.dnp.gov.co/CDT/Agriculturapecuarioforestal%20y%20pesca/EI%20CAMPO%20COLOMBIANO%20UN%20CAMINIO%20HACIA%20EL%20BIENESTAR%20Y%20LA%20PAZ%20MTC.pdf>
34. Espinosa-Solares, T, Domaschko, M, Robles-Martínez, F, Durán-Páramo, E, Hernández-Eugenio, G, y Bombardiere, J. (2010). Short-term effects of

- temperature changes in a pilot plant for the production of biogas from poultry litter. *Universidad y ciencia*, 26 (3). 247-254. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792010000300004&lng=en&tlng=en.
35. Estrada Pareja, M. M. (2005). Manejo y procesamiento de la gallinaza. *Revista Lasallista de Investigación*. 2(1),43-48. ISSN: 1794-4449. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=695/69520108>
36. Fernández, M. T. (2007). Fósforo: amigo o enemigo. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. XLI(2),51-57. ISSN: 0138-6204. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=2231/223114970009>
37. Ferrera, R., Alarcón, A. (2007). *Microbiología Agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. México: Trillas. ISBN: 978-968-24-7810-9.
38. Ferraz, M. A. (2010). *Biofertilizante como ferramenta para incrementar a diversidade microbiana visando o manejo de doenças de plantas*. Universidade Federal de Sao Carlos. Centro de Ciências Agrárias. (tesis de maestría) Programa de Pos-graduacao em Agroecologia e Desenvolvimento Rural. Araras. Brazil.
39. Fitriyanto, N. A., Priyadi, D.A, Suranindyah, Y., Yusiati, L.M., Erwanto, Y., Kurniawati, N. y Pertiwiningrum, A. (2019). Biochemical and physical properties of goat feces liquid biofertilizer fermented with chicken excreta combination and different fermentation condition. Faculty of Animal Science. Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna No. 3, Bulaksumur, Yogyakarta, Indonesia. OP Conf. Series: Earth and Environmental Science: 387 012108. doi:[10.1088/1755-1315/387/1/012108](https://doi.org/10.1088/1755-1315/387/1/012108)

40. Fu, S., Zou, X., Coleman, D. (2009). Highlights and perspectives of soil biology and ecology research in China. *Soil Biology and Biochemistry*. 41 (5), 868-876. ISSN 0038-0717. doi: [https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.10.014.\(http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071708003593\)](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.10.014.(http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071708003593)).
41. Gaenssle, A.L.O., van der Maarel, M.J.E.C., Jurak, E. (2020). Reliability factor for identification of amylolytic enzyme activity in the optimized starch-iodine assay. *Analytical Biochemistry*. Volume 597. ISSN 0003-2697. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113696>.
42. Galindo, A., Jeronimo, C., Spaans, E., Weils, M. (2007). *Los abonos líquidos fermentados y su efectividad en plántulas de papaya*. Tierra Tropical. 3 (1): 1-6. ISSN: 1659-2751.
43. González-Ávalos, E., y Longoria-Ramírez, R. (2005). Variación del pH durante los procesos anaerobios de emisión de metano por el secado y la fermentación de excretas de ganado bovino en el centro de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 21(4), 159-170. Recuperado de: <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/22525>
44. González, J.; Mosquera, D.; Torrente, A. (2015). *Efectos e Impactos Ambientales en la Producción y Aplicación del Abono Supermagro en el Cultivo de Sandía*. Revista Ingeniería y Región. 13 (1): 103-111.
45. Grover, M., Maheswari, M., Desa, S., Gopinath, K.A., Venkateswarlu, B. (2015). Elevated CO₂: Plant associated microorganisms and carbon sequestration. *Applied Soil Ecology*. 95. 73-85. ISSN: 0929-1393. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.05.006>.

46. Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Kumar, R., Laxmipathi, C. L. y Lakshmanan, K. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech.* 5 (4), 355-377. doi: [10.1007/s13205-014-0241](https://doi.org/10.1007/s13205-014-0241)
47. Instituto Colombiano Agropecuario ICA y Ministerio de Agricultura. (2020) Resolución No. 068370. Recuperado de: <https://www.ica.gov.co/getattachment/14d518e8-7f1d-4867-819c-b0ec3828f847/2020R68370.aspx>
48. IDEAM. (2017). *Tiempo y Clima IDEAM*. Colombia. Recuperado de: <http://www.ideam.gov.co/>
49. Instituto Nacional Tecnológico. (s.f.). Manual del Protagonista. Pastos y Forrajes. Recuperado de: https://www.jica.go.jp/project/nicaragua/007/materials/ku57pq0000224spz-att/Manual_de_Pastos_y_Forrajes.pdf
50. Jami, E., Mizrahi, I. (2012) *Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals*. PLOS ONE 7(3): e33306. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033306>
51. Kumar, A., Rai, L. C. (2020). Soil organic carbon and phosphorus availability regulate abundance of culturable phosphate-solubilizing bacteria in paddy fields Arvind. *Pedosphere*. Vol. 30(3): 405–413, 2020. doi: [10.1016/S1002-0160\(17\)60403-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60403-X) ISSN 1002-0160/CN 32-1315/P
52. Kuzyakov, Y., Mason-Jones, K. (2018). Viruses in soil: Nano-scale undead drivers of microbial life, biogeochemical turnover and ecosystem functions. *Soil Biology and Biochemistry*. 127, 305-317. doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.09.032>

53. Lange, B., Strathmann, M., Oßmer, R. (2013). Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. *Applied Microbiology*. 57, 547-553. ISSN 0266-8254. doi: [10.1111/lam.12147](https://doi.org/10.1111/lam.12147)
54. Lien, C-Y., Lee, J-J., Chien, C-C., Huang, C-R., Lu, C-H., Chang, W-N. (2018). Clinical characteristics of Citrobacter meningitis in adults: High incidence in patients with a postneurosurgical state and strains not susceptible to third-generation cephalosporins. *Journal of Clinical Neuroscience*. Volume 54. Pages 83-87. ISSN 0967-5868. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.06.019>.
55. Lima, L. G., Casanova, Nogueira, N. F., Novaes, A. y Fernandes, A. (2020). Casein-based hydrogels: A mini-review. *Food Chemistry*. 314, 126063. ISSN 0308-8146. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126063>
56. Liu, M., Bayjanov, J.R., Renckens, B., Nauta, A., Siezen, R.J.(2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics*. 11 (1), 36. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-36>
57. Liu, P., Klose, M., Conrad, R. (2018). Temperature effects on structure and function of the methanogenic microbial communities in two paddy soils and one desert soil. *Soil Biology and Biochemistry*. Volume 124. Pages 236-244. ISSN 0038-0717. doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.06.024>.
58. Llamas, B., Espinoza, F., Flores, J., Flores, F. (2015). *Acciones para el desarrollo ambiental de las organizaciones de México: Estrategias de gestion y politicas públicas*. Competitive Press, S.A. de C.V. Primera edición. ISBN: 978-607-9429-29-4.

59. López-Baltazar, J., Méndez-Matías, A., Pliego-Marín, L., Aragón-Robles, E., y Robles-Martínez, M. L. (2013). Evaluación agronómica de sustratos en plántulas de chile 'onza' (*Capsicum annuum*) en invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 4, 1139-1150. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342013001000006&lng=es&tlng=es
60. López, L. (2015). *Biol y Gallinaza en la Producción del Ají Tabasco (Capsicum annuum) en la Zona de Patricia Pilar*. (Trabajo de Grado de pregrado Ingeniería Agropecuaria). Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Quevedo, Ecuador.
61. Lv, Y., Chen, Y., Sun, S., Hu, Y. (2014). Interaction among multiple microorganisms and effects of nitrogen and carbon supplementations on lignin degradation. *Bioresource Technology*. 155, 144-151. ISSN 0960-8524. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.012>
62. Madigan, M. T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D, H., Stahl. D.A. (2015). *Biología de los Microorganismos*. Pearson. ISBN ebook: 9788490352809
63. Mayer, J., Scheid, S., Widmer, F., Fließbach, A., Oberholzer, H. (2010). How effective are 'Effective microorganisms® (EM)'? Results from a field study in temperate climate. *Applied Soil Ecology*. ISSN 0929-1393. 46 (2), 230-239.
64. Meng, F., Qiao, Y., Wu, W., Smith, P. y Scott, S. (2017). Environmental impacts and production performances of organic agriculture in China: A monetary valuation. *Journal of Environmental Management*. (188), 49-57. ISSN 0301-4797. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.11.080>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479716309720>)

