

**EFFECTO DE INOCULANTES MICROBIANOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE  
RÁBANO (*Raphanus sativus*), FRÍJOL CANAVALIA (*Canavalia ensiformis*) Y  
PEPINO (*Cucumis sativus*)**

**LUDWING MAURICIO COGOLLO RUEDA  
INGENIERO SANITARIO Y AMBIENTAL**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA AMBIENTAL  
BUCARAMANGA  
2006**

**EFFECTO DE INOCULANTES MICROBIANOS SOBRE EL CRECIMIENTO  
DE RÁBANO (*Raphanus sativus*), FRÍJOL CANAVALIA (*Canavalia ensiformis*)  
Y PEPINO (*Cucumis sativus*)**

**LUDWING MAURICIO COGOLLO RUEDA  
INGENIERO SANITARIO Y AMBIENTAL**

**Monografía para optar al título de  
ESPECIALISTA EN QUÍMICA AMBIENTAL**

**DIRECTORA  
GRACIELA CHALELA ÁLVAREZ  
Bacterióloga, MSc, Dr. Rer. Nat.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA AMBIENTAL  
BUCARAMANGA  
2006**

*“La agricultura ecológica es un Sistema Holístico de Gestión de la Producción que realza y fomenta la diversidad de los ciclos Biológicos y la actividad Biológica del suelo. Se basa en un reducido uso de insumos externos y la no utilización de fertilizantes y plaguicidas químicos de síntesis, teniendo en cuenta que las condiciones regionales requieren de sistemas adaptados localmente”.*

*Códex Alimentarius*

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor agradece a:

Dra. Graciela Chalela directora del Centro de Investigaciones en Biotecnología, Bioética y Ambiente (CINBBYA – UNAB) por su orientación y asesoría durante todo el proyecto de investigación.

Jairo Puente Bruges, director de la Especialización en Química Ambiental de la Universidad Industrial de Santander por su colaboración y apoyo durante esta etapa de su formación profesional.

Universidad Autónoma de Bucaramanga y al CINBBYA por la oportunidad de realizar la Práctica en esta institución.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. HIPÓTESIS</b>	<b>4</b>
<b>1.1 HIPÓTESIS CONCEPTUAL</b>	<b>4</b>
<b>1.2 HIPÓTESIS OPERATIVAS</b>	<b>4</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
<b>2.1 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>6</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>6</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO</b>	<b>7</b>
<b>3.1 DESARROLLO DE LA AGRICULTURA</b>	<b>7</b>
<b>3.2 RECURSO SUELO</b>	<b>10</b>
<b>3.3 MICROORGANISMOS EN EL AMBIENTE</b>	<b>11</b>
3.3.1 Ciclo del Nitrógeno	12
3.3.2 Ciclos del Carbono y el Oxígeno	13
3.3.3 Microorganismos utilizados en la presente investigación	14
<b>4. MATERIALES</b>	<b>15</b>
<b>4.1 AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LA MICROBIOTA A USAR COMO INOCULANTE</b>	<b>16</b>
<b>4.2 PLANTAS</b>	<b>18</b>
4.2.1 Crucíferas	18
4.2.2 Cucurbitáceas	19
4.2.3 Leguminosas	19

<b>4.3</b>	<b>MONTAJE DEL EXPERIMENTO</b>	<b>20</b>
<b>5.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>21</b>
<b>5.1</b>	<b>AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN LABORATORIO</b>	<b>22</b>
5.1.1	Siembra de microorganismos en medios sólidos	22
5.1.2	Biorreactores con medio líquido	23
<b>5.2</b>	<b>PORCENTAJE DE GERMINACIÓN</b>	<b>23</b>
<b>5.3</b>	<b>MONTAJE DE GERMINADORES</b>	<b>23</b>
<b>5.4</b>	<b>ANÁLISIS DEL DESARROLLO VEGETAL</b>	<b>24</b>
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>25</b>
<b>6.1</b>	<b>PORCENTAJE DE GERMINACIÓN EN CAJAS DE PETRI</b>	<b>31</b>
<b>6.2</b>	<b>PORCENTAJE DE GERMINACIÓN EN TIERRA</b>	<b>36</b>
<b>6.3</b>	<b>NIVEL DE ACIDEZ DE SUSTRATOS EN GERMINADORES</b>	<b>37</b>
<b>6.4</b>	<b>ÁREA FOLIAR</b>	<b>38</b>
<b>6.5</b>	<b>PESO DE BIOMASA</b>	<b>39</b>
<b>6.6</b>	<b>CONTENIDO DE NITRÓGENO Y PROTEÍNAS</b>	<b>41</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>8.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>46</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>47</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama global representativo de la materiales	15
Figura 2.	Nódulos de Leguminosas	17
Figura 3.	Biocompost	17
Figura 4.	<i>Raphanus sativus</i>	18
Figura 5.	<i>Cucumis sativus</i>	19
Figura 6.	<i>Canavalia ensiformis</i>	20
Figura 7.	Montaje de germinadores	20
Figura 8.	Diagrama global representativo de la metodología	21
Figura 9.	Siembra por agotamiento	22
Figura 10.	Siembra por un solo paso	22
Figura 11.	Biorreactores con medio líquido	23
Figura 12.	Germinadores	24
Figura 13.	Observación macroscópica <i>Trichoderma harzianum</i>	27
Figura 14.	Observación microscópica <i>Trichoderma harzianum</i> .(40X)	27
Figura 15.	Observación macroscópica <i>Saccharomyces candida</i>	28
Figura 16.	Observación microscópica <i>Saccharomyces candida</i> (40X)	28
Figura 17.	Observación macroscópica <i>Pseudomonas</i> spp.	29
Figura 18.	Observación microscópica <i>Pseudomonas</i> spp. (100X)	29
Figura 19.	Observación macroscópica <i>Rhizobium</i> spp	30
Figura 20.	Observación microscópica <i>Rhizobium</i> spp.	30

Figura 21.	Semillas utilizadas en pruebas de germinación	31
Figura 22.	Germinación de <i>Canavalia ensiformis</i>	32
Figura 23.	Germinación de <i>Raphanus sativus</i>	34
Figura 24.	Germinación de <i>Cucumis sativus</i>	35
Figura 25.	Tallos de <i>Raphanus sativus</i>	39
Figura 26.	Tallos de <i>Cucumis sativus</i>	40
Figura 27.	Tallos de <i>Canavalia ensiformis</i>	40
Figura 28.	Muestras de <i>Raphanus sativus</i> para análisis de proteínas	41
Figura 29.	Muestras de <i>Cucumis sativus</i> para análisis de proteínas	42
Figura 30.	Muestras de <i>Canavalia ensiformis</i> para análisis de proteínas	43

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Composición del Suelo	10
Tabla 2.	Diferentes tipos de microorganismos fijadores de nitrógeno	13
Tabla 3.	Códigos de plantas y muestras recolectadas en diferentes sustratos	37

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Porcentaje de germinación <i>Canavalia ensiformis</i>	32
Cuadro 2.	Porcentaje de germinación <i>Raphanus sativus</i>	33
Cuadro 3.	Porcentaje de germinación <i>Cucumis sativus</i>	35
Cuadro 4.	Porcentaje de germinación tierra	36
Cuadro 5.	Nivel de acidez en germinadores	38
Cuadro 6.	Área foliar de plantas obtenidas en germinadores (cm <sup>2</sup> )	39
Cuadro 7.	Peso de biomasa obtenida en germinadores (gr)	39
Cuadro 8.	Contenido de nitrógeno y proteínas	41

## SUMARIO

1. Título: Efecto de inoculantes microbianos sobre el crecimiento de rábano (*Raphanus sativus*), frijol canavalia (*Canavalia ensiformis*) y pepino (*Cucumis sativus*)\*
2. Autor: Ludwing Mauricio Cogollo Rueda  
Ingeniero Sanitario y Ambiental\*\*
3. Palabras clave: Agroecología, agrotóxicos, microorganismos, biofertilizantes, inoculantes microbianos.

Los microorganismos son seres ubicuos, pues logran colonizar todos los espacios incluyendo zonas con condiciones ambientales extremas; poseen una importante influencia sobre el medio en que habitan llegando a ser un factor determinante en la calidad ambiental de los ecosistemas.

Este ensayo, con el apoyo del Centro de Investigación Biotecnología, Bioética y Ambiente (CINBBYA – UNAB AMBIENTAL), propone la utilización de inoculantes microbianos como estimulantes del desarrollo vegetal, aplicados a semillas de *Cucumis sativus*, *Canavalia ensiformis*, y *Raphanus sativus* sembradas en sustratos previamente inoculados y la comparación de éstas con plantas cultivadas en sustratos libres de inoculación, pero no así de microorganismos. Los microorganismos utilizados fueron extraídos de sustratos naturales como tierra, biocompost, plantas y grasa animal; para su posterior siembra y aislamiento en laboratorio utilizando medios modificados, preparación pool de microorganismos e inoculación de las plantas objeto de estudio.

Se encontró que los sustratos con mayor población microbiana produjeron plantas con superior contenido de proteínas, 11% para *Canavalia ensiformis*; 10.8% para *Cucumis sativus* y 7.1% para *Raphanus sativus*; lo cual incrementa su valor alimenticio; pero también se determinó que es importante tener en cuenta la concentración de los inoculantes pues estos pueden afectar negativamente el desarrollo de las semillas llegando incluso a inhibirlas completamente como ocurrió con *Cucumis sativus* y *Raphanus sativus*; las semillas de estas plantas no germinaron al estar en contacto el inoculante al 100% de concentración y mejoraron este parámetro en otras diluciones alcanzando valores de 70% y 100% de germinación respectivamente en agua destilada. *Canavalia ensiformis* por su parte alcanzaron un 20% de germinación en contacto con el inoculante puro, pero este porcentaje aumentó en otras concentraciones alcanzando un valor máximo del 60% con un 50% de dilución.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Especialización en Química Ambiental. Graciela Chalela Alvarez

## SUMMARY

1. Title: Microbial inoculant effects on the growth of radish (*Raphanus sativus*), canavalia bean (*Canavalia ensiformis*) and cucumber (*Cucumis sativus*)\*
2. Author: Ludwing Mauricio Cogollo Rueda  
Environmental Engineer\*\*
3. Index words: Agroecology agrotóxic, microorganisms, biofertilizer, microbial inoculants
4. Abstract

Microorganisms being ubiquitous are able to populate any places including environmentally extreme zones. They influence the environment and determine the factor that determines the quality of ecosystems.

The carried out, supported by Centro de Investigación Biotecnología, Bioética y Ambiente (CIMBBYA – UNAB AMBIENTAL), proposes the use of microbial inoculant to stimulate the growth, of *Cucumis sativus*, *Canavalia ensiformis*, and *Raphanus sativus*. The seeds of these plants were sown into previously inoculated soils, the growth of these plants was compared with the growth of the plants sown on non inoculated soils that could have microorganisms of any type. The microorganisms used for inoculation were taken from natural matters as a handful of soil, biocompost, plants and animal fat. After their cultivating the microorganisms were examined, classified and selected in accordance with their functions. The microorganisms pool was inoculated into the soil of the target plants.

The highest percentage of protein was found in the soils with the largest microbial population: 11% for *Canavalia ensiformis*; 1.91% for *Cucumis sativus* and 7.1% for *Raphanus sativus*. These plants acquire a better nutritional quality. It is important to check the concentration of microbial inoculants because they can interfere with the development of seeds up to a complete inhibition as it happened to *Cucumis sativus* and *Raphanus sativus*; when they failed to germinate having been planted into pure but this situation improved when they were placed in other dissolutions; 70% and 100% germination respectively was the result in distilled water. However *Canavalia ensiformis* got 20% of germination in contact with pure inoculants. This percentage was improved in other dissolutions: it got a 60% at the highest in the 50% dissolution.

---

\* Work Degree

\*\* Faculty of Science. School of Chemistry. Specialization in Environmental Chemistry Graciela Chalela Alvarez

## INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas el sistema mundial de producción de alimentos ha ido cambiando a partir de la aplicación de insumos químicos e ingeniería genética a la labor agrícola. Así, se ha llegado a desarrollar una gran variedad de semillas modificadas genéticamente (transgénicas) las cuales son dependientes de insumos agrícolas comerciales; contribuyen a la llamada “homogenización de la agricultura” que termina por promover el monocultivo reduciendo drásticamente la diversidad biológica en el agroecosistema.

La utilización de pesticidas en la producción agrícola no es algo propio de los tiempos actuales, los primeros reportes de estas prácticas pueden encontrarse en la Odisea de Homero, donde se menciona la utilización de sulfuro para fumigar las plantas. Durante el siglo XVI, en China, los agricultores emplearon pequeñas cantidades de arsénico y nicotina como insecticida [9]

Pero fue hasta mediados del siglo XX cuando se da el fenómeno conocido como “revolución verde” cuando se masificó el uso de insumos agrícolas de síntesis biológica y más adelante de síntesis química. Este acontecimiento ha permitido atacar “plagas” y añadir fertilizantes al suelo de forma artificial, aumentando así la producción mundial aproximadamente en un 50% utilizando prácticamente la misma superficie, “Si no se hubiesen utilizado pesticidas, este ritmo no habría sido el mismo” [4]. De esta manera también ha aumentado la disponibilidad de alimento para una población humana que a nivel mundial ha ido creciendo continuamente, pasando de 2.500 millones (aprox.) de personas en 1950 a 6.300 millones (aprox.) en la actualidad.

En el año de 1942, durante la segunda guerra mundial, Paul Hermann Müller (laureado con el premio Nóbel en medicina y fisiología en 1948), descubrió en Suiza las propiedades insecticidas del DDT (p,p'-diclorodifenil tricloroetano), este compuesto fue sintetizado por primera vez en 1874. Paralelamente laboratorios alemanes empezaron a producir pesticidas organofosforados. En 1945, se descubren los carbamatos en Inglaterra, y las investigaciones en organoclorados derivaban en nuevos y más eficaces productos. A partir de 1950 hay un crecimiento exponencial en el uso de pesticidas desconociéndose hasta entonces las posibles consecuencias que podría traer la utilización de estas “herramientas de producción” [9]. Contrastando con los “beneficios” que trae la mayor producción de alimentos en áreas más pequeñas, aparecen los daños causados al ecosistema en las zonas y a los individuos que tienen contacto directo o indirecto con insumos agrícolas de síntesis química. A comienzos de los años 60, se expuso que “algunos productos químicos se habían difundido por todo el planeta llegando a contaminar prácticamente a todos los seres vivos, en todas las zonas”; advirtiendo además que “estas sustancias se acumulan en los organismos vivos y se magnifican a través de los niveles tróficos” [6]. Estas declaraciones fueron una voz de alerta a nivel mundial llamando la atención de políticos y científicos que se dedicaron a investigar el efecto de los contaminantes químicos sobre la salud humana, animal y sobre los ecosistemas.

