

**PRODUCCION Y CARACTERIZACIÓN DE BIOLES PARA SU USO EN  
EL CULTIVO DE BANANO (*Musa* sp), RIO FRIO, SARAPIQUI,  
HEREDIA, COSTA RICA.**

**FERNANDO ARAYA ALPIZAR**

Tesis presentada a la Escuela de Agronomía como requisito para optar al grado de  
Licenciatura en Ingeniería en Agronomía.

**INSTITUTO TECNOLOGICO DE COSTA RICA  
SEDE REGIONAL SAN CARLOS**

**2010**

**PRODUCCION Y CARACTERIZACIÓN DE BIOLES PARA SU USO EN  
EL CULTIVO DE BANANO (*Musa sp*), RIO FRIO, SARAPIQUI,  
HEREDIA, COSTA RICA.**

**FERNANDO ARAYA ALPIZAR**

**Aprobado por los miembros del tribunal evaluador:**

Ing. Agr. Xiomara Mata Granados, Lic

\_\_\_\_\_  
Asesor Interno

Ing. Agr. Miguel Muñoz Fonseca, Ph.D.

\_\_\_\_\_  
Asesor Externo

Ing. Agr. Arnoldo Gadea Rivas, M.Sc.

\_\_\_\_\_  
Jurado

Ing. Agr. Fernando Gómez Sánchez, MAE

\_\_\_\_\_  
Coordinador  
Trabajos Finales de Graduación

Ing. Agr. Arnoldo Gadea Rivas, M.Sc.

\_\_\_\_\_  
Director  
Escuela de Agronomía

**2010**

## DEDICATORIA

A mis padres... que gracias a su trabajo durante muchos años lograron brindarme la oportunidad de desarrollar una carrera universitaria.

## **AGRADECIMIENTO**

En general a todas las personas que compartieron mi período universitario, así como las que me apoyaron durante el desarrollo de la investigación.

En Standard, a todos por la oportunidad brindada, en especial a Don Miguel, por su incalculable ayuda y colaboración.

En el TEC, a todos los profesores y demás funcionarios que colaboraron en mi formación tanto profesional como humana. A Gadea por sus consejos de formación personal y su ayuda.

A mis compañeros del TEC, a todos en especial a Olman, Luis, Mario, Sabri, Clau Jey, los Jorges, Ronny y Didier... por siempre estar ahí...

Gracias

## TABLA DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b> .....	III
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	IV
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	VIII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	X
<b>RESUMEN</b> .....	XI
<b>1. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
2.1. Objetivo general.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
<b>3. HIPOTESIS</b> .....	3
3.1. Hipótesis técnica.....	3
<b>4. REVISION DE LITERATURA</b> .....	4
4.1. Generalidades del cultivo de banano.....	4
4.2. Retos de la agricultura Moderna-Futura.....	4
4.3. La materia orgánica.....	6
4.4. Bioles (biofertilizantes líquidos y biofermentos).....	8
4.5. Posibles modos de acción de los Bioles.....	8
4.6. Algunos insumos de uso común en bioles.....	12
4.6.1. <i>Boñiga</i> .....	12
4.6.2. <i>Suero de leche</i> .....	13
4.6.3. <i>Melaza</i> .....	14
4.6.4. <i>Semolina</i> .....	15
4.6.5. <i>Lixiviado de pinzote</i> .....	15
4.6.6. <i>Pasto</i> .....	16
4.6.7. <i>Inoculo microbial</i> .....	16
4.7. La fermentación.....	20
4.8. Composición microbiológica.....	21

4.8.1.	<i>Bacterias</i> .....	21
4.8.2.	<i>Hongos</i> .....	24
4.9.	Calidad de los Bioles .....	25
<b>5.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	27
5.1.	Localización del estudio .....	27
5.2.	Manejo del ensayo .....	27
5.2.1.	Definición de la metodología y desarrollo de los bioles.....	28
5.2.2.	Determinación de la composición química y microbiológica de los bioles desarrollados.....	29
5.2.3.	Estimación del costo de producción de los bioles.....	30
5.2.4.	Evaluación del efecto de los bioles desarrollados sobre plantas a nivel de vivero (Bioensayo). .....	31
5.3.	Definición de la unidad experimental y de las muestras.....	32
5.4.	Descripción de los tratamientos.....	33
5.4.1.	Fase I: Producción Bioles .....	33
5.4.2.	Fase II: Bioensayo.....	34
5.5.	Variables evaluadas.....	34
5.5.1.	Producción de Bioles.....	34
5.5.2.	Fase II: Bioensayo .....	36
5.6.	Definición del diseño experimental.....	37
5.6.1.	Fase I: Producción de Bioles .....	37
5.6.2.	Fase II: Bioensayo .....	39
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	40
6.1.	Producción de bioles.....	40
6.1.1.	Caracterización del inóculo inicial .....	40
6.1.1.1.	Cambios en la estructura de la población microbiana .....	43
6.1.1.1.1.	Bacterias aeróbicas .....	43
6.1.1.1.2.	Bacterias anaeróbicas.....	47
6.1.1.1.3.	<i>Lactobacillus</i> .....	48
6.1.1.1.4.	Actinomicetes.....	49
6.1.1.1.6.	Levaduras.....	53

6.1.2.	Inocuidad de los Bioles .....	55
6.1.3.	Composición química final.....	58
<b>6.2.</b>	<b>Fase II (Bioensayo) .....</b>	<b>66</b>
6.2.1.	Análisis de crecimiento.....	66
6.2.2.	Análisis Foliar.....	70
<b>7.</b>	<b>EVALUACION DE COSTOS.....</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>9.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>82</b>
<b>10.</b>	<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>84</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>89</b>
	ANEXO 1. ....	89
	ANEXO 2. ....	90
	ANEXO 3. ....	95
	ANEXO 4. ....	96
	ANEXO 5 .....	97
	ANEXO 6. ....	98
	ANEXO 7. ....	99
	ANEXO 8. ....	100
	ANEXO 9. ....	101
	ANEXO 10.....	103
	ANEXO 11.....	104
	ANEXO 12.....	105
	ANEXO 13.....	106
	ANEXO 14.....	107
	ANEXO 15.....	108

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Título</b>	<b>Pag</b>
<b>Cuadro 1</b>	Aporte nutricional del estiércol bovino.....	<b>10</b>
<b>Cuadro 2</b>	Composición mineral del lactosuero. En mg/L.....	<b>11</b>
<b>Cuadro 3</b>	Composición microbiológica del lactosuero.....	<b>12</b>
<b>Cuadro 4</b>	Composición mineral de la melaza.....	<b>12</b>
<b>Cuadro 5</b>	Análisis de metales pesados presentes en la melaza. En mg/L.....	<b>13</b>
<b>Cuadro 6</b>	Composición nutricional de la semolina de arroz.....	<b>13</b>
<b>Cuadro 7</b>	Composición mineral del lixiviado de pinzote.....	<b>13</b>
<b>Cuadro 8</b>	Composición de los tratamientos a evaluar.....	<b>29</b>
<b>Cuadro 9</b>	Análisis microbiológicos realizados a los insumos utilizados en la elaboración de los bioles.....	<b>36</b>
<b>Cuadro 10</b>	Niveles poblacionales de bacterias aeróbicas en los bioles durante el tiempo de fermentación.....	<b>38</b>
<b>Cuadro 11</b>	Niveles poblacionales de bacterias anaeróbicas en los bioles durante el tiempo de fermentación.....	<b>40</b>
<b>Cuadro 12</b>	Niveles poblacionales de Lactobacillus detectados en los bioles durante los muestreos.....	<b>41</b>
<b>Cuadro 13</b>	Niveles poblacionales de actinomicetes detectados en los bioles durante los muestreos.....	<b>42</b>
<b>Cuadro 14</b>	Niveles poblacionales de hongos detectados en los Bioles durante los muestreos.....	<b>44</b>
<b>Cuadro 15</b>	Niveles poblacionales de levaduras detectadas en los Bioles durante los muestreos.....	<b>45</b>
<b>Cuadro 16</b>	Descripción de los resultados obtenidos durante los dos primeros muestreos, según la metodología de análisis.....	<b>47</b>



<b>Cuadro 17</b>	Resultados de los análisis microbiológicos realizados por dos laboratorios, para determinar la inocuidad de los bioles evaluados a los treinta días de fermentación.....	<b>48</b>
<b>Cuadro 18</b>	Análisis mineral de los bioles (crudo y sobrenadante).....	<b>51</b>
<b>Cuadro 19</b>	Análisis mineral de los bioles (crudo y sobrenadante) (valores en mg/L). Continuación.....	<b>52</b>
<b>Cuadro 20</b>	Análisis mineral de los bioles (crudo y sobrenadante) (valores en mg/L). Continuación.....	<b>53</b>
<b>Cuadro 21</b>	Análisis mineral de los bioles (crudo y sobrenadante) (valores en mg/L). Continuación.....	<b>54</b>
<b>Cuadro 22</b>	Resultados obtenidos al finalizar las 6 semanas de aplicación a nivel de vivero. ( n 150 plantas/trat).....	<b>55</b>
<b>Cuadro 23</b>	Pesos obtenidos al finalizar las seis semanas de aplicación, a nivel de vivero. ( n 150 plantas/trat).....	<b>57</b>
<b>Cuadro 24</b>	Resultados del análisis foliar al finalizar las seis semanas de aplicación.....	<b>58</b>
<b>Cuadro 25</b>	Resultados del análisis foliar al finalizar las 6 semanas de aplicación. Continuación.....	<b>59</b>
<b>Cuadro 26</b>	Costos de biofermentadores de diseño casero, según su capacidad. Precios de mercado para I semestre 2009.....	<b>60</b>
<b>Cuadro 27</b>	Costo por unidad de producto producido para la elaboración de los Bioles.....	<b>61</b>
<b>Cuadro 28</b>	Costo por litro de Biol producido, valorando la base, el lixiviado y el inóculo utilizado.....	<b>63</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Numero</b>	<b>Titulo</b>	<b>Pag</b>
<b>Figura 1</b>	Fermentador de diseño casero con sistema de liberación de gases utilizado en la investigación.....	<b>26</b>
<b>Figura 2</b>	Comportamiento del pH y la conductividad durante los treinta días de fermentación según el inóculo utilizado.....	<b>49</b>
<b>Figura 3</b>	Comportamiento del pH y la conductividad durante los treinta días de fermentación según base utilizada.....	<b>50</b>
<b>Figura 4</b>	Porcentaje de plantas afectadas con pudrición del cormo. (Barras con desviación estándar). N 630 plantas/trat.....	<b>58</b>

## RESUMEN

En los últimos años se ha popularizado el uso de biofermentos o bioles en cultivos hortícolas y frutales, especialmente en sistemas de producción orgánica. Con el fin de definir su uso en el cultivo de banano convencional se establecieron bioles combinando diferentes insumos y fuentes de inóculo incluyendo boñiga, pasto fermentado, lixiviado del raquis del racimo de banano, melaza, semolina de arroz, lactosuero, EMs y hojarasca y mantillo de montaña, de acuerdo con protocolos establecidos por productores orgánicos. Además se realizaron una serie de análisis químico, conteos de población microbiológica, presencia de coliformes y costos. Además se realizó un bioensayo con plantas en vivero y análisis de crecimiento y contenido mineral foliar.

Se determinó que los diferentes inóculos (pasto fermentado, microorganismos de montaña y EMs) suministran entre 2 y  $10 \times 10^6$  UFC/ml de bacterias aeróbicas, 8 a  $100 \times 10^3$  UFC/ml de bacterias anaeróbicas,  $1 \times 10^3$  CFU/ml actinomicetes, 1.6 a  $100 \times 10^4$  UFC/ml hongos, 1 a  $100 \times 10^4$  UFC/ml levaduras y 2.8 a  $12000 \times 10^8$  UFC/ml Lactobacillus. Cuando se establecieron los bioles se determinó entre 11 y  $88 \times 10^3$  UFC/ml de bacterias aeróbicas, de 7 a  $4700 \times 10^3$  UFC/ml de bacterias anaeróbicas, de 1 a  $11 \times 10^4$  UFC/ml de Lactobacillus, de 3 a  $442 \times 10^3$  UFC/ml de actinomicetes, de 1 a  $310 \times 10^2$  UFC/ml de hongos, de 1 a  $21 \times 10^4$  UFC/ml de levaduras. Estas poblaciones varían en el tiempo dependiendo de los ingredientes del biol y el tiempo de fermentación. En la mayoría de los casos no se observó un incremento significativo en las poblaciones de los diferentes microorganismos. A los 30 días se contabilizaron entre 0.5 y  $14 \times 10^6$  UFC/ml de bacterias aeróbicas, 0.7 a  $13 \times 10^3$  UFC/ml de bacterias anaeróbicas, de 0.8 a  $10 \times 10^4$  UFC/ml de Lactobacillus, de 1 a  $318 \times 10^3$  UFC/ml de actinomicetes, de 1 a  $81 \times 10^2$  UFC/ml de hongos, de 0.8 a  $10 \times 10^4$  UFC/ml de levaduras.

Los análisis de presencia de coliformes totales y fecales indicaron que las condiciones de los bioles no permiten la multiplicación de coliformes. A los 30 días de

fermentación los niveles son no detectables o inferiores a 1 UFC/ml, además no se detectó la presencia de Salmonella en los bioles.

Durante el período de 30 días de fermentación hay ligeros cambios físico-químicos en los bioles, dependiendo de la base utilizada. En el caso de bioles preparados con boñiga, pasaron de 5.4 a 5.7, mientras que la conductividad pasó de 9000 a 9750  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , mientras que los bioles preparados con pasto fermentado pasaron de 4.2 a 4.6 y la conductividad de 9000 a 10000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

En general se observó que los bioles son pobres desde el punto de vista nutricional, y su composición varía dependiendo de la base utilizada y de la adición de lixiviado del raquis del racimo del banano. Cerca del 50 a 70 % de los elementos fueron detectados en el sobrenadante. Los contenidos en los bioles con boñiga varían entre 0.7 y 1.13 g/L para nitrógeno, 160 a 180 g/l de fósforo, 1500 a 5500 g/l de potasio, 4.20 g/l de calcio, 250 a 300 g/l de magnesio, 150 a 70 g/l de azufre. También presentan niveles bajo de hierro de 15 a 20 mg/l, de 0.4 a 0.7 mg/l de cobre y 2 mg/l de zinc, 10 mg/l de manganeso, y 0.2 y 0.3 mg/l de boro. En el caso del pasto fermentado, en comparación con los bioles a base de boñiga, se detectaron contenidos superiores de nitrógeno (1.9 a 2.3 g/l) y fósforo (1100 a 1400 mg/l). En el caso del potasio, el nivel varía según el uso de lixiviado del raquis, entre 2400 y 6700 mg/l. También se observaron niveles inferiores de calcio (280 a 390 mg/l), niveles superiores de magnesio y azufre (670-780 mg/l y 280-350 mg/l respectivamente), contenidos similares de hierro y cobre (20 y 0.6-1,8 mg/l respectivamente), niveles superiores de zinc (5 a 7 mg/l), manganeso (20 a 30 mg/l) y boro (0.4 mg/l).

El bioensayo con dos bioles escogidos por el nivel de nitrógeno (Pasto fermentado, con y sin lixiviado del raquis e inoculado con EMs), en plantas propagadas in vitro y transplantadas en bolsa en vivero, indicaron una ligera diferencia en la variable altura a las 6 semanas de tratamiento con el biol suplementado con lixiviado del raquis, pero no hubo diferencias en las variables diámetro del pseudotallo, número de hojas y área foliar, lo mismo en el caso de peso fresco y seco de raíz, y pseudotallo

y hojas. En análisis foliar de estas plantas no mostraron diferencias significativas excepto en el caso del cobre, que fue inferior en plantas asperjadas con bioles. Además se observó un descenso en la infección de pudrición del cormo por *Fusarium* de 3.6 % en el control a 0.6-1.1 % en las plantas asperjadas con bioles.

En cuanto a costos la producción de bioles varía entre \$ 0.03/L y \$ 0.19/L en el caso de bioles preparados con boñiga y \$ 0.08/L y \$ 0.24/L los preparados con pasto fermentado, siendo el principal costo la recolección de lixiviado del raquis.

Este estudio debe ser considerado preliminar, resta por determinar a través de experimentos diseñados para determinar el posible efecto de los bioles como inoculantes de suelo y su potencial interacción con hongos de suelo y nematodos, así como las aplicaciones foliares y la aplicación al suelo en combinaciones con ahorros porcentuales de fertilizantes.

Palabras claves: Bioles, biofermentos, fermentación, microorganismos de montaña (MM).

## ABSTRACT

During the last few years, the use of fermented juices, called “biol”, has become popular in organic production systems. In order to explore its use in banana production, different biols were produced combining different organic materials (cow manure, fermented grass, stalk juice, sugar cane molasses, rice bran, milk serum, effective microorganism, and indigenous microorganisms, according to protocols previously established by organic farmers.

It was determined that different microbial inoculum sources (fermented grass, IMO and EMs), provide between 2 and 10 x10<sup>6</sup> CFU/ml aerobic bacteria, 8 to 100 x 10<sup>3</sup> CFU/ml anaerobic bacteria, 1 x10<sup>3</sup> CFU/ml actinomycetes, 1.6 to 100 x10<sup>4</sup> CFU/ml fungi, 1 to 100 x10<sup>4</sup> CFU/ml yeast and 2.8 a 12000x10<sup>8</sup> CFU/ml *Lactobacillus*.

At the onset of the fermentation process there were between 11 and 88 x10<sup>3</sup> CFU/ml aerobic bacteria, 7 to 4700 x10<sup>3</sup> CFU/ml anaerobic bacteria, 1 to 11x10<sup>4</sup> CFU/ml *Lactobacillus*, 3 to 442 x10<sup>3</sup> CFU/ml actinomycetes, 1 to 310 x 10<sup>2</sup> CFU/ml fungi and 1 to 21 x10<sup>4</sup> UFC/ml yeast. Microbial populations vary in time, depending on biol composition and fermentation time. In most cases no increase in population was observed. In fact, after the 30 day-fermentation period, microbiological analysis indicated aerobic bacteria in the range of 0.5 and 14 x10<sup>6</sup> UFC/ml, 0.7 to 13 x10<sup>3</sup> UFC/ml anaerobic bacteria, 0.8 and 10 x10<sup>4</sup> UFC/ml *Lactobacillus*, 1 to 318 x10<sup>3</sup> UFC/ml actinomycetes, 1 a 81 x10<sup>2</sup> UFC/ml fungi, and 0.8 to 10 x10<sup>4</sup> UFC/ml yeast.

In order to determine whether biols may pose a risk for human’s exposure, total and fecal coliforms analysis was carried out. It was observed that upon 30 days of fermentation coliform bacterium were either not detectable or below one CFU/ml. Furthermore, *Salmonella* sp. was not detected in the biols regardless of base ingredients.

During the 30 day fermentation process, there were slight changes in physic and chemical properties, influenced mostly by the base ingredients. The pH of cow-manure based biols, slightly increased from 5.4 to 5.7, while conductivity increased from 9000 to 9750  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . In the case of fermented grass biols pH increased from 4.2 to 4.6 and conductivity increased from 9000 to 10000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

The use of biols as such is mainly restricted by its low mineral content. Its composition varies depending on the ingredients used in its preparation, especially banana stalk juice. When crude biols and supernatant were analyzed, it was observed that nearly 50 to 70 % of the minerals were found in the supernatant. Cow-manure based biols showed nitrogen leves in the range of 0.7 to 1.13 g/L, 160 to 180 g/l phosphorus, 1500 to 5500 g/l potassium, 4.20 g/l calcium, 250 to 300 g/l de magnesium and 70 to 150 g/l sulphur. It also showed low levels of (15 to 20 mg/l), copper (0.4 a 0.7 mg/l), zinc (2 mg/l), boron (0.2-0.3 mg/l) and manganese (10 mg/l). In comparison with cow-manure based biols, fermented-grass ones showed higher levels of nitrogen (1.9 - 2.3 g/l) and phosphorus (1100-1400 mg/l), whereas in the case of potassium, it varied depending on the use of banana stalk juice, from 2400 to 6700 mg/l. Calcium content was lower (280 a 390 mg/l), whereas magnesium and sulphur levels were higher (670-780 mg/l and 280-350 mg/l respectively). The same was observed for zinc and manganese (5-7 mg/l and 20 to 30 mg/l, respectively), whereas the content of boron, iroin and copper were similar to cow manure-based biols (0.4 mg/l, 20 mg/l and 0.6-1.8 mg/l respectively).

Based on the nitrogen content, two biols (fermented grass, EM-inoculated, supplemented with banana stalk juice) were chosen for testing growth-enhancement potential on banana tissue culture plants under greenhouse conditions, with weekly spraying, in addition to the regular fertilization program. After six weeks there was a slight difference in plant height but no difference was observed for the remaining growth variables (pseudostem diameter, number of leaves, leaves area, root fresh and dry weight, pseudostem and leaves fresh and dry weight). Foliar analysis did not show any difference in nutrient levels except for copper, which was less than half in biol-sprayed

plants. Interestingly, the incidence of soft-corm rot due to *Fusarium* was much less for biol-sprayed as compared with the control plants (0.6-1.1 % vrs 3.6 %).

In regard to production cost, it varies between \$ 0.03/L and \$ 0.19/L for cow-manure based biols and \$ 0.08/L to \$ 0.24/L for those made of fermented grass. The main difference is the cost associated with collecting banana stalk juice.

This thesis should be regarded a preliminary work, well designed experiments should be established in order to test biols as soil inoculants, its potential for soil fungi and nematode control, as well as its effect on fertilizer uptake.

Key words: Biols, fermented juices, fermentation, IMO's.



## 1. INTRODUCCION

En la producción bananera, al igual que en otros sistemas de producción agrícola, se generan desechos orgánicos (fruta de rechazo, pinzote, lixiviados, etc.) que podrían ser tratados para reintegrarlos al agrosistema. Esto conlleva un costo financiero, pero ofrece una oportunidad para la sostenibilidad del sistema, toda vez que estos materiales pueden ser descompuestos y mejorar el balance de materia orgánica y la actividad microbiana en los suelos, con el consecuente incremento en la eficiencia del uso de fertilizantes convencionales. Por lo tanto el reto es desarrollar e implementar técnicas y metodologías para la reutilización de estos subproductos, de tal forma que las ventajas sean vistas como una inversión ambientalmente sostenible.

La reutilización de desechos permitiría a las empresas estar a la vanguardia con las exigencias de los mercados, los cuales son cada día más exigentes en cuanto a la calidad, inocuidad y la responsabilidad social.

Las empresas bananeras, se encuentran frente al reto de aumentar la producción, reducir el impacto ambiental y disminuir el uso de agroquímicos. Este reto es ilustrado con el surgimiento de iniciativas para la reducción del uso de pesticidas en el cultivo de banano, como el *Banana Pesticide Reduction Plan*, planteado por la Universidad de Wageningen, la Corporación Bananera Nacional y los productores nacionales, incluyendo las compañías transnacionales, así como investigaciones recientes por parte de la universidad EARTH, departamentos de investigación privados y los mismos productores independientes.

Actualmente se ha generado un esfuerzo por investigar y valorar técnicas utilizadas en otros tipos de sistemas agrícolas, y su implementación en la producción de banano, con la finalidad de reducir el uso de agroquímicos. Existen varias vías: uso de inoculantes microbianos (micorrizas, *Trichoderma*, bacterias descomponedoras, bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo, hongos micoparásitos y nematoparásitos), compost y abonos orgánicos.

Dentro de ésta última categoría están los abonos orgánicos fermentados en estado líquido, a base de extractos de plantas, residuos fermentados, lixiviados, compost. Aunque estos productos son fuentes de nutrientes, su mayor aplicación es el suministro de sustancias complejas (carbohidratos, proteínas, enzimas, metabolitos secundarios, etc.) y el mismo inóculo microbial, el cual permite aumentar la actividad biológica de los suelos. Sin embargo hasta la fecha no hay publicaciones de su efectividad en el cultivo de banano en forma convencional, ya sea como componente de un programa de fertilización o por su potencial para el control de plagas y enfermedades. No hay informes de experimentos debidamente replicados y con los controles apropiados. Tampoco se conoce su valor nutricional y la dinámica poblacional de los microorganismos involucrados, aunque la Corporación Bananera Nacional está realizando estudios básicos en el mismo tema.

Este es el fundamento del trabajo propuesto, mediante el cual se pretende producir y caracterizar química y microbiológicamente varios tipos de biofermentos o bioles para su valoración como alternativa o complemento al programa de manejo nutricional comercial. La premisa del trabajo es que los bioles podrían constituirse en una forma de aprovechar los desechos generados por la actividad y disminuir el uso de agroquímicos, con lo cual se podría lograr una disminución en los costos y generar un sistema de producción con un menor impacto ambiental. Esta investigación pretende generar información concerniente al efecto de las materias primas utilizadas en la producción de bioles, así como el aporte de los organismos dominantes en los bioles y servir como base para futuras investigaciones.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Producir y caracterizar química y microbiológicamente varios tipos de bioles para uso en el cultivo de Banano (*Musa sp*).

### **2.2. Objetivos específicos**

- Establecer una metodología para la producción de Bioles.
- Caracterizar microbiológicamente los bioles durante el proceso de fermentación.
- Determinar la composición química de los Bioles desarrollados.
- Estimar el costo de producción de los Bioles desarrollados.
- Evaluar el efecto de la aplicación de bioles sobre el crecimiento de un almácigo de banano.

## **3. HIPOTESIS**

### **3.1. Hipótesis técnica**

Mediante la aplicación de Bioles, dentro del programa de manejo nutricional en vivero, las plantas de banano tendrán un mayor crecimiento en biomasa y alcanzarán el tamaño mínimo para trasplante antes que las plantas con el manejo convencional sin biofermentos.

## 4. REVISION DE LITERATURA

### 4.1. Generalidades del cultivo de banano

El banano (*Musa acumminata AAA*) es una planta herbácea, perenne y monocotiledónea; que posee cormos carnosos de los cuales se origina el pseudotallo aéreo, además de las numerosas yemas laterales que al desarrollarse formarán los nuevos hijos. Las hojas poseen una distribución helicoidal y sus bases nacen circundando al cormo, y se desarrolla el pseudotallo, a través del cual crece la inflorescencia, siendo esta terminal (Soto, 1992 y Ortíz *et al.*, 2001).

A nivel mundial el banano es una de las frutas más importantes y se encuentra ampliamente distribuido en los trópicos y subtrópicos. La actividad bananera inició en Costa Rica a partir del año 1872, posicionándose como una actividad de gran influencia social, económica y cultural para el país (Soto, 1992, Ortiz *et al.*, 2001). Su producción tienen un gran impacto en la economía del país; ya que para el año 2008 el área bananera alcanzó las 43,313 hectáreas, con una productividad de 2,325 cajas por hectárea y logrando generar 35,451 empleos directos; además de haber representado 7% de los ingresos del país por exportaciones (US\$ 674 millones) (CORBANA 2009). Costa Rica ocupa el primer lugar en productividad, lo cual es en parte el resultado del esfuerzo de investigación realizada por las empresas productoras y la Corporación Bananera Nacional.

### 4.2. Retos de la agricultura Moderna-Futura

Actualmente se está generando un cambio de sistemas agrícolas altamente industrializados, poco sostenibles ambientalmente, basados en la máxima productividad mediante el uso intensivo de insumos sintéticos, a sistemas alternativos de producción de menor impacto ambiental (Restrepo 2001). Los primeros han desarrollado sus sistemas productivos bajo la visión del suelo como un medio; y como menciona Benzing (2001), en algunos casos hasta los ven como un sustrato, que sirve

solo para sostener las raíces mientras todos los requerimientos nutricionales del cultivo, son suministrados en forma artificial. (Kinsey y Walters 2006). Dicho concepto sobre el suelo hace que se desvaloricen las grandes funciones de los suelos dentro de los agroecosistemas en donde sirven de hábitat para diversos organismos, regulan los ciclos del agua, carbono, intercambio de radiación y calor con la atmosfera y su importante función tampón y filtro para el agua, ácidos y sustancias tóxicas (Benzing, 2001). Todo esto por medio de mecanismos bien engranados, en donde el equilibrio es fundamental, para mantener el sistema estable.

Un sistema de producción agrícola ideal debería ser desarrollado de forma tal que permita la producción sostenida de alimentos a largo plazo, en cantidad suficiente para la creciente población mundial; pero además debe ser, económica, ambiental y socialmente sostenible, para lo cual debe ser auto-contenida y regenerativa; de forma que proteja a los productores y a los consumidores (Higa y Parr, 1994). Esto implica, teóricamente, manejar correctamente todas las partes del sistema con base en el conocimiento de las complejas interacciones de los microorganismos del suelo, que para comenzar es bastante fragmentario e incompleto.

Benzing (2001) menciona que al estudiar sistemas de agricultura tradicional que se han mantenido a lo largo de los años en convivencia con la naturaleza, se observa que han tenido que desarrollar soluciones por medio de prueba y error; para aprovechar los potenciales de sus zonas de producción, así como para superar sus limitaciones. En esto el autor es claro, no se trata de estar “a favor o en contra” de la agricultura orgánica o ecológica que intentan implementar estos valores, sino de “comprender el carácter dinámico” de los sistemas de agricultura tradicional. De forma tal que se puedan aprovechar las cualidades de cada sitio y mejorar sus problemas, pero sin destruir lo que vive en ella.

Se sabe que la microbiota repercute directamente sobre el desarrollo de las plantas, e indirectamente sobre la calidad de las cosechas, al mejorar la resistencia a plagas y enfermedades; y al inducir la producción de sustancias bioactivas en las

plantas (Higa y Parr, 1994). Se conoce que cuando las plantas poseen deficiencias de nutrientes como fósforo y zinc, aumentan los niveles de exudados en la rizosfera, fomentando el aumento de organismos específicos, que a la vez incrementan la disponibilidad de los nutrientes (Benzing, 2001). Pero a pesar de esto, los microorganismos del suelo continúan siendo uno de los componentes más complejos y menos comprendidos del ecosistema suelo como lo mencionan Benzing (2001) y Stanier *et al* (1992).

Así como también se debe recuperar las condiciones del suelo para facilitar el desarrollo de los mismos, a través de la incorporación de materia orgánica, que le brinde condiciones y alimento apropiado a la microbiología presente, para lograr fomentar las interrelaciones beneficiosas que genera el equilibrio de estos.

#### **4.3. La materia orgánica**

La materia orgánica es una mezcla de materia parcial o totalmente descompuesta; con una estructura a base de carbono en donde dicha composición depende de los ingresos (residuos vegetales, animales, sustancias sintetizadas microbiológica o químicamente y de fertilizantes), así como de las salidas. La materia orgánica posee cantidades variables de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre y muchos otros elementos traza, además de que su formación es un proceso muy complejo y consecuente (Briceño y Gadea, 2002 y Samaniego, 2006).

La materia orgánica del suelo es procesada mediante la acción de los microorganismos hasta mineralizarse en compuestos estables como el humus, el cual está compuesto por huminas, ácidos húmicos y fúlvicos, y tiene gran influencia en la capacidad que tiene un suelo de retener o poner a disposición los cationes y aniones a la planta (Fallas, 2002). Dicho proceso se ve favorecido por condiciones de poca aireación y bajos pHs, así como los hongos favorecen la humidificación y las bacterias la mineralización (Benzing, 2001). Los ácidos húmicos y fúlvicos tienen influencia sobre la capacidad de intercambio catiónico (CIC), mientras que la capacidad de intercambio

aniónico está dada por las huminas; éstos tienen influencia sobre la disponibilidad del nitrógeno (en forma amoniacal o nítrica respectivamente) así como de potasio, calcio, magnesio, cobre, hierro, manganeso y zinc el primero, fósforo, azufre, boro, molibdeno y cloro (Lampkin, 2001). Por lo tanto existe una relación directa y estrecha entre el contenido de humus y la fertilidad del suelo. Además la materia orgánica incrementa la aireación y retención de humedad lo que permite un mejor desarrollo de la raíz.