65. Merck (2014). Chromocult® Agar para coliformes Detección simultánea de bacterias coliformes y E.coli en el agua. URL: [file:///C:/Users/docentesingenieria/Downloads/DS4485ES00_Chromocult%20Coliform%20\(6-25\).pdf](file:///C:/Users/docentesingenieria/Downloads/DS4485ES00_Chromocult%20Coliform%20(6-25).pdf)
66. Mohammadi, K., Sohrabi, Y. (2012). Bacterial Biofertilizers for Sustainable Crop Production: A Review. *Journal of Agricultural and Biological Science*. 7, (5). ISSN. 1990-6145.
67. Montalbetti, A. (2009). *Microbiología del rumen*. España: El Cid Editor. Recuperado de <https://ebookcentral.proquest.com>
68. Needelman, B. A. (2013). *What Are Soils?*. Nature Education Knowledge 4 (3):2. Recuperado de: <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/what-are-soils-67647639/>
69. OCDE. (2015). Revisión de la OCDE de las Políticas Agrícolas - Colombia 2015. Evaluación y Recomendaciones de Política. Colombia. Recuperado de: https://www.minagricultura.gov.co/Reportes/OECD_Review_Agriculture_Colombia_2015_Spanish_Summary.pdf
70. OCDE/FAO (2019), OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2019-2028, OECD Publishing, París/Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Roma <https://doi.org/10.1787/7b2e8ba3-es>. ISBN 978-92-64-18272-1
71. Olaya, Y. González, L. O. (2009). Fundamentos para el Diseño de Biodigestores. Módulo para la asignatura de Construcciones Agrícolas. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Recuperado de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/7967/4/luisoctaviogonzalezsalcedo.20121.pdf>

72. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO; MINERGÍA, PNUD, GEF. (2011). Manual de Biogás. ISBN 978-95-306892-0 (PDF) Recuperado de: <http://www.fao.org/3/as400s/as400s.pdf>
73. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO. (2013). Gestión de residuos de aves de corral en los países en desarrollo. Características de la gallinaza de las aves de corral. Revisión del Desarrollo Avícola. North Carolina State University, Department of Poultry Science, Raleigh, NC. ISBN 978-92-5-308067-0 (PDF) Recuperado de: https://sistemamid.com/panel/uploads/biblioteca/2016-01-10_12-39-12131046.pdf#page=54
74. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2017). *El Estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación. Aprovechar los Sistemas Alimentarios para Lograr una Transformación Rural Inclusiva*. Roma. ISBN 978-92-5-309873-6.
75. Patiño-Torres, Carlos Omar, y Sanclemente-Reyes, Oscar Eduardo. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado*, 10(2),288-297. ISSN: 1900-3803. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/2654/265433711018.pdf>
76. Payen, M., Pardos de la Gándara, M., Cointe, A., Massiot, A., Bidet, P., Weill, F., Bonacorsi, S.(2020). Diagnostic challenge of gastrointestinal infection due to lactose-fermenting Salmonella enterica subsp. enterica serovar 4,5:I. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Volume 98, Issue 2. ISSN 0732-8893. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115105>
77. Pérez-Madruga, Y., López-Padrón, I., y Reyes-Guerrero, Y. (2020). Las Algas como alternativa natural para la producción de diferentes cultivos. *Cultivos*

Tropicales. 41(2), 1–21. Recuperado de:
<https://ezproxy.unbosque.edu.co/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=asx&AN=145333509&lang=es&scope=site>

78. Peters, M., Franco, L. H., Schmidt, A., Hincapié, B. (2010). *Especies Forrajeras Multipropósito Opciones para Productores del Trópico Americano*. CIAT. Cali. Julio. Recuperado de: <https://infopastosyforrajes.com/libros-y-manuales-pdf/especies-forrajeras-multiproposito/>
79. Pratap. D.S., Harikesh, B. S. y Prabha, R. (Ed.). (2016). *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. doi: [10.1007/978-81-322-2647-5_18](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_18)
80. Rajendran, K., Ganti, S. M. (2019). *Techno-economic and life cycle assessment of anaerobic digestion - A review*. *Biotacalys and Agricultural Biotechnology*. 20. 101207. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101207>
81. Ramakrishna, W., Yadav, R., Li, K. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. *Applied Soil Ecology*. 138, 10-18. ISSN 0929-1393. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.019> (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139318312150>).
82. Restrepo, J. (2001). *Elaboración de abonos orgánicos fermentados y biofertilizantes foliares: experiencias con agricultores en Mesoamérica y Brasil*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Editor: San José, Costa Rica : Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. ISBN: 9290395060.
83. Restrepo, J. (2007). *Biofertilizantes preparados y fermentados a base de mierda de vaca*. Impresora Feriva S.A. ISBN: 978-958-44-1261-4. Cali, Colombia.