Aunque los pesticidas han beneficiado la producción agrícola siendo una gran solución en la lucha contra el hambre y el combate de enfermedades humanas y animales, el uso continuado y abusivo, unido a la pobreza de las normas de prevención, han determinado la aparición de problemas para la salud humana y la supervivencia de especies animales y vegetales. Por todo ello, se hace necesaria la adopción de programas de carácter preventivo y de control que disminuyan la exposición de las personas en riesgo y la contaminación ambiental debida a pesticidas. En este sentido, es importante el diseño e implementación de estrategias alternativas en la agricultura. Tras años continuos de uso de insumos agrícolas nocivos para la salud humana y el ecosistema, resurge la búsqueda de técnicas agrícolas que permitan una explotación del suelo y de los recursos biológicos en armonía con la naturaleza. A propósito de este tema existen diferentes términos como “Agricultura Biológica”, “Agroecología”, “Agricultura Integral”, entre otros; términos que se usan indistintamente obviando su verdadero significado [1]

Más allá del uso del lenguaje, los insumos “ecológicos” presentan grandes beneficios tanto en los “agroecosistemas” como en la salud de los consumidores, siendo estos últimos quienes determinan el éxito o fracaso de un producto que ha sido puesto en el mercado. Pero de la misma forma en que no hay claridad en los términos correctos utilizados por el agricultor, es muy difícil encontrar metodologías estandarizadas para iniciar un proceso de “Agroecología”, siendo éste, uno de los principales problemas para implementar estos modelos de producción.

En términos generales la Agricultura Biológica, como su nombre lo indica, se entiende como la aplicación de insumos vivos o provenientes de seres vivos, como forrajes, productos alelopáticos, insectos, inoculantes microbianos, abonos entre otros; sin embargo, estas técnicas no siempre son favorables para el ecosistema. Hoy en día es muy común la aplicación de compost que no ha sido previamente analizado y tratado, y que posiblemente contiene microorganismos patógenos que serán transmitidos directamente a los alimentos; o peor aún la utilización de estiércoles, los cuales producen olores ofensivos, portan altas cargas microbianas de un lugar a otro llevando consigo diferentes procesos infecciosos y se convierten en grandes productores de moscas que actúan como vectores transmisores de enfermedades, poniendo en peligro la salud de las personas, animales y plantas de la granja.

Por esta razón para llevar a cabo un proceso de producción agrícola realmente sano y sostenible, es necesario introducir el término “agroecología”, el cual puede ser entendido como la aplicación de ciclos y modelos naturales en la producción agropecuaria utilizando “herramientas vivas” tan variadas que incluyen plantas forrajeras, insectos, animales superiores, microorganismos, biomasa, biocompost entre otros; evitando la aplicación de agentes que independientemente de su origen o naturaleza puedan degradar las condiciones del ecosistema. Esta metodología permite a su vez introducir el concepto de “integralidad” que consiste en la elaboración de insumos “in situ” permitiendo al agricultor independizarse de casas agrícolas comerciales y al consumidor disfrutar de productos sanos para su alimentación [17];. La agroecología es una disciplina científica que define, clasifica y estudia los sistemas agropecuarios desde una perspectiva ecológica y socioeconómica; esto

quiere decir que su accionar siempre tiene en cuenta principios como la biodiversidad, reciclaje de nutrientes, interacción entre los diferentes cultivos, animales y suelo, además de la regeneración y conservación de los recursos naturales, garantizando un sistema agropecuario perdurable; integrando saberes indígenas y campesinos con el conocimiento técnico moderno para obtener métodos de producción que respeten el medio ambiente y la sociedad [32].

Dentro de las herramientas más utilizadas en la agricultura ecológica se encuentran insumos con propiedades pesticidas y fertilizantes preparados a partir de materiales orgánicos, siendo esta metodología la más adecuada en procesos de producción conservacionista.

Esta forma de producción tampoco es algo propio de la época actual, se sabe que en el antiguo Egipto se utilizaban lombrices para preparar abonos y se les consideraba “los intestinos de la tierra”. En el año 1882 se hizo famoso el caldo “bordelés”, el cual es una mezcla de sustancias minerales utilizada como fungicida, con la que los agricultores de Burdeos (Francia) combatían *Plasmopara viticola*. En 1901 se descubre *Bacillus thuringiensis* que se comercializa en 1938 como insecticida, pero el período de mayor auge fue la década de 1940, debido al gran número de productos que se desarrollaron para el cuidado de los cultivos.

Los caldos microbianos son preparaciones líquidas que incluyen microorganismos activadores del suelo, como los de la rizósfera (zona próxima a la raíz de la planta), favoreciendo la nutrición y desarrollo de las plantas, pues se mejora la actividad biológica del suelo, así como sus características físicas y químicas [17]. Es así como materia orgánica e inoculantes microbianos son herramientas muy importantes para la agricultura, estos últimos establecen diferentes relaciones de sinergia – antagonismo que se ven reflejadas en la maduración de los suelos, liberación de nutrientes e inhibición de organismos que puedan afectar negativamente la evolución de la cosecha.

La capacidad que presentan los microorganismos para degradar materia orgánica no solo es utilizada en procesos de maduración y liberación de nutrientes; estos además prestan grandes beneficios en procesos de biorremediación de suelos contaminados [30] y transformación de residuos de origen pecuario en biofertilizantes [43].

Estudios previos han contemplado la utilización de inoculantes microbianos en procesos agrícolas como producción de trigo [3], elaboración de bioabonos [43], y remediación de suelos contaminados [30], estas pruebas muestran que los biofertilizantes tienen un efecto favorable sobre la producción agrícola en especial en suelos libres o con muy bajas concentraciones de insumos agrícolas de síntesis química. El presente ensayo busca hacer una aproximación al comportamiento de algunas plantas alimenticias (*Cucumis sativus*, *Raphanus sativus* y *Canavalia ensiformis*) cultivadas en diferentes sustratos, utilizando inoculantes microbianos como estimulantes del desarrollo vegetal.

## **1. HIPÓTESIS**

### **1.1 HIPÓTESIS CONCEPTUAL**

El componente biológico del suelo está conformado por una macro y microbiota como lombrices, gusanos, insectos, hongos y bacterias; todos ellos cumplen importantes funciones durante el proceso de maduración del suelo, pues son los encargados de transformar la materia orgánica de modo que pueda ser asimilada por las plantas y así ingresar a los ciclos biogeoquímicos. Los microorganismos son seres ubicuos, con capacidad de colonizar cualquier espacio y soportar condiciones extremas de temperatura y presión como volcanes en erupción, fondo marino y la atmósfera en sus diferentes niveles; su presencia ha llegado a convertir medios y sustratos a escalas tan importantes como la aparición del oxígeno atmosférico, el cual llegó a cambiar sustancialmente las formas de vida existentes en el planeta; la actividad microbiana se encuentra asociada a procesos tan importantes como producción de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y fijación de N<sub>2</sub>; por consiguiente la actividad microbiana es fundamental para el funcionamiento de los ecosistemas y el mantenimiento del equilibrio biológico.

Los inoculantes microbianos son medios que facilitan la introducción de microorganismos a las semillas o al suelo con diversas actividades fisiológicas que favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas; estos pueden presentar diferentes aspectos físicos, ya sea líquidos, sólidos o semisólidos en los que se utilizan “portadores” microbiológicos como el carbón activado, aceites y otros soportes orgánicos e inorgánicos o se utilizan como fertilizantes directos. De este modo, el inoculante puede ser manejado con el fin de fijar microorganismos en el suelo o en las plantas (hojas, tallo o raíces) y así llegar a los diversos sistemas de producción agrícola; la fuente inoculante proviene del conjunto de microorganismos asociados a las raíces o que se encuentran en el mismo suelo de las plantas. Los inoculantes microbianos estimulan el desarrollo de las plantas, pues las diferentes funciones metabólicas de los microorganismos que contienen permiten la degradación más eficiente de la materia orgánica, liberando nutrientes esenciales como el nitrógeno.

### **1.2 HIPÓTESIS OPERATIVAS**

- La fertilidad de los suelos depende en gran proporción de la actividad microbiana que en ellos se dé, ésta llega a verse drásticamente afectada debido a prácticas agrícolas inadecuadas (uso indiscriminado de pesticidas, sobrepastoreo, arado excesivo) perdiendo su capacidad de transformar materia orgánica y liberar nutrientes.

- El crecimiento y desarrollo de la microbiota puede estimularse de manera controlada utilizando *inoculantes microbianos*, aumentando así la población microbiana lo cual repercute en la maduración de los suelos y el desarrollo vegetal.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de inoculantes microbianos sobre el crecimiento y desarrollo de rábano (*Raphanus sativus*), fríjol canavalia (*Canavalia ensiformis*) y pepino (*Cucumis sativus*).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar los sustratos ricos en microorganismos para su posterior aislamiento y utilización como bioinoculante.
- Diseñar medios de cultivo modificados que favorezcan el crecimiento y desarrollo de microorganismos seleccionados como inoculantes.
- Preparar medios de cultivo líquidos en biorreactores aireados para la posterior preparación del pool inoculante.
- Realizar pruebas de germinación que indiquen la concentración más benéfica del inoculante para cada especie vegetal.
- Hacer el montaje de germinadores, para la posterior inoculación del pool y siembra de las semillas.
- Recolectar el material vegetal producido en los germinadores para su análisis comparativo en laboratorio, teniendo en cuenta parámetros como área foliar, peso de biomasa, contenido de proteínas y contenido de nitrógeno.
- Indicar las ventajas que presenta la utilización de métodos alternativos en el cultivo de productos para la alimentación humana.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 DESARROLLO DE LA AGRICULTURA

La palabra agricultura hace referencia al arte y oficio de cultivar la tierra; esta técnica tiene su origen durante el Neolítico (año 9000 – 4000 a. C.) cuando las civilizaciones existentes descubren que pueden trabajar los suelos y así modificar su composición para aumentar su productividad y satisfacer sus necesidades alimenticias. Gracias a este descubrimiento desaparece el nomadismo y se pasa de una cultura “depredadora” a una “productora”.

La productividad de un ecosistema depende del buen funcionamiento de los elementos que lo conforman; las actividades de la naturaleza se basan en las relaciones interdependientes de una gran variedad de organismos ubicados en un entorno determinado; así, cada organismo juega un papel importante en el ecosistema y la ausencia o el crecimiento exagerado de las poblaciones pone en peligro el frágil equilibrio ecológico (entiéndase éste no como un elemento estático, sino como un factor dinámico que se da como resultado de la suma de innumerables agentes) y de esta manera se llega a la pérdida de recursos naturales y la consecuente disminución en el rendimiento de los ecosistemas.

Hay insectos, hongos y bacterias que son benéficos en la actividad agrícola, las abejas por ejemplo son muy importantes ya que transportan el polen de las flores, fertilizándolas; las mariquitas se alimentan de otros insectos que atacan las cosechas, siendo un importante control biológico de plagas. Bacterias y hongos intervienen en procesos de transformación de materia orgánica, liberación de nutrientes y fijación de  $N_2$  al suelo en forma de amoníaco y  $NO_x$  [13]. No obstante existen también plantas, insectos, roedores, bacterias y hongos que generan problemas como son: transmisión enfermedades, devoran las cosechas o parasitan el ganado [2];. Estos organismos se conocen como “plagas” y son la razón de ser de los pesticidas tanto de síntesis química como biológica.

Según la FAO/OMS, el término *pesticida* se define como la “sustancia o mezcla de sustancias utilizadas para prevenir o controlar cualquier especie de plantas o animales perjudiciales para otras plantas, animales o el propio hombre; incluye también otras sustancias o mezclas de ellas utilizadas como reguladoras de crecimiento de las plantas, defoliantes y desecantes”. Este término no se aplica a los antibióticos, ni a los fertilizantes, ni a otros productos químicos suministrados a los animales con objetivos diferentes, como son el estímulo de su crecimiento y el comportamiento reproductivo. En términos concretos, *pesticida agrícola* es todo producto químico, natural o sintetizado, destinado a luchar contra los parásitos animales o vegetales que atacan los cultivos, excluyendo los productos de uso en veterinaria.

Los pesticidas de síntesis biológica son aquellos que se elaboran utilizando elementos naturales como plantas aromáticas, depredadores naturales o microorganismos antagónicos.

Haciendo un uso adecuado de estos recursos puede llegarse a montar todo un sistema productivo “amigable” con la naturaleza, aumentando eficiencia sin alterar el equilibrio en el agroecosistema pues estos atacan específicamente al organismo que causa el daño sobre los cultivos.

Por su parte, los pesticidas de síntesis química son procesados de manera artificial, no son fáciles de degradar y una vez aplicados pueden dejar trazas que duran varias décadas en desaparecer. Presentan altos niveles de toxicidad cuyos efectos son muy difíciles de cuantificar pues pueden evidenciarse de manera inmediata, en el largo plazo o en la descendencia de quienes estuvieron expuestos a estas sustancias. Las redes tróficas comienzan en los organismos fotosintetizadores y terminan en los animales superiores; es en estos últimos donde puede encontrarse mayores trazas de pesticidas persistentes por efecto de la bioacumulación y biomagnificación; esto hace que la concentración de los residuos a lo largo de la cadena alimenticia se haga cada vez superior afectando en mayor medida a organismos consumidores y por ende al hombre [12].

Se estima que un 20% de la producción agrícola en el mundo desarrollado y un 40% en los países en vía de desarrollo se pierde por plagas y enfermedades, a pesar del uso de productos fitosanitarios. Ejemplos como el hongo “tizón de la papa” provocó la pérdida casi total del cultivo de papas en Irlanda entre 1845 y 1850; generó una hambruna que dio como resultado más de un millón muertes y el desplazamiento de buena parte de la población; otros ejemplos son las langostas que han arrasado con cientos de hectáreas de cultivos de arroz en los Llanos Orientales colombianos o el taladro del maíz que destruye anualmente cerca del 7% de la cosecha mundial de este cereal, equivalente a 40 millones de toneladas atacando principalmente a países en vías de desarrollo. La FAO prevé que la población mundial será aproximadamente de 8.000 millones en el año 2030, estimando que la producción de alimentos deberá aumentar en un 60% para atender los requerimientos de este desmesurado crecimiento en la población y cerrar la brecha de la desnutrición, ya que en la actualidad alrededor de 740 millones de personas van a diario a la cama con hambre y 40.000 personas, de las cuales la mitad son menores de edad, mueren cada día de hambre o desnutrición. Cabe mencionar que el hambre no es causada sólo por la “baja” producción agropecuaria sino también por factores como mala distribución, corrupción, políticas inadecuadas, deficiente infraestructura y la pobreza; en muchos países los cuales causan grave desabastecimiento alimentario [9].

El aumento en la productividad se ha dado gracias a la difusión de nuevas variedades de cultivos de alto rendimiento, unido a prácticas de cultivo que usan grandes cantidades de fertilizantes, pesticidas, y maquinaria pesada. Cuando a lo largo de las décadas de 60's y 70's se fueron introduciendo estas mejoras en Latinoamérica y Asia, muchos países que hasta entonces habían sido deficitarios en la producción de alimentos pasaron a ser exportadores. Los países en vías de desarrollo han ido implementando sus formas tradicionales de cultivo con las últimas tecnologías y en la actualidad consumen más de la cuarta parte de este tipo de productos. Debido a la amplia variabilidad de la naturaleza química de los pesticidas usados en la actualidad, existen grandes diferencias en su modo de acción, penetración en el organismo, metabolismo, eliminación por el cuerpo y toxicidad

para los seres humanos, lo que hace difícil las generalizaciones sobre su peligrosidad [12]. El ser humano puede ingerir residuos de pesticidas no sólo al consumir vegetales tratados, sino también alimentos de origen animal, donde se hayan podido acumular esos residuos [10]; [11]; [14]; [22]; [23]; [33]; [36]; [38]; [39]; [40]; [41]; [42]; [45]. [47].