En adición, el humus producto de la descomposición de la materia orgánica no sólo promueve la actividad microbiana responsable de los procesos de mineralización, amonificación, nitrificación y fijación de nitrógeno entre otros sino también, tal como lo indica Samaniego (2006), sirve de reservorio para muchos microorganismos antagonistas de fitopatógenos, bacterias fijadoras de nitrógeno o bien de tipo simbiótico como algunas micorrizas, entre otras.

Existen varias formas de recuperar o regenerar esta fracción del suelo, especialmente con el uso de abonos orgánicos y algunas metodologías de producción, cuya popularidad ha venido aumentando en las últimas décadas. El tipo más común es la aplicación de estiércoles de animales domésticos, debido a la facilidad para conseguirse, y en algunos casos, como solución al manejo de desechos de las actividades pecuarias (Briceño y Gadea, 2002). El uso de abonos producidos a partir de residuos orgánicos apoyan las nuevas tendencias sobre el reciclaje y reutilización de los desechos de producción.

Sin embargo, el uso de estiércol debe estar basado en parámetros físicos y químicos que define el grado de madurez y determinan el uso final más adecuado según sus características. Además este conocimiento permite establecer índices de calidad e inocuidad que deben cumplir los abonos orgánicos en sus diferentes presentaciones, con el objetivo de evitar toxicidades por salinidad, metales pesados, nitratos; además de potenciar los procesos beneficiosos (Briceño y Gadea, 2002).

#### 4.4. Bioles (biofertilizantes líquidos y biofermentos)

En busca no sólo de reactivar el suelo sino también de proponer una solución sostenible para depender menos de los fertilizantes sintéticos, e intentar reducir los costos, nace un creciente interés en la valoración y el uso de los Biofermentos y Biofertilizantes, conocidos en su conjunto como Bioles. Estos productos se elaboran a partir de la fermentación semicontrolada de insumos naturales de fácil obtención, como los estiércoles, residuos vegetales, melaza y algún inóculo microbial (Uribe, 2003 y Galindo y Jerónimo, 2005). Pueden servir *per se* como una fuente alternativa de microelementos, o mezclado con sales minerales como Biofertilizante (Urtecho, 2005 y Samaniego, 2006). Y como mencionan Campos y Meneses (2008), los Bioles son una fuente de fitoreguladores que a pesar de encontrarse en pequeñas concentraciones, su efecto puede ser notable en las plantas; presentando efectos de interés agronómico, tales como enraizamiento, calidad de follaje, floración, germinación.

Sin embargo la rápida popularización de esta herramienta ha traído como consecuencia la aplicación de métodos de producción no estandarizados, al no existir suficientes bases científicas que demuestren no sólo su efectividad, tanto en la planta como en el suelo, sino que permitan tener o generar información sobre su modo de acción y garanticen aspectos de calidad e inocuidad. (Restrepo, 2001; Galindo y Jerónimo (2005).

#### 4.5. Posibles modos de acción de los Bioles

A pesar de las pocas investigaciones que describan el modo de acción de los bioles, se manejan varias hipótesis sobre la forma en que estos podrían mejorar la producción de las plantas. Dichas formas de acción han sido estudiadas a lo largo del tiempo por las diferentes ramas de la biología, así como por las ciencias agronómicas; al investigar el comportamiento de las poblaciones microbiales tanto en sistemas naturales como en sistemas agrícolas. Los bioles, como mencionan Campos y Meneses (2008), básicamente son una fuente microbial, enriquecida por metabolitos



secundarios producidos por los diferentes microorganismos presentes. De lo que se deduce que las posibles formas de acción se basan en el comportamiento de poblaciones microbiales. Algunas hipótesis del modo de acción son las siguientes.

- *Generación de metabolitos secundarios*

Los microorganismos a lo largo de su ciclo de vida, liberan sustancias, las cuales en algunos casos poseen efectos biocidas (Lampkin, 2001). En otros casos la liberación de metabolitos secundarios induce a la planta a producir fitoalexinas, como es el caso de la quitina y su derivado el quitosano, que en algunos estudios se han utilizado para inducir resistencia en plantas (Arauz, 1998 y Lampkin, 2001).

La activación de estos procesos de defensa e inducción de resistencia se inician, como menciona Arauz (1998), debido a que algunas moléculas presentes en la superficie de los patógenos, así como moléculas secretadas por los mismos, conocidas como “Elictores”, inducen una activación de los mecanismos de defensa en las plantas, Estos procesos son activados mediante la acción de genes específicos de resistencia contra el patógeno, pero pueden conducir a la inducción de resistencia a otros patógenos, contra los cuales la planta no posee genes específicos de resistencia (Arauz, 1998), fenómeno conocido como resistencia sistémica inducida (SIR); aunque también se podría dar una resistencia sistémica adquirida (SAR). Ambas respuestas se pueden lograr al inocular con microorganismos no patogénicos, pertenecientes al mismo género de patógenos de interés. Un ejemplo de un elicitor es el ácido araquidónico y el ácido 5,8,11,14,17-*cis*-eicosapentaénico; producidos por el hongo *Phytophthora infestans*, capaces de inducir la activación de los sistemas de defensas (Jankiewicz, 2003). Así como también la materia orgánica libera ciertos complejos como los fenoles que pueden mejorar su resistencia contra patógenos (Benzing, 2001).

Arauz (1998) menciona que en caso de lograr una resistencia inducida, esta puede ser de amplio espectro. Se ha encontrado que una sola inducción puede generar resistencia a una planta contra varias enfermedades no relacionadas. Así como

también puede suceder lo que describe Jankiewicz (2003) con el caso del pepino en donde al ser infectado con cualquiera de los hongos *Colletotrichum lagenarium*, *Cladosporium cucumerinum*, la bacteria *Pseudomonas lachrymans* o el virus TMV, se logra desarrollar resistencia no solo contra el patógeno que infecto la planta, sino también contra todos los patógenos pertenecientes al género.

- *Efecto masa*

Cuando se realiza una aplicación de un inóculo microbial, ya sea al follaje o al suelo, se inunda el sitio con una alta población microbial, la cual compite contra la población nativa. Los microorganismos saprofitos compiten con patógenos que son saprofitos o parásitos facultativos por los nutrientes presentes en la zona en donde fueron inoculados y pueden llegar a impedir la infección, debido a que rápidamente invaden y colonizan el espacio físico que podría servir de entrada al patógeno, como una herida o porque privan a éste de nutrimentos esenciales para su desarrollo o infección. Por ejemplo bacterias saprófitas del grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes producen una molécula con gran afinidad por el hierro (sideróforo) que le permite competir por hierro y suprimir algunas enfermedades causadas por hongos. También algunas levaduras y hongos; como *Gliocladium roseum* colonizan las hojas y flores endofíticamente e inhiben por competencia la esporulación de *Botrytis cinerea* (Arauz 1998).

- *Efecto antagonista directo.*

Además del efecto por competencia, también está la acción directa por antagonismo, en donde organismos específicos son incompatibles con patógenos, por lo cual el inocular con estos microorganismos, permite la eliminación del fitopatógeno (Lampkin, 2001). Dicha incompatibilidad ha llevado al estudio de bacterias saprofitas con especies de hongos y bacterias fitopatógenas. Entre las bacterias mas estudiadas como antagonistas de fitopatógenos se encuentran *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* (Arauz, 1998).

- *Quelación orgánica*

La actividad microbiana al liberar una gran cantidad de metabolitos, como ya se mencionó, entre los cuales se encuentran aminoácidos, ácidos orgánicos, entre otros; los cuales poseen la cualidad de ser quelatantes naturales, al adherirse a los metales cubriéndolos e impidiendo que reaccionen con otros elementos (WALCO, 1997); permitiendo que los minerales sean absorbidos con mayor rapidez. También la materia orgánica puede retener quelatos, logrando así regular la liberación de oligoelementos; evitando niveles tóxicos de microelementos (Lampkin, 2001 y ORIOUS s.f.).

Dicho fenómeno, es uno de los medios por los cuales se podría justificar la aplicabilidad de los inóculos microbiales. La quelación orgánico mineral facilita la asimilación de nutrientes debido a que la molécula mineral con tamaño molecular muy pequeño y bajo peso molecular adquiere carácter orgánico y de esta forma es fácilmente identificada por la planta. Dicha facilidad y velocidad de absorción es lo que caracteriza a la nutrición quelatada de resolver rápidamente deficiencias en plantas, logrando la estabilización nutricional (ORIOUS s.f.). En el caso de aplicar los quelatos al suelo, estos incrementan la movilidad de los metales quelatados, tanto por difusión como por movimiento de masa, aumentando así la disponibilidad del metal al sistema radical (WALCO, 1997).

Algunos de los principales quelatantes orgánicos son: el ácido Cítrico, el ácido Málico, el ácido Tartárico, el ácido Glucónico, el ácido Láctico y el ácido Acético. Muchos otros compuestos químicos como los ácidos húmicos, los ácidos lignosulfónicos, los poliflavonoides, algunos aminoácidos, algunos polisacáridos y algunos polialcoholes tienen propiedades quelantes (WALCO, 1997). Benzing (2001) menciona que los ácidos fúlvicos presentan la cualidad de formar quelatos y facilitar la absorción de elementos como el hierro, zinc, cobre y cobalto.

#### 4.6. Algunos insumos de uso común en bioles

La producción de Bioles, está muy poco estandarizada, ya que en el país se manejan varias metodologías, las cuales varían en ingredientes orgánicos, inóculos microbiales, fuentes energéticas, tipo de fermentación y duración de la misma, lo cual influye aún más en los productos resultantes del proceso de desarrollo de Bioles. A continuación se describirán las características y algunas propiedades de los insumos de interés para esta investigación.

##### 4.6.1. Boñiga

El uso de la boñiga como fertilizante, gracias a su disponibilidad y efectividad, se remonta a los inicios de la agricultura. Nutricionalmente los estiércoles de animales bovinos en forma fresca contienen un porcentaje medio de nitrógeno (1.67%) (CEDECO 2005), el cual es soluble en un 70%, del cual 20% está en forma de proteína y 30% en forma de urea y amoniaco (Pérez-Gavilán y Viniegra s.f.). Además del aporte de otros elementos como se aprecian en el cuadro 1, por lo cual son muy utilizados para realizar procesos de compostaje y otros abonos orgánicos más acabados. (Solórzano y Alvarado 2002).

**Cuadro 1.** Aporte nutricional del estiércol bovino.

<b>Humedad</b>	<b>Nitrógeno</b>	<b>Fosforo</b>	<b>Potasio</b>
83.2 %	1.67 %	1.08 %	0.56 %

Adaptado de CEDECO 2005.

La boñiga es ampliamente utilizada en la elaboración de Bioles, principalmente como fuente de microorganismos tales como levaduras, hongos, bacterias, y protozoos, los cuales juegan un papel primordial en el proceso de fermentación al digerir y metabolizar los ingredientes del biol, liberando elementos nutritivos, disponibles para las plantas (Restrepo 2001; Mazariegos y Colindres 2002; Galindo y Jerónimo, 2005). Además tienen la facilidad de adaptarse a condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas, (Mazariegos y Colindres, 2002), logrando la degradación de sustancias

orgánicas complejas en sustancias menos complejas como ácidos orgánicos simples, alcoholes y metano, entre otros (Galindo y Jerónimo, 2005). Sin embargo el crecimiento microbiano en los estiércoles está limitado principalmente por la poca cantidad de carbohidratos que se encuentra disponible en estos (Pérez-Gavilán y Viniegra s.f.).

Pero así como es una fuente de microorganismos de interés para los procesos fermentativos de los bioles, también presentan el inconveniente de ser una fuente de bacterias patógenas para animales y humanos como es el caso de *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*; por consiguiente se deben de tomar las medidas del caso para evitar riesgos contra la salud humana.

#### 4.6.2. Suero de leche

El suero es un subproducto del proceso de elaboración del queso, en donde al cuajar la leche, se separa la caseína de la grasa, obteniéndose una fase acuosa, la cual recibe el nombre de suero o lactosuero. Este subproducto como se observa en el cuadro 2, contiene el 83% del alimento que contiene la leche entera, en sustancias solubles como lactosa, proteínas, sales minerales y grasa, además de la mayor parte del agua contenida en la leche entera (Obregón *et al.*, 2000; Mazariegos y Colindres, 2002).

**Cuadro 2.** Composición mineral del lactosuero. En mg/L.

<b>N*</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Mn</b>	<b>B</b>	<b>Zn</b>	<b>Mo</b>	<b>S</b>
825	299	1308	328	22.2	5.75	1.82	0.95	2.76	389

Tomado de Obregón *et al* 2000. \* Nitrógeno Total (Kjeldahl)

El lactosuero es utilizado como un nutriente en aplicaciones foliares, así como en la elaboración de abonos orgánicos fermentados; como fuente de grasas, vitaminas, proteínas, aminoácidos y de microorganismos presentes en el mismo entre los que se pueden encontrar los citados en el cuadro 3. Siendo utilizados principalmente los lácticos (Restrepo 1998; Mazariegos y Colindres, 2002). Estos compuestos pueden tener efecto contra plagas y enfermedades, por ejemplo, en el caso de *Erwinia sp.* se

ha observado un efecto bacteriostático por la producción natural de antibióticos del tipo nisina por microorganismos presentes en el suero, principalmente *Streptococcus lactis* descrito por Alifax y Chevalier (1962) citado por Obregón y colaboradores (2000); así como a su bajo pH (5.5), como lo menciona Alais (1993), citado por el mismo autor.

**Cuadro 3.** Composición microbiológica del Lactosuero.

<b>Microorganismo</b>	<b>Cantidades</b>	<b>Unidad</b>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	1 x 10 <sup>6</sup>	UFC/ml
Levaduras diferentes	21 x 10 <sup>3</sup>	UFC/ml
<i>Streptococcus lactis</i>	3 x 10 <sup>6</sup>	UFC/ml
<i>Lactobacillus casei</i>	2 x 10 <sup>6</sup>	UFC/ml
<i>Streptococcus thermophilus</i>	3 x 10 <sup>6</sup>	UFC/ml
<i>Penicillium sp</i>	2 x 10 <sup>3</sup>	UFC/ml
<i>Rhyzopus sp</i>	6 x 10 <sup>3</sup>	UFC/ml
<i>Oidium lactis</i> (conteo microscópico)	3 x 10 <sup>3</sup>	UFC/ml
<i>Mucor sp</i>	1 x 10 <sup>3</sup>	UFC/ml
<i>Asperigillus sp</i>	2 x 10 <sup>3</sup>	UFC/ml

Tomado de Obregón *et al* 2000.

#### 4.6.3. Melaza

Es un subproducto del proceso de la industria azucarera al separar el azúcar refinado del azúcar crudo, proceso por el cual se extraer la mayor parte de la sacarosa (Galindo y Jerónimo, 2005), sin embargo al terminar el proceso se obtiene un jarabe oscuro muy viscoso constituido en un 94%, por carbohidratos (poli y monosacáridos), además de un 4-10% de proteína (Talavera *et al.*, 1996). Por el alto contenido de carbohidratos (sacarosa, glucosa, levulosa, maltosa, lactosa y azúcares reductores), el alto contenido de potasio, calcio, magnesio y micronutrientes, principalmente boro, la melaza es una rica fuente energética (Talavera *et al.*, 1996) y un medio ideal para la multiplicación de microorganismos (Restrepo, 2002). Por lo tanto la melaza es muy utilizada para mejorar los procesos de fermentación, durante la elaboración de los diferentes abonos orgánicos (Restrepo, 2001). En el siguiente cuadro (4) se presentan

los valores obtenidos en una muestra de melaza. Así como en el cuadro 5 se presenta el análisis de metales pesados de la misma.

**Cuadro 4.** Composición mineral de la melaza.

N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B	Al-ex	Si-ex	C.E.
g/L											mg/L		mS/cm
9.16	575	30189	14322	3154	9618	390	11.3	8.76	65.8	1.19	43.1	968	0.45

Fuente: SFCo 2009.

**Cuadro 5.** Análisis de metales pesados presentes en la melaza. En mg/L.

Sb	Cr	Cd	Pb	As
< 3	1.56	< 0.4	< 5	< 5

Fuente: SFCo 2009.

#### 4.6.4. Semolina

Es un subproducto del pulido del grano de arroz, y corresponde a las capas de aleurona. Tiene un alto valor nutricional presenta 12% de proteína cruda, 15% de extracto etéreo (grasas), 10% de fibra cruda, alrededor de 0.05% de calcio y 1.5% de fosforo, como se presenta en el cuadro 6; por dicho aporte se utiliza en alimentación animal y humana.

**Cuadro 6.** Composición nutricional de la semolina de arroz.

Proteína Cruda	Extracto Etéreo	Fibra Cruda	P	Ca
12%	15%	10%	1.50%	0.05%

Tomado de etiqueta del producto comercial (Materias primas para concentrados Ojo de Agua S.A.)

#### 4.6.5. Lixiviado de pinzote

Durante el proceso de empaque en la planta empacadora, las “manos” son separadas de los racimos de banano, dejando el raquis (pinzote) como desecho. El

manejo comercial varía, desde su incorporación en el campo sin procesar, composteo, material para la producción de bokashi o se almacena en fosas para su descomposición natural. La savia del raquis, es extraída mecánicamente por macerado o por compresión, el líquido o lixiviado, aunque tiene contenidos minerales bajos, con excepción del potasio (Cuadro 7), podría ser un insumo adicional en el programa de fertilización foliar o como componente del biofermento. Sin embargo la gran cantidad de sales disueltas representan un inconveniente debido a que causa quema en los follajes debido a su alta conductividad eléctrica, como se puede apreciar en el cuadro 7.

**Cuadro 7.** Composición mineral del lixiviado de pinzote.

N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B	Al	pH	C.E
(g/L)	(mg/L)											(mS/cm)	
0.5	73.8	8726	42	35	60	2.5	0.04	0.31	0.79	0.47	0.46	9.5	16.2

Fuente: SFCo 2009.

#### 4.6.6. *Pasto*

En la elaboración de algunos bioles se utiliza pasto fresco, como fuente de carbohidratos (Restrepo, 2001). Generalmente los pastos utilizados, al igual que la elección de muchas materias primas para la elaboración de los bioles producidos por los agricultores, es definida por la disponibilidad en el mismo sistema productivo. Para la realización del presente estudio se utilizó pasto de corte Maralfalfa (*Pennisetum sp.*), el cual es de crecimiento perenne y con una alta tasa de crecimiento; nutricionalmente es muy rico en carbohidratos y llega a presentar niveles proteicos de hasta 17.2 % en peso seco (Pasto maralfalfa s.f.); aunque a los 35 días de edad, Molina (2005) reporta 12.46%, por lo que es una fuente rica en nitrógeno; además es succulento al contener un 13.7% de materia seca a la misma edad de corte.

#### 4.6.7. *Inoculo microbial*

El factor que se considera primordial en los Bioles son los inoculantes, los cuales consisten en poblaciones complejas de microorganismos, bacterias, levaduras, hongos,



los cuales al estar en presencia de carbohidratos y sales minerales se multiplican a varios órdenes de magnitud (Galindo *et al.*, 2007). Las poblaciones de microorganismos antagonistas a patógenos también se incrementan lo cual incide en una reducción de las enfermedades, tal como es el caso del hongo *Trichoderma*, varios actinomicetes y de otros microorganismos que producen antibióticos tóxicos para bacterias fitopatógenas u otros patógenos (Agrios, 1988; Madigan *et al.*, 2004). Además, como lo demuestran investigaciones mencionadas por Tejada (2002), citado por Samaniego (2006), los hongos de los géneros: *Penicillium*, *Trichoderma* y *Aspergillus* y actinomicetes del género *Streptomyces*, así como también bacterias del género *Bacillus* mencionadas por Okumoto (2003), presentan efectos biostáticos y biocidas sobre los fitopatógenos. En este último caso se ha detectado en el género *Bacillus*, la capacidad de producir diferentes antibióticos como la estreptomina, griseofulvina, cicloheximida, tetraciclina, penicilina (Okumoto 2003).

Además durante sus procesos metabólicos, los microorganismos sintetizan y liberan vitaminas como es el caso de las bacterias del género *Pseudomonas* las cuales producen tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, biotina. Adicionalmente Okumoto (2003) menciona la capacidad de las levaduras, hongos filamentosos, rizobacterias y algunos hongos basidiomicetes para producir vitamina B12, riboflavina, ácido pantoténico, piridoxina, ácido para-aminobenzoico.

La complejidad de las poblaciones microbiales en los bioles, tanto por diversidad como cambios de biomasa en el tiempo, implican que las cantidades y diversidad de los diferentes metabolitos (vitaminas, fitohormonas, factores de crecimientos, antibióticos) van a variar de forma similar dependiendo de la cantidad y tipo de microorganismos presentes en un inoculo microbial. A su vez, estas poblaciones varían según las condiciones físicas y químicas, ya que cada condición específica (pH, temperatura, sustrato, concentración de oxígeno, entre otras condiciones), favorece el crecimiento de solo algunos microorganismos y puede ser dañino para otros grupos de microorganismos. Por tanto, la composición poblacional en un hábitat concreto está

determinada en gran parte por las características físicas y químicas de ese medio (Coyne 2000 y Madigan *et al* 2004).

Algunos microorganismos son capaces de inducir respuestas de resistencia (resistencia sistémica adquirida e inducida, SAR e ISR, respectivamente), que incluyen entre otras respuestas la síntesis de fitoalexinas por parte de las plantas en respuesta a elicitores fúngicos (Agrios, 1988; Stanier *et al* 1992). En el caso de bioles es probable que la síntesis de elicitores y secreciones enzimáticas liberadas por los diferentes hongos y bacterias, inhiban el desarrollo de organismos patógenos cuando sean aplicados sobre las plantas.

Para lograr un efecto sustancial con las aplicaciones de inoculantes microbianos, estos deben presentar poblaciones iniciales altas para asegurar un efecto inundativo, tanto poblacional, así como una cantidad considerable de metabolitos secundarios, sustancias bioactivas y biocidas a patógenos, de forma que se logren los efectos positivos sobre la producción y protección de los cultivos (Higa y Parr 1994).

#### 4.6.7.1. *Microorganismos Efectivos (EM-1®)*

EM-1® es un inoculante líquido, compuesto por “Microorganismos Efectivos™”, producido a través del proceso de fermentación, cuyos componentes son agua (96%), melaza (3%) y contiene como ingrediente activo un millón de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodospseudomonas palustris* (1%); los cuales no son patógenos ni tóxicos (EMRO, 2008).

Además estos microorganismos son facultativos, por lo tanto se pueden desarrollar bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Se distribuye en estado líquido y presenta un color de café a café oscuro y un olor agridulce. Cuando el EM-1® es activado, este debe presentar un pH inferior a 3,7- 4, un olor agradable a fermentación y mínima o

nula presencia de levaduras en la superficie, los cuales son indicadores de calidad (EMRO, 2008). El producto fue desarrollado por Teruo Higa (Higa, 2002, Mau, 2006), a través de mezclas equilibradas entre especies de microorganismos con cualidades beneficiosas (incremento en productividad y reducción de enfermedades, descomposición acelerada de la materia orgánica), y capaces de ser almacenados a largo plazo sin perder viabilidad. Las especies que conforman el EM son capaces coexistir, los organismos aeróbicos sobreviven del oxígeno residual liberado por los anaeróbicos y estos del dióxido de carbono que liberan los aerobios.

Con el inóculo ya establecido Teruo Higa estableció pruebas de campo que posteriormente demostraron como la tecnología EM era una solución a muchos problemas como la caída de los rendimientos en el cultivo de arroz, en donde se alcanzaron aumentos de hasta 3 toneladas/hectárea respecto a la producción convencional, además de una menor incidencia de plagas y enfermedades en los campos de cultivo que utilizaban los microorganismos efectivos.

Luego de los buenos resultados en Okinawa (Japón) la tecnología EM se propagó por varios países del mundo y en Costa Rica, a partir del año 1997, la universidad EARTH, mantiene investigaciones sobre dicha tecnología (Fioravanti *et al.*, 2005).

#### 4.6.7.2. *Microorganismos de Montaña (MM)*

Los “Microorganismos de Montaña” (MM), son un inoculante complejo, generalmente proveniente de la captura y multiplicación de microorganismos, provenientes de zonas ricas en biodiversidad microbiana como el mantillo del sotobosque (Restrepo, 2001). Este es el principio a partir del cual los investigadores japoneses desarrollaron los EM enriquecidos con microorganismos descomponedores de materia orgánica (Samaniego, 2006)

Básicamente la hojarasca o mantillo del bosque funciona como una fuente de inóculo rica en microorganismos descomponedores y fermentadores de la materia

orgánica; la cual es colocada en un sustrato rico en nutrientes, humedad y temperatura adecuada y condiciones anaeróbicas para que las poblaciones microbiales se multipliquen masivamente (Restrepo, 2001; Quirós *et al.*, 2004 y Samaniego, 2006).

Unas de las características que han fomentado el uso de MM, es el hecho de que se trata de un inóculo de microorganismos nativos de la región, de bajo costo y de fácil disponibilidad (Restrepo, 2002 y Quirós *et al.*, 2004). La expectativa es que estos van a tener mayores efectos positivos que negativos en la microbiología del suelo circundante a la zona de aplicación al encontrarse en condiciones agroecológicas adecuadas para su desarrollo (Quirós *et al* 2004; Urtecho 2005 y Samaniego 2006). Sin embargo, el producto presenta la desventaja de no permitir una selectividad en las poblaciones, por lo tanto microorganismos benéficos y patógenos pueden ser capturados e incorporados al Biol.

#### 4.7. La fermentación

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta, totalmente anaeróbico, siendo el producto final un compuesto orgánico. La fermentación típica es llevada a cabo por las levaduras, aunque también algunos metazoos y protistas son capaces de realizarla (Restrepo, 1998; Mazariegos y Colindres, 2002). El proceso de fermentación es anaeróbico ya que se produce en ausencia de oxígeno; ello significa que el aceptor final de los electrones del NADH producido en la glucólisis no es el oxígeno, sino un compuesto orgánico que se reducirá para poder reoxidar el NADH a NAD<sup>+</sup>. El compuesto orgánico que se reduce (acetaldehído o piruvato) es un derivado del sustrato que se ha oxidado anteriormente (Pirt, 1975; Stanier *et al* 1992; Frioni, 1999).

Al iniciar el proceso de fermentación, la materia orgánica cuenta con largas cadenas estructurales de carbono, las cuales en las primeras etapas son degradadas por bacterias anaeróbicas facultativas, tolerantes a acidez y temperatura, para formar cadenas más cortas y simples, mediante la liberación de hidrogeno y dióxido de

carbono, logrando convertirla en ácidos orgánicos (Pirt 1975). Esta primera fase se conoce como hidrólisis.

Posteriormente las bacterias acetogénicas degradan los ácidos orgánicos en la fase de acidificación, convirtiéndolas al grupo acético y liberando hidrógeno y dióxido de carbono; por medio de una reacción endotérmica, lo cual se logra gracias a la relación simbiótica con las bacterias metanogénicas que utilizan los productos finales del medio, bajando la concentración en las cercanías de las bacterias a niveles que son el punto de reacción y actividad de las bacterias acetogénicas; lo que permite mantener las reacciones energéticas equilibradas (Pirt, 1975; Frioni, 1999).

Y finalmente, en la fase final el ácido acético y otros ácidos orgánicos son convertidos principalmente en metano y dióxido de carbono, por medio del metabolismo de bacterias del grupo de las aqueobacterias (Pirt, 1975).

#### **4.8. Composición microbiológica**

##### *4.8.1. Bacterias*

Las bacterias son organismos microscópicos sumamente pequeños (500 a 5000 nm), en donde un gramo de bacterias equivale a un billón de individuos. Dicha característica les confiere el hecho de ser los microorganismos predominantes a nivel del suelo en cuanto a número de individuos (Benzing, 2001), en donde la mayoría son organismos estrictamente saprófitos, esenciales en la descomposición de la materia orgánica, de donde obtienen la energía vital para su ciclo de vida. Sin embargo existe una parte de ellas, que son facultativos y pueden afectar negativamente a la planta (Agrios, 1988 y Benzing, 2001). Algunos poseen flajelos que les permite moverse y algunas poseen la capacidad de formar estadios permanentes bajo condiciones desfavorables (Benzing, 2001).

Las rizobacterias, son organismos que colonizan el interior de las raíces, lo cual en algunos casos promueve el crecimiento de las plantas; lográndolo a través de la liberación de reguladores de crecimiento, vitaminas, toxinas, enzimas celulolíticas, entre otros compuestos, y en algunos casos alterando de la disponibilidad de nutrientes para la planta. Dicha capacidad hace que sean conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento (Weller (1988), citado por Samaniego (2006)).

Por el efecto que causan las rizobacterias en el crecimiento de las plantas, su modo de acción ha sido muy estudiado. Estas especies actúan en forma indirecta en donde interfiere en las poblaciones de hongos y bacterias patogénicas del área circundante a las raíces; y en forma directa al producir metabolitos estimuladores del crecimiento vegetal (Samaniego, 2006).

Químicamente las bacterias poseen una relación carbono/nitrógeno baja (4-5:1), lo cual las transforma en un alimento buscado por otros organismos como protozoos y lombrices; además mientras se encuentran vivas excretan polisacáridos, los cuales además de servir como pegamento entre partículas de minerales, también enriquece el suelo, así como al descomponerse liberan una considerable cantidad de nitrógeno a la solución del suelo (Benzing, 2001).

#### 4.8.1.1. *Lactobacillus*

Los *Lactobacillus* son bacterias de morfología bacilar, comunes en los productos lácteos (Madigan *et al.*, 2004); además actúan como descomponedoras de materia orgánica, convirtiendo los elementos minerales en complejos orgánicos disponibles a las plantas como es el caso del calcio, el fósforo y el potasio. Dichos microorganismos mediante sus procesos eliminan los malos olores generados por materiales en descomposición. Además, Quirós *et al.* (2004) mencionan que estas bacterias son útiles en la prevención de enfermedades y para acelerar procesos de compostaje.

Este género de bacterias presentan resistencia a las condiciones ácidas en comparación con otras respecto a otras bacterias lácticas; dicha capacidad les permite seguir creciendo en fermentaciones lácticas; y por consiguiente son las responsables de terminar la mayoría de los procesos de fermentación de este tipo (Madigan *et al.*, 2004).

Otra característica de los *Lactobacillus* es su capacidad antagónica con bacterias putrefactoras, como la *Erwinia sp.* cuyo control se cree podría ser por la producción de nisina, antibiótico producido por las bacterias lácticas, según Obregón y colaboradores (2000). Quirós *et al.* (2004) observaron que controla a *Fusarium sp.* y *Rhizoctonia sp.* (Pacheco 2003). Además Madigan y colaboradores (2004), mencionan que los *Lactobacillus* poseen la característica de no ser patógenos de plantas.