84. Rey, A. C. (2009). *Hidrolizados caseínicos totales y fraccionados. Evaluación de su acción promotora del crecimiento y estimulante de propiedades tecnológicas de las bacterias ácido lácticas*. Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ingeniería Química. República de Argentina.
85. Rivera-Cruz, M. C., Trujillo, A., Cordoba, G., Kohler, J., Caravaca, F., y Roldan, A. (2008). Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carriers for promoting plant growth and soil sustainability in banana crops. *Soil Biology and Biochemistry*, 12 (40), 3092-3095. ISSN 0038-0717.
86. Rivera-Cruz, M. C., Trujillo, A., Alejo, D. E. (2010). Los Biofertilizantes Integrados con Bacterias Fijadoras de N, Solubilizadoras de P y Sustratos Orgánicos en el Crecimiento de Naranja Agrio *Citrus aurantium* L. *Interciencia*. 35 (2), 113-119. 0378-1844/10/02/113-07.
87. Rodrigues, Artenisa C., Cavalcante, Lourival F., Oliveira, Ademar P. de, Sousa, José T. de, & Mesquita, Francisco O.. (2009). Produção e nutrição mineral do maracujazeiro-amarelo em solo com biofertilizante supermagro e potássio. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 13(2), 117-124. doi: <https://doi.org/10.1590/S1415-43662009000200002>
88. Rodrigues, J. S., Silva Garrido, M., Bezerra da Silva, J. A., Lima Simões, W., Silva, R., Nascimento Amorim, M. (2019). Growth and nutritional status of maize plants in response to different doses and application frequencies of biofertilizer. *Cientifica*. v.47, n.1, p.123–131, 2019. ISSN: 1984-5529. doi: <http://dx.doi.org/10.15361/1984-5529.2019v47n1p123-131>
89. Rodriguez, P., Rothballer, M., Chowdhury, S., Nussbaumer, T., Gutjahr, C., Falter-Braun, P. (2019). Systems Biology of Plant-Microbiome Interactions. *Molecular Plant*. 12, 804–821. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.05.006>

90. Rosales Loaiza, Néstor; Bermúdez, José; Moronta, Reyna; Morales, Ever. (2007). Gallinaza: un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IX(1),41-48. ISSN: 0123-3475. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=776/77690106>.
91. Ruiz, M. A. (2013). *Comportamento Químico e Microbiológico no Biofertilizante tipo Supermagro*. (tesis de maestría). Universidade de Brasilia. Facultad de Agronomia e Medicina Veterinaria. Brasília, Brasil.
92. Ruiz, J. R. (2018). Evaluación de la Actividad Enzimática de Hongos y Bacterias Procedentes de un Suelo Agrícola Contaminado con Plaguicidas de la Parroquia San Luis para la Elección del Microorganismo más Eficiente para su Biorremediación. (Trabajo de Grado modalidad de Pregrado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Ambiental). Riobamba. Ecuador.
93. Salwan, Al-Maliki, Hamza, E. (2020). Changes in soil carbon mineralization, soil microbes, roots density and soil structure following the application of the arbuscular mycorrhizal fungi and green algae in the arid saline soil *Rhizosphere*. Volume 14, 100203. ISSN 2452-2198. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100203>.
94. Sangakkara. U.R. (2001). *Future Tech Today Icon*. The Technology Of Effective Microorganisms – Case Studies of Application. F. o. Agriculture, Editor, y T. T.–C. Application, Productor. Recuperado de EMF Pollution Solutions: <http://www.futuretechtoday.com/em/sang.htm>

95. Sarma, M.V.R.K. Gautam, Ashwani. Kumar, Lalit. Saharan, Krishna. Kapoor, Avhijeet. Shrivastava, Nishant. Sahai, Vikram. Bisaria, V.S.. (2013). Bioprocess strategies for mass multiplication of and metabolite synthesis by plant growth promoting pseudomonads for agronomical applications. *Process Biochemistry*. Volume 48, Issue 9. Pages 1418-1424. ISSN 1359-5113. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.017>.
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511313001931>)
96. Sattar, H., Bibi, Z., Kamran, A., Aman, A., Ali S. (2019). Degradation of complex casein polymer: Production and optimization of a novel serine metalloprotease from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 21 (101256). ISSN 1878-8181. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101256>.
97. Simioni, T.A., Hoffmann, A., Junior, F., Jonasson, C., Gomes, U. H., Fernandes, G. A., Botini, L. A., Cordeiro de Paula, D. (2014). Senescência, remoção, translocação de nutrientes e valor nutritivo em gramíneas tropicais. *PUBVET*, Londrina, V. 8, N. 13, Ed. 262, Art. 1743. doi: <https://www.researchgate.net/publication/309368050>
98. Singh, J. S., Pandey, V. C., y Singh., D. (2011). Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and. (E. B. reserved, Ed.) *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 140, 339-353. doi: [10.1016/j.agee.2011.01.017](https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.01.017)
99. Smid, E., Poolman, B., Konings, W. (1991). Casein Utilization by Lactococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (9) 2447-2452. doi: [0099-2240/91/092447-06\\$02.00/0](https://doi.org/10.1093/aem/57.9.2447).