Un alimento puede ser perjudicial o tóxico de diferentes maneras, o su peligrosidad puede tener distintos orígenes como son: contaminación por parásitos, microbios o virus (riesgo biológico); presencia de trazas de compuestos químicos tóxicos de diferente naturaleza y contaminación radiactiva [2].

Otro factor importante a tener en cuenta es la grave contaminación de los cuerpos de agua que se produce por la aplicación de pesticidas ya sea de manera directa, por escorrentía, lavado de envases y equipos, lixiviación, etc. Las aguas contaminadas propagan el tóxico a la flora y fauna produciendo: muerte de poblaciones, aumento de la exposición humana, pérdida del curso de agua como recurso utilizable y la probable contaminación de las reservas hídricas [16]; [37].

Actualmente muchos países cuentan con una legislación estricta y específica sobre la contaminación de alimentos. La relevancia del tema ha llevado a la realización de diversos estudios, con el fin de determinar las concentraciones de pesticidas presentes en los alimentos. Los alimentos en los que generalmente se encuentran más residuos de pesticidas corresponde a los vegetales, tubérculos y frutas frescas [15]; [24]; [41]; sobre los que más se deposita en forma directa el pesticida. Los alimentos contaminados con trazas de pesticidas organoclorados no cumplen con los requerimientos de la normativa fitosanitaria internacional y son rechazados por los países importadores. Se hace necesario hacer un alto en el camino y considerar si es realmente conveniente desde el punto de vista económico y con miras a los nuevos tratados de comercio internacional continuar utilizando los productos de síntesis química que día a día salen al mercado o se debe buscar la forma de implementar soluciones propias.

El surgimiento de la agricultura como técnica de producción se constituyó en un drástico cambio en la economía; trajo consigo un cada vez mayor interés sobre ciertas plantas, favoreciendo sólo la producción de aquellas que representen un interés específicamente consumista. Aparecen también los “métodos” de cultivo que en muchos casos no son favorables para el ambiente (quema de tierra por ejemplo), esto ha generado una mayor presión sobre los ecosistemas y una reducción de la diversidad y la productividad de los mismos.

Estas prácticas se vieron incrementadas durante la Revolución Industrial (s. XVII), pero fue sólo hasta mediados de la década de 1940 cuando realmente se crea una producción agrícola con fines industriales y comerciales, impulsados por el fenómeno conocido como *Revolución Verde*, basado en la aplicación de métodos e insumos que logren “beneficios” en términos de volumen y de producción, dejando de lado en muchos casos la calidad de vida de consumidores, productores y ecosistemas.

A partir de la década de los 40, cuando laboratorios y casas agrícolas comerciales empezaron su producción en masa, promovieron el diseño más de 600 productos químicos para combatir insectos, malas hierbas, roedores, bacterias, hongos y otros organismos "dañinos" para la agricultura y la ganadería. El uso de insumos químicos en las actividades agrícolas ha supuesto una mejora radical en la producción agraria, llegó a incrementar el rendimiento de las cosechas y a elevar la calidad de los alimentos; pero a pesar del beneficio que supone la destrucción sistemática de "parásitos" que atacan a plantas, animales y al ser humano; es necesario tener en cuenta la interacción de los distintos principios activos de estas sustancias con las especies animales y el propio hombre, es así como los pesticidas de síntesis química se han convertido un arma de doble filo, ya que fueron de gran ayuda en la lucha contra el hambre y las enfermedades, pero están generando problemas en el medio ambiente y en la salud humana que hasta ahora se empiezan a comprender .

El uso de insumos de síntesis química en la actividad agrícola (agrotóxicos) tiene a su vez consecuencias a corto y largo plazo, que se ven reflejadas en el deterioro ambiental causando la pérdida de la calidad de fuentes de agua, erosión del suelo y pérdida de organismos benéficos ya que los plaguicidas químicos no son selectivos cuando atacan a los organismos presentes y tienen diversos efectos sobre la salud tanto de los productores como de los consumidores de alimentos procesados con este tipo de insumos. En la actualidad, los efectos sobre la salud humana van desde irritaciones de la piel, tracto digestivo y vías respiratorias hasta la introducción al organismo de agentes cancerígenos y mutagénicos que pueden afectar al individuo que los consume y a su descendencia; hasta tal grado que cualquier población humana, en cualquier parte del mundo, está expuesta a pesticidas organoclorados y presenta niveles tisulares y séricos apreciables [5]; [6]; [9]; [10]; [11]; [19]; [20]; [22]; [23]; [26]; [27]; [31]; [33]; [34]; [35]; [36]; [38]; [40]; [42]; [45]; [46]; [47]. Pese a la alarmante situación que cada día se hace más común, estos efectos no han sido propiamente cuantificados y se desconoce gran parte de sus consecuencias.

Colombia es un país que posee gran variedad tanto de pisos térmicos como de suelos, lo cual le permite tener un amplio potencial de producción agrícola; siendo éste uno de los principales renglones de la economía nacional. Como estrategia de producción sostenible se habla de "rotación" y "diversificación" de cultivos; Es decir en un mismo espacio cultivar diferentes tipos de productos, incluyendo a la vez cultivos transitorios y perennes; de esta manera el agricultor tiene la posibilidad de ofrecer varios productos en el mercado. Los cultivos perennes son aquellos que permiten una producción sostenida a largo plazo, conformados principalmente por cultivos agroforestales (frutales como cítricos, aguacate, mango, guanábana, guayaba, etc.) estos cultivos, una vez establecidos, permiten hacer una planeación de su ciclo productivo, conociendo las temporadas de mayor producción, dependiendo de esto el nivel de oferta y demanda en el mercado; pero este proceso de establecimiento puede tomar varios años; de ahí la importancia de contar también con cultivos transitorios con tiempos de producción más cortos.

Existen más de 80.000 especies de plantas comestibles y en la historia humana sólo se han utilizado 10.000; hoy en día se cultivan solo 150 y 12 de ellas proporcionan más del 80% de los alimentos de consumo humano [9]. Solo nueve cultivos (papa, sorgo, maíz, cebada, arroz, trigo, batata, caña de azúcar y soya) aportan más del 75% de la energía dietética de las plantas. Esta actividad reduccionista favorece el crecimiento de las plagas. Algunas de las técnicas agrícolas actuales, como el monocultivo, solo permiten la siembra de un tipo de planta en grandes extensiones de terreno; esta condición hace que los organismos depredadores de éstas encuentren una situación excelente para aumentar su población. El monocultivo es un ecosistema muy simple, con muy poca variedad de organismos y no contiene, como el ecosistema natural, otras especies, algunas de las cuales mantienen controladas las plagas de forma natural. Estas características hacen casi inevitable el uso de compuestos químicos para combatir los daños causados por las plagas en este tipo de cultivos.

Una estrategia de producción “diversificada” se basa en combinar los cultivos perennes (árboles frutales por ejemplo) con cultivos transitorios, se denominan así porque poseen tiempos de producción relativamente cortos, es común encontrar plantas como las cucurbitáceas (ahuyama, calabacín, melón, pepino, etc.), las crucíferas (repollo, lechuga, coliflor, brócoli, rábano, etc.) y las leguminosas (lenteja, arveja, garbanzo, frijoles, etc) formando parte de esta denominación.

### 3.2 RECURSO SUELO

El suelo es el soporte de toda la vida sobre la tierra; es el elemento fundamental para la producción agropecuaria, de él depende el crecimiento de las plantas y de esta forma el rendimiento de las cosechas. La fertilidad del suelo depende de su grado de maduración; un suelo desarrollado (maduro) es una mezcla compleja de compuestos orgánicos e inorgánicos, combinando a su vez la roca madre, tipografía, clima, tiempo y actividad biológica

**Tabla 1.** Composición del Suelo

Elemento	Porcentaje
Materia mineral (rocas erosionadas)	50%
Aire, agua	35 – 39%
Componente orgánico (plantas, animales, microorganismos)	10 – 15%
Organismos vivos	< 1%

Tomado de Gómez M. E 1989

Los suelos se clasifican en dos grandes grupos según su naturaleza: a) Suelos minerales; los cuales son el resultado de la fragmentación de rocas y otros materiales inorgánicos; y b) Suelos orgánicos procedentes de la sedimentación en turberas y marismas [25].

El componente biológico del suelo está conformado por macro y microorganismos como lombrices, gusanos, insectos, hongos, bacterias, entre otros. Todos ellos cumplen importantes funciones durante el proceso de maduración del suelo, pues son los encargados de transformar la materia orgánica de modo que pueda ser asimilada por las plantas y así ingresar a los ciclos biogeoquímicos.

### **3.3 MICROORGANISMOS EN EL AMBIENTE**

Existen en el mundo seres tan pequeños que resulta imposible percibirlos a simple vista; sin embargo,, el tamaño de estos seres contrasta con su inmensa diversidad y su amplia capacidad de adaptación siendo estos tal vez los únicos que pueden encontrarse en cualquier lugar del planeta; son transportados por el aire desde la superficie de la tierra hasta los diferentes niveles de la atmósfera, están en la superficie de los océanos, en las profundidades del mar, en la tierra cultivada, etc. [21].

El holandés Antoine Van Leeuwenhoek (1632 – 1723) reconocido comerciante pionero en la utilización de lentes pequeñas y en descubrimientos sobre los protozoos, los glóbulos rojos de la sangre, el sistema de capilares y los ciclos vitales de los insectos afirmó que los microorganismos son seres ubicuos, fácilmente transportados por el aire desde la superficie de la tierra a la atmósfera, presentes en los océanos, profundidades del mar, tierra cultivada. “Cuanto más rica la tierra en materia orgánica, mayor será el número de microorganismos que posea y así aumenta su fertilidad”.

Así los microorganismos conviven entre sí y con todos los demás seres creando diversas relaciones. En algunos casos los microorganismos pueden ser patógenos, y desencadenar verdaderos problemas para los organismos “superiores” como es el caso de las epidemias que en diferentes momentos históricos han mermado considerablemente la población humana; como también suelen ser indispensables para la supervivencia de especies animales (como los rumiantes por ejemplo) ya que son estos quienes les permiten procesar el alimento y obtener energía para sus funciones vitales.

La participación de los microorganismos en el ambiente se da llevando a cabo importantes e indispensables procesos para la sostenibilidad del entorno; estos colonizan y convierten cualquier sustrato natural facilitando así la dinámica sucesional de los ecosistemas, coadyuvando al flujo de materia y energía a través de los ciclos de la materia, así además permiten la transformación de elementos y compuestos químicos a formas que puedan ser asimiladas por las plantas, liberando sustancias como ácidos húmicos y fúlvicos mejorando así las propiedades del suelo [30].

Los ciclos de la materia son transformaciones sucesivas del estado y composición bioquímica de los compuestos y elementos que intervienen en todas las funciones vitales de los organismos. Estos elementos no son estáticos, sino que atraviesan continuas transformaciones en las que intervienen los seres vivos y el ambiente (la biosfera).

La introducción de microorganismos específicos al suelo es una práctica que ha sido llevada a cabo en la agricultura durante décadas [30]. Algunos beneficios obtenidos a partir de estas liberaciones son:

- Control o inhibición de la actividad de patógenos en las plantas [13]
- Mineralización de contaminantes inorgánicos [29]
- Provisión de nutrientes a las cosechas [30]
- Estimulación del crecimiento de las plantas [30]
- Mejoramiento de la estructura del suelo [30]

Es importante tener en cuenta que los microorganismos crean reacciones de sinergia – antagonismo con otros microbios presentes en el ambiente, de ahí la importancia de conocer la microbiota presente en el suelo para seleccionar adecuadamente los microorganismos a inocular.

### 3.3.1 Ciclo del Nitrógeno

El nitrógeno es uno de los elementos fundamentales en la constitución de todos los seres vivos, forma parte de los lípidos, ácidos grasos, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos (bases nitrogenadas) y otras biomoléculas; de ahí su vital importancia [8]

El nitrógeno es el elemento más abundante de la atmósfera (aproximadamente el 78%) en forma de  $N_2$ , pero paradójicamente en esta forma no es asimilable casi por ningún organismo debiendo atravesar varios procesos bioquímicos antes de incorporarse a la cadena alimenticia. Las bacterias nitrificadoras fijan el  $N_2$  al suelo en forma de  $NO_x$ , donde en forma simbiótica es asimilado por las leguminosas. Los animales toman su alimento de las plantas o de otros animales, dando como resultado la formación del Ion amonio que es bastante tóxico y debe ser expulsado. Así se libera amoniaco al medio donde las bacterias desnitrificantes se encargan nuevamente de liberar  $N_2$  a la atmósfera.

Como se mencionó anteriormente, el nitrógeno es un elemento fundamental para la síntesis de sustancias que conforman las biomoléculas y están presentes en todos los seres vivos. El proceso de asimilación solo es posible una vez éste ha sido tomado de la atmósfera y fijado al suelo en formas que puedan ser asimilables por la plantas para así entrar a la cadena alimenticia. El proceso de fijación del nitrógeno atmosférico sería imposible sin la participación de bacterias nitrificantes, así como la liberación de nitrógeno atmosférico que esté disponible para reiniciar el ciclo sería imposible sin bacterias desnitrificadoras. Cuando el suelo presenta un estado de deterioro por exceso de pesticidas, malas prácticas agrícolas o quemadas, la población microbiana decae considerablemente y así mismo la productividad

de los suelos. Una forma de restablecer estas poblaciones es a través de la utilización de inoculantes microbianos como coadyuvante en la recuperación de la fertilidad del suelo.

**Tabla 2.** Diferentes tipos de microorganismos fijadores de nitrógeno

	Fototrópicos	Quimiotrópicos
Libres oxigénicos	Cianobacterias	Azotobacter spp., Mycobacterium spp., Bacterias oxidantes de metano, Thiobacillus spp.
Libres anoxigénicos	Cianobacterias Bacterias rojas Bacterias verdes	Clostridium spp., Klebsiella spp., Bacillus spp., Desulfovibrio spp., Desulfatomaculum spp., Bacterias Metanogénicas
Simbióticos oxigénicos	Cianobacterias (+ hongos, helechos)	Rhizobium (+ leguminosas, gramíneas), Azospirillum (gramíneas), Frankia (+ aliso, espino, etc.)
Simbióticos anoxigénicos	No se conocen	Citrobacter (+ termes)

Tomado de Stainer *et al* 1989 Modificado por Dra. Graciela Chalela 2006

### 3.3.2 Ciclos del Carbono y el Oxígeno

La reserva fundamental de carbono, asimilable por los seres vivos es el CO<sub>2</sub>. Este gas se encuentra en la atmósfera en una concentración de más del 0,03% y cada año aproximadamente un 5% de estas reservas de CO<sub>2</sub>, se consumen en los procesos de fotosíntesis, es decir que todo el anhídrido carbónico se renueva en la atmósfera cada 20 años. La vuelta de CO<sub>2</sub> a la atmósfera se hace cuando en la respiración los seres vivos oxidan los alimentos produciendo CO<sub>2</sub>. En el conjunto de la biosfera la mayor parte de la respiración la hacen las raíces de las plantas y los organismos del suelo [18]

El oxígeno es el elemento químico más abundante en los seres vivos. Forma parte del agua y de todo tipo de moléculas orgánicas. Como molécula, en forma de O<sub>2</sub> su presencia en la atmósfera se debe a la actividad fotosintética de organismos primitivos [8]

La reserva fundamental de oxígeno utilizable por los seres vivos está en la atmósfera. Su ciclo está estrechamente vinculado al del carbono pues el proceso por el que el CO<sub>2</sub> es asimilado por las plantas (fotosíntesis), supone también devolución del oxígeno a la atmósfera, mientras que la respiración ocasiona el efecto contrario.