#### 4.8.1.2. *Bacillus*

Las bacterias del género *Bacillus* crecen en sustratos ricos en carbono, los cuales por medio de su producción de enzimas extracelulares como las hidrolasas, rompen los polisacáridos complejos, ácidos nucleicos o ácidos grasos hasta unidades asimilables por las células (Madigan *et al.*, 2004). Una gran parte de los *Bacillus*, tienen la capacidad de producir antibióticos como un metabolito secundario ligado a la esporulación, liberando antibióticos como son la bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicida y circulina (Madigan *et al.*, 2004).

#### 4.8.1.3. Actinomicetes

El grupo de los actinomicetes son bacterias filamentosas y ramificadas, con un crecimiento celular micelial y con métodos especializados de reproducción por esporas. Son bacterias Gram +, además de ser aerobias y algunas anaeróbicas facultativas u obligadas, por lo que se desarrollan bien en condiciones húmedas, bien aireadas y con pH ligeramente alcalinos o neutros (Embrapa 1998, Benzing, 2001, Madigan *et al.*, 2004 y Samaniego, 2006).

Los actinomicetes son de gran utilidad, ya que estos son capaces de descomponer la materia orgánica del suelo permitiendo la liberación de nutrientes, aun cuando sean materiales ricos en celulosa y lignina. Además poseen la capacidad de liberar nitrógeno al simplificar las partículas del humus, a través de melaninas (sustancias que brindan el color negro al suelo); y de disolver sustancias complejas en nutrientes orgánicos simples, disponibles para las plantas. También poseen la cualidad de producir antibióticos (como la estreptomicina, terramicina o aureomicina), como lo es el caso del género *Streptomyces*, (Embrapa 1998, Benzing, 2001, Madigan *et al.*, 2004). Por estas y otras características la presencia de los actinomicetes en los suelos, es un indicador de calidad del mismo como menciona Pankhurst *et al.*, (1995) citado por Samaniego (2006), Además, representan una poderosa arma para desplazar otros microorganismos por efecto antibiótico y por competencia por alimento, agua, oxígeno y espacio. Benzing (2001) además menciona que algunos géneros como el mencionado anteriormente (*Streptomyces*), tienen la cualidad de fijar nitrógeno atmosférico. Por estas características los actinos están siendo ampliamente estudiados, con el fin de descubrir nuevas metabolitos secundarios (enzimas, inmunoadyuvantes, inhibidores de enzimas) para usos clínicos, veterinarios, agroindustrial (Embrapa 1998).

Benzing (2001) también menciona que ciertos actinos pueden ser afectados por el uso indiscriminado de agroquímicos, en especial las aplicaciones de fertilizantes minerales, los cuales investigaciones han podido determinar que causan reducciones del 50% de las poblaciones de *Streptomyces*. Y en muchos casos como indica Embrapa (1998), los actinomicetos, poseen una velocidad de crecimiento inferior a hongos y a otras bacterias, ya que su capacidad de división celular es lenta. Lo cual es un problema en el aislamiento y trabajo con los mismos. Por lo cual su estudio y multiplicación son de interés para muchas industrias.

#### 4.8.2. Hongos

Los hongos son organismos bastante diversos, también así en los hábitats en los que se desarrollan, siendo la mayoría terrestres, en donde crecen en suelos o sobre



materia orgánica en descomposición y contribuyen con los procesos de mineralización del carbono orgánico. Además una gran cantidad de los hongos son parásitos de plantas terrestres, algunos de animales y de los seres humanos. (Madigan *et al.*, 2004).

Por otro lado los hongos poseen la capacidad de reproducirse tanto sexual como asexualmente, en donde la segunda les permite multiplicarse de forma rápida bajo condiciones favorables (sustratos ácidos y ricos en carbono) y la sexual (esporas) es más común bajo condiciones desfavorables. Los hongos poseen requerimientos relativamente bajos de nitrógeno, lo cual les brinda gran importancia en la descomposición de materiales como la paja y la madera. Además su metabolismo posee la característica de retener en su biomasa una mayor cantidad de la energía consumida, respecto a las bacterias (Benzing, 2001).

#### 4.8.2.1. Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares, de mayor tamaño que las bacterias (Madigan *et al.*, 2004). Son aerobios facultativos, capaces de sobrevivir en ámbitos de pH bajos y se desarrollan normalmente en condiciones ricas en azúcares como melazas, frutas y residuos vegetales. Esto sumado a la capacidad de soportar altas concentraciones de alcohol en comparación con otros microorganismos, hace que las levaduras sean las participantes de los procesos de fermentación alcohólica (Madigan *et al.*, 2004; Galindo y Jerónimo, 2005). La especie *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más conocida (Madigan *et al.*, 2004).

### 4.9. Calidad de los Bioles

Durante la producción de abonos orgánicos debe mantenerse la inocuidad de los mismos; lo que quiere decir que se debe eliminar o reducir al mínimo permitido, la presencia de microorganismos patógenos para el hombre como *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, entre otros (Soto y Meléndez 2004; Madigan *et al* 2004) y el contenido de metales pesados, que puedan afectar la salud humana (Soto y Meléndez 2004).

La determinación de la calidad de los Bioles es complicada por la variabilidad química de los diferentes insumos con los que se elaboran, así como del proceso mediante el cual se producen (fermentación aeróbica o anaeróbica) y del inóculo microbiano inicial. Esto dependiendo del tipo de proceso e inóculo así varía la composición de las poblaciones microbianas dominantes. (Restrepo, 1998).

El mal olor es el producto de una actividad microbiana no deseada (putrefacción) donde predominan altas cantidades de coliformes fecales (Quirós *et al.*, 2004) y es un indicador de calidad de bioles (Restrepo, 2001). El olor agridulce es el más característico, sin embargo dependiendo de las materias primas utilizadas, el olor podría ser un poco fuerte, sin ser indicador de un mal proceso como lo indica Zúñiga<sup>1</sup> (2009).

Los conteos de *Escherichia coli*, son utilizados, ya que esta bacteria es normal en la flora microbiana de animales de sangre caliente, por lo cual su presencia es un parámetro de medición de contaminación fecal (Fioravanti *et al.*, 2005). En cuanto a las bacterias patógenas pertenecientes al género *Salmonella* (Gram-), son de suma importancia, ya que algunas especies son causantes de enfermedades en animales y humanos; por lo que su presencia es negativa (Uribe, 2003).

Además, es necesario asegurarse que los niveles de coliformes sean lo más bajos posibles. Esto se logra regulando el pH del biol; niveles inferiores a 3.5-4.0 asegura la inocuidad del Biol, respecto a presencia de coliformes Uribe (2003).

---

<sup>1</sup> Zúñiga S, J. 2009. Metodologías y formulaciones en la producción de bioles (Comunicación personal). Departamento suelos, CORBANA. CR.

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1. Localización del estudio

La investigación se realizó en las instalaciones de la empresa Dole - Standard Fruit Company de Costa Rica S.A., en la localidad de Río Frío (Latitud 10° 20' N, Longitud 83° 57' O), perteneciente al distrito de Horquetas de Sarapiquí, Heredia. Esta se encuentra a unos 68 msnm, con precipitaciones anuales que van desde los 2800 hasta los 4900 mm; con una temperatura promedio anual de 25° C y una humedad relativa promedio alrededor del 85%. Durante la primera etapa, se desarrollaron los Bioles en condiciones bajo techo y la segunda etapa se llevó a cabo en el vivero de la empresa.

### 5.2. Manejo del ensayo

La investigación se realizó entre el mes de Enero y Junio del año 2009 y se dividió en dos etapas: en la primera etapa se elaboró una batería de diferentes bioles, los cuales fueron evaluados química y biológicamente para determinar la calidad, inocuidad y composición mineral. Al finalizar la primera etapa, se seleccionaron dos bioles, según los resultados que arrojaron los análisis químicos y microbiológicos. Luego de ser definidos los dos bioles con mayor aporte nutricional, los mismos fueron utilizados para desarrollar la segunda parte de la investigación, la cual consistió en una evaluación a nivel de vivero (bioensayo) en donde se utilizaron plantas de banano en fase IV (de producción *in vitro*, enraizadas y trasplantadas en vivero), bajo condiciones de invernadero (casa sombra controlada). Se realizaron aplicaciones foliares de los Bioles escogidos semanalmente, por un período de seis semanas. Para mayor detalle se describen a continuación las condiciones en que se realizaron cada etapa de la investigación.

### 5.2.1. Definición de la metodología y desarrollo de los bioles

En la primera parte de la investigación, se procedió con la elaboración de los bioles, según la información obtenida de visitas y entrevistas a agricultores orgánicos e investigadores de CORBANA, con experiencia en el uso y producción de Bioles; más el criterio técnico del departamento de Investigaciones (División Banano) de la compañía Standard Fruit. Además se tomó en cuenta la disponibilidad de insumos y subproductos de la actividad bananera como el lixiviado de pinzote. De esta forma se procedió a definir y desarrollar la metodología básica para la producción de Bioles; la cual se puede ver en el anexo 2. A continuación se describen los detalles del montaje de los tratamientos.

Durante el proceso de establecimiento de los Bioles, se mantuvo la mayor rigurosidad posible en las mediciones y dosificaciones para montar los tratamientos; en el caso de los insumos menos homogéneos, se cuidó el origen y el mezclado de cada uno. Como fue el caso de la boñiga, la cual provenía de una finca dedicada al engorde de toretes bajo condiciones estabuladas, los cuales son alimentados con pastos de corta (*Pennisetum sp*), así como subproductos de granos. El día del montaje, la boñiga fue recolectada de los pisos de cemento de los corrales, colocada en forma de montículo (en donde se aseguró un buen mezclado) y posteriormente trasladada al área de preparación.

Respecto al pasto fermentado, la preparación del mismo inicio desde el 31 de diciembre 2008, cuando se establecieron los Microorganismos de Montaña (MM sólidos). Al finalizar el proceso de fermentación a los 30 días, se prepararon los MM activados necesarios para el montaje del pasto fermentado. Ocho días después del montaje del MM activado; se procedió a la elaboración del pasto fermentado, para lo cual se utilizó pasto de corta Maralfalfa (*Pennisetum sp.*), de 25 días de edad de rebrote. Posteriormente se realizó el mezclado con los demás insumos según se describe en el anexo 2, y se conservó en condiciones anaeróbicas por 22 días. Ocho días previos a finalizar el período de fermentación del pasto fermentado, se volvió a

preparar MM activados así como el EM-1® activado necesarios para el establecimiento de los tratamientos. El día de la preparación se recolectó la boñiga de la forma previamente descrita y posteriormente se procedió a dosificar cada insumo en forma ordenada para cada réplica, asegurando agregar la cantidad adecuada a cada biofermentador previamente rotulado.

Al finalizar el montaje de los tratamientos, se realizó un mezclado vigoroso para el tomado de las muestras del día cero, las cuales fueron coladas para eliminar las partículas más grandes que afectaban el procesamiento de las muestras en los laboratorios. Las muestras destinadas para los conteos de coliformes fecales, fueron procesadas de inmediato; y las muestras para los conteos microbiológicos se conservaron a 15 °C mientras se trasladaban a los laboratorios para su procesamiento. Posterior a la toma de muestras, los biofermentadores fueron sellados y colocados los sistemas de liberación de gases; los cuales fueron asegurados, para evitar el ingreso de oxígeno.

#### 5.2.2. Determinación de la composición química y microbiológica de los bioles desarrollados.

Como se mencionó anteriormente, durante el proceso de fermentación de los Bioles se realizaron tres muestreos generales (0, 15 y 30 días), en los cuales se extrajeron muestras para realizar los análisis microbiológicos y se determinaron las población de *Actinomicetes*, levaduras, *Lactobacillus*, bacterias aeróbicas, bacterias anaeróbicas y hongos, lo mismo que el conteo de coliformes fecales, pH y conductividad eléctrica. En el muestreo del día 30, se tomaron muestras para determinar la composición química, las cuales fueron enviadas al laboratorio de CORBANA, para hacer un análisis químico completo en estado crudo y filtrado. Todas las muestras para análisis microbiológicos, fueron enviadas al Laboratorio Dr. Obregón, en donde se realizaron los conteos de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro de Biol. Los análisis de inocuidad (presencia de coliformes fecales) se analizaron en el laboratorio de aguas de la compañía Standard Fruit en Rio Frío, así

como también se envió una muestra compuesta laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica. Previamente se envió una muestra de la boñiga utilizada para determinar si existía la presencia de *Salmonella*.

El área donde se ubicaron los biofermentadores durante el período de estudio, es un área techada, en donde los rayos solares no llegaban a los baldes. El hangar en donde se ubicó la prueba, se encuentra a cincuenta metros de la estación meteorológica, por lo cual algunos datos climatológicos se pueden observar en el anexo 3. Estos datos son importantes, debido a que la temperatura influye directamente en la tasa de multiplicación de los microorganismos (Benzing, 2001).

### 5.2.3. Estimación del costo de producción de los bioles.

Para valorar los costos de producción de los bioles, se tomó en cuenta los costos de los insumos tanto para el desarrollo de los fermentadores utilizados en la investigación como se puede observar en la figura 1, así como también se calculó el precio de fermentadores de mayor tamaño, para la obtención de los costos, se realizaron cotizaciones en los almacenes Colono de la zona de Guápiles así como en locales dedicados a la venta de barriles para reutilización. Los precios utilizados en la investigación pertenecen al primer semestre del año 2009. Respecto a los insumos propios de la producción de los bioles, en el caso de la melaza y la semolina fue cotizada en los almacenes agroveterinarios de la DosPinos, la boñiga según la cotización brindada por un proveedor de la compañía y el pasto Maralfalfa y el lixiviado de pinzote, según los datos brindados por los departamentos encargados de la producción de los mismos. Con la información recopilada y los tiempos utilizados en el montaje se realizó el análisis de costos.



**Figura 1.** Fermentador de diseño casero con sistema de liberación de gases utilizado en la investigación.

#### 5.2.4. Evaluación del efecto de los bioles desarrollados sobre plantas a nivel de vivero (Bioensayo).

Como se mencionó previamente los bioles utilizados en la segunda fase se seleccionaron valorando los aportes nutricionales, microbiológicos, disponibilidad de materias primas e inocuidad. Basados en todos los criterios anteriores se decidió evaluar los bioles T7 (pasto fermentado + EM-1 + sin lixiviado) y el T10 (pasto fermentado + EM-1 + con lixiviado).

Para la evaluación en vivero las plantas utilizadas fueron seleccionadas y homogenizadas, de forma tal que todas estuvieran en un mismo ámbito de altura (6-8 cm) además de tener la hoja bandera arrollada, con lo cual se aseguraría que la emisión foliar fuera lo más homogénea posible. Posterior a la selección, acomodo y

marcado de las plantas, se inició el ciclo de aplicaciones según el programa comercial complementado con los Bioles 7 y 10), previamente activados con un 4% de melaza y al menos 12 horas de anterioridad. Para las aplicaciones fueron diluidos al 15%, esto debido a experiencias previas de la empresa respecto a la respuesta de las plantas a las diferentes concentraciones del producto, así como también a las encuestas realizadas por Galindo y Jerónimo (2005). Dichas aplicaciones se realizaron en horas de la mañana, según se puede ver en el anexo 11.

Además de las aplicaciones de los tratamientos correspondientes, las plantas se manejaron bajo el plan nutricional utilizado comercialmente por la empresa. Con respecto al manejo fitosanitario, no se realizaron aplicaciones de fungicidas ni productos que pudieran interferir con el posible efecto de los bioles, a los tres tratamientos por igual. Al final del periodo de estudio, se evaluaron las variables de altura, grosor, número de hojas, área foliar, peso seco aéreo, peso seco radicular y se realizó un análisis químico foliar para las plantas de cada tratamiento.

### **5.3. Definición de la unidad experimental y de las muestras**

En la primera etapa de la evaluación, se produjeron doce Bioles con tres repeticiones por cada tipo de Biol, para un total de treinta y seis fermentadores con capacidad para dieciocho litros, de los cuales se tomaron muestras de 100 ml, para cada análisis requerido. Estos fermentadores se ubicaron bajo techo para evitar su exposición al sol y cambios bruscos de temperatura.

Para la extracción de las muestras, al día 15 y 30 después del inicio del biol, se dobla la manguera de liberación de gases y se amarra para evitar el ingreso de oxígeno), posteriormente se agitan los biofermentadores vigorosamente, para homogenizar el biol de muestra; luego de ser agitado el embase, se coloca en posición horizontal sobre un banco y se mantiene la agitación para facilitar la salida del líquido. Luego sobre un vaso desechable se coloca el extremo de la manguera y se elimina la presión sobre la misma, dejando fluir el líquido fuera del fermentador, cuando ya se



tiene el volumen necesario se vuelve a aplicar presión sobre la manguera se regresa a posición vertical y se inserta el extremo de la manguera nuevamente en la botella con agua, que funciona como filtro para evitar el ingreso de oxígeno al sistema, de tal forma se mantiene la condición anaeróbica en el biofermentador.

En la segunda etapa (bioensayo), se utilizaron 1800 plantas categoría\_M (6-8 cm altura), de las cuales se colocaron 100 plantas para ser aplicadas con cada tratamiento, para un total de tres tratamientos y seis repeticiones por cada uno. Para la evaluación, solamente se tomaron datos de las 25 plantas centrales aplicadas, de cada repetición para evitar el efecto borde.

#### 5.4. Descripción de los tratamientos

##### 5.4.1. Fase I: Producción Bioles

A continuación se presentan los tratamientos utilizados en la producción de los Bioles, en donde se pueden ver los porcentajes utilizados de cada insumo para la elaboración de cada tratamiento (Biol).

**Cuadro 8.** Composición de los tratamientos a evaluar.

Lixiviado Pinzote %	<i>Base Boñiga (25% m/v)</i>			<i>Pasto Fermentado (25% m/v)</i>		
	EM (5%) Activado	MM (5%) Activado	MM + EM (5%) Act	EM (5%) Activado	MM (5%) Activado	MM + EM (5%) Act
<b>0</b>	T1	T2	T3	T7	T8	T9
<b>50</b>	T4	T5	T6	T10	T11	T12

Las metodologías para la producción de cada base y de los diferentes tratamientos se describen en el anexo 2.

#### 5.4.2. Fase II: Bioensayo

Para el bioensayo, se evaluaron tres tratamientos en donde el primero era el testigo (T1) y los otros dos consistían en la aplicación semanal de las plantas con los bioles definidos previamente, siendo T2 el tratamiento con aplicaciones con biol 7 [Pasto Fermentado (25% m/v) + EM Activado (5%)] y T3 el que recibía aplicaciones con biol 10 [Pasto Fermentado (25% m/v) + Lixiviado de Pinzote (50%) + EM Activado (5%)].

### 5.5. Variables evaluadas

#### 5.5.1. Producción de Bioles

Durante el proceso de fermentación de los bioles se tomaron muestras por medio de un sistema de extracción el cual redujo la posibilidad de ingreso de oxígeno al mínimo, de forma tal que el ambiente interno del fermentador permaneciera anaeróbico hasta el final del proceso.

##### 5.5.1.1. Acidez (pH)

Durante el período de estudio, se tomaron tres muestras durante las cuatro semanas que duró el proceso, a las cuales se les midió el pH, utilizando un pHmetro marca Oakton, serie 310.

##### 5.5.1.2. Conductividad

Durante el período de estudio, se tomaron tres muestras durante las cuatro semanas que duró el proceso, a las cuales se les evaluó la conductividad, utilizando un lector de conductividad marca HANNA, modelo HI9811-0.

#### 5.5.1.3. Prueba para *Salmonella*

A la boñiga que se utilizó para la elaboración de los bioles, se le tomó una muestra que fue enviada al laboratorio del Centro Investigaciones Agronómicas (CIA) de la UCR, para determinar la presencia de *Salmonella*.

#### 5.5.1.4. Conteo de coliformes fecales

Durante el periodo de producción de los bioles se tomaron muestras a los 0, 15 y 30 días a cada unidad experimental, las cuales se enviaron al laboratorio de aguas de la Standard Fruit Company, para realizar un conteo de coliformes fecales mediante la metodología de filtrado de membrana. Estos resultados se verificaron con un método cualitativo de fluorescencia, de la marca comercial ColiTag™, en el cual si la muestra se torna amarilla indica presencia de coliformes totales (ver anexo 4, fotografía **K**) y si al ser expuesta a luz ultravioleta presenta fluorescencia, indica que la muestra es positiva a la presencia de coliformes fecales (ver anexo 4, fotografía **L**). Al finalizar el período de fermentación a los 30 días se envió una muestra compuesta de las tres réplicas de cada tratamiento al laboratorio del CIA-UCR, para realizar una comprobación de los niveles de coliformes fecales en los Bioles producidos.

#### 5.5.1.5. Conteos microbiológicos

Durante el período de producción de los bioles, se tomaron muestras a los 0, 15 y 30 días a cada unidad experimental, las cuales se enviaron al laboratorio Dr. Obregón donde se realizaron conteos microbiológicos (UFC) para determinar el comportamiento poblacional de los diferentes microorganismos evaluados, conforme transcurrió el proceso de fermentación.

#### 5.5.1.6. Análisis químico completo

Al finalizar el período de fermentación de los bioles, se tomó una muestra final, la cual fue enviada al laboratorio de CORBANA, para realizar un análisis químico completo, tanto en estado crudo, como del sobrenadante de una muestra centrifugada.

### 5.5.2. Fase II: Bioensayo

#### 5.5.2.1. Altura

Se evaluó la altura a todas las plantas al inicio del estudio, cuatro semanas después del trasplante, dicha medida se toma desde la parte superior del cormo en donde inicia el pseudotallo hasta el punto de emisión de la última hoja abierta; para homogenizar las plantas utilizadas y al finalizar la investigación se volvieron a medir, estos últimos datos son los que se utilizaron en el análisis estadístico.

#### 5.5.2.2. Grosor de cormo

La variable grosor fue medida en la parte más ancha del cormo de todas las plantas al inicio de la prueba y al finalizar el periodo de estudio, fue medida en las plantas utilizadas. Para la medición del grosor, se utilizó un “Electronic Digital Caliper” (pie de rey).

#### 5.5.2.3. Número Hojas

Para el conteo de hojas se contabilizan desde las que aún se encuentran verdes en más de un 50%, hasta la última hoja emitida que se encuentre abierta en más de un 50%.

#### 5.5.2.4. Área foliar

El área foliar fue medida, tomando muestras cuadradas de la lámina foliar del mismo tamaño, de tres hojas por cada planta. Se determinó el área a dichas muestras y posteriormente se pesaron en una balanza analítica de cuatro decimales. Con este dato se genera un índice que representa la relación área foliar / peso. Paralelamente se cortan y pesan todas las hojas de la planta, hasta el pecíolo. Posteriormente con el peso obtenido se determina el área foliar de la planta, utilizando el índice antes calculado. Dicho procedimiento práctico genera un dato aproximado.

#### 5.5.2.5. Peso Seco

Luego de ser evaluadas, las plantas se empacan en bolsas de papel, separando la parte aérea de las raíces y se secaron en horno durante 48 horas a una temperatura de 93 °C. Luego fueron pesadas en una balanza analítica, para determinar el peso seco de las muestras.

#### 5.5.2.6. Análisis químico foliar

Las muestras secas luego de ser pesadas, fueron molidas y enviadas al laboratorio de CORBANA, en donde mediante la metodología de extracción de microondas en ácido nítrico, se realizó un análisis foliar completo, para cada muestra.

### 5.6. Definición del diseño experimental

#### 5.6.1. Fase I: Producción de Bioles

En la fase de producción de bioles, se utilizó un diseño irrestricto al azar con un arreglo factorial de 2 x 3 x 2 (dos sustratos, tres inóculos y dos concentraciones de lixiviado); resultando en 31 grados de libertad para el error experimental. Para lo cual se utilizó el siguiente diseño estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + I_j + L_k + (SI)_{ij} + (SL)_{ik} + (IL)_{jk} + (SIL)_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

$Y_{ijkl}$  = es la variable respuesta

$\mu$  = es la media poblacional

$S_i$  = donde S representa es el i ésimo efecto del factor sustrato base.

$I_j$  = donde I representa el j ésimo efecto del factor origen del inóculo microbial.

$L_k$  = donde L representa el k ésimo efecto del factor presencia lixiviado de pinzote.

$(SI)_{ij}$  = donde SI representa la interacción de i ésimo factor sustrato base y el j ésimo factor origen del inóculo microbial.

$(SL)_{ik}$  = donde SL representa la interacción de i ésimo factor sustrato base y el k ésimo factor presencia lixiviado de pinzote.

$(IL)_{jk}$  = donde IL representa la interacción de i ésimo factor origen inóculo microbial y el k ésimo factor presencia lixiviado de pinzote.

$(SIL)_{ijk}$  = donde SIL representa la interacción de i ésimo factor origen del inóculo microbial, el j ésimo factor origen del inóculo microbial y k ésimo factor presencia lixiviado de pinzote.

$\epsilon_{ijkl}$  = el error experimental

Los datos obtenidos se analizaron con el programa Infostat, por medio de un análisis de varianza y se utilizaron métodos formales para la verificación de los supuestos (normalidad, varianza constante e independencia). Por la naturaleza tan variable de los datos, en algunos casos los datos no cumplieron la totalidad de los supuestos estadísticos; a pesar de haber sido convertidos (Log, LN, Raíz, x/10.00) para corregir la falta de normalidad y de los demás supuestos. Sin embargo para este tipo de datos, se acepto el no cumplimiento de alguno de los supuestos. Posteriormente se les realizaron pruebas de Tukey, para comprobar los resultados de los análisis de varianza, para cada población evaluada.

### 5.6.2. Fase II: Bioensayo

Para la evaluación del bioensayo, se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar de tres tratamientos con 6 repeticiones (Bloques); resultando en 10 grados de libertad para el error experimental. El uso de bloques se utilizó para evitar cualquier posible influencia por el factor “cama” (des-homogenización de las condiciones según la estructura de la cama, riego y calidad de luz). Los datos obtenidos de igual manera se analizaron utilizando el paquete informático Infostat. Bajo el siguiente diseño estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + (T)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

$Y_{ij}$  = es la variable respuesta

$\mu$  = es la media poblacional

$T_i$  = donde T representa es el i-ésimo efecto tratamiento.

$B_j$  = donde B representa el k-ésimo efecto del factor cama.

$\epsilon_{ij}$  = el error experimental

## 6. RESULTADOS Y DISCUSION

### 6.1. Producción de bioles

#### 6.1.1. Caracterización del inóculo inicial

En general, los organismos varían su comportamiento según las condiciones circundantes, tanto físicas (temperatura, luz, humedad) como químicas (nutrientes, metabolitos primarios y secundarios). Se establecen interacciones interespecíficas e intraespecíficas, en donde la competencia, el mutualismo y el antagonismo, juegan un papel importante en el equilibrio de las poblaciones (EMBRAPA 1998, Restrepo 2002, Madigan et al 2004, Smith y Smith 2005).

Dicha interrelación entre las condiciones físicas, químicas y microbiológicas son la base de la formulación de los bioles. El método de producción debe ser estandarizado, se debe controlar la mayoría de las condiciones físicas, utilizar insumos de calidad constante y el uso de un inóculo microbial que contenga organismos beneficiosos para la agricultura (Higa 2002).

En este capítulo se intenta demostrar cómo ciertos insumos interaccionan con los diferentes inóculos microbiales de formas distintas favoreciendo el crecimiento de ciertos organismos y afectando el de otros, ya que como menciona Stanier *et al.* (1992), cada microorganismo requiere de fuentes orgánicas que les brinden el carbono y la energía necesaria para su crecimiento (factores de crecimiento) las cuales en algunos casos son sumamente específicas. Por lo cual a continuación se presentan los comportamientos poblacionales evaluados según los insumos utilizados en la investigación.

Previo al establecimiento de los bioles, se prepararon y evaluaron microbiológicamente algunos insumos necesarios para su preparación. Estos números



sirven como base para determinar si posteriormente las condiciones de fermentación propician el incremento de algunas poblaciones o las reduce.

En la Cuadro 9 se muestran los resultados reportados por el laboratorio, en donde se observa que el pasto fermentado presenta en general poblaciones microbianas inferiores a los otros inóculos, mientras que la preparación de Microorganismos de Montaña (MM) con melaza y semolina, a partir de hojarasca de bosque, presenta un orden de magnitud superior con respecto al Pasto Fermentado, en cuanto a levaduras, hongos y bacterias anaeróbicas, mientras que para el resto de grupos de microorganismos no hay diferencia. Esto se puede deber tanto a las condiciones de almacenamiento de los sustratos como por la cantidad y diversidad del inóculo inicial.

Además se observa como la activación de los MM en medio líquido con melaza por ocho días induce el incremento de las poblaciones de bacterias aeróbicas y los *Lactobacillus*, pero reducen en un orden de magnitud las poblaciones de bacterias anaeróbicas, actinomicetes, hongos y levaduras. Aunque se esperaba que las condiciones de anaerobiosis beneficiaran a las bacterias anaeróbicas, estas disminuyeron su población, probablemente el tiempo de activación (8 días) es muy corto para ver algún incremento en la población o por el contrario, el incremento de población y el consumo del sustrato de carbono (melaza) se lleva a cabo en cuestión de días.

Adicionalmente, como menciona Stanier *et al* (1992), podría ser que los factores de crecimiento presentes en las activaciones posiblemente no beneficiaron un crecimiento acelerado de las poblaciones anaerobias, contrario a lo que ocurrió con las bacterias aeróbicas. Estas presentaron un incremento importante bajo las condiciones de fermentación, lo cual se explica por la presencia de bacterias aerobias facultativas, las cuales en los primeros días del proceso utilizan el oxígeno aun disponible y luego de la reducción cambian su metabolismo hacia una ruta metabólica en donde la fermentación es la fuente de energía.

Por otro lado hay que considerar que las técnicas de laboratorio para valorar poblaciones microbiales, como menciona Agrios (1988), presentan limitaciones para lograr un crecimiento real de todos los organismos presentes en las muestras y en condiciones de laboratorio, siendo solo unas pocas bacterias las que logran establecerse de forma exitosa en los medios nutritivos utilizados convencionalmente para los conteos microbiológicos. Dicho punto podría ser una de las explicaciones de la disminución de las poblaciones anaeróbicas en el tiempo de fermentación.

En resumen los análisis pretenden indicar la cantidad y diversidad del inóculo inicial. Todos los sustratos tienen la misma diversidad de grupos, aunque la diversidad dentro de cada grupo debe ser muy amplia. El inóculo inicial en el caso de pasto fermentado es bacterias aeróbicas, actinomicetes y *Lactobacillus*, mientras que el MM sólido tiene un alto inóculo de bacterias aeróbicas y anaeróbicas, actinomicetes, hongos, levaduras y *Lactobacillus*. Su activación en medio líquido incrementa las bacterias anaeróbicas y los *Lactobacillus* pero reducen las poblaciones de bacterias anaeróbicas, levaduras y hongos, mientras que los actinomicetes no muestran ningún cambio. Es importante notar que las condiciones de activación propician el incremento de las poblaciones de *Lactobacillus* principalmente.

El EM, que es un producto formulado y con poblaciones microbiales estandarizadas, como bacterias aeróbicas y anaeróbicas, actinomicetes y levaduras también presentes en el MM sólido, pero por su misma preparación tiene niveles bajos de hongos. Siendo el mayor componente las bacterias aeróbicas y los *Lactobacillus*.