100. Soria, M.C., Soria, M.A., Bueno, D.J., Godano, E.I., Gómez, S.C., ViaButron, I.A., Padin, V.M., Rogé, A.D. (2017). Salmonella spp. contamination in commercial layer hen farms using different types of samples and detection methods. *Poultry Science*. Volume 96, Issue 8. Pages 2820-2830. ISSN 0032-5791. <https://doi.org/10.3382/ps/pex053>
101. Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater, 23rd. 9225 DIFFERENTIATION OF COLIFORM BACTERIA (2017). URL: <https://www.standardmethods.org/doi/10.2105/SMWW.2882.196>
102. Statista. (2015). Porcentaje de la superficie mundial total usado para fines agrícolas de 1990 a 2012. Statista Recuperado de: <https://es.statista.com/estadisticas/600305/porcentaje-de-la-superficie-total-destinado-a-agricultura-1990/>
103. Stout, J.D., Heal, O.W. (1967). Chapter 6 – Protozoa. Editor(s): A. BURGESS, F. RAW. Soil Biology. Academic Press. Pages 149-195. ISBN 9780123956996. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395699-6.50010-9>
104. Sylvia, D., Fuhrmann, J., Hartel, P., Zuberer, D. (1999). *Principles and Applications of Soil Microbiology*. United States of America: Editorial Prentice Hall, Inc. ISBN: 0-13-459991-8.
105. Talia, P., Sede, S.M., Campos, E., Rorig, M., Principi, D., Tosto, D., Hopp, H.E., Grasso, D., Cataldi, A. (2012). Biodiversity characterization of cellulolytic bacteria present on native Chaco soil by comparison of ribosomal RNA genes. *Research in Microbiology*. 163 (3), 221-232. ISSN 0923-2508. doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.12.001>
106. Tarigo, A., Reptto, C., y Acosta, D. (2004). *Evaluación Agonómica de Biofertilizantes en la Producción de Lechuga (Lactuca sativa) a Campo*.

Montevideo. Uruguay: Tesis presentada como requisito para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de la República. Facultad de Agronomía.

107. Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M., Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3),131-138. ISSN: 0253-5688. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1812/181222321004>
108. Ungvarsky, J. (2017). Klebsiella. Salem Press Encyclopedia of Health.
109. Vilanova, C., Guillem, M., Dominguez-Escribá, L., Genovés, S., Sentandreu, V., Bataller, E., Ramón, D., Porcar, M. (2012). Bacteria from acidic to strongly alkaline insect midguts: Potential sources of extreme cellulolytic enzymes. *Biomass and Bioenergy*. 45, 288-294. ISSN 0961-9534. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.017>
110. Villalobos-Villalobos, Luis A., & WingChing-Jones, Rodolfo. (2019). Remoción mecánica del material senescente para la recuperación de pasturas. *Agronomía Mesoamericana*, 30(3), 821-840. doi: <https://dx.doi.org/10.15517/am.v30i3.36625>
111. Villanueva – Mejía. (2018). Estudios sobre la Bioeconomía como fuente de nuevas industrias basadas en el capital natural de Colombia. Medellín. Colombia. Recuperado de: https://www.dnp.gov.co/Crecimiento-Verde/Documents/ejes-tematicos/Bioeconomia/Informe%20/ANEXO%201_An%C3%A1lisis%20sector%20agr%C3%ADcola.pdf

112. Wang, H., Liu, S., Zhai, L., Zhang, J., Ren, T., Fan, B., Liu, H. (2015). Preparation and utilization of phosphate biofertilizers using agricultural waste. *Journal of Integrative Agriculture*. 14 (1), 158-167. doi: [10.1016/S2095-3119\(14\)60760-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60760-7).
113. Xu, Y., Zhou, T., Tang, H., Li, X., Chen, Y., Zhang, L., Zhang, J. 2020. Probiotic potential and amylolytic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese fermented cereal foods. *Food Control*. Volume 111. ISSN 0956-7135. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107057>