Estos dos elementos poseen importantes papeles en el mantenimiento de los ecosistemas, sus ciclos van íntimamente ligados y dependen de 2 procesos complementarios que son respiración y fotosíntesis; y si bien plantas y animales macroscópicos pueden llevar a cabo estos procesos, vale la pena aclarar que las mayores proporciones de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> se producen gracias a la actividad de bacterias oxigénicas que viven en el suelo y cianobacterias que viven en el agua respectivamente [18].

### 3.3.3 Microorganismos utilizados en la presente investigación

Los microorganismos reseñados fueron aislados como parte del proceso investigativo y escogidos por sus características de utilización en el suelo; experiencias previas demostraron su eficiencia en procesos de estimulación del desarrollo vegetal mediante incorporación y solubilización de nutrientes.

*Trichoderma harzianum*. Este hongo fue extraído de biocompost; pertenece al grupo de hongos Deuteromicetes u hongos imperfectos. En su estado vegetativo presentan un micelio o septos simples. Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Se reproducen asexualmente por conidios. Las hifas que llevan las esporas o canidiófonos son ramificadas, reproducción sexual ausente

*Saccharomyces candida*. En general las levaduras son hongos microscópicos, unicelulares importantes por su capacidad para realizar la fermentación de carbohidratos produciendo diferentes sustancias. Esta levadura fue aislada en bioprocesos industriales a partir de grasa animal.

*Pseudomonas* spp. Estas bacterias son muy comunes en el suelo; son organismos móviles con flagelos monotricos y multitricos; se clasifican como bacilos Gram.<sup>^-</sup>negativos y poseen una importante capacidad para fermentar carbohidratos. Su utilización como bioinoculante debe hacerse bajo estricta supervisión pues existen variedades patógenas.

*Rhizobium* spp. Estas bacterias establecen relaciones simbióticas con las plantas leguminosas en una relación de endometabolismo; los Rhizobia capturan el N<sub>2</sub> atmosférico para convertirlo en proteínas, amoníaco y nitratos que la planta pueda asimilar. Las plantas por su parte aportan enzimas que estimulan y facilitan el metabolismo de las bacterias.

## 4. MATERIALES

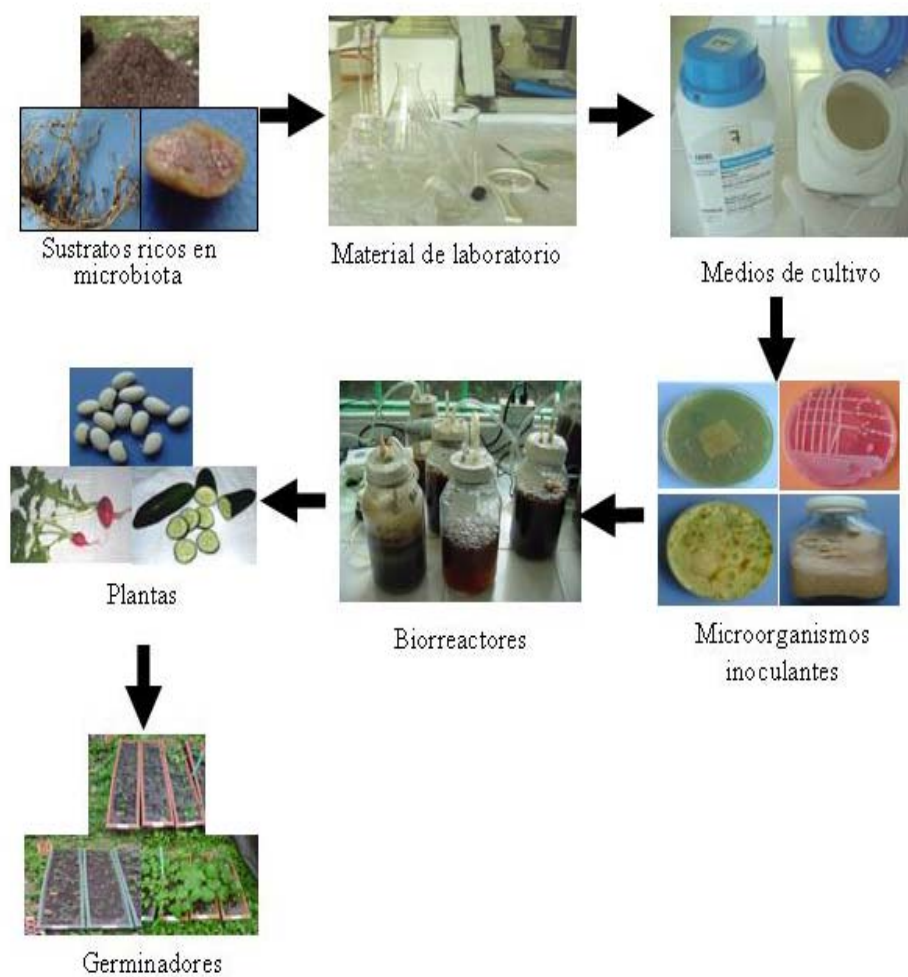


Figura 1. Diagrama global representativo de los materiales

Esta experiencia se llevó a cabo durante el período comprendido entre junio de 2005 y marzo de 2006, en el Centro de Investigación en Biotecnología, Bioética y Ambiente (CINBBYA) de la Universidad Autónoma de Bucaramanga con total financiación del centro.

Para el desarrollo de la presente investigación se contó con los siguientes materiales:

- Materiales y equipos de laboratorio
- Sustratos ricos en microorganismos (material recolectado en campo): biocompost obtenido a partir de aserrín, tierra de diferentes orígenes (granjas agrícolas, jardines, parques), grasa animal, raíces de leguminosas (*Canavalia ensiformis*, *Calliandra carbonaria*, *Erythrina glauca*, *Leucaena leucocephala*, *Pithecellobium dulce*)
- Medios de cultivo comerciales y modificados
- Sustratos orgánicos para cultivo en medio líquido: melaza de caña y urea
- Biorreactores diseñados con aireación y salida de gas
- Semillas de *Raphanus sativus*, *Cucumis sativus* y *Canavalia ensiformis*
- Germinadores y soporte

#### **4.1 AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LA MICROBIOTA A USAR COMO INOCULANTE**

En la búsqueda y selección de microorganismos para ser utilizados como inoculantes fueron analizados diferentes sustratos como grasa animal, biocompost, extractos de diferentes tipos de suelo y nódulos de leguminosas.



**Figura 2.** Nódulos de leguminosas (*Canavalia ensiformis*)  
Foto Dra. Graciela Chalela



**Figura 3.** Biocompost  
Foto Dra. Graciela Chalela

Los medios de cultivo sólidos utilizados en el proceso de aislamiento de las cepas fueron: OGY, Blood agar Base, Plate Count, Rosa de Bengala, Malta; los cuales fueron modificados con un 20% de extracto del sustrato del cual provenían los microorganismos.

El proceso de aislamiento de la cepa *Rhizobium* spp. requirió el diseño de un medio modificado; la composición de este medio es: 60 gr L<sup>-1</sup> de agar manitol, 15 gr L<sup>-1</sup> extracto de levadura, 5 gr L<sup>-1</sup> de agar – agar, preparado en solución al 20% de hojas y raíces de plantas.

Una vez seleccionados y aislados los microorganismos a ser utilizados como inoculantes se procedió a su siembra en biorreactores con medio líquido. El medio utilizado para este proceso consistió en una mezcla de sustratos orgánicos: melaza de caña al 0.5% y urea al 0.1%.

## 4.2 PLANTAS

Para este ensayo se utilizaron plantas de diferentes familias como crucíferas, cucurbitáceas y leguminosas las cuales forman parte de la dieta de seres humanos y se caracterizan por poseer tiempo de cosecha relativamente corto, lo cual facilita la presente experiencia.

En el caso de *Raphanus sativus* y *Cucumis sativus* fueron utilizadas semillas certificadas de uso agrícola; para *Canavalia ensiformis* se trabajó con semillas silvestres recolectadas por el autor.

### 4.2.1 Crucíferas

Familia de plantas dicotiledóneas, de hojas alternas, flores (hermafroditas y actinomorfas) en racimo, de corola cruciforme y fruto en silicua. Pertenecen a esta familia los géneros Alyssum, Brassica, Rhabanus.

#### *Raphanus sativus*

Tubérculo de la familia de las crucíferas de tamaño variable. Tallo breve antes de la floración, y posteriormente alcanza una altura de 0,50 a 1 m. Flores de sépalos erguidos; pétalos casi siempre blancos, 6 estambres libres; estilo delgado con un estigma ligeramente lobulado. Planta cultivada en muchos lugares del mundo, no se ha determinado su lugar de origen.



**Figura 4.** *Raphanus sativus*  
Foto Mauricio Cogollo Rueda

#### 4.2.2 Cucurbitáceas

Esta familia de plantas dicotiledóneas, comprende alrededor de 700 plantas distribuidas por los países cálidos; son rastreras o trepadoras, de hojas sencillas, flores de cinco pétalos y fruto en pepónide. Pertenecen a esta familia cerca de 90 géneros entre los que se encuentran Cucumis, Lutta, Bryonia, Cucúrbita.

##### *Cucumis sativus*

Planta herbácea anual de la familia de las *cucurbitáceas*; posee grandes hojas verdes formando un dosel sobre los frutos, que nacen de brotes laterales en las axilas de éstas. Emite zarcillos, por lo que se la puede guiar por una espaldera o dejarla crecer sobre el suelo de forma rastrera. Los tallos, gruesos y espinosos están divididos en nudos de los que nace un zarcillo y una hoja.



**Figura 5.** *Cucumis sativus*  
Foto Mauricio Cogollo Rueda

#### 4.2.3 Leguminosas

Grupo de plantas que ofrecen su fruto en vaina o legumbre. Comprende las familias de las Mimosáceas, Cesalpiniáceas y Papilionáceas, del orden rosales.

##### *Canavalia ensiformis*

Planta enredadera de la familia de las leguminosas. Cada vez más comúnmente utilizada como planta acompañante de diversos cultivos gracias a sus propiedades como formícida y como procesadora de suelos.



**Figura 6.** *Canavalia ensiformis*  
Foto Dra. Graciela Chalela

### 4.3 MONTAJE DEL EXPERIMENTO

Para el montaje del experimento se utilizaron en total 18 germinadores, 396 Kg de tierra, 504 semillas de cada especie, 12 bastones PVC de un metro de longitud, plástico transparente y malla polisombra.



**Figura 7.** Montaje de germinadores  
Foto Dra. Graciela Chalela

## 5. METODOLOGIA

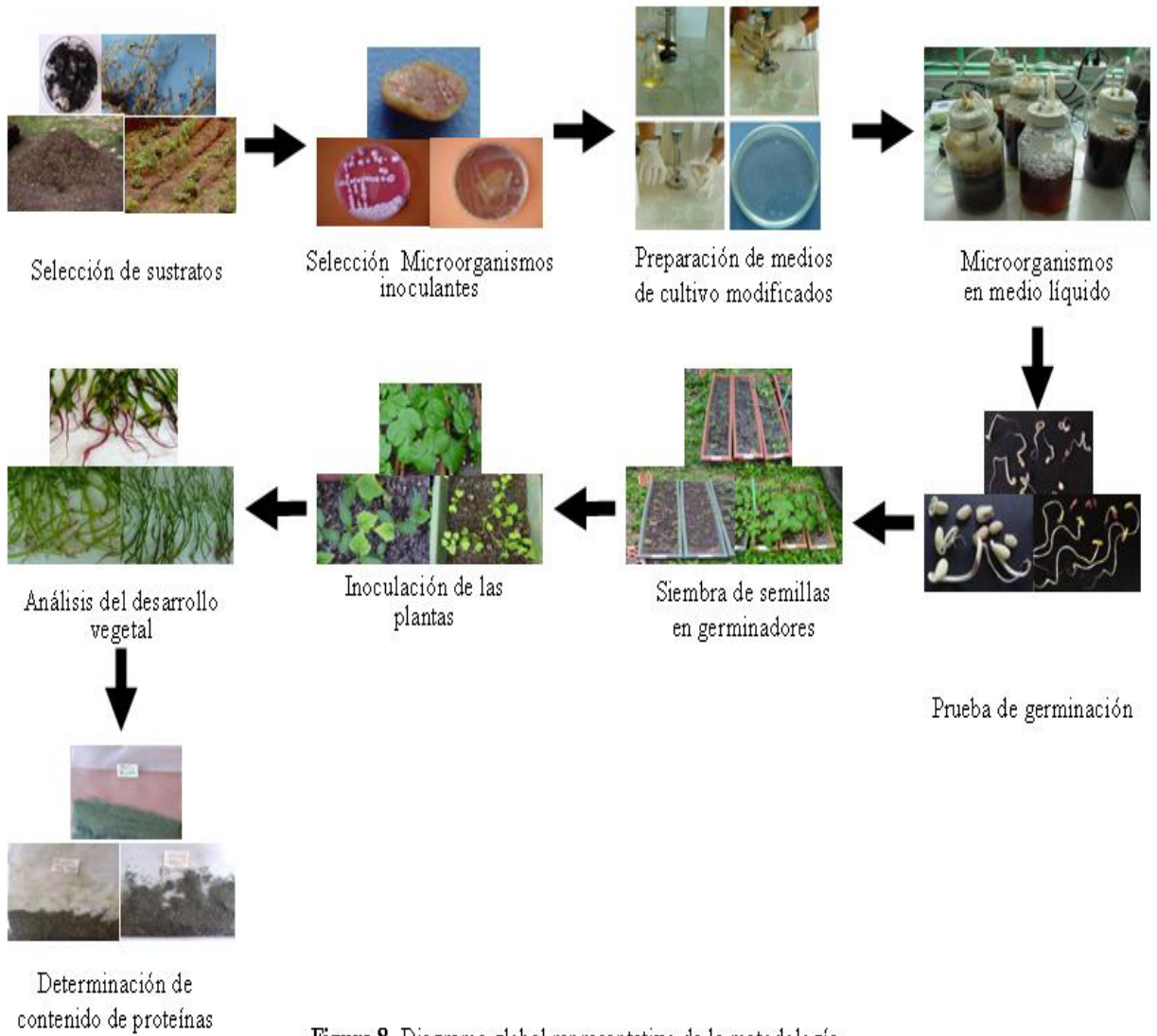


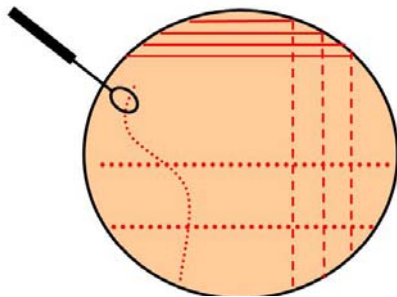
Figura 8. Diagrama global representativo de la metodología

## 5.1 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN LABORATORIO

Existen diferentes medios de cultivo que se utilizan según el tipo de microorganismo que se desea sembrar. Estos medios pueden ser sólidos, semisólidos o líquidos. Su preparación se hace según las especificaciones técnicas de cada uno; o pueden ser modificados y enriquecidos para favorecer el crecimiento de determinadas especies. Es importante esterilizar los medios de cultivo a fin de reducir el riesgo de contaminación por microorganismos presentes en el ambiente.