**Cuadro 9.** Análisis microbiológicos realizados a los insumos utilizados en la elaboración de los bioles.

Producto	pH	Conductividad	Bacterias aeróbicas	Bacterias anaeróbicas	Actinos	Hongos	Levaduras	Lactobacillus
		μS/cm	UFC/ml					
Pasto Fermentado	3.5	nd	2.0E+06	1.0E+02	1.0E+03	1.0E+02	1.0E+02	4.0E+04
MM Sólido	3.3	nd	6.0E+06	2.2E+04	1.0E+03	1.6E+04	8.0E+04	1.2E+04
MM Activado	3.6	6385	3.4E+07	6.0E+03	1.0E+03	2.0E+03	1.0E+04	1.8E+07
EM-1 Activado	3.6	6010	1.0E+07	8.0E+03	1.0E+03	1.0E+02	1.0E+04	2.8E+08

nd= no determinado

Respecto al comportamiento de las levaduras como lo demostró Pasteur citado por Stanier *et al* (1992); las levaduras presentan un menor crecimiento poblacional en la fermentación debido a la menor eficiencia del proceso fermentativo, para brindar la energía necesaria para que las levaduras logren altas tasas de crecimiento. Bajo condiciones de aerobiosis logran una mayor cantidad de energía mediante la respiración, mientras que en la fermentación invierte energía en la producción de los alcoholes.

Otro factor que puede influir es la adición de altas cantidades de azúcares (alimento) con lo cual como menciona EMBRAPA (1998) las poblaciones que logran adaptarse aumentan exponencialmente su tasa de reproducción, lográndose un equilibrio, como menciona Higa (2002), en donde los organismos anaeróbicos liberan O<sub>2</sub> como residuo de su metabolismo, el cual podría ser utilizado por los aeróbicos durante la etapa de fermentación de apenas ocho días.

#### 6.1.1.1. Cambios en la estructura de la población microbiana

##### 6.1.1.1.1. Bacterias aeróbicas

Durante el proceso de fermentación anaeróbica, como se mencionó anteriormente, las poblaciones de los diferentes microorganismos se adaptan a las condiciones nutricionales y ambientales y prosperan dominando el medio de cultivo en

forma temporal hasta que el sustrato de carbono y las condiciones gaseosas se conviertan limitantes. Posteriormente entran en una etapa de latencia y esporulación. Simultáneamente se generan sustratos que sirven para que otras poblaciones se incrementen, generando un sistema de relevo de especies y grupos, determinados básicamente por sus características bioquímicas.

Con base en esa consideración, en este apartado se busca determinar la dinámica poblacional de los diferentes grupos de microorganismos durante un período de 30 días de fermentación anaeróbica con diferentes sustratos e insumos del biol. Hay que tomar en cuenta que por restricciones de muestreo no se pudieron tomar muestras con mayor frecuencia, muchos cambios poblacionales ocurren en término de días, por lo que el período de un mes se considera suficiente para apreciar la caída de poblaciones y su posterior recuperación, en caso de un comportamiento esperado..

También hay que tomar en cuenta que diferencias pequeñas en el inóculo inicial pueden generar en corto tiempo grandes diferencias en las poblaciones, por lo que se espera esa misma situación en las diferentes réplicas, las cuales tenían un bajo volumen.

En el caso de las bacterias aeróbicas, como se observa en el cuadro 10, independiente del sustrato y del uso de lixiviado de pinzote, cuando se utiliza EM como inoculante principal hay una reducción lineal en la población de bacterias anaeróbicas, dentro del mismo orden de magnitud. Esto indica que las condiciones de anaerobiosis no permite su crecimiento sino que están en una fase de latencia.

Cuando se utilizan MM como inóculo principal hay una reducción entre el inicio y las dos semanas, seguida de una recuperación hacia el final del mes. Probablemente esto se debe a la presencia de bacterias aerobicas facultativas. Hay que recordar que a diferencia de EM, cuya composición es conocida, los MM son una colección cruda y diversa de lo que hay en la zona de trabajo (mantillo de sotobosque).

Cuando el inóculo inicial fue una mezcla de EM y MM, se observa que la adición de lixiviado de pinzote permitió el incremento de población luego de la caída a los 15 días.

**Cuadro 10.** Niveles poblacionales de bacterias aeróbicas en los bioles durante el tiempo de fermentación.

DESCRIPCION / FERMENTACION			0 DÍAS		15 DÍAS		30 DÍAS		
TRATAMIENTO	BASE	LIXIVIADO PINZOTE	INÓCULO	MEDIA	Tukey CV- 51.1	MEDIA	Tukey CV- 69.3	MEDIA	Tukey CV- 67
T1	Boñiga		EM	22.E+06	A	39.E+06	A	0.5E+06	A
T2		SIN	MM	25.E+06	A	7.E+06	A	11.E+6	A
T3			EM + MM	88.E+06	A	10.E+06	A	8.E+06	A
T4			EM	31.E+06	A	8.E+06	A	2.E+06	A
T5		CON	MM	21.E+06	A	5.E+06	A	12.E+06	A
T6			EM+ MM	24.E06	A	3.E+06	A	14.E+06	A
T7	Pasto Fermentado		EM	42.E+06	A	3.E+06	A	3.E+06	A
T8		SIN	MM	17.E+06	A	3.E+06	A	19.E+06	A
T9			EM+ MM	48.E+06	A	3.E+06	A	9.E+06	A
T10			EM	24.E06	A	10.E+06	A	6.E+06	A
T11		CON	MM	24.E06	A	29.E+06	A	7.E+06	A
T12			EM+ MM	11.E+06	A	7.E+06	A	12.E+06	A

Letras distintas indican diferencias significativas( $p \leq 0.05$ )

Estadísticamente no existen diferencias significativas a los 0 días entre los tratamientos ni factores, sin embargo a los 15 días si se determinaron diferencias estadísticas entre los factores base y lixiviado, en donde al ser analizados individualmente se determinó que el utilizar pasto fermentado con lixiviado de pinzote aumentan los niveles poblacionales de bacterias aeróbicas, lo cual se debe posiblemente al aporte mineral brindado por el lixiviado, el cual se puede ver en el Cuadro 7. Adicional al aporte químico del lixiviado, los organismos predominantes en el pasto fermentado, evidentemente se beneficia de la presencia del lixiviado y los presentes en la boñiga, no se beneficiaron por los aportes del lixiviado.

También se observa que T1 (Boñiga+EM-1) y T11 (Pasto fermentado + lixiviado + MM) presentan comportamientos diferentes a la mayoría, sin ser estadísticamente

significativos; los cuales en los primeros quince días aumentan considerablemente sus poblaciones de bacterias aeróbicas y posteriormente decaen, terminando con niveles por debajo de los iniciales. Según la curva de crecimiento bacteriano, el crecimiento es exponencial mientras que no exista un factor limitante; de existir cualquier limitación, el crecimiento tiende a ser estacionario y de mantenerse llega a decaer, por la muerte de los organismos, ya sea por condiciones inapropiadas de pH, niveles de oxígeno, competencia por alimento, tanto por organismos de la misma especie como también de otros géneros que lograron adaptarse mejor al medio. De igual forma el comportamiento de los demás tratamientos (T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10 y T12) como mencionan Llácer *et al.* (2000), se debe a que las bacterias en los otros bioles, no encontraron condiciones tan favorables, por lo cual antes de la etapa de crecimiento exponencial, debieron pasar por una etapa de latencia en la cual debieron adaptarse a las condiciones del medio, para luego iniciar su multiplicación, sin embargo al encontrarse bajo condiciones anaeróbicas, con la excepción del T7 los bioles a los treinta días finalizaron con poblaciones inferiores a las iniciales.

Respecto al aumento que se da a los quince días este se debe a que durante el muestreo del día quince el biol se oxigena por la agitación y se da una reactivación de los microorganismos, debido a que la estratificación por oxígeno se rompe al ser agitado. Lo mismo ocurre con las sustancias orgánicas (exudados, reguladores de crecimiento, antibióticos, y demás sustancias liberadas por los microorganismos) (EMBRAPA 1998, Restrepo 2002, Smith y Smith 2005), así como minerales disueltos en el fermentador. Sin embargo la mayoría finalizó con una menor cantidad de bacterias aeróbicas activas.

Este comportamiento respalda la teoría, como lo mencionan Llácer *et al.* (2000), en donde las poblaciones de bacterias aerobias disminuyen durante el proceso de fermentación anaeróbica. Debido a la disminución del oxígeno en los biofermentadores lo cual causa una disminución en la tasa de multiplicación de las bacterias aeróbicas no facultativas, las poblaciones de las mismas entran en una etapa estacionaria, en donde la tasa de reproducción se ve disminuida al mínimo; y si la condición no mejora o

empeora, se inicia la etapa esporulación o muerte, lo que induce a las bacterias a liberar exudados y sus mismas células son descompuestas por otros microorganismos y por los mismos ácidos orgánicos disueltos en los bioles, como mencionan Lampkin (2001) y Restrepo (2001).

#### 6.1.1.2. Bacterias anaeróbicas

Se realizó una curva de población de las bacterias anaeróbicas y los resultados se suman en el cuadro 11. Se observó la misma tendencia que en las bacterias aeróbicas, el inóculo inicial se redujo a los 15 y a los 30 días en forma casi lineal, dentro del mismo orden de magnitud, sin efecto de la base ni los aditivos al biol. Es interesante notar que aunque se esperaba una fermentación anaeróbica en la que justamente quienes prosperaran fueran las especies de bacterias anaeróbicas, ésta alcanzaron niveles inferiores a las bacterias aeróbicas.

**Cuadro 11.** Niveles poblacionales de bacterias anaeróbicas detectadas en los bioles durante los muestreos.

DESCRIPCION		0 DÍAS		15 DÍAS		30 DÍAS			
TRATAMIENTO	BASE LIXIVIADO PINZOTE	INÓCULO	MEDIA	Tukey CV- 470.8	MEDIA	Tukey CV- 139.1	MEDIA	Tukey CV- 152.6	
T1	Boñiga	EM	4693.E+03	A	8.E+03	A	1.E+03	A	
T2		SIN	MM	1342.E+03	A	3.E+03	A	3.E+03	A
T3			EM + MM	13.E+03	A	1.E+03	A	1.E+03	A
T4			EM	15.E+03	A	3.E+03	A	7.E+03	A
T5		CON	MM	5.E+03	A	1.E+03	A	5.E+03	A
T6			EM+ MM	5.E+03	A	3.E+03	A	11.E+03	A
T7	Pasto Fermentado	EM	7.E03	A	0.7E+03	A	0.7E+03	A	
T8		SIN	MM	1.E+03	A	3.E+03	A	2.E+03	A
T9			EM+ MM	67.E+03	A	0.6E+03	A	5.E+03	A
T10			EM	2.E+03	A	3.E+03	A	1.E+03	A
T11		CON	MM	7.E+03	A	0.7E+03	A	1.E+03	A
T12			EM+ MM	10.E+03	A	9.E+03	A	0.7E+03	A

Letras distintas indican diferencias significativas( $p \leq 0.05$ )

Para el caso de las poblaciones de bacterias anaeróbicas, durante los primeros quince días de fermentación, los resultados no arrojaron diferencias entre los tratamientos ni factores, pero el muestreo del día treinta, se presenta una interacción entre las bases y el lixiviado, en donde el análisis individual arroja que no es significativo. Por lo cual para las poblaciones de bacteria anaeróbicas las diferentes materias primas e inóculos utilizados en la investigación, no inciden en forma significativa con las mismas. Pero se debe aclarar que la falta de significancia se debe a la gran variabilidad y a la imprevisibilidad del comportamiento de las mismas, lo cual se resume con los altos coeficientes de variación que van de los 152.6 hasta los 470.8. Como ya se conoce al intentar contabilizar seres tan variables en medios de cultivo artificiales y bajo condiciones de laboratorio, es normal que solo se logren establecer colonias de ciertas cepas que se logran adaptar a las condiciones dadas y por tal motivo no se logren contabilizar la totalidad de la población de bacterias anaeróbicas.

Otro factor que podría haber influido en la disminución de las poblaciones anaeróbicas sería un mal sellado de los fermentadores, pero dicha hipótesis es descartada, ya que durante el montaje y días previos los recipientes fueron revisados para evitar dicho problemas y la totalidad de los treinta y seis fermentadores se mantuvieron con buena presión gaseosa, lo cual se podía observar en la tapa de los recipientes en forma cóncava, indicando que la presión interna del sistema se mantenía correcta, sin fugas ni ingreso de aire, siendo así descartada la probabilidad de intercambio gaseoso del exterior hacia el biol.

#### 6.1.1.3. *Lactobacillus*

Los conteos de población de *Lactobacillus* mostraron que en la mayoría de los casos donde se usó EM, hubo un incremento entre los 0 y 15 días, pero luego caen y a los 30 días no hay diferencia con el nivel de inóculo inicial. Por el contrario, cuando se utilizó el MM en la mayoría de los casos no hubo incremento en la población a los 15 y 30 días. El análisis de varianza no indica diferencias durante los primeros quince días



de fermentación debido a la alta variabilidad de los datos, con coeficiente de variación superiores a 177, como se presenta en el Cuadro 12.

Es interesante notar la capacidad del biol con pasto fermentado para permitir la multiplicación de *Lactobacillus*. A diferencia del biol a base de boñiga, al cual se le agregó 1 % de lactosuero, fuente de inóculo de *Lactobacillus* (Obregón *et al.* 2000), el pasto fermentado no tenía lactosuero, la única fuente fue el pasto original y aún así los niveles de población fueron similares en ambos casos.

**Cuadro 12.** Niveles poblacionales de *Lactobacillus* detectados en los bioles durante los muestreos.

TRATAMIENTO	DESCRIPCION	0 DÍAS		15 DÍAS		30 DÍAS			
		BASE	LIXIVIADO PINZOTE	MEDIA	Tukey CV- 217.2	MEDIA	Tukey CV- 217.2	MEDIA	Tukey CV- 177.5
T1	Boñiga	SIN	EM	2.E+04	A	11.E+04	A	10.E+04	A
T2			MM	3.E+04	A	3.E+04	A	3.E+04	A
T3			EM + MM	3.E+04	A	6.E+04	A	3.E+04	A
T4		CON	EM	3.E+04	A	10.E+04	A	3.E+04	A
T5			MM	11.E+04	A	6.E+04	A	4.E+04	A
T6			EM+ MM	3.E+04	A	0.7.E+04	A	2.E+04	A
T7	Pasto Fermentado	SIN	EM	1.E+04	A	9.E+04	A	0.8.E+04	A
T8			MM	1.E+04	A	2.E+04	A	1.E+04	A
T9			EM+ MM	3.E+04	A	5.E+04	A	2.E+04	A
T10		CON	EM	21.E+04	A	3.E+04	A	3.E+04	A
T11			MM	3.E+04	A	3.E+04	A	2.E+04	A
T12			EM+ MM	2.E+04	A	3.E+04	A	2.E+04	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

#### 6.1.1.4. Actinomicetes

El análisis de cambio poblacional de actinomicetes se muestra en el cuadro 13. Con este grupo de microorganismos se observaron efectos a diferentes niveles algunas veces contrastantes. En primer lugar el inóculo inicial es mucho mayor cuando se utilizó boñiga como sustrato, con diferencias hasta de dos órdenes de magnitud con respecto al pasto fermentado. También se observaron variaciones en el tiempo y la fuente de inóculo. Por ejemplo, usando como base la boñiga y como inóculo el EM, se observó

que las poblaciones se reducían a la mitad (con lixiviado de pinzote) o se mantenían al mismo nivel inicial. Pero cuando se mezcla EM y MM con lixiviado de pinzote hay un incremento de un orden de magnitud a los 30 días con respecto al nivel de inóculo inicial. Este efecto es producto de especies incluidas en los MM. En contraste, cuando se prescinde del lixiviado de pinzote, el inóculo de MM se reduce en dos órdenes de magnitud en comparación con el inóculo inicial. En resumen, aparentemente hay una interacción positiva entre la base de boñiga, la adición de lixiviado de pinzote y el uso de microorganismos de montaña como fuente de inóculo.

Por el contrario, cuando la base utilizada es el pasto fermentado, las poblaciones se reducen significativamente independientemente de la fuente de inóculo y la adición del lixiviado de pinzote.

**Cuadro 13.** Niveles poblacionales de actinomicetes detectados en los bioles durante los muestreos.

TRATAMIENTO	DESCRIPCION		0 DÍAS		15 DÍAS		30 DÍAS		
	BASE	LIXIVIADO PINZOTE	INÓCULO	MEDIA Tukey CV- 27.3	MEDIA Tukey CV- 8.1	MEDIA Tukey CV- 10.2			
T1	Boñiga	SIN	EM	60.E+03	A	43.E+03	B	60.E+03	B C
T2			MM	442.E+03	A	163.E+03	B	4.E+03	A B
T3			EM + MM	318.E+03	A	60.E+03	B	4.E+03	A B
T4		CON	EM	442.E+03	A	226.E+03	B	226.E+03	C
T5			MM	22.E+037	A	163.E+03	B	226.E+03	C
T6			EM+ MM	43.E+03	A	117.E+03	B	318.E+03	C
T7	Pasto Fermentado	SIN	EM	4.E+039	A	0.6.E+03	A	1.E+03	A
T8			MM	8.E+03	A	1.E+03	A	2.E+03	A
T9			EM+ MM	6.E+03	A	1.E+03	A	1.E+03	A
T10		CON	EM	22.E+03	A	1.E+03	A	1.E+03	A
T11			MM	6.E+03	A	0.6.E+03	A	1.E+03	A
T12			EM+ MM	3.E+03	A	1.E+03	A	1.E+03	A

Letras distintas indican diferencias significativas( $p \leq 0.05$ )

Al día cero, no hubo diferencias entre las bases (boñiga/pasto fermentado), ni entre tratamientos. Al analizar las bases se determina que si hay diferencias significativas ( $p = 0.0042$ ) entre la base utilizada para producir los bioles, ya que la

boñiga presenta un mayor número de UFC de actinos respecto a los bioles producidos con pasto fermentado como base. No se observaron diferencias ni interacciones con los demás factores.

Luego de quince días de fermentación, las diferencias se mantienen de forma significativa entre las bases ( $p < 0.0001$ ), como se aprecia marcadamente en el Cuadro 13. Además comienza a detectarse una tendencia en donde la presencia del lixiviado de pinzote favorece la presencia de los actinos. A los treinta días de fermentación se observó una interacción entre la base y el lixiviado, y al ser analizada se concluye que cuando se utiliza pasto fermentado como base, la presencia o ausencia de lixiviado al 50% no repercute en el crecimiento poblacional de los actinos, pero cuando se utiliza boñiga la presencia de lixiviado favorece el crecimiento poblacional de los mismos.

#### 6.1.1.5. Hongos

Como se observa en el cuadro 14, en comparación con los otros grupos de microorganismos, los hongos fueron los que se presentaron en menor cantidad. La mayor cantidad se observó cuando se utilizaron los MM como inóculo inicial, ya sea solo o mezclado con EM. Se observaron diferentes patrones, en la mayoría de los casos se reduce la cantidad de hongos cultivables con respecto al tiempo de fermentación y en unos pocos casos, principalmente con MM como fuente de inóculo combinado con lixiviado de pinzote, hay cierta recuperación a los 30 días.

Durante el proceso de fermentación de los Bioles, las poblaciones de hongos, cuantificables por el método clásico, presentaron una disminución considerable al finalizar el período de fermentación para los tratamientos del 1 al 9, pero en los tratamientos 10, 11 y 12, se dio un leve aumento poblacional. El tratamiento 6 (Boñiga+Lixiviado+EM+MM) tiene un comportamiento diferente: en los primeros 15 días creció considerablemente, lo cual podría pensarse que sucedió por un mal cerrado del envase. Sin embargo esta posibilidad es descartada ya que se verificó que el cerrado

de los embases fuera el correcto y además los conteos de cada una de las tres réplicas mantienen el mismo comportamiento.

Este comportamiento podría deberse a la presencia de alguna cepa de hongos, con la capacidad de adaptarse a las condiciones como el pH ( 6.53-6.34-6.87 a los 0, 15 y 30 días respectivamente) y alta conductividad eléctrica (12927-13267-13580  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , a los 0,15 y 30 días respectivamente) brindadas por los insumos utilizados en el tratamiento 6. Aunque en la investigación no se incluyó la identificación de especies en los análisis microbiológicos, cuando eran fácilmente identificables el laboratorio reportaba las especies predominantes y para el caso del tratamiento 6, a los 15 días reportaron en la réplica 2 la presencia de *Trichoderma* y en la 3, *Mucor* y *Aspergillus*.

Es importante observar la tendencia al aumento de la conductividad eléctrica en el tiempo, lo cual indica un aumento en las sales solubles dentro de la solución del Biol; lo cual se observa globalmente en las figuras 2 y 3.

**Cuadro 14.** Niveles poblacionales de hongos detectados en los Bioles durante los muestreos.

DESCRIPCION			0 DÍAS		15 DÍAS		30 DÍAS		
TRATAMIENTO	BASE	LIXIVIADO PINZOTE	INÓCULO	MEDIA	Tukey CV- 27.2	MEDIA	Tukey CV- 21.8	MEDIA	Tukey CV- 27.2
T1	Boñiga	SIN	EM	30.E+02	A	11.E+02	A B	81.E+02	A
T2			MM	310.E+02	A	113.E+02	A B	21.E+02	A
T3			EM + MM	220.E+02	A	41.E+02	A B	15.E+02	A
T4		CON	EM	220.E+02	A	30.E+02	A B	11.E+02	A
T5			MM	40.E+02	A	4.E+02	A B	81.E+02	A
T6			EM+ MM	30.E+02	A	220.E+02	B	30.E+02	A
T7	Pasto Fermentado	SIN	EM	60.E+02	A	3.E+02	A B	4.E+02	A
T8			MM	20.E+02	A	4.E+02	A B	11.E+02	A
T9			EM+ MM	80.E+02	A	4.E+02	A B	1.E+02	A
T10		CON	EM	6.E+02	A	3.E+02	A B	21.E+02	A
T11			MM	1.E+02	A	1.E+02	A	21.E+02	A
T12			EM+ MM	30.E+02	A	4.E+02	A B	6.E+02	A

Letras distintas indican diferencias significativas( $p \leq 0.05$ )

Respecto al análisis estadístico para las poblaciones de hongos a pesar de no presentarse diferencias significativas entre los tratamientos como se observa en el Cuadro 14; el análisis de varianza detecta diferencias estadísticas entre bases y el factor lixiviado al día cero, en donde la prueba de Tukey al 95% indica significancia entre el tipo de base, siendo un mejor sustrato para la proliferación de hongos la boñiga y respecto al uso de lixiviado, sin importar la base utilizada. Los hongos se adaptan mejor a condiciones sin lixiviado de pinzote, por lo cual presentan mayores poblaciones. Al día quince se presenta una interacción entre los inóculos y el lixiviado, sin embargo dicha interacción al ser analizada individualmente se descarta su significancia. Pero en el muestreo del día treinta se identifica un efecto de la base como tal, en donde la boñiga representa un mejor medio de crecimiento para los hongos, respecto al pasto fermentado ( $p$  0.0272). Por lo que se podría decir que los hongos no son afectados ni beneficiados por el lixiviado de pinzote y que la diferencia al día cero, solamente fue debido al aporte inicial de los insumos.

#### 6.1.1.6. Levaduras

La dinámica poblacional de las levaduras en el medio de cultivo y condiciones anaeróbicas se presenta en el Cuadro 15. En general en todos los tratamientos la cantidad de levaduras fue similar o menor a los 30 días en comparación con el inóculo inicial. Sin embargo en algunos casos se observó un incremento temporal en las poblaciones cuando se utilizó EM como fuente de inóculo.

**Cuadro 15.** Niveles poblacionales de levaduras detectadas en los Bioles durante los muestreos.

DESCRIPCION			0 DÍAS		15 DÍAS		30 DÍAS		
TRATAMIENTO	BASE	LIXIVIADO PINZOTE	INÓCULO	MEDIA	Tukey CV- 89.6	MEDIA	Tukey CV- 36.7	MEDIA	Tukey CV- 41.8
T1	Boñiga	SIN	EM	2.E+04	A	11.E+04	C	10.E+04	
T2			MM	3.E+04	A	3.E+04	A B C	3.E+04	A
T3			EM + MM	3.E+04	A	6.E+04	A B C	3.E+04	A
T4		CON	EM	3.E+04	A	10.E+04	A B	3.E+04	A
T5			MM	11.E+04	A	6.E+04	A B C	4.E+04	A
T6			EM+ MM	3.E+04	A	0.7.E+04	A	2.E+04	A
T7	Pasto Fermentado	SIN	EM	1.E+04	A	9.E+04	B C	0.8.E+04	A
T8			MM	1.E+04	A	2.E+04	A B C	1.E+04	A
T9			EM+ MM	3.E+04	A	5.E+04	A B C	3.E+04	A
T10		CON	EM	21.E+04	A	3.E+04	A B C	4.E+04	A
T11			MM	3.E+04	A	3.E+04	A B C	2.E+04	A
T12			EM+ MM	2.E+04	A	3.E+04	A B C	2.E+04	A

Letras distintas indican diferencias significativas( $p \leq 0.05$ )

Las levaduras mantienen un comportamiento bastante variable entre los tratamientos, aún entre los de una misma base. Se observaron tanto incrementos como disminuciones en el nivel de la población, sin embargo la mayoría tendió a mantener sus niveles poblacionales.

Sin embargo estadísticamente se empiezan a notar diferencias significativas a partir de los quince días de fermentación, en donde se presenta una interacción entre los inóculos y el lixiviado, en donde se determinó que el lixiviado afecta los niveles de levaduras. Además, se aprecia que su ausencia incide en una mayor población de levaduras en los tratamientos inoculados con EM-1®, aunque la tendencia no es estadísticamente significativa. Esto puede deberse al efecto que tiene el lixiviado de pinzote de aumentar el pH de los bioles en 1.3 (Sin lixiviado 4.5 y Con Lixiviado 5.8 a los treinta días de fermentación), afectando esto el crecimiento de las levaduras, ya que como mencionan Madigan *et al.* (2004), y Galindo y Jerónimo (2005), las mismas son favorecidas por pH bajos. Sin embargo dichas tendencias no se mantienen hasta los treinta días de fermentación.

Al día treinta se identifica una interacción entre los factores bases y lixiviado y al ser analizados individualmente se determina que los bioles a base de boñiga, presentan mayores poblaciones de levaduras respecto al pasto fermentado, a pesar de que los Bioles a base de pasto fermentado presentan valores de pH inferiores (media= 4.62) a los que utilizan boñiga (media= 5.68). Al realizar un análisis individual, se determino que la presencia de lixiviado de pinzote afecta los niveles de levaduras en el Biol, lo cual no ocurre en bioles a base de pasto fermentado.

En cuanto al efecto del inóculo microbial, a los treinta días de fermentación se observa una tendencia en donde los bioles que utilizan EM-1® presentan mayores poblaciones de levaduras, siendo dicha tendencia una posible repercusión de la población inicial (al día cero), la cual era mayor en los tratamientos con microorganismos efectivos (EM-1®) y al haberse mantenido en el tiempo se podría mal interpretar como una característica del inóculo evaluado. De igual forma dichas diferencias no se consideran estadísticamente significativas.

#### 6.1.2. Inocuidad de los Bioles

Cuando se utilizan productos biológicos en la agricultura en general y en especial de exportación, uno de los factores limitantes es asegurarle al mercado que el producto es totalmente inocuo para los seres humanos y que por consiguiente la utilización de los productos es segura. En el caso de esta investigación, se enviaron muestras a varios laboratorios para determinar la presencia de organismos patogénicos, siendo el caso de la *Salmonella* y los coliformes fecales causantes de diarreas y serios problemas digestivos.

Para la investigación, se tomó una muestra compuesta de la boñiga utilizada para la formulación de los bioles evaluados, y se envió al laboratorio del CIA-UCR, en donde fue procesada y los resultados del análisis fueron negativos para presencia de la bacteria Gram negativa *Salmonella*. Los resultados se pueden observar en el anexo 5.

Con respecto a la presencia de coliformes, los resultados de los conteos microbiológicos a través de los tres muestreos realizados, se presentan en la Cuadro 16 en donde se resumen los resultados obtenidos bajo cada metodología de análisis en los muestreos de los días cero y quince. En el Cuadro 17 se muestran los resultados del muestreo del día treinta, incluyendo los resultados reportados por el laboratorio CIA/UCR.

En los análisis realizados en el laboratorio de la compañía SFCo, durante los primeros quince días de fermentación, los niveles de coliformes para el caso del análisis por filtrado de membrana fueron menores al límite de detección, mientras que con fluorescencia, que es un método cualitativo, el resultado fue positivo para coliformes totales, independiente de la base utilizada en el biol. Para este primer muestreo, no se cuentan con los datos de fluorescencia para coliformes fecales. En las muestras tomadas a los quince días solamente el tratamiento 12 mostro niveles mínimos de coliformes fecales por la técnica del filtrado de membrana, pero tal y como se observa en la Cuadro 16 en la prueba de fluorescencia los bioles a base de boñiga resultaron negativos y los de pasto fermentado positivos a coliformes totales y en coliformes fecales ambas bases se comportaron similar con un tratamiento positivo.

**Cuadro 16.** Descripción de los resultados obtenidos durante los dos primeros muestreos, según la metodología de análisis.

LABORATORIO				Standard Fruit Co				Standard Fruit Co		
Metodología de Análisis				Lectura	Filtrado Membrana	Fluorescencia		Filtrado Membrana	Fluorescencia	
DÍAS DE FERMENTACION				0				15		
Tratamiento	Base	Lixiviado	Inóculo	UFC/ml	C. Fecales UFC/ml	C. Totales	C. Fecales	C. Fecales UFC/ml	C. Totales	C. Fecales
T1	Boñiga	SIN	EM-1	ND	<1	+	+	<1	-	+
T2			MM	1/1	<1	+	+	<1	-	+
T3			EM-1+MM	3/1	<1	+	sd	<1	-	-
T4		CON	EM-1	2-1/2	<1	+	sd	<1	-	+
T5			MM	3/2	<1	+	sd	<1	-	+
T6			EM-1+MM	1/1	<1	+	sd	<1	-	+
T7	Pasto Fermentado	SIN	EM-1	1/1	<1	+	sd	<1	+	+
T8			MM	ND	<1	+	sd	<1	+	+
T9			EM-1+MM	ND	<1	+	sd	<1	+	-
T10		CON	EM-1	ND	<1	+	sd	<1	+	+
T11			MM	ND	<1	+	sd	<1	+	+
T12			EM-1+MM	2-1/2	<1	+	sd	1	+	+

<1 = no detectado    += Positivo    - = Negativo    sd= sin dato



En el Cuadro 17 se presentan los resultados del muestreo del día treinta para ambos laboratorios con muestras compuestas para el laboratorio CIA-UCR, y las dos metodologías realizadas en el laboratorio de SFCo. Y como se aprecia la diferencias entre laboratorios es grande, a pesar de provenir de la misma muestra madre. Pero las mismas se podría justificar al haber sido analizadas por diferentes metodologías y aunque todas las muestras fueron procesadas en menos de veinticuatro horas, entre laboratorios hay diferencias de horas y los coliformes poseen ciclos reproductivos muy cortos, en donde EMBRAPA (1998) menciona que los mismos tienen la capacidad de completar su ciclo reproductivo en veinte minutos, con lo cual en una hora logran completar tres generaciones Sin embargo si el inóculo está presente en los bioles, el mismo podría ser un problema en casos donde el biol se mantenga almacenado sin ser aplicado.