### 5.1.1 Siembra de microorganismos en medios sólidos

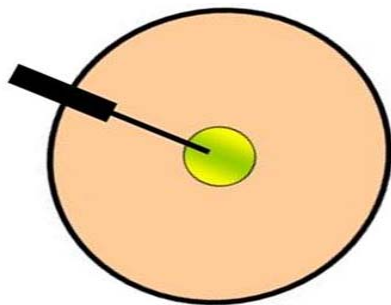
Siembra por agotamiento:



**Figura 9.** Siembra por agotamiento

Este método se utiliza principalmente para sembrar bacterias, teniendo como objetivo el aislamiento de colonias; consiste en inocular los microorganismos utilizando pequeñas cantidades del medio que los contiene rayando el agar de la forma como se muestra en el gráfico.

Siembra en un solo paso:



**Figura 10.** Siembra por un solo paso

Este método se utiliza principalmente para sembrar hongos; su objetivo es aislar y mantener el organismo seleccionado; consiste en inocular partes reproductivas mediante una pequeña incisión en el agar de la forma como se muestra en el gráfico.

Las cepas de microorganismos fueron obtenidas a partir de la preparación de extractos de sustratos mencionados anteriormente (ver página 18), preparados al 10% en solución salina (0.85%), incubados a 35 °C por 4 horas.

### 5.1.2 Biorreactores con medio líquido

Con el fin de aumentar la biomasa microbiana, las cepas fueron llevadas a biorreactores aireados de 1 litro con medio líquido, utilizando nutrientes como melaza de caña (0.5%) y urea (0.1%); cultivando cada microorganismo por separado para evitar posibles relaciones inhibitorias entre estos (Figura 11).



**Figura 11.** Biorreactores con medio líquido  
Foto Dra. Graciela Chalela

Las cepas de microorganismos aislados sembradas en medio líquido fueron mezcladas luego de 30 días para elaborar el pool en biorreactores de 25 litros; utilizando el mismo medio de cultivo (melaza de caña 0.5% y urea 0.1%) una vez elaborado el pool se dejó 30 días más, antes de aplicar en los germinadores.

### 5.2 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN

Esta prueba consiste en poner semillas en diferentes concentraciones del pool de microorganismos, con el fin de observar qué concentración es más beneficiosa.

Para esto se trabajó con el pool en concentraciones de 10%, 25%, 50%, 100%, también se utilizó agua destilada como control.

En cajas de petri, sobre algodón empapado en cada una de las concentraciones de pool y el agua destilada se pusieron 10 semillas de cada planta las cuales estuvieron por 15 días protegidas de la luz para después proceder a contar el número de semillas germinadas y medir la longitud alcanzada por cada una.

### 5.3 MONTAJE DE GERMINADORES

Los germinadores utilizados para esta experiencia cuentan con una capacidad aproximada de 22 Kg de tierra, en cada germinador se dispusieron 84 semillas, distribuidas en 3 hileras,

espaciadas 5 centímetros entre sí y separadas por una capa de piedra para evitar posibles interferencias entre las raíces de las plantas

Es en este proceso cuando finalmente los microorganismos entran en contacto con el sustrato (tierra en este caso) para transformarlo y establecer las diversas relaciones mencionadas anteriormente.

La inoculación se hizo mediante riego a los germinadores con el pool de microorganismos que contenía las diferentes cepas previamente mezcladas.

Los sustratos inoculados fueron: 1) tierra esterilizada (expuesta a 120 °C por 2 horas) , y 2) tierra no esterilizada. El tercer sustrato consistió de tierra sin inóculo ni tratamiento alguno el cual servirá como testigo para comparar (Figura 12).

Una vez llevado a cabo el primer riego con el pool de microorganismos en la tierra esterilizada y en la tierra sin tratamiento, estos sustratos se dejaron al ambiente por un período de 1 semana; luego se hizo una reinoculación y la siembra de las semillas



**Figura 12.** Germinadores.

Foto Dra. Graciela Chalela

#### **5.4 ANÁLISIS DEL DESARROLLO VEGETAL**

Este proceso se hizo 60 días después de haber sembrado las semillas en los germinadores; los parámetros estudiados fueron:

- Área foliar (cm<sup>2</sup>)
- Peso de biomasa (gr)
- Crecimiento (cm)
- Contenido de nitrógeno
- Contenido de proteínas (%)

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Si bien es cierto que los inoculantes microbianos son de reciente aparición y utilización y que por lo tanto no hay mucha literatura al respecto; estudios previos han planteado su utilización como procesadores y depuradores de suelos [30]; transformadores de materia orgánica [43]; estimulantes del desarrollo vegetal [3]; y como medio de prevención – control de fitopatologías [13].

Este trabajo se diseñó con el objeto de investigar la influencia que los *inoculantes microbianos* tienen sobre el crecimiento y desarrollo del rábano (*Raphanus sativus*), frijol canavalia (*Canavalia ensiformis*) y pepino (*Cucumis sativus*); investigaciones previas llevadas a cabo la Unidad de Biología Molecular del Instituto Internacional de Patología Molecular y Celular (Bruselas – Bélgica, 1988) demostraron los beneficios sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas gracias a la provisión de nutrientes así como la introducción de antibióticos que actúan como antagonistas de microorganismos fitopatógenos contribuyendo de esta manera a incrementar el rendimiento en la actividad agrícola [13]; asimismo estudios llevados a cabo por el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Buenos Aires – Argentina, 2002) indican que el uso de biofertilizantes aumenta la efectividad de la cosecha de trigo produciendo un mayor número de espigas por unidad de superficie sólo en los casos en que plantas y suelos se encontraban libres de fertilizantes químicos [3]. En la presente investigación se encontró un contenido de proteínas y nitrógeno superior en las plantas cuyo sustrato no fue esterilizado y recibieron el inoculante; los tres sustratos utilizados estuvieron libres de la aplicación de abonos químicos; sin embargo, las semillas comerciales (*Raphanus sativus* y *Cucumis sativus* en este caso) están recubiertas con sustancias fungicidas lo cual dificulta la acción de los bioinoculantes.

La utilización de microorganismos en la agricultura se lleva a cabo de diversas maneras, y con diferentes objetivos. Además de promover el desarrollo vegetal mediante la liberación de nutrientes y antibióticos; los inoculantes microbianos brindan la posibilidad de transformar los residuos agropecuarios. Un estudio conjunto del Instituto Tecnológico Agropecuario de Conkal y el Instituto de Recursos Naturales del Colegio de Postgraduados de Montecillo (Yucatán – Montecillo; México 2001) logró tratar excretas líquidas de cerdo las cuales se constituyen en importantes focos de contaminación de fuentes hídricas generadores de olores ofensivos y convertirlas a través de bioprocesos en abonos agrícolas de excelente calidad y a muy bajo costo [43].

En términos de biorremediación de suelos contaminados por actividad minera, un estudio de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga - Colombia, 1999) propuso la

utilización de microorganismos nativos como estrategia para mitigar los problemas de contaminación generados a partir de la disposición de residuos sólidos provenientes de la extracción de carbón mineral en El Cerrejón – Colombia; alcanzando una degradación de residuos de carbón hasta del 70.21% y un aumento en la productividad del suelo del 34%. [30].

Así, el campo de los inoculantes microbianos presenta múltiples funciones y beneficios que faltan aún por estudiar para conocer y aprovechar al máximo.

En los diferentes sustratos estudiados se logró detectar la presencia de microorganismos como:

Bacterias:

- Cocobacilos Gram negativos
- Bacilos endosporados Gram negativos
- Bacilos endosporados en cadenas Gram negativos
- Bacilos con endospora subterminal que deforman cuerpo bacilo Gram positivos
- Bacilo no endosporados con gránulos metacromáticos y extremos rectangulares Gram positivos
- Bacilos Gram positivos delgados no endosporados
- Bacilos con gránulos metacromáticos Gram positivos
- Bacterias filamentosas
- Bacilos pleomórficos Gram negativos

Hongos:

- Hifas septadas, conidias agrupadas formando racimos de color verde claro
- Hifas septadas con métula triverticilada
- Hifas septadas con métula simétrica
- Hifas septadas diverticiladas tipo *Penicillium*
- Hifas septadas con vesícula o cabeza redonda y esterigma primaria y secundaria
- Esporas con botonamiento o blastosporas, pseudomicelios, tipo Levaduras Imperfectas

Los microorganismos seleccionados como inoculantes para esta investigación fueron:

- *Trichoderma harzianum* (Figuras 12 y 13)
- *Saccharomyces candida* (Figuras 14 y 15)
- *Pseudomonas* spp (Figuras 16 y 17)
- *Rhizobium* spp. (figuras 18 y 19)



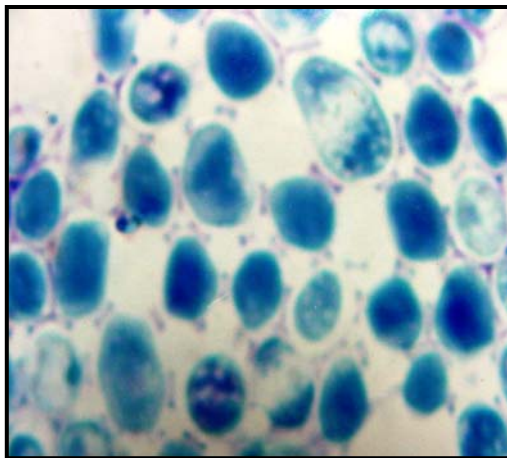
**Figura 13** Observación macroscópica *Trichoderma harzianum*.  
Foto Da. Graciela Chalela



**Figura 14.** Observación microscópica *Trichoderma harzianum*.(40X)  
Foto Dra. Graciela Chalela



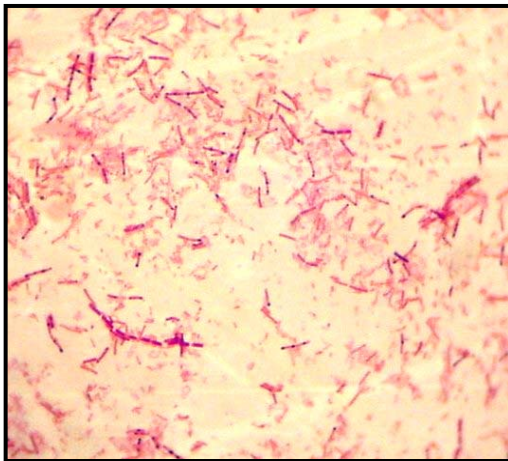
**Figura 15.** Observación macroscópica *Saccharomyces candida*  
Foto Dra. Graciela Chalela



**Figura 16.** Observación microscópica *Saccharomyces candida* (40X)  
Foto Dra. Graciela Chalela



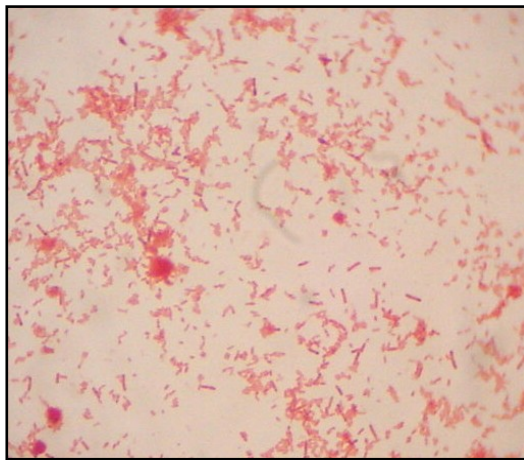
**Figura 17.** Observación macroscópica *Pseudomonas* spp.  
Foto Dra. Graciela Chalela



**Figura 18.** Observación microscópica *Pseudomonas* spp. (100X)  
Foto Dra. Graciela Chalela



**Figura 19.** Observación macroscòpica *Rhizobium* spp.  
Foto Dra. Graciela Chalela



**Figura 20.** Observación microscòpica *Rhizobium* spp.  
Foto Dra. Graciela Chalela

Aunque en la actualidad hay un mayor control en el empleo de sustancias químicas en la agricultura, los niveles de exposición de la población humana y la impregnación medioambiental son tan importantes como en el pasado, esto es debido a la elevada persistencia de estas sustancias y a su mala utilización.

Actualmente, cuando los mercados internacionales están abriendo sus puertas es de vital importancia la generación de nuevas alternativas en la producción agraria, ya que los métodos actuales de cultivo utilizan una gran cantidad de insumos químicos, de los cuales muchos están restringidos por la legislación medioambiental internacional. La presencia de “remanentes” de sustancias reconocidas como *agrotóxicos* en la normatividad

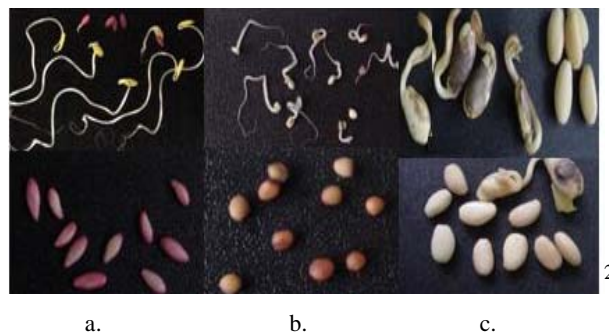
medioambiental puede llegar a bloquear parcial o totalmente el comercio de los productos que los contienen debido a los cada vez más exigentes estándares de calidad.

La elección de rábano (*Raphanus sativus*), fríjol canavalia (*Canavalia ensiformis*) y pepino (*Cucumis sativus*) como base de estudio para este trabajo no es fruto del azar; éstas plantas se utilizan frecuentemente como cultivos transitorios pues tienen tiempos de producción relativamente cortos y hacen parte de la dieta de la población promedio de la región.

Los microorganismos seleccionados<sup>1</sup> como inoculantes fueron extraídos del medio ambiente local (muestras de tierra de diferentes lugares, grasa procedente de bioprocesos industriales, nódulos de diferentes tipos de leguminosas silvestres y cultivadas, biocompost).

## 6.1 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN EN CAJAS DE PETRI

En el caso de *Raphanus sativus* y *Cucumis sativus* se trabajó con semillas certificadas, las cuales según especificaciones técnicas tienen una germinación aproximada del 80%; para *Canavalia ensiformis*, se contó con semillas silvestres recolectadas por el autor, por esta razón no se conocen datos sobre porcentaje de germinación esperado.



**Figura 21.** Semillas utilizadas en pruebas de germinación  
Foto Dra. Graciela Chalela

Atendiendo a las características del porcentaje de germinación en cajas de petri para *Canavalia ensiformis* se encontró que la concentración del 50% del inoculante microbiano es la que mejor rendimiento muestra en relación al porcentaje de germinación, alcanzando un valor del 60%, superior a las demás disoluciones y las muestras de control; además el menor rendimiento en relación a esta variable se encuentra cuando la concentración es del 100%. Si la variable a analizar es el tamaño de la planta la concentración que muestra un mayor rendimiento es la del 10% alcanzando un valor promedio de 14.2 cm, seguida por la

<sup>1</sup> Ver páginas 16 y 28 - 32

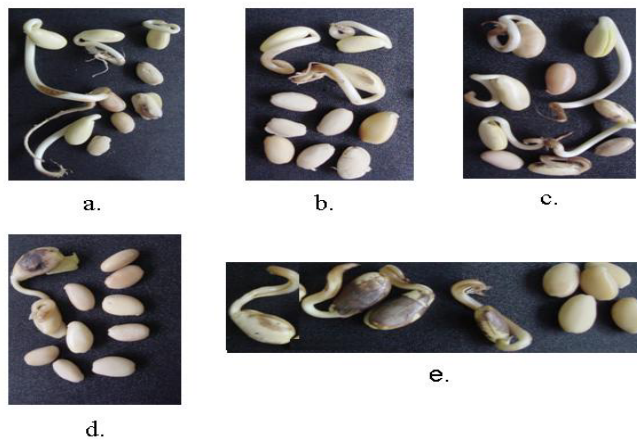
<sup>2</sup> a. *Cucumis sativus*      b. *Raphanus sativus*      c. *Canavalia ensiformis*

concentración al 50% que muestra un valor de crecimiento promedio de 11.02 cm, ambas superiores a las muestras control (7.08 cm) ; en contraste a estos resultados, el valor de menor crecimiento corresponde a la muestra donde se utilizó el inoculante al 100% (3.9 cm). (Cuadro 1.)

**Cuadro 1.** Porcentaje de germinación *Canavalia ensiformis*

Dilución (%)	0% (agua destilada)	10%	25%	50%	100% (Pool)
Germinación (%)	40%	40%	30%	60%	20%
Crecimiento (cm)	6	25.5	13.5	7.1	4
	6	14	9.8	11.5	3.8
	6.5	7.5	10	10.7	NG
	9.8	9.8	NG	10.8	NG
	NG <sup>3</sup>	NG	NG	10	NG
	NG	NG	NG	16	NG
Cremiento promedio (cm)	7.08	14.2	11.1	11.02	3.9

Fuente: Mauricio Cogollo Rueda



**Figura 22.** Germinación de *Canavalia ensiformis*<sup>4</sup>  
Foto: Dra. Graciela Chalela

<sup>3</sup> NG: No hubo germinación

<sup>4</sup> Porcentajes de dilución: a. 10% b. 25% c. 50% d. 100% e. Control (0%)

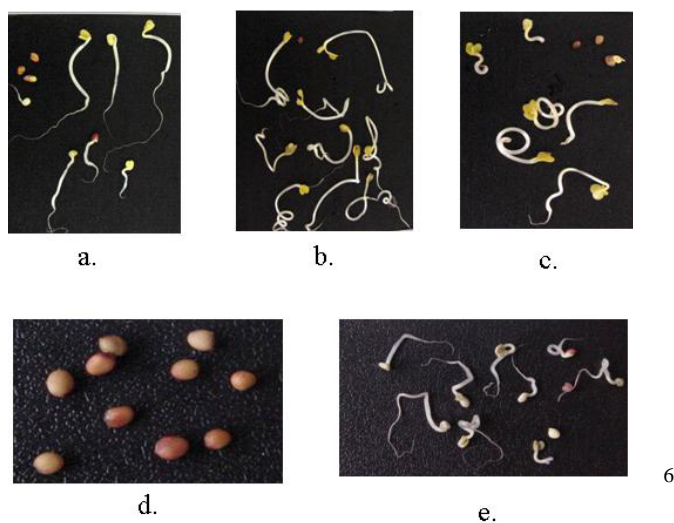
En relación a *Raphanus sativus* y las características del porcentaje de germinación en cajas de petri, se encuentra que la concentración del 25% de inoculante microbiano es la de mejor rendimiento alcanzando un valor promedio del 90%, superior a las demás disoluciones y la muestra de control, además el menor rendimiento en relación a esta variable se encuentra cuando la concentración es del 100%, con un porcentaje de germinación del 0%. Cuando la variable a analizar es el tamaño de la planta se encuentra que también la concentración que muestra una mayor rendimiento es la del 25% alcanzando un valor promedio de 7,86 cm, seguida por la concentración al 10% que muestra un valor de crecimiento promedio de 4.79 cm; ambas superiores a las muestras control (2,98 cm) que en este ensayo mostró el menor crecimiento (Cuadro 2.)

**Cuadro 2.** Porcentaje de germinación *Raphanus sativus*

Dilución (%)	0% (agua destilada)	10%	25%	50%	100% (Pool)
Germinación (%)	100%	70%	90%	60%	0%
Crecimiento (cm)	2.6	6.2	9.2	5.8	NG
	4.4	5	8.5	7	NG
	2.3	8.6	10.8	5.4	NG
	0.8	1.5	11.2	4	NG
	5.8	3.6	10.8	1.8	NG
	6.8	1.7	6.9	0.9	NG
	7.1	6.9	13.3	NG	NG
	4	NG <sup>5</sup>	6.3	NG	NG
	2.5	NG	8.1	NG	NG
1.5	NG	NG	NG	NG	
Cremiento promedio (cm)	3.78	4.79	9.45	4.15	NG

Fuente: Mauricio Cogollo Rueda

<sup>5</sup> NG: No hubo germinación



**Figura 23.** Germinación de *Raphanus sativus*  
Foto: Dra. Graciela Chalela

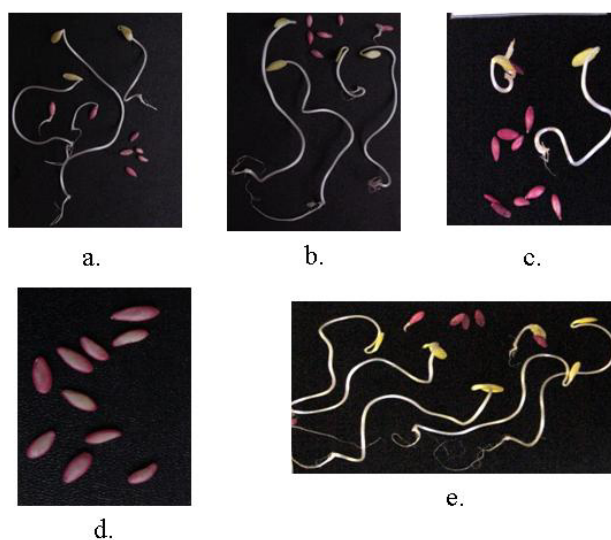
Por último en relación a *Cucumis sativus* y las características del porcentaje de germinación en cajas de petri, se encontró que la muestra control es la que mejor rendimiento muestra en relación al porcentaje de germinación, alcanzando un valor promedio del 70%, seguida por las diluciones al 10% y 25% con un valor de germinación del 50%, además el menor rendimiento en relación a esta variable lo encontramos cuando la concentración es del 100%, con un porcentaje de germinación del 0%. Cuando la variable a analizar es el tamaño de la planta se encuentra que también la muestra con mayor rendimiento es la de control, alcanzando un valor promedio de 17.56cm, seguida por la concentración al 25% que muestra un valor de crecimiento promedio de 17.02cm y la muestra que tuvo el menor crecimiento corresponde a la concentración al 50% alcanzando un valor promedio de 5.1cm (Cuadro 3).

<sup>6</sup> Porcentajes de dilución: a. 10% b. 25% c. 50% d. 100% e. Control (0%)

**Cuadro 3.** Porcentaje de germinación *Cucumis sativus*

Dilución (%)	Control	10 (%)	25 (%)	50 (%)	100 (%)
Germinación (%)	70%	50%	50%	20%	0%
Crecimiento (cm)	25	13.7	13.6	4.8	NG
	22.2	17.5	2.5	5.4	NG
	1.8	25.2	20.7	NG	NG
	23	2	24.3	NG	NG
	3.1	6.4	24	NG	NG
	22	NG <sup>7</sup>	NG	NG	NG
	25.8	NG	NG	NG	NG
Cremiento promedio (cm)	17.56	12.96	17.02	5.1	NG

Fuente: Mauricio Cogollo Rueda



**Figura 24.** Germinación de *Cucumis sativus*<sup>8</sup>  
Foto: Dra. Graciela Chalela

Estudios previos muestran la efectividad de inoculantes microbianos en como estimulantes del desarrollo vegetal [3]; [13]; pero no se tiene en cuenta la dosis óptima de inoculante de modo que no se lleve a cabo el fenómeno de inhibición presentado en este ensayo cuando se utilizó el 100% de pureza del pool. Esta inhibición se da como resultado de la

<sup>7</sup> NG: No hubo germinación

<sup>8</sup> Porcentajes de dilución: a. 10% b. 25% c. 50% d. 100% e. Control (0%)

actividad microbiana y la ausencia de un sustrato sobre el cuál trabajar, pues las semillas estaban sólo sobre algodón humedecido con el inoculante.

## 6.2 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN EN TIERRA

En relación al porcentaje de germinación en tierra y haciendo referencia a *Raphanus sativus* se encuentra que el mayor valor promedio está en las plantas control con un porcentaje del 84.1%, seguido por tierra no esterilizada inoculada con un valor del 78.41% y en último lugar tierra esterilizada inoculada con un valor promedio de 76.14% (Cuadro 4).

Haciendo referencia a *Cucumis sativus* y el porcentaje de germinación en tierra se observa que el mayor valor promedio se encontró en las plantas sembradas tierra esterilizada inoculada con un valor promedio de 82.95%, seguido por las plantas control, con un valor medio de 80.68% y en último lugar las plantas sembradas en tierra no esterilizada inoculada con un valor promedio de 78.41% (Cuadro 4).

Por último, haciendo referencia a *Canavalia ensiformis* y el porcentaje de germinación en tierra se observa que el mayor valor promedio se presenta en las plantas sembradas en tierra no esterilizada inoculada con un valor promedio de 46.59%, seguido por las plantas sembradas en tierra esterilizada inoculada con un valor promedio de 39.77% y en último lugar las plantas control, con un valor medio de 36.36% (Cuadro 4).

Como se mencionó anteriormente las semillas de *Raphanus sativus* y *Cucumis sativus* estaban recubiertas por una sustancia que actúa como fungicida<sup>9</sup>, lo cual dificulta el trabajo de los microorganismos inculados; de ahí que los promedios de germinación más altos no estuvieron en los sustratos con mayor población microbiana; en el caso de *Canavalia ensiformis*; semillas libres de fungicidas, el valor de germinación más alto estuvo en los sustratos inoculados con el pool de microorganismos (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Porcentaje de germinación tierra

SUSTRATO	Tierra sin tratamiento	Tierra esterilizada inoculada	Tierra no esterilizada inoculada
<i>Raphanus sativus</i>	84.1%	76.14%	78.41%
<i>Cucumis sativus</i>	80.68%	82.95%	78.41%
<i>Canavalia ensiformis</i>	36.36%	39.77%	46.59%

Fuente: Mauricio Cogollo Rueda

<sup>9</sup> Ver página 27

**Tabla 3.** Códigos de plantas y muestras recolectadas en diferentes sustratos

CÓDIGO	PLANTA	SUSTRATO
RS01	<i>Raphanus sativus</i>	Tierra no esterilizada, no inoculada
RS02	<i>Raphanus sativus</i>	Tierra esterilizada, inoculada
RS03	<i>Raphanus sativus</i>	Tierra no esterilizada, inoculada
RS04	<i>Raphanus sativus</i>	Parámetro externo
CS01	<i>Cucumis sativus</i>	Tierra no esterilizada, no inoculada
CS02	<i>Cucumis sativus</i>	Tierra esterilizada, inoculada
CS03	<i>Cucumis sativus</i>	Tierra no esterilizada, inoculada
CS04	<i>Cucumis sativus</i>	Parámetro externo
FC01	<i>Canavalia ensiformis</i>	Tierra no esterilizada, no inoculada
FC02	<i>Canavalia ensiformis</i>	Tierra esterilizada, inoculada
FC03	<i>Canavalia ensiformis</i>	Tierra no esterilizada, inoculada
FC04	<i>Canavalia ensiformis</i>	Parámetro externo

Fuente. Mauricio Cogollo Rueda

### 6.3 NIVEL DE ACIDEZ DE SUSTRATOS EN GERMINADORES

Al hacer medición de pH en los diferentes sustratos donde se habían sembrado las diferentes plantas no se encontraron diferencias significativas; el valor más alto se aparece en *Cucumis sativus* sembrado en tierra esterilizada inoculada y corresponde a 6.49; mientras el más bajo se encuentra en *Canavalia ensiformis* sembrado en tierra no inoculada no esterilizada y corresponde a 5.36 (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Nivel de acidez en germinadores

Muestra <sup>10</sup>	Variaciones del pH				pH promedio
RS01	5.72	6.12	6.16	6.03	6
RS02	5.67	6.02	6	5.87	5.89
RS03	5.7	5.81	6.09	5.74	5.84
CS01	5.67	5.61	5.57	5.84	5.67
CS02	6.06	5.89	5.91	5.89	5.94
CS03	5.87	5.62	5.81	5.83	5.78
FC01	5.7	5.13	5.3	5.46	5.39
FC02	6.06	5.89	5.91	5.86	5.93
FC03	5.87	5.89	5.81	5.83	5.85

Fuente: Mauricio Cogollo Rueda

#### **6.4 ÁREA FOLIAR<sup>11</sup> (cm<sup>2</sup>)**

Los resultados de las características de área foliar en relación a *Raphanus sativus* y *Cucumis sativus* no se pueden interpretar ya que debido al ataque de las hormigas se perdió gran parte de las muestras. Pero en relación a *Canavalia ensiformis* se observa que el mayor valor foliar se encontró en las plantas sembradas en Tierra no esterilizada inoculada, con un área de 14538.6 cm<sup>2</sup>, seguido por las plantas control con un área de 13479.29 cm<sup>2</sup> y en último lugar las plantas sembradas en tierra esterilizada inoculada con un área de 9595.5 cm<sup>2</sup> (Cuadro 6)

<sup>10</sup> Ver Tabla 3, página 39

<sup>11</sup> Calculado según método de Germán Cardoso, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Biología. 1987

Cuadro 6. Área foliar de plantas obtenidas en germinadores (cm<sup>2</sup>)

SUSTRATO PLANTA	Tierra sin tratamiento	Tierra esterilizada inoculada	Tierra no esterilizada inoculada
<i>Raphanus sativus</i>	4762	AM <sup>12</sup>	AM
<i>Cucumis sativus</i>	4117.65	AM	9595.5
<i>Canavalia ensiformis</i>	13479.29	9595.5	14538.6

Fuente: Mauricio Cogollo Rueda

### 6.5 PESO DE BIOMASA (gr)

De igual forma el análisis de los resultados de las características peso de biomasa para *Raphanus sativus* y *Cucumis sativus* no se pueden interpretar ya que debido al ataque de las hormigas se perdió gran parte de las muestras. Pero en relación a la *Canavalia ensiformis* se observa que el mayor peso de biomasa se encontró en las plantas sembradas en tierra no esterilizada inoculada, con un peso de 515.95 gr., seguido por las plantas sembradas en tierra esterilizada inoculada con un peso de de 401.91 gr. y en último lugar las plantas control, con un peso de 348.71gr (Cuadro 7).