Lo importante de los resultados brindados por el CIA/UCR, es que los bioles que presentaron los altos niveles de coliformes fecales fueron solamente los que utilizaron como base la boñiga como se puede observar en el Cuadro 17; dicha situación se debe al origen de la base, ya que la boñiga proviene de un organismo mamífero y de sangre caliente, por lo cual es un hospedero natural de dichas bacterias (Smith y Smith 2005). También importante que los bioles con lixiviado fueron los de mayor incidencia de coliformes.

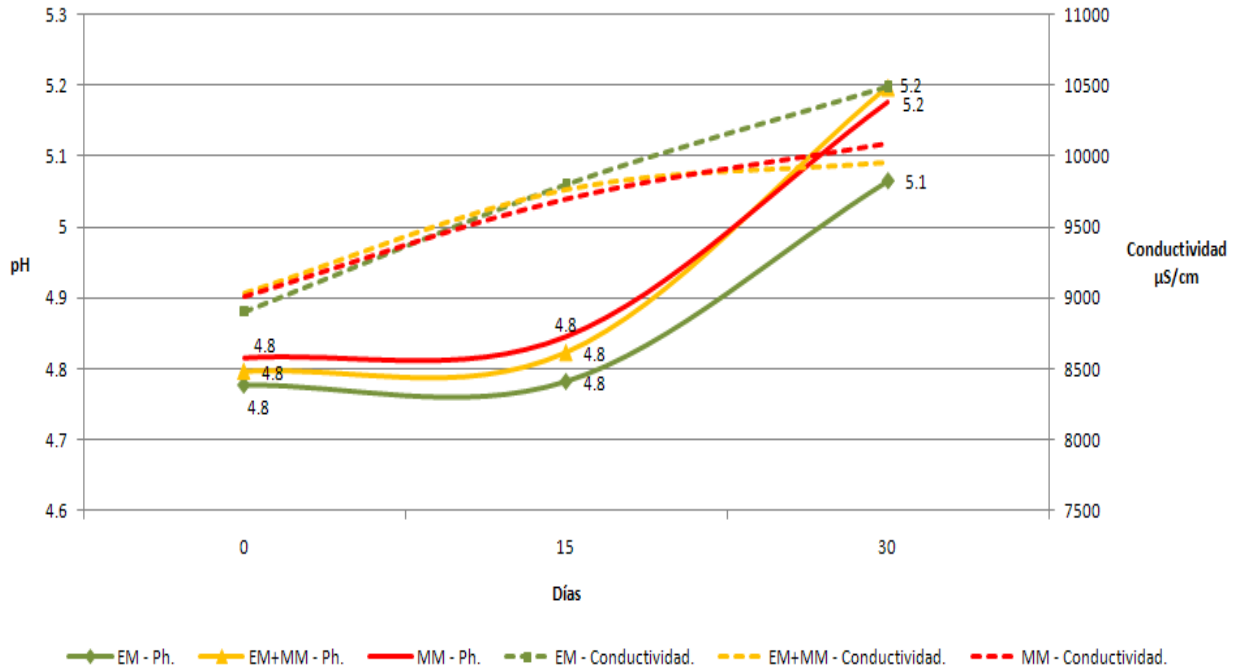
Adicionalmente se comprueba que una mayor presencia de *Lactobacillus* como ocurre en los bioles a base de pasto fermentado incide directamente en una menor cantidad de coliformes ya que los mismo poseen la capacidad de desplazar por competencia a los coliformes fecales y en especial a niveles de pH bajos (Soto y Meléndez, 2004). Y el mismo pH por ser bajo le dificulta el establecimiento de los coliformes.

**Cuadro 17.** Resultados de los análisis microbiológicos realizados por dos laboratorios, para determinar la inocuidad de los bioles evaluados a los treinta días de fermentación.

Tratamiento	Días	Standard Fruit Co				Observación	CIA/UCR
		Lectura	Promedio	Fluorescencia			C. Fecales NMP/ ml
		UFC/ml	UFC/100ml	C. Totales	C. Fecales		
T1	30	ND	<10	-	-	Sedimento	2
T2	30	1/1	33	-	-	Sedimento	2
T3	30	3/1	100	+	-	Sedimento	33
T4	30	2-1/2	100	-	-	Sedimento	160
T5	30	3/2	200	+	+	Sedimento	160
T6	30	1/1	33	+	+	Sedimento	160
T7	30	1/1	33	-	+		2
T8	30	ND	<10	+	-		2
T9	30	ND	<10	+	-		2
T10	30	ND	<10	-	-	Sedimento	2
T11	30	ND	<10	+	-		2
T12	30	2-1/2	100	+	-	Sedimento	2

### 6.1.3. Composición química final

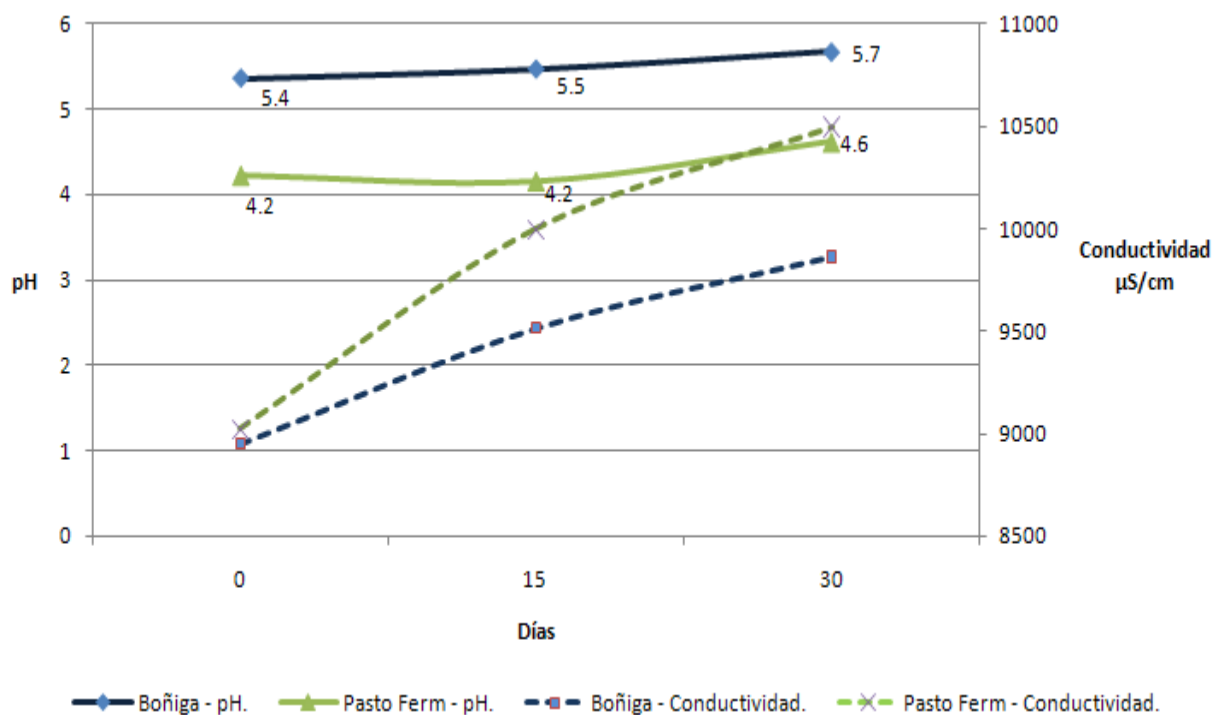
Al finalizar el proceso de fermentación de treinta días, se enviaron muestras al laboratorio de CORBANA, para ser evaluadas químicamente. En el laboratorio las muestras se procesaron de dos formas, las primeras se procesaron en crudo y las segundas fueron centrifugadas y se analizó el sobrenadante, esto con la intención de determinar la disponibilidad de elementos disueltos. Además al preparar las muestras se realizó una lectura del pH y de la conductividad. Como se observa en la figura 2 el inóculo microbial ejerce un efecto diferencial respecto al pH de los bioles al finalizar los treinta días de fermentación, siendo los bioles elaborados con EM los que menor pH presentaron, lo cual se debe a la mayor cantidad de *Lactobacillus* suministrados en general por el inóculo comercial, los cuales, liberan ácidos orgánicos los cuales disminuyen el pH del medio (Stanier *et al* 1992, Higa y Parr, 1994).



**Figura 2.** Comportamiento del pH y la conductividad durante los treinta días de fermentación según el inóculo utilizado.

Las bases utilizadas demostraron su influencia directa sobre el pH y la conductividad, ya que como se aprecia en la figura 3 y el cuadro 12, el pasto fermentado presenta un menor pH, por la mayor presencia de *Lactobacillus*, los cuales liberan ácidos orgánicos; así como una mayor conductividad. Y los mismos tienden a aumentar durante la fermentación. Lo anterior como mencionan Stanier *et al.* (1992), así como Soto y Meléndez (2004); desfavorece el crecimiento de bacterias como *E. Coli* en los bioles.

En cuanto al aumento del pH durante el proceso de fermentación, como menciona Stanier *et al.* (1992) a pesar de haberse utilizado medios ricos en glucosa, los cuales inducen al proceso fermentativo con alta liberación de ácidos orgánicos que acidificarían el medio, ocurrió un aumento del pH. Dicha situación se explica porque las mismas bases utilizadas presentaban niveles considerables de proteínas y amino ácidos; y estos al ser procesados por los microorganismos tienden a subir el pH por la liberación de amoníaco (Madigan *et al* 2004) y ácidos orgánicos (Stanier *et al* 1992).



**Figura 3.** Comportamiento del pH y la conductividad durante los treinta días de fermentación según base utilizada.

En los cuadros abajo descritos se presentan los resultados del análisis químico de las muestras analizadas tanto en suspensión, como en el sobrenadante luego de centrifugar la muestra. Dicho procedimiento se llevo a cabo con el fin de determinar cantidad aproximada de los elementos que se encuentran solubles y disponibles a la planta, pero no inmovilizado en estructuras celulares que requieren un proceso de degradación para solubilizarse, por lo cual serán disponibles a mediano plazo. Por lo anterior con los resultados de los análisis realizados al sobrenadante se puede tener una idea de la capacidad como suplemento foliar de los bioles evaluados.

Sin embargo el aporte general de los mismos es muy inferior al utilizado en fertilizantes foliares utilizados comercialmente, como se puede apreciar en el cuadro 18; por lo cual la aplicación de bioles sin ser enriquecidos mineralmente, sus efectos sobre el crecimiento de las plantas se debe a los reguladores de crecimientos disueltos en los mismos, gracias al metabolismo microbial; así como a los elementos menores

que son requeridos en cantidades trazas por las plantas y los bioles son ricos en ellos (Restrepo 2001).

**Cuadro 18** Análisis mineral de los bioles (crudo y sobrenadante).

ELEMENTO				N				P				K			
				g/L				mg/L				mg/L			
ESTADO				Puro		Sobrenadante		Puro		Sobrenadante		Puro		Sobrenadante	
TRATAMIENTO				Media	C.V. 22	Media	C.V. 28	Media	C.V. 19	Media	C.V. 21	Media	C.V. 4.9	Media	C.V. 4.7
T1	Boñiga	Sin Lix	EM	0.72	A	0.4	A	181.8	A	158.6	A	1581.0	A	1589.9	A
T2	Boñiga	Sin Lix	MM	1.13	A B C	0.7	A B C D E	214.2	A	191.9	A	1580.0	A	1544.3	A
T3	Boñiga	Sin Lix	EM+MM	0.93	A B	0.53	A B C	167.6	A	145.7	A	1516.0	A	1478.5	A
T4	Boñiga	Lix	EM	1.04	A B	0.63	A B C D E	212.8	A	185.0	A	5383.0	C	5306.6	C
T5	Boñiga	Lix	MM	0.81	A	0.44	A B	257.5	A	203.2	A	5560.0	C D	5440.0	C
T6	Boñiga	Lix	EM+MM	0.98	A B	0.6	A B C D	233.2	A	169.2	A	5514.0	C	5355.1	C
T7	Pasto Ferm	Sin Lix	EM	2.14	D	1.54	D	1437	B	1474.4	B	2566.0	B	2584.1	B
T8	Pasto Ferm	Sin Lix	MM	2.33	D	1.33	D E	1440	B	1463.5	B	2411.0	B	2475.5	B
T9	Pasto Ferm	Sin Lix	EM+MM	1.79	B C D	1.41	D E	1350	B	1314.1	B	2400.0	B	2419.4	B
T10	Pasto Ferm	Lix	EM	2.04	C D	1.18	A B C D E	1352	B	1308.3	B	6660.0	E	6797.0	E
T11	Pasto Ferm	Lix	MM	1.68	A B C D	1.21	B C D E	1170	B	1125.8	B	6215.0	E	6319.5	D E
T12	Pasto Ferm	Lix	EM+MM	1.87	B C D	1.31	C D E	1283.0	B	1255.0	B	6120.0	D E	6071.5	D

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

En general la base del biol y el lixiviado de pinzote definieron el contenido nutricional de la mezcla. Los bioles preparados con boñiga presentaron valores de N bajos, entre 0.4 y 0.7 % en el sobrenadante, independientemente de la presencia del lixiviado y el tipo de inóculo, mientras que los preparados con pasto fermentado tuvieron dos o tres veces más nitrógeno, aunque siempre a niveles bajos (1.2 a 1.5 %), con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) entre el aporte del pasto y la boñiga, respecto al nitrógeno. Esto se debe en parte al aporte de proteína cruda (12%) de la semolina así como los 12.5% de proteína que reporta Molina (2005) del pasto Maralfalfa (*Pennisetum sp.*). Además del aporte por parte de la melaza utilizada para elaborar el pasto fermentado.

La misma tendencia se observa con fósforo, los niveles en bioles con boñiga estuvieron entre 150 y 200 mg/L, mientras que los de pasto fermentado alcanzaron entre 1100 y 1500 mg/L; las cuales en promedio significan un aumento del 754%. Siendo dicha diferencia entre las bases altamente significativa ( $p < 0.001$ ). Y no se presenta ninguna influencia por el tipo de inóculo microbial utilizado, ni la presencia del lixiviado de pinzote, lo cual es respaldado por el bajo aporte de fósforo del lixiviado, lo

cual se observa en la Cuadro 7 donde el lixiviado solamente aporta 73.8 mg de fosforo por litro.

Por otro lado, el efecto del lixiviado de pinzote y la base, fue muy claro para el caso del potasio. Los bioles con boñiga presentaron valores alrededor de 1500 mg/L, pero al adicional el lixiviado se incrementa a 5300 mg/L. Lo mismo se observa en bioles de pasto fermentado, que pasaron de 2500 mg/L a 6000-6700 mg/L con la adición de lixiviado. Al analizar estos resultados el análisis de varianza detecta una interacción entre los tres factores ( $p = 0.062$ ). Sin embargo al realizar un análisis individualizado se descarta una interacción y se determina un efecto individual aditivo ( $p < 0.001$ ), en donde se respalda el mayor aporte del pasto fermentado respecto a la boñiga y también el evidente efecto del lixiviado, el cual incide directamente en el aporte de potasio, casi triplicando la cantidad respecto al biol sin lixiviado, ya que el mismo aporta 8726 mg de potasio por litro, como se puede ver en el Cuadro 7.

En cuanto al Calcio y como se presenta en el cuadro 19, los bioles preparados con boñiga tuvieron niveles ligeramente superiores a los de pasto fermentado (300-400 mg/L versus 150-270 mg/L) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ). Adicionalmente se observó un efecto del lixiviado, ya que como se aprecia en la Cuadro 19, en los análisis realizados al sobrenadante, los bioles con lixiviado independientemente de la base, presentan aportes inferiores a cuando no se utilizó ( $p = 0.0017$ ). Con respecto al inóculo microbial, se identifica una tendencia en donde los EM-1 y el EM-1+MM presentan los mayores aportes de calcio con una significancia de  $p = 0.0478$ , la cual está en el límite pero los coeficientes de variación en este caso se encuentran aceptables para esta investigación.

**Cuadro 19.** Análisis mineral de los bioles (crudo y sobrenadante) (valores en mg/L).  
Continuación.

ELEMENTO				Ca				Mg				S			
ESTADO				Puro		Sobrenadante		Puro		Sobrenadante		Puro		Sobrenadante	
TRATAMIENTO				Media	C.V. 12.9	Media	C.V. 15.7	Media	C.V 13.6	Media	C.V 15	Media	C.V 13	Media	C.V 12
T1	Boñiga	Sin Lix	EM	426.4		407.1		279.4		276.4		171.2		151.7	
T2	Boñiga	Sin Lix	MM	419.7	B C	387.2	D E	289.9	A	279.5	A	172.6	A	149.8	A
T3	Boñiga	Sin Lix	EM+MM	380.8	B C	356.1	C D E	258.9	A	249.2	A	159.5	A	140.3	A
T4	Boñiga	Lix	EM	423.8	B C	365.2	C D E	291.4	A	278.6	A	168.7	A	116.0	A
T5	Boñiga	Lix	MM	417.4	B C	317.1	B C D E	307.5	A	287.1	A	165.7	A	119.1	A
T6	Boñiga	Lix	EM+MM	420.7	B C	308.8	B C D E	301.9	A	278.6	A	167.5	A	115.5	A
T7	Pasto Ferm	Sin Lix	EM	393.5	B C	278.4	A B C D E	846.2	B	869.3	B	335.4	B	273.8	B
T8	Pasto Ferm	Sin Lix	MM	415.5	B C	252.3	A B C D	824.9	B	865.9	B	353.3	B	258.8	B
T9	Pasto Ferm	Sin Lix	EM+MM	301.1	A B C	248.3	A B C	792.8	B	807.2	B	279.2	B	250.6	B
T10	Pasto Ferm	Lix	EM	322.9	A B C	240.9	A B C	783.5	B	798.5	B	352.0	B	295.1	B
T11	Pasto Ferm	Lix	MM	235.3	A	159.5	A	671.1	B	673.8	B	295.3	B	256.9	B
T12	Pasto Ferm	Lix	EM+MM	283.8	A B	210.2	A B	742.0	B	730.7	B	304.7	B	264.1	B

Letras distintas indican diferencias significativas( $p \leq 0.05$ )

Por el contrario, el Magnesio fue detectado a niveles mayores en los bioles de pasto fermentado en comparación con los de boñiga (700-800 mg/L versus 250-270 mg/L). Presentando diferencias estadísticas altamente significativas. De igual forma sucede con los niveles de azufre en donde el pasto fermentado duplica el aporte de la boñiga (115-152 mg/L versus 251-295 mg/L). Sin presentarse ningún efecto significativo por la presencia del lixiviado ni los diferentes inóculos.

**Cuadro 20.** Análisis mineral de los bioles (crudo y sobrenadante) (valores en mg/L).  
Continuación.

ELEMENTO				Fe				Cu				Zn									
ESTADO				Puro		Sobrenadante		Puro		Sobrenadante		Puro		Sobrenadante							
TRATAMIENTO				Media	C.V 8.0	Media	C.V 18	Media	C.V 51	Media	C.V 55	Media	C.V 19.6	Media	C.V 34						
T1	Boñiga	Sin Lix	EM	22.2		C	18.1	B	C	0.47	A	0.19	A	B	C	2.17	A	1.1	A		
T2	Boñiga	Sin Lix	MM	22.1		C	16.9	B	C	0.50	A	0.16	A	B	C	2.24	A	1.1	A		
T3	Boñiga	Sin Lix	EM+MM	19.6	B	C	14.9	B	C	0.44	A	0.15	A	B	C	1.73	A	0.8	A		
T4	Boñiga	Lix	EM	14.9	A		5.8	A		0.63	A	0.26	B	C		2.01	A	0.7	A		
T5	Boñiga	Lix	MM	16.0	A	B	6.0	A		0.74	A	0.27	B	C		2.41	A	0.7	A		
T6	Boñiga	Lix	EM+MM	14.7	A		4.3	A		0.76	A	0.29		C		2.46	A	0.7	A		
T7	Pasto Ferm	Sin Lix	EM	21.5		C	20.4		C	1.30	A	0.07	A	B		7.22		C	6.9	C	
T8	Pasto Ferm	Sin Lix	MM	22.5		C	20.4		C	1.83	B	0.03	A			7.35		C	6.8	C	
T9	Pasto Ferm	Sin Lix	EM+MM	19.4	B	C	19.2		C	0.63	A	0.06	A	B		6.48		C	6.3	C	
T10	Pasto Ferm	Lix	EM	21.7		C	19.2		C	0.87	A	0.04	A			6.26	B	C	5.5	B	C
T11	Pasto Ferm	Lix	MM	18.8	A	B	11.2	A	B	0.60	A	0.06	A	B		4.02	A	B	2.0	A	
T12	Pasto Ferm	Lix	EM+MM	18.9	A	B	13.7	B	C	0.61	A	0.06	A	B		5.02	B	C	3.1	A	B

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

En el cuadro 20 se puede observar los resultados para el elemento hierro, en donde de nuevo se presenta un efecto de bases en donde la boñiga presenta aportes menores de hierro respecto a los bioles a base de pasto fermentado. Pero respecto al lixiviado de pinzote, es evidente la interacción inversa cuando está presente, ya que en los bioles con boñiga y lixiviado presentaron tres veces menos hierro que el biol sin lixiviado. Dicho efecto es menos evidente en el pasto fermentado, lo cual explica la interacción ( $p < 0.0019$ ) entre la base y el lixiviado en los resultados del sobrenadante, ya que se comporta dependiendo de la base utilizada.

El cobre también presenta una interacción entre la base y el lixiviado (en centrifugado  $p < 0.0001$  y en estado puro  $p < 0.0079$ ), la cual causa que el lixiviado aumente los niveles de cobre en bioles a base de boñiga, pero no influya cuando la base utilizada sea pasto fermentado. Importante para este caso que a pesar de los altos valores del coeficiente de variación (sobrenadante CV 55, puro CV 51), la prueba de Tukey detectó las diferencias significativas.



En cuanto a los niveles de zinc, los bioles a base de boñiga presentan niveles inferiores estadísticamente significativos respecto a usar pasto fermentado, pero adicionalmente se presenta una interacción (centrifugadas  $p < 0.0003$ , puras  $p 0.0005$ ) entre las bases y el lixiviado, en donde al utilizar pasto fermentado el lixiviado influye negativamente sobre los niveles de zinc, lo cual no ocurre cuando se utiliza boñiga como base, ya que los microorganismos liberadores de zinc se pueden ver afectados por el aumento de la conductividad y del pH causado por la adición del lixiviado.

**Cuadro 21.** Análisis mineral de los bioles (crudo y sobrenadante) (valores en mg/L).

Continuación.

ELEMENTO				Mn				B				Al-ex				Si-ex			
ESTADO				Crudo		Sobrenadante		Puro		Sobrenadante		Crudo		Sobrenadante		Crudo		Sobrenadante	
TRATAMIENTO				Media	C.V. 12	Media	C.V. 18	Media	C.V. 14	Media	C.V. 11.6	Media	C.V. 43	Media	C.V. 17	Media	C.V. 34	Media	C.V. 6
T1	Boñiga	Sin Lix	EM	10.8	A	10.1	A	0.22	A	0.2	A	9.52	A	1.2	A B C	152.80	A	67.8	B
T2	Boñiga	Sin Lix	MM	11.2	A	10.2	A	0.23	A	0.2	A B	10.37	A	1.1	A B C	161.30	A	65.4	B
T3	Boñiga	Sin Lix	EM+MM	9.6	A	8.6	A	0.21	A	0.2	A	7.89	A	1.1	A B C	137.40	A	61.9	B
T4	Boñiga	Lix	EM	10.3	A	7.3	A	0.29	A B	0.2	A B C	10.49	A	1.5	A B C D	166.30	A	82.3	C
T5	Boñiga	Lix	MM	10.6	A	6.1	A	0.30	A B	0.2	A B C	12.88	A	1.5	A B C D	178.90	A	82.9	C
T6	Boñiga	Lix	EM+MM	9.4	A	4.9	A	0.29	A B	0.2	A B C	13.20	A	1.5	A B C D	185.30	A	82.4	C
T7	Pasto Ferm	Sin Lix	EM	28.8	C	26.5	B	0.37	B C	0.3	B C D	7.00	A	1.6	B C D	333.10	A B	41.6	A
T8	Pasto Ferm	Sin Lix	MM	28.6	C	27.4	B	0.41	B C	0.3	C D	10.43	A	2.1	D	449.60	B	42.3	A
T9	Pasto Ferm	Sin Lix	EM+MM	26.3	B C	24.5	B	0.30	A B	0.3	B C D	4.41	A	1.8	C D	192.10	A	40.4	A
T10	Pasto Ferm	Lix	EM	25.9	B C	24.8	B	0.45	C	0.4	E	5.18	A	1.3	A B C	250.20	A B	66.2	B
T11	Pasto Ferm	Lix	MM	20.9	B	19.2	B	0.40	B C	0.4	D E	4.36	A	0.8	A	196.90	A	72.0	B C
T12	Pasto Ferm	Lix	EM+MM	23.5	B C	21.5	B	0.42	B C	0.4	D E	4.37	A	1.0	A B	202.60	A	62.8	B

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Para el caso del manganeso como es evidente en el cuadro 21, existe una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) entre los aportes de las bases siendo el pasto fermentado el que más manganeso aporta. Además se presenta un efecto del lixiviado ( $p 0.0004$ ), en donde la presencia del lixiviado disminuye los niveles del elemento. Además no se encontraron efectos entre los inóculos microbiales.

Los niveles de boro obtenidos tanto en las muestras puras como en las centrifugadas, presentan efectos individuales tanto para las bases ( $p < 0.0001$ ), como

para el lixiviado (sobrenadante  $p < 0.0001$ , puro  $p 0.0002$ ) en donde se da una relación directa con la adición del lixiviado. Con respecto a la base utilizada, el pasto fermentado brinda un mayor nivel de boro que la boñiga. Los inóculos no presentan un efecto sobre la disponibilidad del boro en la solución.

El aluminio extraíble en los bioles puros, presentan una interacción triple ( $p 0.0346$ ), la cual al ser analizada se determina que cuando se utiliza como base la boñiga la presencia del lixiviado brinda una mayor cantidad de aluminio, mientras que cuando se utiliza pasto fermentado la presencia del lixiviado disminuye los niveles del aluminio disponible en el sobrenadante. En general no se apreció ninguna diferencia estadística influida por los inóculos microbiales.

Un elemento importante a considerar es el silicio extraíble el cual según los resultados arrojados por los análisis, es inferior cuando se utiliza pasto fermentado. Así como existe un mayor aporte cuando se utiliza lixiviado de pinzote, manteniéndose sin diferencias el tipo de inóculo utilizado.

## **6.2. Fase II (Bioensayo)**

### **6.2.1. Análisis de crecimiento**

Como anteriormente se mencionó, durante la realización del bioensayo, se realizaron seis aplicaciones foliares, en forma adicional al programa de manejo comercial, las cuales se realizaron los primeros días de cada semana, según las condiciones climáticas; los detalles de cada aplicación se presentan en el anexo 11.

Para las aplicaciones los bioles fueron diluidos y activados, con al menos 12 horas de anticipación, con el fin de reactivar las poblaciones y aumentar las poblaciones de las bacterias rápidamente, ya que como menciona Benzing (2001), bajo condiciones apropiadas como temperaturas entre 25 y 35°C, y en sustratos ricos en sustancias alimenticias, la bipartición bacteriana tarda solamente entre 10 y 60 minutos. En el caso

de los otros organismos (ej. hongos), al menos se activarían previo a la aplicación, logrando así estar en buenas condiciones que les permitiera sobrevivir a la competencia en la superficie de las hojas y del sustrato al ser asperjados. A continuación en el cuadro 22 se presentan los resultados obtenidos luego del procesamiento de las plantas evaluadas a nivel de vivero.

**Cuadro 22.** Resultados obtenidos al finalizar las 6 semanas de aplicación a nivel de vivero. ( n 150 plantas/trat)

VARIABLE	Altura		Diametro		Hojas		Área Foliar	
TRATAMIENTO	Media (cm)		Media (mm)		Media		Media (cm <sup>2</sup> )	
Testigo	27.8	A	23.2	B	7.4	B	999.1	B
Biol 7	27.8	A	22.8	A B	6.9	A	953.0	A
Biol 10	28.8	B	22.4	A	7.3	B	963.0	A B
C.V	8.2		8.2		10.5		14.1	
p-valor	0.0		0.0		< 0.0001		0.0	

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Al finalizar las seis semanas en la fase de vivero, las plantas aplicadas con bioles no presentaron un mayor desarrollo general respecto al tratamiento testigo, excepto por la variable altura en el tratamiento aplicado con el Biol 10, siendo el testigo el que presentó el mayor diámetro de cormo. En cuanto al área foliar, el tratamiento 3 en donde se aplicó el Biol 10 no presentó diferencias respecto al testigo; pero el tratamiento aplicado con Biol 7 si las presento, siendo las plantas con menor área foliar del grupo evaluado.

La diferencia de alturas comprueba lo mencionado por Restrepo (2001), respecto a la presencia de reguladores de crecimiento como giberelinas en los bioles y las mismas posiblemente influyeron en la elongación de las plantas del tratamiento tres con aplicaciones del Biol 10.

Respecto al número de hojas, estas inciden directamente en las diferencias significativas del área foliar antes comentadas, lo cual se demuestra al seguir el mismo patrón en donde el testigo no presenta diferencias significativas contra el tratamiento tres. Sin embargo el número de hojas activas, no es un parámetro realmente

importante en la etapa en que se realizó la evaluación, como si lo es la calidad de las hojas nuevas, que les permiten abarcar una mayor área de absorción de energía, y así poder competir con las plantas circundantes. Esta diferencia en la altura de las plantas, permite que las mismas puedan ser enviadas a campo una semana antes respecto al testigo, lo cual significa grandes ventajas en viveros por la demanda de espacio.

Aunque la diferencia entre medias es de un centímetro, en la práctica las plantas se apreciaban con un vigor superior a las plantas testigo y el personal del vivero coincidían en la superioridad de las plantas. Por lo tanto, en forma preliminar se puede decir que la aplicación del biol 10 en plantas de vivero, resulta en un mejor desarrollo de la planta, hasta comparables con productos comerciales anteriormente probados por parte de la empresa a base de reguladores de crecimiento principalmente giberelinas; así como evaluaciones con ácidos húmicos y fúlvicos. Dichos resultados no son de carácter público. La diferencia de apariencia se basa en el color y vigor visual de las plantas, coincide con lo mencionado por otros investigadores como Paniagua<sup>2</sup> (2009), quien además respalda el uso de los mismos por aumentar los rendimientos productivos en hortalizas, pastos, tubérculos, café y aguacate entre otros. Al utilizar bioles inoculados con microorganismos de montaña. Así como también lo describen las investigaciones realizadas por estudiantes de la universidad EARTH como Mazariegos y Colindres (2002), Pacheco (2003), Galindo y Jerónimo (2007) y Campos y Meneses (2008) quienes en muchos casos mencionan que mediante las evaluaciones cuantitativas no han logrado determinar efectos significativos, pero que el vigor de las plantas si es diferente a plantas no aplicadas con los diferentes bioles probados.

---

<sup>2</sup> Paniagua, J. J. 2009. Metodologías y formulaciones en la producción de bioles y su efecto en la horticultura (Comunicación personal). Asesor Orgánico Internacional. Zarcero, CR.