Cuadro 7. Peso de biomasa obtenida en germinadores (gr)

SUSTRATO PLANTA	Tierra sin tratamiento	Tierra esterilizada inoculada	Tierra no esterilizada inoculada
<i>Raphanus sativus</i>	200	AM	AM
<i>Cucumis sativus</i>	250	AM	169.39
<i>Canavalia ensiformis</i>	348.71	401.91	515.95

Fuente: Mauricio Cogollo Rueda



RS01



RS03

**Figura 25.** Tallos de *Raphanus sativus*  
Foto Dra. Graciela Chalela

<sup>12</sup> Ausencia de muestra por invasión inesperada de hormigas

<sup>13</sup> Ver Tabla 3 pág. 39



CS01



CS02



CS03

14

**Figura 26.** Tallos de *Cucumis sativus*  
Foto Dra. Graciela Chalela



FC01



FC02



FC03

15

**Figura 27.** Tallos de *Canavalia ensiformis*  
Foto Dra. Graciela Chalela

---

<sup>14</sup> Ver Tabla 3 página 39

<sup>15</sup> Ver Tabla 3 página 39

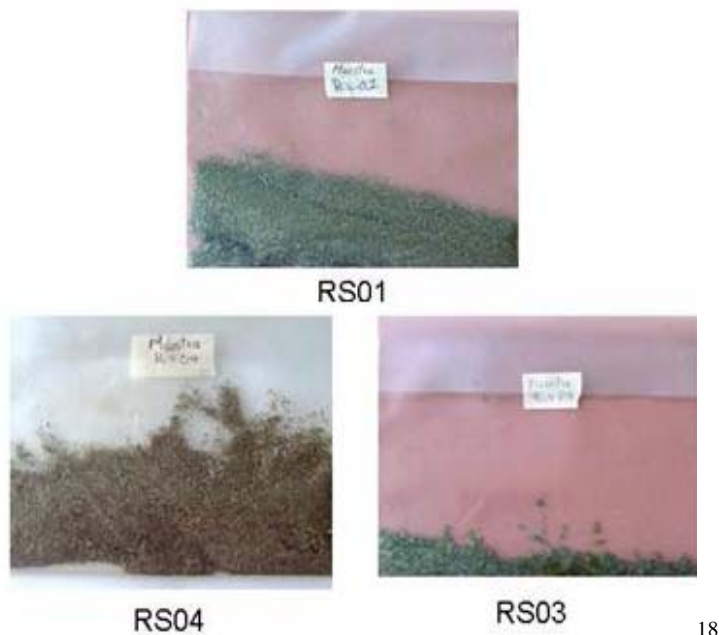
## 6.6 CONTENIDO DE NITRÓGENO Y PROTEÍNAS

**Cuadro 8.** Contenido de nitrógeno y proteínas<sup>16</sup>

SISTRATO PLANTA	Tierra sin tratamiento		Tierra esterilizada inoculada		Tierra no esterilizada inoculada		Parámetro externo	
	Nitrógeno (%)	Proteínas (%)	Nitrógeno (%)	Proteínas (%)	Nitrógeno (%)	Proteínas (%)	Nitrógeno (%)	Proteínas (%)
<i>Raphanus sativus</i>	1.16	6.7	AM <sup>17</sup>	AM	1.23	7.1	1.18	6.8
<i>Cucumis sativus</i>	1.48	8.5	1.84	10.6	1.88	10.8	1.63	9.4
<i>Canavalia ensiformis</i>	1.6	9.2	1.86	10.7	1.91	11.0	1.6	9.2

Fuente: Mauricio Cogollo Rueda

En relación a los contenidos de nitrógeno y proteínas en *Raphanus sativus* no se encontraron diferencias significativas entre las plantas sembradas en tierra no esterilizada inoculada, tierra esterilizada inoculada y las plantas control (Cuadro 8).



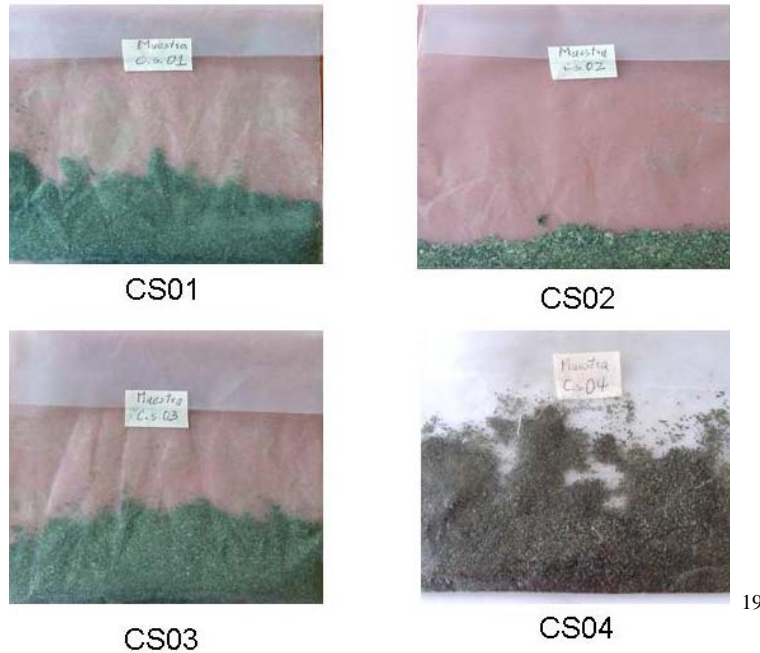
**Figura 28.** Muestras de *Raphanus sativus* para análisis de proteínas  
Foto Dra. Graciela Chalela

<sup>16</sup>Norma Icontec: 770. Laboratorios PSL Proanálisis Ltda. Control ciego de calidad: Laboratorio Especializado Alimentos. Factor de conversión Proteína: 5.75 estipulado para vegetales en el TLC con MERCOSUR.

<sup>17</sup>Ausencia de muestra por invasión inesperada de hormigas

<sup>18</sup> Ver Tabla 3 página 39

El análisis de contenido de nitrógeno y proteínas en *Cucumis sativus* muestra valores superiores de estos compuestos en aquellas plantas que fueron sembradas en tierra no esterilizada inoculada con valores de %N=1.88 y % Pr=10.8, seguidos por las plantas sembradas en tierra esterilizada inoculada donde %N=1.84y % Pr=10.6 y los valores más bajos de estos compuestos se encontraron en las plantas control con %N=1.48 y % Pr=8.5 (Cuadro 8).



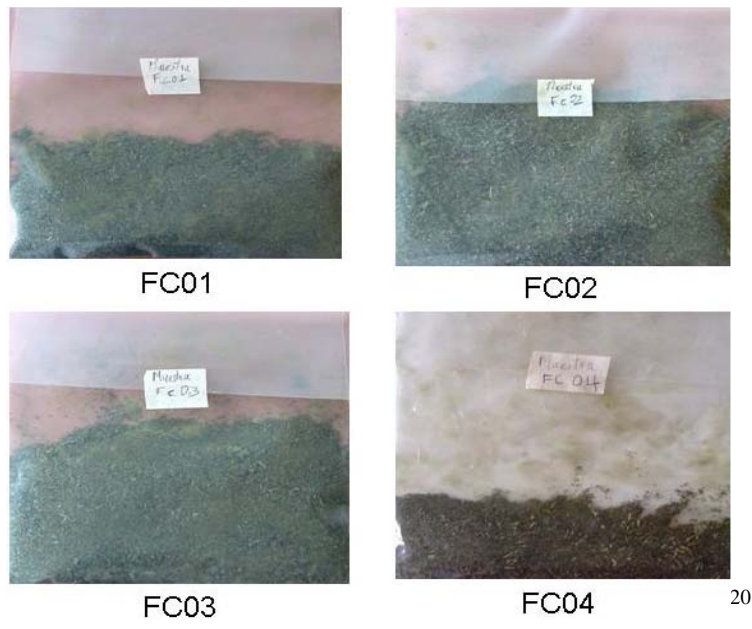
**Figura 29.** Muestras de *Cucumis sativus* para análisis de proteínas  
Foto Dra. Graciela Chalela

Por su parte, el contenido de nitrógeno y proteínas en *Canavalia ensiformis* muestra valores superiores de estos compuestos en aquellas plantas que fueron sembradas en tierra no esterilizada inoculada con valores de %N=1.91 y % Pr=11, seguidos por las plantas sembradas en tierra esterilizada inoculada donde %N=1.86 y % Pr=10.7 y los valores más bajos de estos compuestos se encontraron en las plantas control con %N=1.6y % Pr=9.2 (Cuadro 8).

Uno de los principales grupos de microorganismos fijadores de nitrógeno es *Rhizobium* spp., siendo éste uno de los microorganismos inoculados se esperaba que llevara a cabo procesos que aumentaran la disponibilidad de  $\text{NO}_x$  en el suelo y así aumentara también la concentración de nitrógeno y proteínas en las plantas. En todos los casos excepto en el parámetro externo la concentración de nitrógeno y proteínas fue superior en *Canavalia*

<sup>19</sup> Ver Tabla 3 página 39

*ensiformis* ya que ésta es una planta que crea relaciones simbióticas que favorecen el desarrollo de *Rhizobium* spp.



**Figura 30.** Muestras de *Canavalia ensiformis* para análisis de proteínas  
Foto Dra. Graciela Chalela

---

<sup>20</sup> Ver Tabla 3 página 39

## 7. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados de la presente investigación permite llegar a las siguientes conclusiones:

1. Los inoculantes microbianos son medios que facilitan la introducción de microorganismos a un suelo (sustrato) determinado; estos deben ser aplicados teniendo conocimiento previo de los microorganismos que habitan dicho sustrato de modo que se dé prioridad a microorganismos nativos pues estos ya están adaptados a las condiciones ambientales locales y a otros microorganismos que creen relaciones de sinergia con los nativos y favorezcan el proceso de maduración de suelos. En este caso los microorganismos inoculados fueron: *Trichoderma harzianum*, *Saccharomices candida*, *Pseudomonas spp* y *Rhizobium spp*.

2. La utilización de inoculantes microbianos es una importante estrategia en procesos de liberación y fijación de nutrientes al suelo; sin embargo, debe tenerse en cuenta parámetros como dosis óptima de inoculantes pues su exceso puede producir un efecto contrario al esperado. Los ensayos de germinación demostraron que la excesiva concentración de inoculantes microbianos puede llegar a inhibir el desarrollo de las semillas, por eso es importante realizar éstas pruebas utilizando diferentes porcentajes de dilución a fin de determinar empíricamente la concentración más adecuada para cada planta (en este caso las semillas de *Raphanus sativus* y *Cucumis sativus* no germinaron al estar en contacto con inoculante al 100%).

3. *Rhizobium spp.* es un grupo de bacterias que crece asociado a las raíces de plantas leguminosas, en el caso de los germinadores de *Cucumis sativus* y *Raphanus sativus* no había leguminosas que estimularan el desarrollo de la Rhizobia; aún así los valores de nitrógeno y proteínas fueron mayores en las plantas inoculadas que en los demás sustratos y los parámetros externos.

4. El uso de inoculantes microbianos tienen efectos diversos sobre los diferentes tipos de plantas, el pool diseñado para este ensayo favoreció el desarrollo de leguminosas (*Canavalia ensiformis*) más que el de cucurbitáceas (*Cucumis sativus*) (*Cucumis sativus*) y crucíferas (*Raphanus sativus*) siendo estas últimas quienes mostraron menor desarrollo.

5. El desarrollo vegetal entendido desde el punto de vista del tamaño de las plantas no está necesariamente asociado a su valor nutricional; se encontró que las plantas más grandes podían contener concentraciones de nitrógeno y proteínas inferiores a las que presentaban plantas más pequeñas, tal es el caso de *Cucumis sativus* donde las plantas provenientes del sustrato sin tratamiento alcanzaron valores totales de peso de biomasa igual a 250 gr, frente a la tierra inoculada con 169.39 gr; pero su contenido de proteínas fue

8.5% frente a 10.8 respectivamente. El mayor contenido de proteínas implica un mayor valor nutricional independientemente del tamaño de las plantas.

6. La presencia de microorganismos es fundamental en para llevar a cabo procesos de descomposición de materia orgánica y fijación de nitrógeno los cuales juegan un papel de vital importancia en los procesos de maduración y fertilización del suelo. En este ensayo los mayores valores de nitrógeno (N) y proteínas (Pr) fueron obtenidos para todas las plantas en el sustrato que poseía la mayor concentración de microorganismos, es decir tierra que conservaba sus microorganismos nativos porque no fue esterilizada en laboratorio y que además fue regada con el inoculante preparado. Para *Raphanus sativus* N=1,23 y Pr=7.1%; *Cucumis sativus* N=1.88% y Pr=10.8%; *Canavalia ensiformis* N=1.91% y Pr=11%

7. *Canavalia ensiformis*, es una planta utilizada tradicionalmente como control biológico de hormigas, este ensayo se vio drásticamente afectado por un ataque de hormigas, las cuales disminuyeron significativamente las muestras de las plantas en estudio. Las únicas plantas que no se vieron afectadas por este evento fueron las de *Canavalia ensiformis*, lo cual demuestra su efectividad como formicida natural.

## 8. RECOMENDACIONES

Para una segunda fase de esta investigación o para estudios similares el autor recomienda:

En esta investigación se trabajó con semillas sembradas en germinadores protegidos únicamente por plástico transparente y malla polisombra. En una siguiente fase sería conveniente trabajar de manera simultánea en el diseño de invernaderos que permitan el control de las condiciones ambientales y la implementación de parcelas demostrativas al aire libre para analizar los efectos de inoculantes microbianos en diferentes entornos.

Para la aplicación de un inoculante microbiano se recomienda hacer caracterizaciones microbiológicas de los suelos para así conocer la biota presente en el lugar e inocular microbios que causen relaciones benéficas para el proceso de maduración del suelo. También es necesario llevar a cabo pruebas físico – químicas para determinar si el suelo necesita o no un tratamiento previo (descontaminación, biorremediación, hidratación, implementación de sistemas de drenaje, adición de materia orgánica) con el fin de corregir cualquier situación que pueda interferir negativamente en el proceso de colonización microbiana.

El ensayo arrojó los mejores resultados en el caso de leguminosas (*Canavalia ensiformis*), se recomienda hacer ensayos con otras plantas para estudiar su respuesta y comportamiento ante el inoculante y la capacidad de albergar microorganismos benéficos en la rizósfera. Estas plantas pueden ser utilizadas con fines comerciales o como forrajes verdes.