**Cuadro 23.** Pesos obtenidos al finalizar las seis semanas de aplicación, a nivel de vivero. ( n 150 plantas/trat).

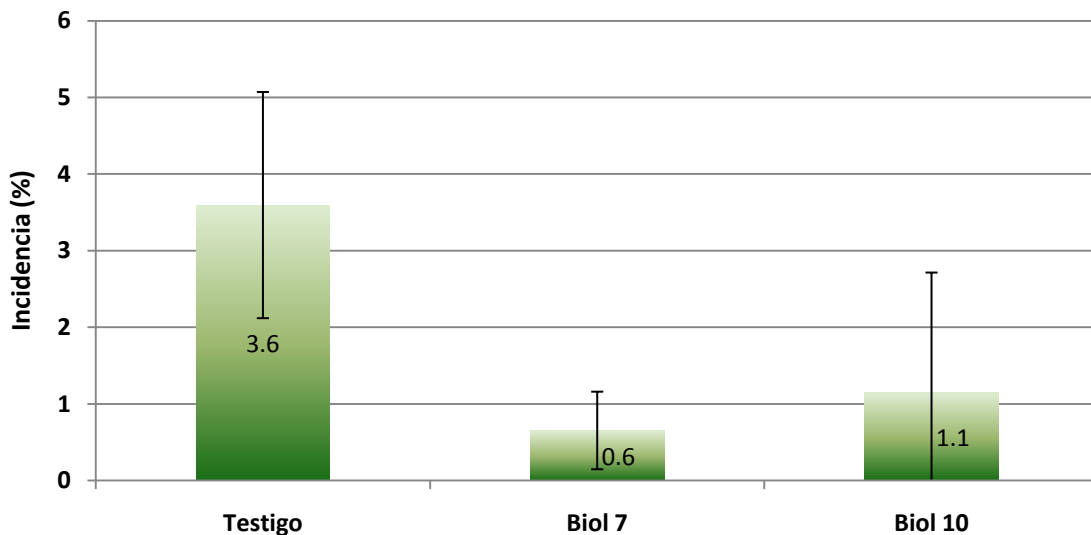
VARIABLE	Peso Fresco				Peso Seco			
	Aéreo		Raíz		Aéreo		Raíz	
TRATAMIENTO	Media (gr)	Media (gr)	Media (gr)	Media (gr)	Media (gr)	Media (gr)	Media (gr)	Media (gr)
T1	113.34	A	26.4	A	10.4	A	1.6	A
T2	121.84	A	27.4	A	10.1	A	1.7	A
T3	113.49	A	26.1	A	9.9	A	1.5	A
<b>c.v</b>	48.5		22.0		31.5		26.6	
<b>p-valor</b>	0.3270		0.1421		0.4128		0.0470	

Letras distintas indican diferencias significativas( $p \leq 0.05$ )

Las plantas luego de ser medidas, se procesaron para determinar el área foliar y los pesos, tanto aéreos como de raíces. En dichas variables los tratamientos no presentaron diferencias significativas, con respecto al testigo como se aprecia en el Cuadro 23; por lo cual se puede decir que la aplicación de los bioles evaluados en el presente ensayo, no inducen un aumento en la biomasa de las plantas de banano en la etapa de vivero; sin embargo el crecimiento como se observo en la Cuadro 22, si presenta diferencias. Adicional a esto, como se observa en la figura 4, las aplicaciones con los bioles evaluados incidieron en la disminución de plantas con problemas de pudrición de cormo (Pudrición Seca causada por *Fusarium* sp.). Dicha pudrición ingresa por las raíces dañadas por la alta humedad y la quema causada por el plástico de las bolsas; avanzando hasta el centro del cormo, con la consecuente degradación del ápice caulinar y el cese de la emisión foliar.

Al igual que las pruebas que llevaron a Higa (2002) a desarrollar la tecnología EM; durante la investigación se determinó que las aplicaciones de bioles causaron reducciones en la incidencia de plantas afectadas con pudrición del cormo, lo cual es sumamente importante en vivero por la alta densidad de plantas. Dicha variable no se había considerado en la metodología, pero si se evaluó en campo y en la figura 4 se resume. Es importante aclarar que las seis camas en donde se realizó la investigación no recibieron aplicaciones para el control de enfermedades; por lo cual el porcentaje de

plantas afectadas en el testigo es superior a lo comercial, en donde ronda el 1% bajo el plan de manejo fitosanitario a base de agroquímicos. Por consiguiente se puede concluir que la utilización de bioles en vivero permite un control del pudre a un nivel igual que las aplicaciones químicas; sin embargo se debe de evaluar a mayor escala para poder asegurarlo.



**Figura 4.** Porcentaje de plantas afectadas con pudrición del cormo. (Barras con desviación estándar). N 630 plantas/trat.

#### 6.2.2. Análisis Foliar

Estadísticamente los resultados del análisis foliar para los elementos mayores, no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, como se puede observar en el cuadro 24.

**Cuadro 24.** Resultados del análisis foliar al finalizar las seis semanas de aplicación.

ELEMENTO	N		P		K		Ca		Mg		S	
	g/kg											
TRATAMIENTO	Media		Media		Media		Media		Media		Media	
Testigo	2.18	A	0.3	A	3.3	A	0.8	A	0.4	A	0.2	A
Biol 7	2.13	A	0.31	A	3.3	A	0.8	A	0.4	A	0.2	A
Biol 10	2.12	A	0.31	A	3.4	A	0.9	A	0.4	A	0.2	A
C.V	4.8		3.3		5.1		7.2		7.5		6.3	
p-valor	0.5632		0.0658		0.5096		0.5909		0.1091		0.3673	

Letras distintas indican diferencias significativas( $p \leq 0.05$ )

En el cuadro 25, se aprecia que el cobre fue el único elemento que presentó diferencias significativas entre los tratamientos y cómo los dos tratamientos en donde se realizaron aplicaciones con bioles, las plantas presentaron niveles inferiores de cobre respecto al testigo. Es importante aclarar que el testigo utilizado en el bioensayo, no recibió ninguna aplicación de fungicidas (cobres ni de ningún tipo), ni bactericidas, por lo tanto la mayor cantidad de cobre en los tejidos del testigo no se debe a aplicaciones adicionales. Por el contrario los tratamientos 2 y 3, recibieron las aplicaciones adicionales de los bioles.

**Cuadro 25.** Resultados del análisis foliar al finalizar las 6 semanas de aplicación.

Continuación.

ELEMENTO	Fe		Cu		Zn		Mn		B	
	mg/kg									
TRATAMIENTO	Media		Media		Media		Media		Media	
Testigo	267.7	A	15.0	B	83.2	A	458.7	A	31.7	A
Biol 7	299.7	A	9.5	A	88.8	A	449.3	A	32.2	A
Biol 10	306.3	A	9.3	A	85.5	A	446.3	A	32.3	A
C.V	15.1		26.2		11.9		6.9		14.2	
p-valor	0.2963		0.0066		0.6350		0.7780		0.9657	

Letras distintas indican diferencias significativas( $p \leq 0.05$ )

Una explicación a la menor presencia de cobre en los tejidos de plantas aplicadas podría deberse al secuestro por parte de los microorganismos del cobre aplicado en el

manejo comercial. El secuestro de cobre se podría dar en forma similar a lo que describe Arauz (1998) con las *Pseudomonas* fluorescentes, las cuales por medio de la producción de moléculas muy afines al hierro, logran secuestrar el mismo del medio, perjudicando el desarrollo y establecimiento de otros organismos que requieren del elemento para su supervivencia. Esto justificaría lo que ocurrió con el cobre, en donde el problema impidió que la planta misma pudiera absorber el cobre. Además de esta razón, se podría haber debido a otras situaciones similares.

Aunque no hay una relación directa, Benzing (2001) menciona que en suelos con más de un 50% de materia orgánica, los mismos presentan escasez de cobre, dicha situación podría tener relación con lo que menciona Arauz (1998), en donde posiblemente algún ácido orgánico o alguna molécula liberada en la humidificación y mineralización de la materia orgánica utilizada en la producción de los bioles, podría presentar la capacidad de secuestrar o fijar cobre. La biocapa formada sobre la hoja con la aplicación de bioles podría estar absorbiendo el cobre aportado por los Bioles, así como el de las aplicaciones foliares, de forma que las plantas no lograron absorberlo. Dicha situación podría intentar reducirse con un aumento en la dosis de cobre aplicado y de esta forma descartar la hipótesis de que el cobre pudo haber sido el elemento limitante para las plantas de los tratamientos aplicados con bioles, ya que como mencionan Azcon-Bieto y Talon (2001), el cobre es esencial en diversas proteínas y enzimas implicadas en los procesos de oxido/reducción y más específicamente participa en los sistemas de transporte de la fotosíntesis, entre el fotosistema II y el I. Así como también forma parte de la enzima *citocromo c oxidasa*, que facilita la transferencia de electrones en las crestas mitocondriales. Lo cual podría ser la causa del menor crecimiento presentado por las plantas a las cuales se les aplicaron los bioles.



## 7. EVALUACION DE COSTOS

Para la producción de los bioles, fueron necesarios materiales, tanto para desarrollar los fermentadores así como insumos necesarios para el montaje de los tratamientos. Por lo cual se realizó un resumen de costos según la producción de cada biol valorando los costos del fermentador en forma separada.

**Cuadro 26.** Costos de biofermentadores de diseño casero, según su capacidad. Precios de mercado para I semestre 2009.

Capacidad (L)	Precio	Regulador de gases	Total
18	\$8	\$3	\$11
75	\$7	\$3	\$10
200	\$27	\$3	\$30
2000	\$91	\$3	\$94

\*Envases nuevos utilizados en la investigación. Tipo cambio ₡550/\$1

El costo de los fermentadores varía según la capacidad del mismo, por lo cual en la Cuadro 26, se describen los costos de fermentadores de diseño casero, según su capacidad. Como es de prever, los fermentadores de mayor tamaño resultan más rentables, ya que el costo del sistema de liberación de gases que se puede observar en la figura 3, representa el mismo costo, siendo la única diferencia la longitud de la manguera (\$0.11/m). Es importante aclarar que los precios de los envases son los obtenidos en las zona de Guápiles, CR, en donde los de 200 L son estañones (barriles) con tapa y cincha, no son de tapones, ya que estos últimos dificultan la elaboración de ciertos bioles. Los precios varían considerablemente de un lugar a otro y en el caso de algunas compañías, la reutilización hasta podría significar un aprovechamiento del recurso, siempre y cuando el producto original del envase no sea tóxico para con los organismos.

Respecto al costo de los insumos estos varían según la época del año, específicamente la melaza, ya que la misma solamente se produce durante el período de zafra; esto aunado a los aumentos de la energía necesaria para su producción y al

incremento en la demanda de melaza por su uso en ganadería y en la industria piñera tanto orgánica como convencional, lo cual causa escasez en ciertos periodos y el incremento en precio. Respecto a la semolina, esta es más dependiente del precio de los combustibles.

Por todo lo anterior, en la Cuadro 27, se presentan los costos de los productos necesarios para la producción de los bioles, en los cuales va implícito el valor de los insumos primarios (melaza, semolina, suero, boñiga, pasto) utilizados para producir los insumos secundarios (MM sólidos y líquidos, pasto fermentado, boñiga preparada, lixiviado de pinzote); así como el costo de mano de obra para realizar las preparaciones, basados en tiempos obtenidos durante la realización de la presente investigación. Los tiempos considerados podrían mejorarse al aumentar los volúmenes producidos ya que en promedio la mano de obra aporta un 9.6% al costo total (ver anexo15).

**Cuadro 27.** Costo por unidad de producto producido para la elaboración de los Bioles.

<b>Producto</b>	<b>Costo</b>	<b>Unidad</b>
<b>MM Sólido</b>	\$0.64	<b>/Kg</b>
<b>MM Activado</b>	\$0.08	<b>/L</b>
<b>EM-1 Activado</b>	\$0.14	<b>/L</b>
<b>Pasto Fermentado</b>	\$0.22	<b>/Kg</b>
<b>Lixiviado Pinzote</b>	\$0.23	<b>/L</b>
<b>Boñiga</b>	\$0.08	<b>/Kg</b>

**Tipo cambio ₡550/\$1**

En la Cuadro 27 se muestra el costo por unidad de cada materia prima e inóculo que fue utilizado, en donde el costo de los microorganismos de montaña implicaría la mano de obra desde la recolección de la hojarasca y el mantillo de bosque, hasta el mezclado, compactación y sellado del estañon, así como la melaza y la semolina utilizada. Posterior a este proceso y basado en el costo del mismo, se calculo el valor del MM activados tomando como materia prima el MM sólido, más la melaza, el agua y la mano de obra necesaria para producir el MM activado. De igual forma se calculo el

costo del EM-1® activado, tomando en cuenta el precio del EM-1® comercializado por la Universidad EARTH.

Para el cálculo del pasto fermentado, se consideró como costo el manejo convencional que se le brinda a los pastos de corta utilizados para la alimentación de mulas en la empresa, así como la mano de obra de cosecha y picado del mismo, además de la semolina, melaza y MM activados utilizados en su producción.

Hablando igualmente sobre el costo de las bases para los Bioles, la boñiga para la investigación se utilizó en la forma en que la literatura la describe (Restrepo 2000); por lo cual se enriqueció con suero de leche y melaza al 1%. Aún así el costo de la boñiga apenas representa un 36% del costo que implica utilizar pasto fermentado como base. Sin embargo los análisis microbiológicos respaldan el hecho que los bioles a base de boñiga representan un riesgo potencial para la salud, ya que a los treinta días de fermentación, al menos para esta investigación varios tratamientos presentaron 16 000 UFC de coliformes fecales por mililitro de biol, según el análisis realizado por el laboratorio del CIA-UCR. Esto sigue la tendencia detectada en los análisis realizados en el laboratorio de aguas de la compañía, en donde aunque se detectaron coliformes fecales y la mayoría fue en bioles a base de boñiga, aunque a muy bajos niveles (máximo 2 UFC/ml). La diferencia entre laboratorios podría deberse al tiempo que transcurrió entre los muestreos y el tipo de análisis, sin embargo las muestras enviadas al CIA, se trasladaron a bajas temperaturas hasta el laboratorio, en donde fueron procesadas y analizadas.

En la práctica, los bioles a base de boñiga presentan un olor que podría resultar molesto para muchas personas; lo cual es diferente cuando se utiliza pasto fermentado y en especial si no se utiliza lixiviado de pinzote, ya que este le brinda un olor más fuerte, sin ser desagradable, lo cual se podría deber al aporte mineral que brinda el lixiviado y favorece la liberación de gases como sulfuro u otros que tiende a dispersar el agradable olor a fermentación común de un buen proceso anaeróbico.

Para el cálculo del costo del lixiviado de pinzote, se basó en un proyecto que duró seis meses en donde se procesaron 32 carretas con pinzotes, los cuales brindaron 16,316 litros de lixiviado. Basado en la cantidad de producto recolectado y la mano de obra invertida, se dedujo el costo de \$0.234/L. Es importante aclarar que no se está valorando el costo por el uso de las instalaciones, sin embargo el mismo se podría considerar como una inversión sobre un manejo aprovechable de los residuos de las plantas empacadoras.

Como se observa en la Cuadro 28, en donde se presentan los costos por tratamiento, los bioles a base de pasto fermentado presentan un costo adicional de \$0.05/ L de biol respecto a cuándo se utiliza boñiga, además cuando se utiliza lixiviado al 50%, se debe agregar un costo de \$0.14/L producido (considerando el menor uso de agua).

**Cuadro 28.** Costo por litro de Biol producido, valorando la base, el lixiviado y el inóculo utilizado.

Tratamiento	Insumo				Costo/L
	Base	Lixiviado	Inóculo	Agua	
T1	\$0.03	\$0.00	\$0.009	\$0.014	<b>\$0.05</b>
T2	\$0.03	\$0.00	\$0.005	\$0.014	<b>\$0.04</b>
T3	\$0.03	\$0.00	\$0.006	\$0.014	<b>\$0.05</b>
T4	\$0.03	\$0.15	\$0.009	\$0.004	<b>\$0.19</b>
T5	\$0.03	\$0.15	\$0.005	\$0.004	<b>\$0.19</b>
T6	\$0.03	\$0.15	\$0.007	\$0.004	<b>\$0.19</b>
T7	\$0.07	\$0.00	\$0.009	\$0.014	<b>\$0.09</b>
T8	\$0.07	\$0.00	\$0.005	\$0.014	<b>\$0.09</b>
T9	\$0.07	\$0.00	\$0.007	\$0.014	<b>\$0.09</b>
T10	\$0.07	\$0.15	\$0.009	\$0.004	<b>\$0.24</b>
T11	\$0.07	\$0.15	\$0.005	\$0.004	<b>\$0.23</b>
T12	\$0.07	\$0.15	\$0.007	\$0.004	<b>\$0.23</b>

Costos calculados al producir 14 L de Biol colado.

Respecto al inóculo utilizado y costo, el EM-1® cuesta \$0.004/L más que los MM, sin embargo aunque cuesta más, y según lo observado durante la producción, es

recomendable la utilización de un producto con composición constante y respaldado por una casa comercial (distribuidor) y además se pudo observar en la investigación, que los bioles con EM-1®, presentan un mejor olor; respecto a los microorganismos de montaña, los cuales poseen el riesgo de transportar organismos fitopatógenos y de riesgo a la salud.

Esto último debe ser valorado y cuando se requiera utilizar MM, los mismos, previo a su utilización deben ser valorados microbiológicamente con el fin de descartar la presencia de cepas patogénicas agresivas y así poder utilizar los MM sólidos, ya que si se presenta una cepa problemática. Esto significaría la contaminación de áreas bastante grandes, ya que un solo estañon de MM sólidos produce alrededor de 80Kg, con los cuales se puede producir 800 L de MM activado, con lo cual se podrían producir 16,000 L de biol, utilizando el inóculo al 5%. Si al tener listo el biol se aplica al 15% en plantas de vivero, se podrían inocular 320,001 plantas con los 106,667 L de producto listo para aplicar. Este factor es uno de los que causan que técnicos y profesionales duden sobre el uso de los Bioles a gran escala, por lo difícil que resulta intentar controlar la estabilidad del producto; ya que al tratarse de seres vivos con altas tasas de reproducción, en sustratos ricos en carbono y energía metabolizable, casi cualquier cosa podría influir en la jerarquización y dominio entre especies dentro de los bioles.

## 8. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se realizó este estudio, se concluye que:

- 8.1.** A pesar de que los bioles se utilizan desde hace varios años en el país, no hay un esfuerzo sistemático para documentar sus potenciales beneficios, así como una estandarización del método de producción y criterios para su uso. Por lo tanto para esta investigación se definió una metodología en base a la información disponible por parte de los agricultores orgánicos con más experiencia empírica en el uso comercial de bioles. Para estos productores los bioles son un componente más en su sistema de producción, donde lo utilizan mezclados con sales disueltas (fertilizantes quelatados con aminoácidos?), extractos vegetales con posibles efectos para control de plagas y enfermedades (inducción de resistencia sistémica inducida?), como promotores de crecimiento (producción o inducción de reguladores de crecimiento por microorganismos), tolerancia a estrés (inducción de asociación efectiva con micorrizas por rizobacterias? Como consecuencia cada uno de estos potenciales beneficios debe ser sometido a ensayos específicamente diseñados. Además, la producción de bioles debe ser reproducible, tanto por la base, la fuente de microorganismos y las condiciones físico químicas durante el período de estandarización. Finalmente debe existir una caracterización de qué es lo que compone un biol para separar el conocimiento empírico del conocimiento agronómico.
- 8.2.** Los bioles son mezclas muy complejas de microorganismos de diferentes grupos. La composición y tamaño de las poblaciones varían a través del tiempo de fermentación, en gran parte determinado por la capacidad bioquímica y genética de cada grupo. No se puede concluir que hayan grupos dominantes de microorganismos. Por ejemplo, al inicio se encontraron niveles de bacterias aeróbicas entre 11 y 88 x10<sup>3</sup> UFC/ml, pero contrario a lo esperado, a los 30 días se contabilizaron entre 0.5 y 14 x10<sup>6</sup> UFC/ml de bacterias aeróbicas, un incremento de tres órdenes de magnitud. Por el contrario las bacterias

anaeróbicas, pasaron de 7 a  $4700 \times 10^3$  UFC/ml a 0.7 a  $13 \times 10^3$  UFC/ml. Los *Lactobacillus*, que permanecieron estables en el ámbito de 1 a  $11 \times 10^4$  UFC/ml, lo mismo que las levaduras, que permanecieron en un ámbito de 1 a  $20 \times 10^4$  UFC/ml. Otros grupos, como los actinomicetes y los hongos, tuvieron ámbito amplio desde el inicio dependiendo de la base utilizada. Los actinomicetes permanecieron entre 1 y  $400 \times 10^3$  UFC/ml. Lo mismo se observó con los hongos, aunque variaron en un amplio ámbito desde el inicio, pasaron de 1 a  $310 \times 10^2$  UFC/ml a 1 a  $81 \times 10^2$  UFC/ml.

- 8.3.** Los bioles a base de pasto fermentado a pesar de presentar un menor pH, respecto a los de boñiga, presentaron niveles inferiores de levaduras. Con lo cual se puede decir que la boñiga es un mejor sustrato para las levaduras. Los bioles con base en pasto fermentado como base alcanzaron niveles superiores de nitrógeno y de magnesio en comparación con los bioles de boñiga.
- 8.4.** Con excepción de los bioles con boñiga, donde se observó un incremento en la población de actinomicetes y ligeramente de hongos con el uso de lixiviado de pinzote, este producto no tuvo efecto en la estabilidad de las poblaciones de los otros grupos de microorganismos. El principal aporte del lixiviado de pinzote al biol es el incremento en la cantidad de potasio y zinc. Por otro lado aunque es un recurso disponible en las fincas bananeras, su recolección conlleva a un costo que incrementa el precio del biol.
- 8.5.** Con excepción de los *Lactobacillus*, los EM`s y los Microorganismos de Montaña, no se diferencian en su aporte global como fuentes de inóculo, al menos en cuanto a grupos de microorganismos. Sin embargo, los EM`s incluyen en su preparación un grupo reducido pero bien definido de microorganismos, seleccionados por su función, mientras que los MM son poblaciones mucho más complejas, incluyendo saprófitos, patógenos, saprófitos facultativos, etc.

**8.6.** En general se observó que los bioles son pobres desde el punto de vista nutricional, y su composición varía dependiendo de la base utilizada y de la adición de lixiviado del raquis del racimo del banano. Cerca del 50 a 70 % de los elementos fueron detectados en el sobrenadante, de allí el potencial de generar quelatos a partir de aminoácidos presentes en el medio de cultivo. Los contenidos en los bioles con boñiga sin diluir, varían entre 0.7 y 1.13 g/L para nitrógeno, 160 a 180 g/l de fósforo, 1500 a 5500 g/l de potasio, 4.20 g/l de calcio, 250 a 300 g/l de magnesio y 150 a 70 g/l de azufre. También presentan niveles bajo de hierro de 15 a 20 mg/l, de 0.4 a 0.7 mg/l de cobre y 2 mg/l de zinc, 10 mg/l de manganeso, y 0.2 y 0.3 mg/l de boro. En el caso del pasto fermentado, en comparación con los bioles a base de boñiga, se detectaron contenidos superiores de nitrógeno (1.9 a 2.3 g/l) y fósforo (1100 a 1400 mg/l). El nivel de potasio varía según el uso de lixiviado del raquis, entre 2400 y 6700 mg/l. También se observaron niveles inferiores de calcio (280 a 390 mg/l), niveles superiores de magnesio y azufre (670-780 mg/l y 280-350 mg/l respectivamente), contenidos similares de hierro y cobre (20 y 0.6-1,8 mg/l respectivamente), niveles superiores de zinc (5 a 7 mg/l), manganeso (20 a 30 mg/l) y boro (0.4 mg/l). Esto apoya el hecho que los agricultores orgánicos que utilizan bioles, los refuerzan con boro, magnesio, nitrógeno, azufre, fósforo, silicio, etc, generando de esta manera un fertilizante foliar, posiblemente con quelatos a base de aminoácidos libres en el sobrenadante del biol.

**8.7.** Los análisis de presencia de coliformes totales y fecales indicaron que las condiciones de los bioles no permiten la multiplicación de coliformes. A los 30 días de fermentación los niveles son no detectables o inferiores a 1 UFC/ml, además no se detectó la presencia de Salmonella en los bioles. Por lo tanto se considera que el uso agrícola de bioles, siguiendo la metodología empleada en este trabajo, es segura desde el punto de vista de exposición de los trabajadores.



- 8.8.** La aplicación de bioles en adición al programa de fertilización foliar por seis semanas en el vivero, no tuvo un efecto estimulante del crecimiento de meristemas. Sin embargo las aplicaciones de los bioles redujeron la incidencia de la pudrición del cormo causada por *Fusarium* de 3.6 % a 0.8%, lo cual es similar a los niveles obtenidos con control químico (1%) utilizado comercialmente e indica un posible rol de los microorganismos presentes en los bioles desplazando o compitiendo contra microorganismos fitopatógenos.
- 8.9.** En cuanto a costos la producción de bioles varía entre \$ 0.03/L y \$ 0.19/L en el caso de bioles preparados con boñiga y \$ 0.08/L y \$ 0.24/L los preparados con pasto fermentado, siendo el principal costo la recolección de lixiviado del raquis y el uso de EM-1.

## 9. RECOMENDACIONES

- Durante la preparación de los bioles, se debe de asegurar la calidad de los insumos que se utilizan, así como asegurarse que no sean una fuente de transmisión de enfermedades que puedan atentar contra la salud humana, así como patógenos. Para lo cual se deben implementar controles que permitan conocer microbiológicamente el producto de cada proceso.
- Se respalda lo mencionado por varios investigadores en lo fundamental que es el sellado de los biofermentadores, para asegurar que el proceso de fermentación no se convierta en un proceso de putrefacción; el cual atenta contra el objetivo de los bioles.
- Evaluar la respuesta de las plantas a un tratamiento con melaza al 4%, el cual podría fortalecer la microbiología presente en las hojas de las plantas y lograr un efecto similar, siempre y cuando la microbiología inicial sea favorable; por lo cual sería recomendable hacer una inoculación inicial con organismos benéficos.
- Aumentar los niveles de cobre en el paquete nutricional de las plantas a aplicar con bioles. Para evaluar si el cobre se presenta como el elemento limitante.
- Realizar una evaluación a mayor escala de las aplicaciones de bioles a nivel de vivero, para determinar su estabilidad como posible control de la Pudrición Seca del Cormo por *Fusarium*.
- Los bioles son mezclas microbiológicamente muy complejas, se debe realizar una caracterización más detallada de la composición poblacional, tal y como lo está evaluando CORBANA, con técnicas moleculares, con el fin de asegurarse la presencia de microorganismos benéficos y la ausencia de patógenos.

- Esta tesis debe ser considerada preliminar, se requiere continuar desarrollando experimentos para determinar el efecto de los bioles como inoculantes de suelo y su potencial interacción con hongos de suelo y nematodos, así como las aplicaciones foliares, y la aplicación al suelo en combinaciones con ahorros porcentuales de fertilizantes. También se debe determinar su dinámica con respecto al contenido de materia orgánica en el suelo, ya que se promociona como descomponedor de materia orgánica.

## 10. LITERATURA CITADA

- Agrios N, G. 1988. Fitopatología. D.F. México. LIMUSA. 530 p.
- Arauz C, LF. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. Editorial UCR. San Jose, Costa Rica. 472 p.
- Benzing A. 2001. Agricultura orgánica: fundamentos para la región andina. Neckar-Verlag. Villingen-Schwenningen, Alemania. 682 p.
- Briceño S, J. y Gadea R, A. 2002. Materia orgánica y adición de residuos al suelo. In Briceño, S, J; et al. Materia orgánica: características y uso de insumos orgánicos en suelos de Costa Rica. Heredia, C.R. EUNA. 107 p. (Serie Agricultura orgánica No 1)
- Campos V, DR y Meneses S, JM. 2008. Evaluación de fertilizantes biológicos (Bioles) líquidos reforzados aplicados al suelo en el cultivo de banano. Tesis Lic., Universidad Earth, Guácimo, Costa Rica.
- CEDECO (Corporación Educativa para el Desarrollo Costarricense). 2005. Preparación y uso de abonos orgánicos: sólidos y líquidos (en línea). San Jose, Costa Rica. 66 p. (Serie agricultura orgánica N°7) Consultado 16 feb 2009. Disponible en: [http://www.cedeco.or.cr/documentos/Abonos\\_organicos.pdf](http://www.cedeco.or.cr/documentos/Abonos_organicos.pdf)
- CORBANA (Corporación bananera nacional). 2009. Estadísticas de la industria bananera (en línea). Página Web. Consultado 16 junio 2009. Disponible en: <http://www.corbana.co.cr>
- Coyne, M. 2000. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Madrid, España. Paraninfo. 416 p.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 1998. Ecología microbiana. Ed. I Melo y J Azevedo. Jaguariúna, Brazil, Embrapa-CNPMA. 488 p.
- EMRO (EM Research Organization). 2008. Tecnología EM (en línea). Japan. Consultado 7 ene. 2009. Disponible en <http://emrojapan.com/>
- Fallas, K. 2002. Extracción de ácidos húmicos en suelos e insumos orgánicos. In Briceño, SJ; et al. Materia orgánica: características y uso de insumos orgánicos en suelos de Costa Rica. Heredia, C.R. EUNA. 107 p. (Serie Agricultura orgánica No 1)

- Fioravanti, M; Vega, N; Hernández, C; Okumoto, S; Yeomans, J. 2005. Eficiencia de los microorganismos eficaces (EM) en la estabilización de iodos sépticos para su uso agrícola. *Tierra Tropical* 1 (1): p. 69-76.
- Froni, L. 1999. Procesos microbianos (en línea). Consultado 18 ene. 2009. Disponible en <http://www.fagro.edu.uy/microbiologia/docs/Procesos%20Microbianos.pdf>
- Galindo B, AG y Jerónimo G, CS. 2005. Estudio sobre los abonos líquidos fermentados y su efectividad en la producción agrícola. Tesis Lic., Universidad Earth, Guácimo, Costa Rica.
- Galindo B, AG; Jerónimo G, CS; Spaans, E; Weil, M. 2007. Los abonos líquidos fermentados y su efectividad en plántulas de papaya (*Carica papaya* L.) *Tierra Tropical* 3 (1): p. 91-96.
- Higa, T. 2002. Una revolución para salvar la tierra. Trad. M<sup>a</sup> del Mar, R. EMRO Europe Branch. Terragona, España. 332 p.
- Higa, T; Parr F, J. 1994. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment (en línea). Japan. Consultado 18 dic. 2008. Disponible en: <http://www.agriton.nl/higa.html>
- Jankiewicz SL. 2003. Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas: propiedades y acción. D.F. México, Mundi-Prensa. v. 1, 487 p.
- Kinsey, N y Walters, C. 2006. Neal Kinsey's Hands-On Agronomy. Texas, U.S.A. 391 p.
- Lampkin N. 2001. Agricultura ecológica. Madrid, España. Mundi-Prensa. 725 p.
- Llácer, G; López, M; Trapero, A; Bello, A. Patología Vegetal. Mundi-Prensa. Madrid, España. 691 p.
- Madigan T, M; Martinko M, J; Parker J. 2004. Brock: Biología de los microorganismos. Ed. I Capella. Décima ed. Madrid, España, Pearson Prentice Hall. 1111 p.
- Mau, F. 2006. La solución ideal para el medio ambiente: EM Microorganismos efectivos. Trad. Marie-Luise, S. Editorial Integral. Barcelona, España. 237 p.
- Mazariegos R, SR. y Colindres V, CO. 2002. Producción de chile picante (*Capsicum frutescens* L.) con y sin presencia de arvenses y bajo cinco concentraciones de abono líquido orgánico fermentado, en las Mercedes de Guácimo, Costa Rica. Tesis Lic., Universidad Earth, Guácimo, Costa Rica.