Existen microorganismos fijadores de nitrógeno que viven en simbiosis (*Rhizobium* spp.) estos se ven favorecidos en los suelos donde habitan plantas que los alberguen (*Canavalia ensiformis* en este caso). En estudios posteriores se recomienda la utilización de cepas de microorganismos fijadores de nitrógeno con vida libre (*Azotobacter* spp, *Mycobacterium* spp, *Thiobacillus* spp, entre otros) de modo que la permanencia de los microorganismos no dependa de la presencia de plantas hospedantes.

La dosis óptima de inoculante puede variar según el tipo de planta y las condiciones ambientales locales; para su determinación se recomienda realizar pruebas de germinación cada vez que se vaya inocular una nueva especie, y de ser posible aumentar el rango de dilución del inoculante.

Las semillas comerciales *Raphanus sativus* y *Cucumis sativus* en este caso, se encuentran recubiertas por sustancias fungicidas lo cual dificulta la acción de los microorganismos. Para obtener mayores beneficios conviene la utilización de semillas “naturales”, es decir producidas directamente en granjas y que no hayan sido tratadas con este tipo de sustancias.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **ACUÑA F, ARCHILA O, BUSTOS O, CONTRERAS L, DÍAZ E, ESPINOSA H, FAJARDO G, FORERO A, FORERO G, OSPINA J, RAMÍREZ C, RIVEROS M, SÁNCHEZ J, TÉLLEZ G, TORRES C.** Manual agropecuario, tecnologías orgánicas de la granja integral autosuficiente. Ed. Hogares Juveniles Campesinos – Biblioteca del Campo. Bogotá, Colombia 2002.
2. **BELLAPART C.** Agricultura Biológica en Equilibrio con la Agricultura Química. Ed. AEDOS. Barcelona, España 1988.
3. **BOLLETA A., VENANZI S., KRÜGER H.** Respuestas del cultivo de trigo a la inoculación con biofertilizantes en el sur de la provincia de Buenos Aires. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Bordenave. Buenos Aires, Argentina, 2002.  
<http://www.inta.gov.ar/bordenave/contactos/autores/bolleta/inoculacion.pdf>
4. **BORLAUG N.** Discurso de investidura Doctor Honoris Causa Universidad de Granada, abril del 2005
5. **CAMPOY C, JIMENEZ M, OLEA-SERRANO MF, MORENO-FRIAS M, CANABATE F, OLEA N, BAYES R, MOLINA-FONT JA.** Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. *Early Hum Dev.* 65: 183-190 (2001).
6. **CAMPS M, PLANAS J, GÓMEZ-CATALÁN J, SABROSO M, TOFIGUERAS J, CORBELLA J.** Organochlorine residues in human adipose tissue in Spain: study of an agrarian area. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 42: 195-201 (1989).  
[http://www.springerlink.com/\(auncsobncnggu5i1bf0h54qr\)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,7,23;journal,211,375;linkingpublicationresults,1:101156,1](http://www.springerlink.com/(auncsobncnggu5i1bf0h54qr)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,7,23;journal,211,375;linkingpublicationresults,1:101156,1)
7. **CARSON R.** *Silent Spring.* Houghton Mifflin Company (1962)
8. **CASAS L.F.** *Bioquímica.* Ed. Publicaciones UIS. Bucaramanga, Colombia 1985
9. **CARREÑO-R. J.** Tesis Doctoral Exposición de hombres jóvenes a compuestos tóxicos persistentes y bioacumulables en el sureste peninsular. Universidad de Granada, España 2005

**10. CERRILLO I, OLEA-SERRANO MF, IBARLUZEA J, EXPOSITO J, TORNE P, LAGUNA J, PEDRAZA V, OLEA N.** Environmental and lifestyle factors for organochlorine exposure among women living in Southern Spain. *Chemosphere*. (2005).

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=16153679&dopt=Citation](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=16153679&dopt=Citation)

**11. COOPER GS, MARTIN SA, LONGNECKER MP, SANDLER DP, GERMOLÉC DR.** Associations between plasma DDE levels and immunologic measures in African-American farmers in North Carolina. *Environ. Health Perspect.* 112(10): 1080-1084 (2004).

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1247381>

**12. COSCOLLA R.** Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales. Ediciones Mundi-Prensa (1993).

**13. DAVISON J.** Plant Beneficial Bacteria. *Bio/Technology*, 6:282 – 286. 1988

<http://www.nature.com/nbt/journal/v6/n3/abs/nbt0388-282.html>

**14. FATTORE E, FANELLI R, LA VECCHIA C.** Persistent organic pollutants in food: public health implications. *J Epidemiol Community Health.* 56: 831-832 (2002)

**15. FENSKE RA, KEDAN G, LU C, FISHER-ANDERSEN JA, CURL CL.** Assessment of organophosphorous pesticide exposures in the diets of preschool children in Washington State. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.*, 12: 21-28 (2002)

[http://www.invs.sante.fr/publications/2006/exposition\\_pesticides/exposition\\_pesticides.pdf](http://www.invs.sante.fr/publications/2006/exposition_pesticides/exposition_pesticides.pdf)

**16. FERNÁNDEZ M, CUESTA S, JIMENEZ O, GARCIA MA, HERNANDEZ LM, MARINA ML, GONZALEZ MJ.** Organochlorine and heavy metal residues in the water/sediment system of the Southeast Regional Park in Madrid, Spain. *Chemosphere.* 41(6): 801-12 (2000)

**17. FUNDACIÓN HOGARES JUVENILES CAMPESINOS.** Granja Integral Autosuficiente. Ed. San Pablo. Bogotá, Colombia 2004

**18. GLYNN H, GARY H.** Ingeniería Ambiental. Ed. Prentice Hall. Ciudad de México, México 1999

**19. GÓMEZ-CATALÁN J, PLANAS J, TO-FIGUERAS J, CAMPS M, CORBELLA J.** Organochlorine residues in the population of Catalonia (Spain). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51: 160-164 (1993).

[http://www.springerlink.com/\(iodxrijriajzto45d0htl145\)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,24,25;journal,158,375;linkingpublicationresults,1:101156,1](http://www.springerlink.com/(iodxrijriajzto45d0htl145)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,24,25;journal,158,375;linkingpublicationresults,1:101156,1)

**20. GÓMEZ-CATALÁN J, LEZAUN M, TO-FIGUERAS J, CORBELLA J.** Organochlorine residues in the adipose tissue of the population of Navarra (Spain). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 54: 534-540 (1995).

[http://www.springerlink.com/\(yaenatrwq4j4w345jxmtv445\)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,9,22;journal,137,375;linkingpublicationresults,1:101156,1](http://www.springerlink.com/(yaenatrwq4j4w345jxmtv445)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,9,22;journal,137,375;linkingpublicationresults,1:101156,1)

**21. GÓMEZ M.E.** Microbiología Ambiental. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España 1989.

**22. HERNÁNDEZ LM, FERNÁNDEZ MA, HOYAS E, GONZÁLEZ MJ, GARCÍA JF.** Organochlorine insecticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast milk in Madrid (Spain). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 308-315 (1993).

[http://www.springerlink.com/\(ovt0hfz0mttnom55ov2siar3\)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,21,22;journal,163,375;linkingpublicationresults,1:101156,1](http://www.springerlink.com/(ovt0hfz0mttnom55ov2siar3)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,21,22;journal,163,375;linkingpublicationresults,1:101156,1)

**23. IBARLUZEA JM J, FERNANDEZ MF, SANTA-MARINA L, OLEA-SERRANO MF, RIVAS AM, AURREKOETXEA JJ, EXPOSITO J, LORENZO M, TORNE P, VILLALOBOS M, PEDRAZA V, SASCO AJ, OLEA N.** Breast cancer risk and the combined effect of environmental estrogens. Cancer Causes Control. 15(6): 591-600 (2004).

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=15280638&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=15280638&dopt=Abstract)

**24. KOBAYASKI M, NAGAYAMA T, TAKANO I, ITO M, TAMURA Y, TATEISHI Y, KIMURA N, KITAYAMA K, YASUDA K, SAITO K.** Survey of pesticide residues in baby foods (1996.4-1998.6). Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 42: 283-288 (2001)

**25. MADIGAN M., MARTINKO J., PARKER J.** Biología de los Microorganismos 8ª edición, Ed. Prentice Hall, España 1997

**26. MARTÍ LLORET JB, PRATS RICO D, MAS SELLES ME.** Contaminación por organoclorados en tejido adiposo humano. Primera jornada sobre hexaclorobenceno; 1988, mayo 23-24. libro de actas. Barcelona: promociones y publicaciones Universitarias (PPU), 141.147 (1990).

**27. MARTÍ J, ANTÓ JM, SANTAMARIA J, GRIMALT JO, OLEA N, PORTA M.** Documentos de la IV conferencia sobre disruptores endocrinos (Barcelona 26-27. 11. 1999) Quadern CAPS 29: 5-67 (2000).

[http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0213-91112002000300011](http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-91112002000300011)

**28. MARTÍNEZ E, ROMANOS A, PRAENA M, REPETTO M, MARTMEZ D.** Compuestos organoclorados: relación de niveles sanguíneos en madres y recién nacidos y en leche materna con parámetros maternos y de lactantes. Estudio en la provincia de Huelva. An. Esp. Pediatr. 38:493-8 (1993).

**29. Mc. BRIDE, M.** Environmental Chemistry of soils. Ed. Oxford University Press, New York, United States of America

**30. MENDOZA C., VESGA F.** Utilización de inoculantes microbianos para el mejoramiento de suelos contaminados por la extracción de carbón mineral. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Bucaramanga, Colombia 1999

**31. MUSCAT JE, BRITTON JA, DJORDJEVIC MV, CITRON ML, KEMENY M, BUSCH-DEVEREAUX E, PITTMAN B, STELLMAN SD.** Adipose concentrations of organochlorine compounds and breast cancer recurrence in Long Island, New York. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 12(12): 1474-1478 (2003).

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list\\_uids=11097233&query\\_hl=3&itool=pubmed\\_docsum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=11097233&query_hl=3&itool=pubmed_docsum)

**32. MONCALEANO R.** Manual de Prácticas para una Finca Ecológica “Tierra Viva”. Ed. Centrodibujo. Bucaramanga, Colombia 2004.

**33. OLEA N, FERNÁNDEZ MF, ARAQUE P, OLEA SERRANO F.** Perspectivas en disrupción endocrina. Gac Sanit. 16: 261-7 (2002).

[http://www.scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0213-91112002000300010&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-91112002000300010&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

**34. PAUWELS, A. COVACI, A., WEYLER, J. DELBEKE, L. DHONT, M. DE SUTTER, P. D’HOOGHE, T. SCHEPENS, P.J.** Comparison of persistent organic pollutant residues in serum and adipose tissue in a female population in Belgium, 1996-1998. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 39: 265-270 (2000).

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1241307>

**35. PETREAS M, SMITH D, HURLEY S, JEFFREY SS, GILLISS D, REYNOLDS P.** Distribution of persistent, lipid-soluble chemicals in breast and abdominal adipose tissues: lessons learned from a breast cancer study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13(3) :416-24 (2004).

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=15006918&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=15006918&dopt=Abstract)

**36. PORTA M, KOGEVINAS M, ZUMETA E, SUNYER J, RIBAS-FITO N, RUIZ L, JARIOD M, VIOQUE J, ALGUACIL J, MARTIN P, MALATS N, AYUDE D.** Concentrations of persistent toxic compounds in the Spanish population: a puzzle without pieces and the protection of public health. *Gac Sanit.*16(3): 257-266 2002).

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=12057183&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12057183&dopt=Abstract)

**37. QUINTANA J, MARTI I, VENTURA F.** Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC-MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results. *J Chromatogr. A.* 14;938 (1-2) :3-13 (2001).

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=11771844&dopt=Citation](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11771844&dopt=Citation)

**38. RAASCHOU-NIELSEN O, PAVUK M, LEBLANC A, DUMAS P, PHILIPPE WEBER J, OLSEN A, TJONNELAND A, OVERVAD K, OLSEN JH.** Adipose organochlorine concentrations and risk of breast cancer among postmenopausal Danish women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (1):67-74 (2005).

<http://cebp.aacrjournals.org/cgi/content/full/14/1/67>

**39. RIVAS A, FERNÁNDEZ MF, CERRILLO I, IBARLUZEA J, OLEA-SERRANO MF, PEDRAZA V, OLEA N.** Human exposure to endocrine disruptors: Standardisation of a marker of estrogenic exposure in adipose tissue. *APMIS* 109: 1-13 (2001).

<http://www.revistaecosistemas.net/pdfs/54.pdf>

**40. SALA M, SUNYCR J, HERRERO C, TO-FIGUERAS J, GRIMALT J.** Association between serum concentrations of hexachlorobenzene and polychlorobiphenyls with thyroid hormone and liver enzymes in a sample of the general population. *Occup. Environ. Mcd.*, 58: 172-177(2001).

**41. SCHINAS V, LEOTSINIDIS M, ALEXOPOULOS A, TSAPANOS V, KONDAKIS XG.** Organochlorine pesticide residues in human breast milk from southwest greece: associations with weekly food consumption patterns of mothers. Arch. Environ. Health, 55: 411-417 (2000).

<http://www.ehponline.org/members/2005/7940/7940.html>

**42. SMITH D.** Worldwide trends in DDT levels in human breast milk. Int. J Epidemiol. 28: 179-88 (1999).

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list\\_uids=10342677&query\\_hl=10&itool=pubmed\\_docsum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=10342677&query_hl=10&itool=pubmed_docsum)

**43. SORIA M.J., FERRERA-CERRATO R., ETCHEVERS J., ALCÁNTAR G., SANTOS J.T., BORGES L., PEREYDA G.** Producción de biofertilizantes mediante biodigestor de excreta líquida de cerdo. Revista Terra, Volumen 19, Número 4. México, 2001.

**44. STAINER R, INGRAHM J, WHEELIS M, PAINTER P.** Microbiología. Ed. Revesté S.A. Barcelona, España 1989.

**45. TSUKINO H, HANAOKA T, SASAKI H, MOTOYAMA H, HIROSHIMA M, TANAKA T, KABUTO M, NISKAR AS, RUBIN C, PATTERSON DG JR, TURNER W, NEEDHAM L, TSUGANE S.** Associations between serum levels of selected organochlorine compounds and endometriosis in infertile Japanese women. Environ Res. May 28 (2005).

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list\\_uids=15927178&query\\_hl=12&itool=pubmed\\_docsum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=15927178&query_hl=12&itool=pubmed_docsum)

**46. VAN'T VEER P, LOBBEZOO LE, MARTIN-MORENO JM, GUALLAR E, GOMEZ-ARACENA J, KARDINAAL AF, KOHLMEIER L, MARTIN BC, STRAIN JJ, THAMM M, VAN ZONEN P, BAUMANN BA, BUTTUNEN JK, KOK FJ.** DDT (dicophane) and postmenopausal breast cancer in Europe: case-control study. BMJ 315 (7100): 81-5 (1997).

**47. ZUMBADO M, GOETHALS M, ALVEREZ-LEON EE, LUZARDO OP, CABRERA F, SERRA-MAJEM L, DOMINGUEZ-BOADA L.** Inadvertent exposure to organochlorine pesticides DDT and derivatives in people from the Canary Islands (Spain). Sci Total Environ. 1;339(1-3): 49-62. (2005).