- Molina E, SJ. 2005. Evaluación agronómica y bromatológica del pasto Maralfalfa (*Pennisetum sp.*) cultivado en el valle del Sinú. Universidad Nacional. Medellín, Colombia.
- Obregón C, M; Arias M, V; Durán R, C. 2000. Estudio preliminar para evaluar las posibles aplicaciones del lactosuero en la agricultura. *Tecnia*. 1 (1): p. 17-19.
- Okumoto, S. 2003. Uso de inoculante microbiano para la elaboración de abono orgánico. In Meléndez, G; Soto, G; eds. Taller de Abonos Orgánicos. San Jose, Costa Rica, CATIE/UCR. p. 57-66.
- ORIOUS. Sf. La nutrición vegetal con quelatos en aminoácidos (El línea). Villavicencio, Colombia. Consultado 20 feb 2009. Disponible en <http://www.oriousbiotecnologia.com/portal/content/view/17/7/>
- Ortiz V, RA; López M, A; Ponchner G, S; Segura M, Alvaro. 2001. El cultivo del Banano. San Jose, CR. EUNED. 187 p.
- Pacheco R, F. 2003. Evaluación del efecto de un abono líquido orgánico fermentado (biofermento) sobre el crecimiento de morera (*Morus alba*) en bancos de forraje en la Región Tropical de Costa Rica. Tesis Lic., Universidad Earth, Guácimo, Costa Rica.
- Pankhurst CE; Hawke, BG; McDonald, HJ; Kirkby, CA; Buckerfield, JC; Michelsen, P; O'Brien, KA; Gupta, VVSR; Doube, BM. 1995. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 35: 1015-1028.
- Pasto maralfalfa, Colombia. 2009. Pasto maralfalfa: generalidades. Página Web. (en línea). Consultado 30 ene. 2009. Disponible en <http://www.maralfalfa.com/spanish/general.html>
- Pérez-Gavilán P; Viniegra G. s.f. Potencial del uso del estiércol en la alimentación de los bovinos (en línea). México. Consultado 14 feb. 2009. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol1/CVv1c10.pdf>
- Pirt, SJ. 1975. Capítulo 4: Medios de Fermentación (en línea). *In Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Blackwell Scientific Publications. p. 31-42. Consultado 30 de ene. del 2009. Disponible en [http://www.science.oas.org/Simbio/mbio\\_ind/cap4\\_mi.pdf](http://www.science.oas.org/Simbio/mbio_ind/cap4_mi.pdf)

- Quirós P, A; Albertin B, A; Blázquez S, M. 2004. Elabore sus propios abonos, insecticidas y repelentes orgánicos. INA-OET. 36p.
- Restrepo R, J. 1998. La idea y el arte de fabricar los abonos orgánicos fermentados. Managua, Nicaragua. SIMAS. 151 p.
- Restrepo R, J. 2001. Elaboración de abonos orgánicos fermentados y Biofertilizantes foliares: experiencias con agricultores en Mesoamérica y Brasil. San Jose, CR. IICA. 155 p.
- Restrepo R, J. 2002. Agricultura orgánica biofertilizantes preparados y fermentados a base de mierda de vaca: a preguntas directas respuestas prácticas. Santiago de Cali (CO); Fundación Juquira Candirú. 104 p.
- Samaniego S, RD. 2006. Efecto de la producción orgánica y convencional de chile dulce (*Capsicum annuum*) bajo invernadero sobre el componente planta-suelo en el cantón de Alfaro Ruiz, Costa Rica. Tesis Mag. Sci., CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- Smith RL; Smith TM. 2005. Ecología. Ed. I Capella. Cuarta ed. Madrid, España, Pearson Educación. 642 p.
- Solórzano J. y Alvarado G. 2002. Efecto de varios abonos orgánicos y el encalado en el contenido nutricional de un inceptisol cultivado con mora, variedad vino (*Rubus praeicipuus* Bailey) en La Cima De Dota, Costa Rica. In Briceño, S, J; et al. Materia orgánica: características y uso de insumos orgánicos en suelos de Costa Rica. Heredia, C.R. EUNA. 107 p. (Serie Agricultura orgánica No 1)
- Soto B, M. 1992. BANANOS: Cultivo y comercialización. 2ª ed. San José, CR, LIL S.A. 674 p.
- Soto, G. y Meléndez, G. 2004. Como medir la calidad de los abonos orgánicos. Manejo integrado de plagas y agroecología (Costa Rica) No.72 p. 91-97.
- Stanier Y, R; Ingraham L, J; Wheelis L, M; Painter R, P. 1992. Microbiología. Barcelona, España. Editorial Reverté. 750 p.
- Talavera V; Zapata LM; Sánchez D. 1996. Utilización de bacterias y melaza en el cultivo de camarón (en línea). Boletín Nivovita. Perú. Vol 1. Ed 01. p. 17-19. Consultado 16 febrero 2009. Disponible en <http://www.industriaacuicola.com/PDFs/4.4-MelazayBacterias.pdf>

- Uribe, L. 2003. Inocuidad de abonos orgánicos. *In* Meléndez, G; Soto,G; eds. Taller de Abonos Orgánicos. San Jose, Costa Rica, CATIE/UCR.
- Urtecho, K. 2005. Elaboración de inóculo microbiológico MM. In Feria América Tropical. La sostenibilidad esta en tus manos (2005, EARTH). Memorias. EARTH, CR.
- WALCO. 1997. Todo sobre los quelatos (En línea). Bogotá, Colombia. Consultado 20 feb. 2009. Cartilla. Disponible en:  
[http://www.drcalderonlabs.com/Publicaciones/Cartilla\\_Quelatos.pdf](http://www.drcalderonlabs.com/Publicaciones/Cartilla_Quelatos.pdf)



## 11. ANEXOS

### ANEXO 1.

#### Cronograma de la investigación

<b>Actividad</b>	Dic.		Enero				Febrero				Marzo				Abril				Mayo				Junio			
	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>Planeamiento</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■																
<i>MM Sólidos</i>			■	■	■	■					■															
<i>MM Activado</i>							■																			
<i>Pasto Fermentado</i>								■	■	■	■															
<i>EM Activado</i>											■															
<i>Inicio Producción Bioles</i>											■	■	■	■												
<i>Análisis de Muestras</i>															■	■	■	■								
<i>Inicio Bioensayo</i>																			■	■	■	■				
<i>Toma de Datos</i>					■	■					■	■	■	■									■	■		
<i>Análisis y redacción</i>															■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

**Figura 1a.** Cronograma de actividades realizadas durante la investigación (2009).

## ANEXO 2.

Detalles de la formulación y montaje de los bioles evaluados en la investigación.

### **Formulación de los bioles**

Luego de la revisión de literatura, sobre el tema de biofermentos y biofertilizantes (Bioles), y de entrevistas con personas afines a la actividad, como el Ing. Rodrigo Vargas (Standard Fruit Co), Ing. Luis Quiroz (Finca Orgánica, Universidad Earth), Juan Zuñiga Samuels (CORBANA), además de información aportada por el Ph.D. Miguel Muñoz (Research, Standard Fruit Co), se definió el siguiente protocolo para desarrollar los bioles a evaluar en la investigación.

- **MM Sólidos (Microorganismos de montaña)**

#### Materiales necesarios:

- 2 sacos (aprox 16 Kg c/u) de hojarasca y mantillo de montaña
- 7.6 L de melaza
- 46 Kg de semolina de arroz
- 1 estañón de 200 L

#### Metodología:

Para la recolección de hojarasca de montaña, se retiran las hojas superficiales, hasta eliminar las hojas que no se encuentran en estado avanzado de descomposición, posteriormente se recoge la materia en descomposición, hasta parte del mantillo del suelo.

La mezcla se hace en dos tandas, para asegurar la homogeneidad de la mezcla. Se combinan 1 saco de hojarasca de montaña, 23 Kg de semolina y 3,7 L de melaza, disuelto en medio galón de agua. Y se repite lo mismo con el restante de los materiales. Una vez lista las dos tandas se mezclan bien. Si la mezcla queda muy seca,

se le agrega agua, pero evitando que quede muy húmedo (Se toma un puñado y se comprime, debe mantener la forma al soltarlo, pero no debe escurrir líquido durante la compresión). Después se echa al estañón, apelmazándolo bien para que no entre aire y se sella herméticamente el estañón (Restrepo 2001; Zúñiga 2008).

### Duración

Posterior al mezclado y sellado, se debe dejar un mes en condiciones anaeróbicas (Restrepo 2001; Zúñiga 2008).

- **Activación de los MM**

### Materiales necesarios:

- 20 Kg de MM (al 10% m/v)
- 10 L de melaza (al 5%)
- Agua limpia (al 85%)
- 1 envase de 200 L con sistema de liberación de gases

### Metodología:

Se agregan 100 L de agua, se disuelve la melaza hasta homogeneidad; posteriormente se agregan los MM y se mezclan. Luego se completa con agua hasta los 200 L. Finalmente se sella el sistema, dejando la válvula de salida de gases de forma tal que el sello de agua quede bien, para que no entre oxígeno al sistema (Restrepo 2001; Zúñiga 2008).

### Duración

La activación debe transcurrir de 6 a 8 días, para estar lista (Restrepo 2001; Zúñiga 2008).

- **Activación de los EM**

Materiales necesarios:

- 1 L de EM-1 (al 1%)
- 4 L de melaza (al 9%)
- Agua limpia (al 90%)
- 1 envase de 100 L con sistema de liberación de gases

Metodología:

Se agregan 50 L de agua, se diluye la melaza, hasta estar lo más homogénea posible; posteriormente se agrega el EM-1®, se mezcla y luego se completa con agua hasta los 100 L. Finalmente se sella el sistema, dejando la válvula de salida de gases de forma tal que el sello de agua quede bien, para que no entre oxígeno al sistema.

Duración

Varía según la temperatura ambiental, aproximadamente 8 días, y se utiliza al presentar un pH de 3.5 y un olor agridulce como indicador de que la activación fue exitosa.

- **Base Pasto Fermentado**

Materiales necesarios:

- 20 Kg de pasto tierno

- 46 kg de semolina de arroz
- 7,6 L de melaza
- 3,7 L de MM Activado
- 1 estañón con cierre hermético

### Metodología:

El pasto recolectado debe estar en una etapa fenológica temprana con tejido poco lignificado; para este caso se usará pasto de corta Maralfalfa. Posteriormente se debe picar, para aumentar el área de contacto y la mezcla se hace en dos tandas, con la mitad de los ingredientes; mezclando así la mitad del pasto (10 Kg), con la mitad de la semolina (23 Kg), agregando la mitad de la melaza (3,7 L) y ½ galón de MM activado. Posteriormente se repite con la mitad restante de los materiales. Después de tener las dos capas listas se voltea seis vueltas para que quede bien mezclado. Luego se deposita en un estañón plástico y cada cinco paladas se apelmaza lo mejor posible para reducir al mínimo el aire atrapado y se asegura el sellado del envase, para que no entre oxígeno, de forma que el sistema se mantenga bajo condiciones anaeróbicas (Restrepo 2001 y Zuñiga 2008).

### Duración

Posterior al sellado del envase, el proceso de fermentación anaeróbica debe transcurrir por un lapso de 22 a 30 días.

- **Base Boñiga**

### Materiales necesarios según Restrepo (2000):

- 50 Kg de Boñiga fresca (al 25%)
- 2 L de melaza (al 1%)
- 2 L de suero (al 1%)

- Agua limpia (al 73%)
- 1 envase de 200 L con sistema de liberación de gases

### Metodología:

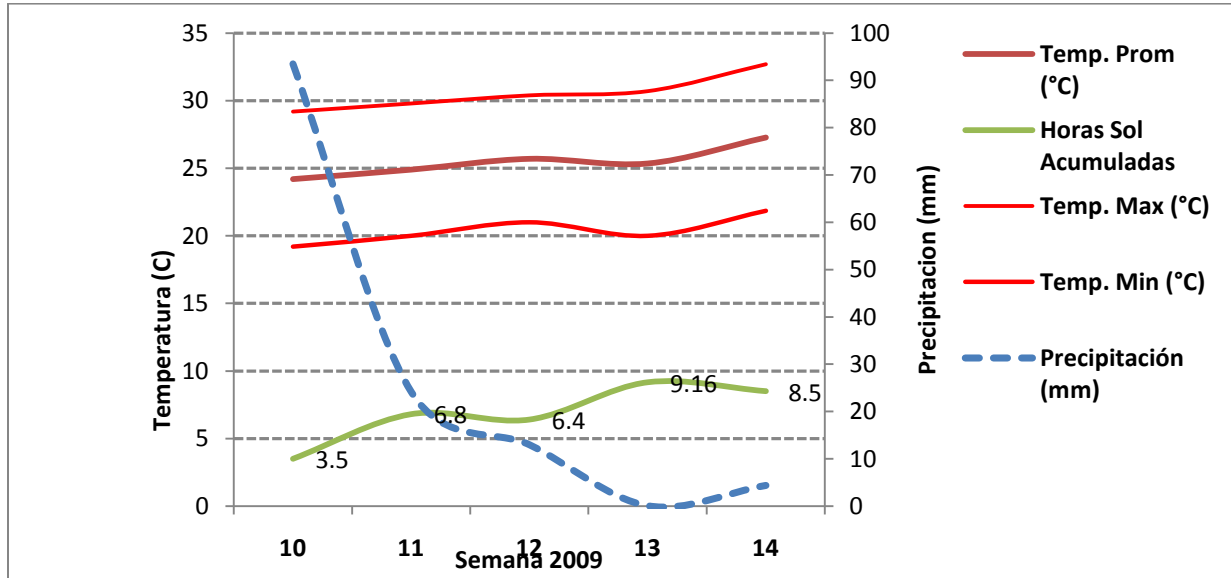
En 100 L de agua, se agregan los 50 Kg de boñiga y se mezcla bien, aparte se diluye la melaza y el suero y se agregan al estañón, posteriormente se completa con agua hasta los 200 L, luego se sella el sistema, dejando la válvula de salida de gases de forma tal que el sello de agua quede bien cerrado para que no entre oxígeno al sistema (Restrepo 2000).

### Duración

El lapso para obtener una buena fermentación anaeróbica va de los 26 a 30 días; el cual varía según la temperatura del sistema, siendo lo ideal 38°C (Restrepo 2000).

ANEXO 3.

Condiciones climáticas en la zona de Río Frío durante la producción de los Bioles.



**Figura 2a.** Condiciones climáticas durante el proceso de fermentación de los Bioles. Brindado por SFCo.

## ANEXO 4.

### Fotografías del montaje y muestreo de los bioles.



A y B Montaje de los bioles, reacción del pasto fermentado y el lixiviado de pinzote. C Ubicación de los fermentadores durante la investigación. D Fermentador previo al primer muestreo y sellado. E y F Método de extracción de las muestras para evitar el intercambio gaseoso. G y H Muestras extraídas para los análisis de laboratorio. I Montaje de las muestras para los análisis de coliformes. J Muestras procesadas por el método de filtrado de membrana. K Muestras procesadas por el método de fluorescencia a luz día identifican presencia de coliformes totales cuando se tornan amarillo, al frente los controles. L Ejemplo de resultado negativo para coliformes fecales, a la izquierda el control negativo, en medio muestra del tratamiento 3 y a la derecha el control positivo.



## ANEXO 5

Resultado del análisis de *Salmonella* realizado por el laboratorio del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.



Laboratorio de Microbiología Agrícola  
Centro de Investigaciones Agronómicas  
Universidad de Costa Rica



Número de Solicitud: 31613      Fecha de emisión del reporte: 3/04/2009

### Información del Usuario:

Nombre: Standard Fruit Company de CR S.A  
Dirección: Limón, Limón  
Contacto: Miguel Muñoz  
Teléfono: 2764-4000

## Resultados del ensayo

Para la ejecución de los ensayos de coliformes se utiliza el procedimiento Determinación de Coliformes Totales, Coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Salmonella* en abonos orgánicos, metodología desarrollada de acuerdo al Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20<sup>a</sup> Edición, 1998 y Test Methods for the Examination of Composting and Compost, 2002.

ID Lab	ID Usuario	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>
MI-130-09	Muestra tesis	Negativo

Lidieth Uribe

Dra. Lidieth Uribe López Ph.D.  
M.Q.C. cod 664  
Coordinadora  
Laboratorio de Microbiología



Teléfono: (506) 2511-3128 • Fax: (506) 2234-1627 • Correo electrónico: lidieth.uribe@ucr.ac.cr  
Ciudad de la Investigación, Universidad de Costa Rica. Carretera a Sabanilla.  
50 m O, 100 m S de las Instalaciones Deportivas de la UCR.

## ANEXO 6.

Resultado de los análisis microbiológicos realizados por el laboratorio Doctor Obregon, del muestreo a los cero días de fermentación.



## Asesoramiento Fitosanitario

**LAB. Dr. Obregón**

Telefax 2293-03-94

Celular 8828-63-82

Oficina Sarapiquí 2761-06-68

m.obregon@costarricense.cr

www.doctor-obregon.com

### Informe

#### Análisis microbiológico de Bioles

Fecha Ingreso: 10/3/2009

Código Lab	Tratamiento	Días	Lixiviado	Base	Inóculo	Bact. Aeróbicas	Bact. Anaeróbicas	Actinos	Hongos	Levaduras	Lactobacillus	pH	
05	T1	0	Sin Lixiviado	Boñiga	EM	2000000.00	100.00	1000.00	100.00	100.00	20000000.00	3.78	
06	T2	0	Sin Lixiviado	Boñiga	MM	20000000.00	100.00	320000.00	36000.00	32000.00	8000000.00	3.83	
07	T3	0	Sin Lixiviado	Boñiga	EM+MM	88000000.00	8000.00	140000.00	26000.00	10000.00	26000000.00	3.88	
08	T4	0	Lixiviado	Boñiga	EM	10000000.00	24000.00	380000.00	12000.00	38000.00	18000000.00	6.45	
09	T5	0	Lixiviado	Boñiga	MM	10000000.00	10000.00	38000.00	26000.00	8000.00	200000.00	7.16	
10	T6	0	Lixiviado	Boñiga	EM+MM	8000000.00	6000.00	300000.00	26000.00	88000.00	20000000.00	6.30	
11	T7	0	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM	48000000.00	100.00	1000.00	100000.00	10000.00	120000000.00	3.10	
12	T8	0	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	MM	24000000.00	100.00	1000.00	100.00	10000.00	28000000.00	3.04	
13	T9	0	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	70000000.00	100000.00	1000.00	100.00	10000.00	10000000.00	2.98	
14	T10	0	Lixiviado	Pasto Ferm	EM	82000000.00	6000.00	14000000.00	1000.00	1000.00	7400000.00	10000000.00	3.77
15	T11	0	Lixiviado	Pasto Ferm	MM	56000000.00	100.00	1000.00	100.00	10000.00	68000000.00	3.78	
16	T12	0	Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	6000000.00	10000.00	1000.00	100.00	18000.00	20000000.00	4.02	
17	T1	0	Sin Lixiviado	Boñiga	EM	88000000.00	14000000.00	320000.00	24000.00	10000.00	48000000.00	3.95	
18	T2	0	Sin Lixiviado	Boñiga	MM	14000000.00	4000000.00	360000.00	22000.00	24000.00	14000000.00	4.01	
19	T3	0	Sin Lixiviado	Boñiga	EM+MM	76000000.00	30000.00	320000.00	22000.00	58000.00	12000000.00	3.90	
20	T4	0	Lixiviado	Boñiga	EM	54000000.00	2000.00	380000.00	24000.00	16000.00	600000.00	3.09	
21	T5	0	Lixiviado	Boñiga	MM	74000000.00	100.00	260000.00	20000.00	14000.00	140000.00	6.45	
22	T6	0	Lixiviado	Boñiga	EM+MM	6000000.00	8000.00	100000.00	12000.00	16000.00	20000000.00	6.50	
23	T7	0	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM	24000000.00	20000.00	1000.00	100.00	10000.00	54000000.00	3.47	
24	T8	0	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	MM	500000.00	4000.00	1000.00	2000.00	10000.00	10000000.00	2.93	
25	T9	0	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	18000000.00	100000.00	1000.00	100000.00	100000.00	26000000.00	3.06	
26	T10	0	Lixiviado	Pasto Ferm	EM	6000000.00	100.00	1000.00	1000.00	180000.00	14000000.00	3.70	
27	T11	0	Lixiviado	Pasto Ferm	MM	12000000.00	12000.00	140000.00	100.00	26000.00	12000000.00	3.57	
28	T12	0	Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	14000000.00	18000.00	20000.00	1000.00	30000.00	14000000.00	3.30	
29	T1	0	Sin Lixiviado	Boñiga	EM	18000000.00	80000.00	520000.00	10000.00	100000.00	86000000.00	3.46	
30	T2	0	Sin Lixiviado	Boñiga	MM	46000000.00	26000.00	480000.00	46000.00	38000.00	200000.00	6.50	
31	T3	0	Sin Lixiviado	Boñiga	EM+MM	100000000.00	100.00	320000.00	24000.00	46000.00	22000000.00	3.80	
32	T4	0	Lixiviado	Boñiga	EM	40000000.00	18000.00	580000.00	46000.00	52000.00	16000000.00	3.30	
33	T5	0	Lixiviado	Boñiga	MM	4000000.00	6000.00	1000.00	100.00	640000.00	92000000.00	3.40	
34	T6	0	Lixiviado	Boñiga	EM+MM	88000000.00	100.00	1000.00	100.00	10000.00	64000000.00	3.05	
35	T7	0	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM	58000000.00	100.00	80000.00	6000.00	10000.00	5600000.00	5.90	
36	T8	0	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	MM	48000000.00	100.00	320000.00	26000.00	16000.00	360000.00	6.40	
37	T9	0	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	68000000.00	2000.00	140000.00	16000.00	10000.00	8000000.00	6.20	
38	T10	0	Lixiviado	Pasto Ferm	EM	10000000.00	100.00	1000.00	100.00	10000.00	24000000.00	3.39	
39	T11	0	Lixiviado	Pasto Ferm	MM	14000000.00	10000.00	1000.00	100.00	58000.00	32000000.00	3.40	
40	T12	0	Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	16000000.00	2000.00	1000.00	100.00	27000.00	1400000.00	3.50	

Ph.D. Miguel Obregon

## ANEXO 7.

Resultado de los análisis microbiológicos realizados por el laboratorio Doctor Obregon, del muestreo a los quince días de fermentación.



# Asesoramiento Fitosanitario

**LAB. Dr. Obregón**

Telefax 2293-03-94

Celular 8828-63-82

Oficina Sarapiquí 2761-06-68

m.obregon@costarricense.cr

www.doctor-obregon.com

## Informe

### Análisis microbiológico de Bioles

Fecha Ingreso: 25/3/2009

Código Lab	Tratamiento	Días	Lixiviado	Base	Inóculo	Bact. Aeróbicas	Bact. Anaeróbicas	Actinos	Hongos	Levaduras	Lactobacillus	pH
1	T1	15	Sin Lixiviado	Boñiga	EM	16000000.00	19000.00	40000.00	100.00	56000.00	54000000.00	4.40
2	T2	15	Sin Lixiviado	Boñiga	MM	14000000.00	4000.00	120000.00	4000.00	8000.00	560000000.00	4.05
3	T3	15	Sin Lixiviado	Boñiga	EM+MM	4000000.00	2000.00	14000.00	4000.00	120000.00	140000.00	4.01
4	T4	15	Lixiviado	Boñiga	EM	10000000.00	10000.00	180000.00	20000.00	10000.00	610000.00	6.15
5	T5	15	Lixiviado	Boñiga	MM	22000000.00	4000.00	260000.00	100.00	48000.00	22000000.00	6.50
6	T6	15	Lixiviado	Boñiga	EM+MM	2000000.00	6000.00	60000.00	40000.00	3400.00	8000000.00	6.05
7	T7	15	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM	2000000.00	100.00	1000.00	1000.00	94000.00	240000.00	3.07
8	T8	15	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	MM	1000000.00	100.00	1000.00	100.00	24000.00	42000000.00	3.14
9	T9	15	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	100000.00	100.00	1000.00	100.00	78000.00	240000.00	3.05
10	T10	15	Lixiviado	Pasto Ferm	EM	28000000.00	100.00	1000.00	100.00	32000.00	68000000.00	3.66
11	T11	15	Lixiviado	Pasto Ferm	MM	22000000.00	100.00	1000.00	100.00	10000.00	680000.00	4.05
12	T12	15	Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	1200000.00	2000.00	1000.00	100.00	46000.00	1800000.00	3.75
13	T1	15	Sin Lixiviado	Boñiga	EM	140000000.00	4000.00	12000.00	4000.00	68000.00	280000.00	4.10
14	T2	15	Sin Lixiviado	Boñiga	MM	8000000.00	100.00	100000.00	18000.00	44000.00	6000000.00	4.11
15	T3	15	Sin Lixiviado	Boñiga	EM+MM	14000000.00	2000.00	160000.00	6000.00	32000.00	34000000.00	4.36
16	T4	15	Lixiviado	Boñiga	EM	6000000.00	100.00	140000.00	100.00	6000.00	340000.00	6.46
17	T5	15	Lixiviado	Boñiga	MM	100000.00	100.00	240000.00	100.00	66000.00	4000000.00	5.94
18	T6	15	Lixiviado	Boñiga	EM+MM	6000000.00	2000.00	200000.00	20000.00	6000.00	16000000.00	6.52
19	T7	15	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM	100000.00	100.00	1000.00	100.00	82000.00	180000.00	3.70
20	T8	15	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	MM	1000000.00	8000.00	1000.00	100.00	14000.00	100000.00	3.25
21	T9	15	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	8000000.00	100.00	1000.00	100.00	28000.00	64000000.00	3.10
22	T10	15	Lixiviado	Pasto Ferm	EM	4000000.00	6000.00	1000.00	1200.00	10000.00	64000000.00	3.75
23	T11	15	Lixiviado	Pasto Ferm	MM	20000000.00	2000.00	1000.00	100.00	10000.00	54000000.00	3.92
24	T12	15	Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	16000000.00	14000.00	1000.00	100.00	6000.00	68000000.00	3.67
25	T1	15	Sin Lixiviado	Boñiga	EM	8000000.00	2000.00	200000.00	4000.00	240000.00	14000000.00	4.38
26	T2	15	Sin Lixiviado	Boñiga	MM	24000000.00	4000.00	180000.00	14000.00	42000.00	100000.00	4.05
27	T3	15	Sin Lixiviado	Boñiga	EM+MM	16000000.00	100.00	40000.00	2000.00	40000.00	280000.00	4.11
28	T4	15	Lixiviado	Boñiga	EM	8000000.00	100.00	300000.00	6000.00	14000.00	200000.00	6.10
29	T5	15	Lixiviado	Boñiga	MM	2000000.00	100.00	140000.00	4000.00	68000.00	8000000.00	5.52
30	T6	15	Lixiviado	Boñiga	EM+MM	2000000.00	100.00	120000.00	8000.00	14000.00	200000.00	6.70
31	T7	15	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM	10000000.00	2000.00	100.00	100.00	88000.00	320000.00	3.10
32	T8	15	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	MM	24000000.00	100.00	1000.00	4000.00	16000.00	480000000.00	3.17
33	T9	15	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	4000000.00	1600.00	1000.00	2000.00	56000.00	80000.00	3.17
34	T10	15	Lixiviado	Pasto Ferm	EM	6000000.00	2000.00	1000.00	100.00	48000.00	300000.00	3.72
35	T11	15	Lixiviado	Pasto Ferm	MM	48000000.00	100.00	100.00	100.00	82000.00	64000000.00	3.95
36	T12	15	Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	8000000.00	10000.00	1000.00	2000.00	56000.00	80000.00	3.93

Ph.D. Miguel Obregon

## ANEXO 8.

Resultado de los análisis microbiológicos realizados por el laboratorio Doctor Obregon, del muestreo a los treinta días de fermentación.



## Asesoramiento Fitosanitario

**LAB. Dr. Obregón**

Telefax 2293-03-94

Celular 8828-63-82

Oficina Sarapiquí 2761-06-68

m.obregon@costarricense.cr

www.doctor-obregon.com

### Informe

#### Análisis microbiológico de Bioles

Fecha Ingreso: 13-04-09

Código Lab	Tratamiento	Días	Lixiviado	Base	Inóculo	Bact. Aeróbicas	Bact. Anaeróbicas	Actinos	Hongos	Levaduras	Lactobacillus	pH
1	T1	30	Sin Lixiviado	Boñiga	EM	100000.00	100.00	60000.00	2000.00	260000.00	1000.00	4.68
2	T2	30	Sin Lixiviado	Boñiga	MM	12000000.00	100.00	1000.00	4000.00	24000.00	460000.00	4.34
3	T3	30	Sin Lixiviado	Boñiga	EM+MM	8000000.00	100.00	20000.00	4000.00	36000.00	14000000.00	4.24
4	T4	30	Lixiviado	Boñiga	EM	100000.00	14000.00	360000.00	100.00	36000.00	100000.00	6.57
5	T5	30	Lixiviado	Boñiga	MM	18000000.00	8000.00	340000.00	6000.00	54000.00	100000.00	7.61
6	T6	30	Lixiviado	Boñiga	EM+MM	20000000.00	26000.00	180000.00	4000.00	20000.00	2000000.00	6.56
7	T7	30	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM	8000000.00	2000.00	1000.00	4000.00	6000.00	96000000.00	3.45
8	T8	30	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	MM	8000000.00	6000.00	1000.00	2000.00	8000.00	72000000.00	3.60
9	T9	30	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	18000000.00	6000.00	1000.00	100.00	38000.00	510000000.00	3.45
10	T10	30	Lixiviado	Pasto Ferm	EM	14000000.00	100.00	1000.00	6000.00	44000.00	180000000.00	3.96
11	T11	30	Lixiviado	Pasto Ferm	MM	100000.00	4000.00	1000.00	20000.00	8000.00	24000000.00	4.58
12	T12	30	Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	34000000.00	2000.00	1000.00	100.00	42000.00	48000000.00	4.53
13	T1	30	Sin Lixiviado	Boñiga	EM	2000000.00	4000.00	60000.00	30000.00	52000.00	2000000.00	4.23
14	T2	30	Sin Lixiviado	Boñiga	MM	22000000.00	8000.00	40000.00	14000.00	26000.00	80000.00	4.23
15	T3	30	Sin Lixiviado	Boñiga	EM+MM	4000000.00	100.00	2000.00	6000.00	42000.00	6000000.00	4.30
16	T4	30	Lixiviado	Boñiga	EM	4000000.00	6000.00	260000.00	4000.00	42000.00	26000000.00	7.00
17	T5	30	Lixiviado	Boñiga	MM	10000000.00	8000.00	260000.00	10000.00	14000.00	2000000.00	6.91
18	T6	30	Lixiviado	Boñiga	EM+MM	4000000.00	100.00	480000.00	2000.00	16000.00	4000000.00	7.30
19	T7	30	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM	100000.00	100.00	1000.00	100.00	34000.00	46000000.00	3.51
20	T8	30	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	MM	2000000.00	100.00	1000.00	2000.00	18000.00	70000000.00	3.50
21	T9	30	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	6000000.00	6000.00	1000.00	100.00	54000.00	64000000.00	3.49
22	T10	30	Lixiviado	Pasto Ferm	EM	100000.00	100.00	1000.00	6000.00	28000.00	32000000.00	4.11
23	T11	30	Lixiviado	Pasto Ferm	MM	20000000.00	100.00	1000.00	100.00	28000.00	72000000.00	4.31
24	T12	30	Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	100000.00	100.00	1000.00	6000.00	16000.00	70000000.00	4.19
25	T1	30	Sin Lixiviado	Boñiga	EM	100000.00	100.00	40000.00	12000.00	48000.00	680000.00	4.25
26	T2	30	Sin Lixiviado	Boñiga	MM	4000000.00	100.00	1000.00	100.00	28000.00	4000000.00	4.22
27	T3	30	Sin Lixiviado	Boñiga	EM+MM	14000000.00	4000.00	1000.00	100.00	18000.00	8000000.00	4.20
28	T4	30	Lixiviado	Boñiga	EM	2000000.00	100.00	220000.00	2000.00	10000.00	1000.00	6.11
29	T5	30	Lixiviado	Boñiga	MM	10000000.00	100.00	120000.00	6000.00	68000.00	1000.00	5.77
30	T6	30	Lixiviado	Boñiga	EM+MM	22000000.00	6000.00	320000.00	2000.00	24000.00	100000.00	7.29
31	T7	30	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM	4000000.00	100.00	1000.00	100.00	100.00	420000000.00	4.15
32	T8	30	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	MM	80000000.00	100.00	10000.00	100.00	6000.00	54000000.00	4.29
33	T9	30	Sin Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	6000000.00	4000.00	1000.00	100.00	4000.00	62000000.00	4.12
34	T10	30	Lixiviado	Pasto Ferm	EM	12000000.00	4000.00	1000.00	100.00	46000.00	55000000.00	4.14
35	T11	30	Lixiviado	Pasto Ferm	MM	10000000.00	100.00	1000.00	2000.00	30000.00	44000000.00	3.78
36	T12	30	Lixiviado	Pasto Ferm	EM+MM	20000000.00	100.00	1000.00	100.00	20000.00	26000000.00	4.15

Ph.D. Miguel Obregon

# ANEXO 9.

Resultado de los análisis químicos realizados por el laboratorio de CORBANA, a los bioles posterior a los treinta días de fermentación.



COR-LQ-MCS-IT1-FR1  
Página 1 de 2

**LABORATORIO QUÍMICO**  
Centro de Investigación La Rita  
Pococi, Limón  
Tel. 2713-1675 Fax 2763-3055  
Correo e- rgonzalez@corbana.co.cr

### INFORME DE ENSAYO

INFORME N° 11332  
Boleta N° 1660  
Factura N° na

Cliente Standard Fruit Company de Costa Rica  
Solicitante Miguel Muñoz Fonseca  
Correo e- mmunoz@la.dole.com / faraya03@hotmail.com  
27 64 40 00  
Tipo de muestra Líquido Orgánico  
Observaciones na

Fecha de emisión del informe 4/30/2009  
Fecha de ingreso 4/14/2009  
Fecha de muestreo 4/9/2009  
Responsable del muestreo El Cliente  
Cantidad 72  
Análisis adicionales Centrifugar  
Análisis a omitir na

Código de muestra	Identificación de la muestra (colilla)	pH	N g/L	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B	Al-ex	Si-ex	C.E mS/cm	Observaciones
lo-2009-5028	1	4.82	0.78	178	1670	421	275	170	22.2	0.51	2.31	11.1	0.28	10.2	170	8.93	
lo-2009-5029	2	4.88	1.10	200	1670	392	275	163	21.5	0.53	2.08	10.4	0.25	11.8	176	9.42	
lo-2009-5030	3	4.85	1.30	187	1673	407	270	171	22.9	0.59	2.40	10.9	0.24	13.0	192	10.2	
lo-2009-5031	4	6.42	1.13	210	5495	432	295	202	13.4	0.91	2.08	9.91	0.31	10.1	183	19.0	
lo-2009-5032	5	7.16	1.11	252	5781	428	310	178	17.7	1.18	3.03	9.45	0.34	17.8	223	19.6	
lo-2009-5033	6	6.26	1.22	246	5794	446	314	261	15.7	0.97	2.16	10.5	0.33	10.6	188	20.0	
lo-2009-5034	7	4.18	2.68	1426	2572	483	813	393	23.2	2.28	7.16	28.9	0.42	11.3	519	11.4	
lo-2009-5035	8	4.32	2.77	1342	2238	461	758	377	23.0	2.51	7.12	27.3	0.45	13.2	563	11.4	
lo-2009-5036	9	4.15	1.62	1199	2324	286	717	267	18.3	0.65	5.88	23.7	0.29	4.65	209	11.4	
lo-2009-5037	10	4.73	1.44	1088	8881	224	681	311	19.8	0.24	4.98	21.3	0.37	2.59	125	21.6	
lo-2009-5038	11	5.35	1.41	963	6367	217	567	287	18.2	0.64	3.11	18.4	0.39	5.13	218	20.6	
lo-2009-5039	12	5.22	1.92	970	6433	232	583	297	18.7	0.62	3.47	19.5	0.38	4.78	206	20.0	
lo-2009-5040	13	4.38	0.70	182	1661	438	285	178	23.9	0.51	2.10	10.5	0.22	11.7	165	12.0	
lo-2009-5041	14	4.89	1.20	226	1622	426	297	178	22.6	0.52	2.19	11.2	0.21	10.6	169	12.0	
lo-2009-5042	15	4.62	0.89	169	1541	373	262	166	17.3	0.35	1.33	9.05	0.20	4.71	112	11.5	
lo-2009-5043	16	6.76	0.99	236	5491	434	291	135	16.0	0.65	2.71	10.8	0.30	15.8	196	23.2	
lo-2009-5044	17	6.79	0.81	278	5647	438	314	144	16.6	0.72	3.09	11.9	0.32	16.9	203	22.8	
lo-2009-5045	18	7.19	1.00	229	5255	405	295	127	15.1	0.66	2.80	9.22	0.28	15.9	198	22.0	
lo-2009-5046	19	4.32	2.02	1448	2425	346	827	310	20.1	1.09	7.14	28.4	0.35	5.80	286	13.0	muestras agitadas
lo-2009-5047	20	4.36	2.12	1572	2549	392	893	344	23.2	1.48	7.78	30.4	0.39	8.99	382	13.9	
lo-2009-5048	21	4.32	2.14	1459	2401	327	828	296	20.2	0.84	6.79	28.1	0.31	5.25	234	13.0	
lo-2009-5049	22	4.94	2.37	1467	6407	316	801	346	21.5	1.01	6.40	26.9	0.45	5.23	273	19.6	
lo-2009-5050	23	5.20	1.53	1008	6296	218	601	297	18.8	0.48	3.62	18.6	0.34	3.97	159	21.6	
lo-2009-5051	24	5.01	1.80	1548	5790	256	845	283	18.9	0.38	5.12	25.6	0.38	2.89	149	23.6	
lo-2009-5052	25	4.94	0.68	186	1513	420	275	166	20.5	0.38	2.09	10.6	0.19	6.72	123	11.8	
lo-2009-5053	26	4.85	1.09	216	1650	442	297	177	22.2	0.46	2.46	11.9	0.23	8.77	139	11.4	
lo-2009-5054	27	4.90	0.60	146	1438	362	244	152	18.7	0.37	1.47	8.78	0.18	5.95	108	10.8	
lo-2009-5055	28	6.23	0.99	193	5165	406	288	169	15.2	0.33	1.25	10.1	0.26	5.57	119	23.6	
lo-2009-5056	29	6.10	0.50	242	5253	386	299	175	13.6	0.31	1.12	10.6	0.24	3.98	111	23.6	
lo-2009-5057	30	7.32	0.72	226	5498	411	297	125	13.3	0.65	2.42	8.58	0.26	13.1	170	23.6	
lo-2009-5058	31	4.30	1.72	1440	2703	352	899	304	21.1	0.54	7.36	29.1	0.35	3.86	194	13.7	
lo-2009-5059	32	4.40	2.10	1407	2447	393	825	338	21.4	1.50	7.15	28.2	0.40	9.06	403	14.1	
lo-2009-5060	33	4.39	1.30	1393	2477	291	835	274	19.8	0.40	6.79	27.1	0.29	3.34	133	13.3	
lo-2009-5061	34	4.84	2.32	1505	6694	429	869	399	23.7	1.37	7.39	29.7	0.53	7.72	353	25.1	
lo-2009-5062	35	5.05	2.10	1541	5983	270	845	302	19.4	0.67	5.33	25.6	0.49	3.97	214	21.2	
lo-2009-5063	36	4.88	1.90	1332	6140	365	799	335	19.3	0.84	6.46	25.5	0.49	5.43	253	23.0	

Métodos de ensayo:

N: Combustión seca  
P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Zn, Mn, B: digestión en microondas y lectura en espectrofotómetro de plasma.

Nota: El laboratorio queda eximido de toda responsabilidad, en interpretaciones de resultados, cuando el muestreo no ha sido realizado por CORBANA, S.A.

Al y Si extraído en HNO<sub>3</sub>

Jefe de Laboratorio Químico

Lic. Roberto González Rojas

Firma \_\_\_\_\_

CQCR 1177



LABORATORIO QUIMICO  
Centro de Investigación La Rita  
Pococi, Limón  
Tel. 2713-1676 Fax 2763-3066  
Correo e- rgonzalez@corbana.co.cr

INFORME DE ENSAYO

INFORME N° 11332  
Boleta N° 1060  
Factura N° na

Cliente Standard Fruit Company de Costa Rica  
Solicitante Miguel Muñoz Fonseca  
Correo e- mmunoz@la.dole.com / faraya03@hotmail.com  
27 64 40 00  
Tipo de muestra Líquido Orgánico  
Observaciones na

Fecha de emisión del informe 4/30/2009  
Fecha de ingreso 4/14/2009  
Fecha de muestreo 4/9/2009  
Responsable del muestreo El Cliente  
Cantidad 72  
Análisis adicionales Centrifugar  
Análisis a omitir na

Código de muestra	Identificación de la muestra (colilla)	pH	N g/L	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B	Al-ex	Si-ex	C.E mS/cm	Observaciones
lo-2009-5064	1	5.19	0.79	146	1531	392	264	143	17.4	0.20	0.99	10.1	0.19	1.22	66.7	8.94	
lo-2009-5065	2	4.86	0.50	178	1525	358	263	137	15.9	0.18	0.68	9.34	0.20	1.14	63.6	10.1	
lo-2009-5066	3	4.85	0.78	163	1509	371	256	142	16.9	0.18	1.07	9.61	0.18	1.48	66.2	10.3	
lo-2009-5067	4	6.77	0.80	191	5250	379	276	122	4.64	0.41	0.88	8.04	0.26	1.65	93.2	21.1	
lo-2009-5068	5	7.60	0.81	165	5645	271	283	117	3.06	0.41	0.69	2.87	0.25	1.43	84.1	22.2	
lo-2009-5069	6	6.57	0.60	228	5603	408	304	191	7.07	0.45	0.66	9.26	0.28	1.57	88.6	22.2	
lo-2009-5070	7	4.17	1.90	1412	2524	271	824	275	20.5	0.08	6.72	25.5	0.28	1.64	43.4	12.7	
lo-2009-5071	8	4.30	1.40	1323	2360	251	818	260	19.7	0.02	6.35	26.3	0.30	2.07	44.3	12.6	
lo-2009-5072	9	4.13	1.62	1150	2315	221	721	238	17.5	0.03	5.75	21.9	0.28	1.82	40.0	12.1	
lo-2009-5073	10	4.76	1.52	1036	6789	191	672	293	20.1	0.01	4.77	19.7	0.36	1.52	67.1	22.5	
lo-2009-5074	11	5.32	1.24	928	6471	115	568	248	9.04	0.04	0.70	16.3	0.33	0.59	74.4	21.1	
lo-2009-5075	12	5.15	1.52	894	6283	120	561	253	8.29	0.07	0.48	16.5	0.31	0.52	67.9	21.6	
lo-2009-5076	13	4.84	0.30	148	1635	401	278	151	18.3	0.20	0.84	9.54	0.18	1.20	68.7	12.2	
lo-2009-5077	14	4.97	0.70	194	1604	394	288	151	17.4	0.15	1.03	10.2	0.20	1.12	66.9	12.0	
lo-2009-5078	15	5.66	0.30	137	1515	353	255	138	11.8	0.15	0.60	7.99	0.17	0.94	61.4	10.2	
lo-2009-5079	16	6.99	0.50	190	5445	355	277	84	3.7	0.22	0.64	6.94	0.21	1.63	84.2	22.5	
lo-2009-5080	17	7.07	0.50	219	5544	320	290	87	4.3	0.26	0.82	6.07	0.24	1.88	86.6	22.4	
lo-2009-5081	18	7.37	0.60	149	5298	269	275	83	3.2	0.23	0.69	3.09	0.21	1.53	84.4	22.2	
lo-2009-5082	19	4.21	1.60	1494	2520	257	866	264	19.5	0.12	6.95	26.2	0.28	1.46	42.6	12.9	
lo-2009-5083	20	4.30	1.40	1610	2608	255	928	269	21.2	0.05	7.33	29.0	0.29	2.17	42.0	13.8	
lo-2009-5084	21	4.29	1.41	1453	2436	262	852	257	20.6	0.06	6.55	25.6	0.28	1.85	41.7	12.3	
lo-2009-5085	22	4.78	1.11	1417	6659	225	810	280	16.3	0.09	4.73	26.2	0.39	0.95	69.8	22.5	
lo-2009-5086	23	5.27	1.10	978	6410	149	600	267	11.5	0.05	1.43	16.8	0.33	0.89	70.4	20.9	
lo-2009-5087	24	4.98	0.90	1522	5655	217	815	257	14.5	0.06	3.04	23.7	0.36	0.99	64.9	20.7	
lo-2009-5088	25	4.95	0.10	182	1803	428	290	161	18.7	0.16	1.45	10.6	0.16	1.14	68.0	11.1	
lo-2009-5089	26	4.68	0.89	204	1503	409	287	161	17.4	0.16	1.70	11.0	0.20	1.17	65.5	10.8	
lo-2009-5090	27	5.00	0.50	137	1412	345	237	141	16.0	0.11	0.67	8.18	0.14	0.98	58.0	9.48	
lo-2009-5091	28	6.92	0.60	175	5225	361	283	141	9.2	0.14	0.50	6.84	0.24	1.28	79.4	20.7	
lo-2009-5092	29	6.34	0.00	226	5130	380	288	153	10.7	0.14	0.52	9.46	0.21	1.23	77.9	21.1	
lo-2009-5093	30	7.58	0.59	131	5165	249	258	73	2.7	0.20	0.59	2.33	0.16	1.25	74.3	20.2	
lo-2009-5094	31	4.30	1.12	1517	2709	307	918	283	21.1	0.00	7.08	27.7	0.28	1.59	38.8	12.7	
lo-2009-5095	32	4.43	1.19	1457	2458	251	853	258	20.4	0.02	6.59	26.8	0.29	2.06	40.6	12.9	
lo-2009-5096	33	4.33	1.21	1339	2507	261	849	257	19.4	0.08	6.73	25.9	0.28	1.81	39.4	13.1	
lo-2009-5097	34	4.82	0.91	1472	7042	307	914	313	21.2	0.01	6.85	28.5	0.43	1.55	61.9	22.9	
lo-2009-5098	35	5.04	1.30	1471	6077	215	853	255	13.2	0.08	3.82	24.5	0.41	1.01	71.0	20.4	
lo-2009-5099	36	4.91	1.52	1359	6277	293	816	283	18.3	0.04	5.75	24.4	0.41	1.48	55.5	21.5	

Métodos de ensayo:

N: Combustión seca  
P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Zn, Mn, B: digestión en microondas y lectura en espectrofotómetro de plasma.

Nota: El laboratorio queda eximido de toda responsabilidad, en interpretaciones de resultados, cuando el muestreo no ha sido realizado por CORBANA, S.A.

Al y Si extraído en HNO<sub>3</sub>

Jefe de Laboratorio Químico

Lic. Roberto González Rojas

Firma \_\_\_\_\_

CQCR 1177

## ANEXO 10.

Resultado del análisis de coliformes fecales realizado por el laboratorio del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.



### Reporte de Resultados de Ensayo



Número de Solicitud: 31909      Fecha de emisión del reporte: 07/05/2009

#### Información del Usuario:

Nombre: STANDARD FRUIT COMPANY DE CR S.A.  
Dirección: Limón.  
Teléfono: 22764-4000  
Contacto: Miguel Muñoz.

#### Resultados del ensayo

Para la ejecución de los ensayos de coliformes se utiliza el procedimiento Determinación de Coliformes Totales, Coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Salmonella* en abonos orgánicos, metodología desarrollada de acuerdo al Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20ª Edición, 1998 y Test Methods for the Examination of Composting and Compost, 2002.

ID Lab.	ID Usuario	Coliformes Fecales NMP /ml
MI-156-09	Muestra 1	<2
MI-157-09	Muestra 2	<2
MI-158-09	Muestra 3	33
MI-159-09	Muestra 4	>16000
MI-160-09	Muestra 5	>16000
MI-161-09	Muestra 6	16000
MI-162-09	Muestra 7	<2
MI-163-09	Muestra 8	<2
MI-164-09	Muestra 9	<2
MI-165-09	Muestra 10	<2
MI-166-09	Muestra 11	<2
MI-167-09	Muestra 12	<2

Lidieth Uribe  
Dra. Lidieth Uribe Lopez  
M.Q.C. Cod. 664  
Coordinadora  
Laboratorio de Microbiología Agrícola



Teléfonos: (506) 2511-3061, 2511-3011, 2511-3005 • Fax: (506) 2234-1627  
Recepción de muestras: 2511-3091

## ANEXO 11.

Hoja de control de aplicaciones durante la realización del bioensayo del 6 de Mayo al 9 de Junio del 2009.

### CONTROL APLICACIONES

#### Proyecto: Bioensayo Bioles

WK	Fecha Aplic.	Hora	Condición			Cant. Aplicada	Aplicador	Firma
			Sol	Nub	Lluv			
18	6/5/2009	9:30 AM		X		1825/Tratamiento	Fernando	
19	13/5/2009	8:30 AM	X			1775/Tratamiento	Fernando	
20	19/5/2009	9:30 AM		X		1800/Tratamiento	Fernando	
21	26/5/2009	8:30 AM	X			1900/Tratamiento	Fernando	
22	2/6/2009	8:30 AM		X		1950/Tratamiento	Fernando	
23	9/6/2009	8:00 AM	X			1970/Tratamiento	Fernando	

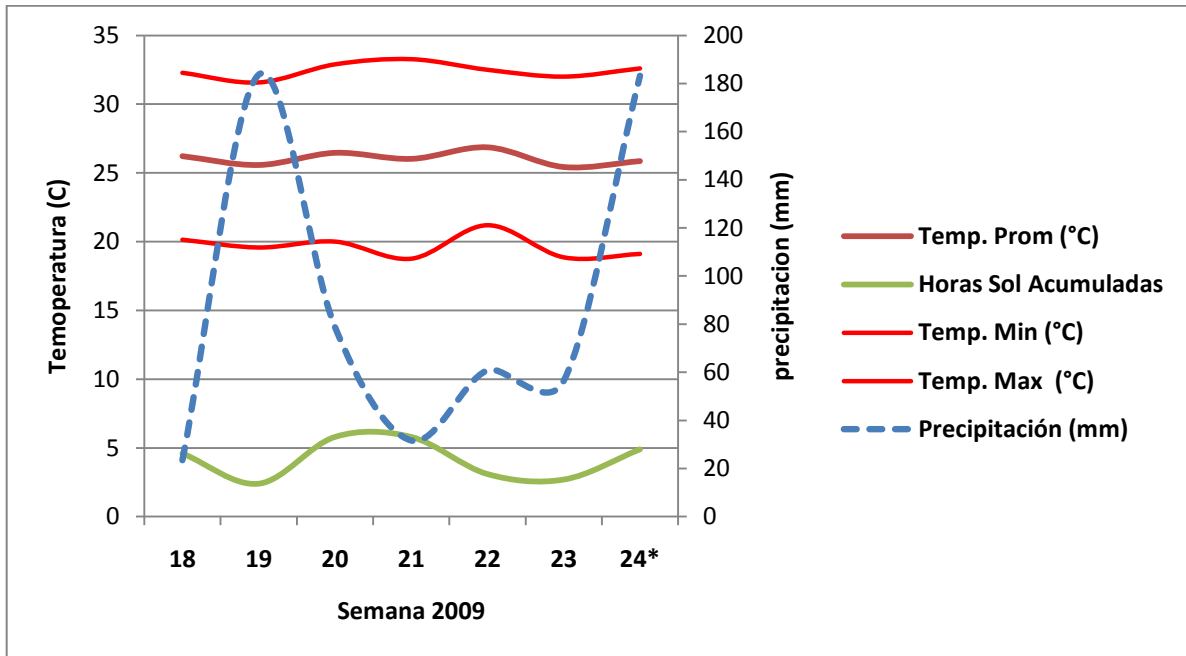
Dilución al 15 %  
Melaza al 4%

150 ml de Biol / L de Agua



ANEXO 12.

Condiciones climáticas en la zona de Río Frío durante la realización del bioensayo.



**Figura 3a.** Condiciones climáticas durante la realización del bioensayo. Brindado por SFCo.

ANEXO 13.

Resultado de los análisis químicos-foliare realizados por el laboratorio de CORBANA, a las muestras foliars de las plantas del bioensayo.



COR-LQ-MC8-IT1-FR1  
Página 1 de 1

LABORATORIO QUÍMICO

Centro de Investigación La Rita  
Pococí, Limón  
Tel. 2713-1875 Fax 2783-3056  
Correo e- rgonzalez@corbana.co.cr

INFORME DE ENSAYO

Don Fernando

INFORME N° 11556  
Boleta N° 1822  
Factura N° na

Cliete Standard Fruit Company de Costa Rica  
Solicitante Carlos Cambronero  
Correo e- carlos.cambronero@dole.com  
nd  
Tipo de muestra **Foliar**  
Observaciones na

Fecha de emisión del informe 7/9/2009  
Fecha de ingreso 6/24/2009  
Fecha de muestreo 6/19/2009  
Responsable del muestreo El Cliente  
Cantidad 18  
Análisis adicionales na  
Análisis a omitir na

Código de muestra	Identificación de la muestra (colilla)	N P K Ca Mg S						Fe Cu Zn Mn B					Observaciones
		% sobre base seca						mg/kg					
fo-2009-7755	0 0 1	2.16	0.29	3.22	0.79	0.34	0.21	225	10	75	423	33	Banano
fo-2009-7756	0 0 2	2.09	0.31	3.14	0.79	0.38	0.20	226	7	72	424	28	
fo-2009-7757	0 0 3	2.20	0.31	3.41	0.85	0.39	0.22	301	8	79	448	32	
fo-2009-7758	0 0 4	2.38	0.30	3.22	0.78	0.34	0.21	279	17	89	454	28	
fo-2009-7759	0 0 5	2.10	0.29	3.37	0.76	0.37	0.21	338	9	109	520	33	
fo-2009-7760	0 0 6	2.13	0.33	3.73	0.90	0.40	0.21	301	10	81	484	35	
fo-2009-7761	0 0 7	2.28	0.31	3.57	0.81	0.35	0.23	254	18	89	471	39	
fo-2009-7762	0 0 8	2.26	0.30	3.53	0.82	0.34	0.22	249	8	96	454	38	
fo-2009-7763	0 0 9	2.14	0.31	3.36	0.80	0.33	0.22	342	8	98	474	38	
fo-2009-7764	0 1 0	2.03	0.30	3.10	0.85	0.34	0.21	228	11	86	471	30	
fo-2009-7765	0 1 1	2.00	0.31	3.30	0.88	0.39	0.22	297	11	99	420	29	
fo-2009-7766	0 1 2	1.97	0.31	3.14	0.95	0.44	0.20	356	9	84	446	25	
fo-2009-7767	0 1 3	2.07	0.30	3.25	0.90	0.37	0.21	320	13	74	472	25	
fo-2009-7768	0 1 4	2.20	0.33	3.41	0.88	0.39	0.23	372	10	83	463	36	
fo-2009-7769	0 1 5	2.16	0.31	3.30	0.78	0.34	0.22	263	8	87	397	33	
fo-2009-7770	0 1 6	2.17	0.29	3.37	0.74	0.33	0.21	300	21	86	461	35	
fo-2009-7771	0 1 7	2.12	0.30	3.19	0.77	0.35	0.26	316	12	74	415	29	
fo-2009-7772	0 1 8	2.14	0.31	3.47	0.79	0.38	0.21	275	13	84	429	31	

Métodos de ensayo:

N: Combustión seca

P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Zn, Mn, B: digestión en microondas y lectura en espectrofotómetro de plasma.

Nota: El laboratorio queda eximido de toda responsabilidad, en interpretaciones de resultados, cuando el muestreo no ha sido realizado por CORBANA, S.A.

Jefe de Laboratorio Químico

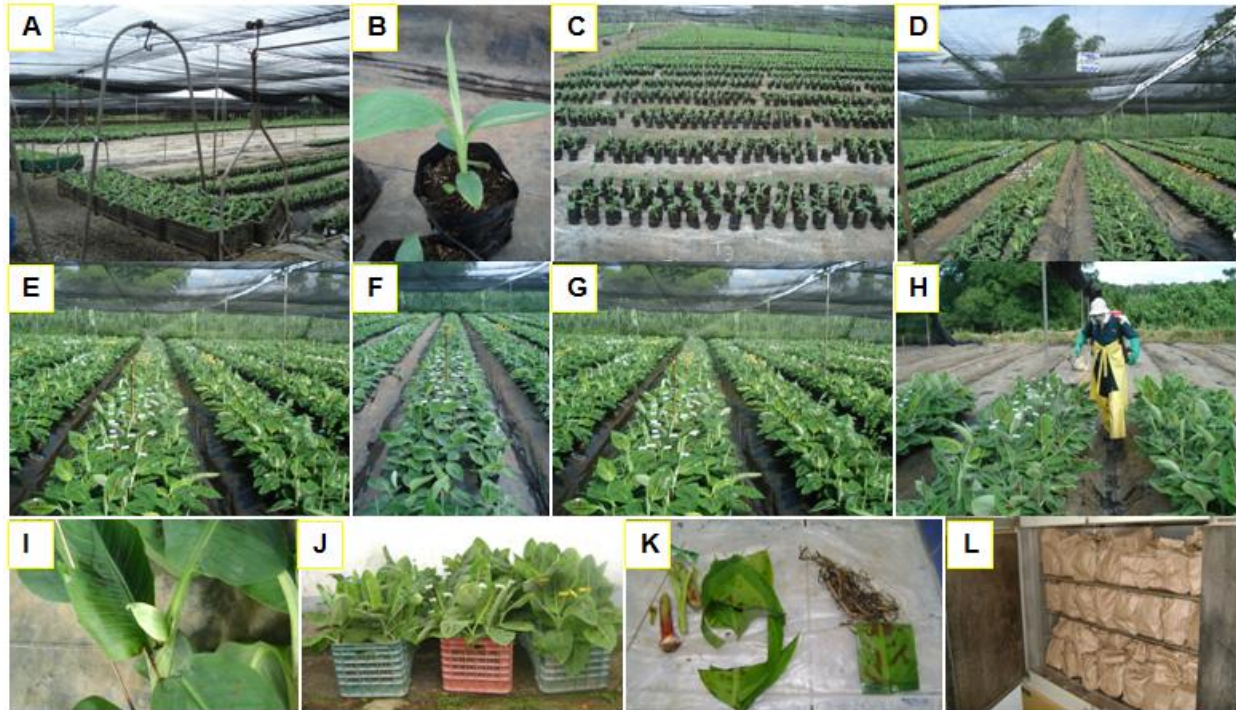
Lic. Roberto González Rojas

Firma \_\_\_\_\_

CQCR 1177

## ANEXO 14.

Fotografías de las plantas utilizadas durante el bioensayo en vivero.



**A** Traslado de las plantas de invernadero a vivero. **B** Planta con hoja candela arrollada. **C** Acomodo inicial de las plantas. **D** Plantas con una semana del traslado. **E, F y G** Plantas con 4-5 semanas de aplicaciones. **H** Ultima aplicación foliar a inicio de la sexta semana. **I** Planta afectada con "Podre". **J** Diferencias evidentes entre tratamientos, iniciando a la izquierda el testigo, luego biol 7 y biol 10. **K** Plantas procesadas para determinar área foliar, peso fresco y lista para empaque y secado. **L** Plantas listas para ser secadas en horno.

ANEXO 15.

Detalles de los costos de producción de los insumos secundarios necesarios para la producción de los Bioles. A ¢550 tipo de cambio.

**Costo MM Sólidos**

Insumo	Cant/Kg MM	Precio/Und	Costo	%
Semolina (Kg)	1.923	¢165.4	¢318.1	90.9%
Melaza (L)	0.043	¢148.0	¢6.4	1.8%
*Mano de Obra (Hora)	0.029	¢880.2	¢25.6	7.3%
<b>Costo Final/Kg</b>			<b>¢350.0</b>	<b>100%</b>

**Costo Activación de EM-1**

Insumo	Cant/L EM Act	Precio/Und	Costo	%
EM-1	0.01	¢6,188.0	¢61.9	79.4%
Melaza	0.09	¢148.0	¢13.3	17.1%
Agua	0.90	¢0.58	¢0.5	0.7%
*Mano de Obra	0.003	¢880.2	¢2.2	2.8%
<b>Costo Final/L</b>			<b>¢77.9</b>	<b>100%</b>

**Costo Activación de MM**

Insumo	Cant/L MM Act	Precio/Und	Costo	%
MM Sólido	0.1	¢350.0	¢35.0	77.6%
Melaza	0.05	¢148.0	¢7.4	16.4%
Agua	0.85	¢0.6	¢0.5	1.1%
Mano de Obra	0.003	¢880.2	¢2.2	4.9%
<b>Costo Final/L</b>			<b>¢45.1</b>	<b>100%</b>

**Costo Pasto Fermentado**

Insumo	Cant/Kg Pasto Ferm.	Precio/Und	Costo	%
Pasto	0.10	¢50.0	¢5.0	4.1%
Semolina	0.575	¢165.4	¢95.1	77.4%
Melaza	0.095	¢148.0	¢14.1	11.4%
MM Act	0.046	¢45.1	¢2.1	1.7%
Agua	0.046	¢0.6	¢0.0	0.0%
Mano de Obra	0.008	¢880.2	¢6.6	5.4%
<b>Costo Final/Kg</b>			<b>¢122.9</b>	<b>100%</b>

**Costo Boñiga Preparada**

Insumo	Cant/Kg Boñiga Prep.	Precio/Und	Costo	%
Boñiga	0.91	¢25.0	¢22.6	51.6%
Melaza	0.037	¢148.0	¢5.5	12.5%
Suero	0.037	¢100.0	¢3.7	8.4%
Mano de Obra	0.014	¢880.2	¢12.1	27.5%
<b>Costo Final/Kg</b>			<b>¢43.9</b>	<b>100%</b>

**Costo Lixiviado de Pinzote**

Insumo	Cant/ L Producido	Precio/Und	Costo
Recolección	0.126	¢880.2	¢110.5
Acomodo	0.016	¢880.2	¢14.3
Transporte	0.002	¢2,000.0	¢3.9
<b>Costo Final/L producido</b>			<b>¢128.8</b>