

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS EN CONSERVACIÓN DE
SUELOS Y AGUA



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE FUNGI Y BACTERIAS PRESENTES
EN ABONO ORGÁNICO BOCASHI EN EL DISTRITO DE DANIEL ALOMIAS
ROBLES - TINGO MARIA.

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERO EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES
MENCIÓN CONSERVACIÓN DE SUELOS Y AGUA

Presentado por

MARÍA GRIMANEZA RENGIFO ARVILDO

PROMOCIÓN 2008

Tingo María – Perú

2011

RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en el distrito de Daniel Alomía Robles - Pendencia Baja, en donde se elaboró el abono orgánico Bocashi (AOB) y en el Laboratorio de Microbiología General, de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS); ubicado en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región de Huánuco, para aislar e identificar bacterias, fungí y enumeración de microorganismos por gramo del AOB. Esta investigación determinó los principales géneros de bacteria y fúngicos presentes en el AOB. Para aislar bacterias y fungí se utilizó 10 g de la muestra del AOB (preparado con insumos de la zona), realizando diluciones seriadas para aislar bacterias en medio sólido M77 y fungí en medio rosa de bengala, para luego repicar las colonias aisladas y realizar la identificación de las bacterias por diferenciación bioquímica y fungí por micro cultivo (contrastación morfológica). Lográndose aislar e identificar cuatro géneros de fungí a partir de muestras de AOB, *Trichoderma* sp, *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp, *Rhizopus* sp, de ellos los dos últimos son géneros que presentan capacidad patogénica capaces de afectar a los vegetales y se aisló e identificó dos géneros de bacterias gram negativas *Pseudomonas* sp, *Rhizobium* sp. El número promedio de microorganismos presentes en el abono orgánico Bocashi por muestra está en un rango de $7,666 \times 10^4$ a $10,573 \times 10^4$ m.o/ g. AOB. Demostrando así que el AOB posee una carga microbiana alta típica de un suelo fértil y géneros de bacterias y fungí que participan activamente en el proceso de mineralización de la materia orgánica y en la absorción de nutrientes a través de simbiosis.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Fungís y bacterias.....	43
2. Microorganismos por gramo de abono orgánico Bocashi.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Colonia de <i>Trichoderma sp</i> en medio agar rosa de bengala	33
2. Hifas y esporangios de <i>Trichoderma sp</i> observados a 400 X.....	33
3. Colonias de <i>Aspergillus sp</i> en medio rosa de bengala	35
4. <i>Aspergillus sp</i> observado a 400 X.....	35
5. Colonias de <i>Fusarium sp</i> en medio rosa de bengala.....	37
6. Hifas y esporangios de <i>fusarium sp</i> observados a 400 X.....	37
7. Colonias de <i>Rhizopus sp</i> en medio rosa de bengala.....	38
8. <i>Rhizopus sp</i> observados a 400 X.....	39
9. Colonias de <i>Pseudomonas sp</i> en medio M77	40
10. <i>Pseudomonas sp</i> observados a 1000 X.....	41
11. Colonias de <i>Rhizobium sp</i> en medio M77	42
12. Bacterias del género <i>Rhizobium spa</i> 1000 X.....	42
13. Colonias de microorganismos del abono orgánico Bocashi.....	44

AGRADECIMIENTOS

- A DIOS, por guiarme e iluminarme cada instante de mi vida en la culminación de mi carrera profesional.
- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, por haberme forjado como profesional.
- A mis profesores de la Facultad de Recursos Naturales Renovables, por sus consejos y enseñanzas impartidas.
- Dr. Cesar S. López López por permitirme haber realizado el trabajo de investigación en el laboratorio de Microbiología General.
- A los jurados de tesis: Ing. Jaime Torres García, Ing. M.Sc. Ladislao Ruiz Rengifo, Blgo.M.Sc. Edilberto Chuquilin Bustamante por sus oportunas sugerencias.
- Al Ing. Nelino Florida Rofner, por su valioso apoyo como asesor del trabajo de investigación.
- Al Ing. Richard Sias Rodríguez, por su valioso apoyo en el laboratorio de microbiología general y contribuir en el trabajo de investigación.
- Al Ing. Juan Pablo Trigozo Rengifo, por sus oportunas correcciones.
- Al Tec. Michel Abendaño Rubio, por su valioso apoyo en el laboratorio de fitopatología.
- Al señor José Gonzales Torres, dueño del fundo San José, por brindarme la facilidad en la preparación del abono orgánico.

- Al Bach. Daniel Ríos, Marlon Mas, Carlos Tello, Ángel Agüero, por su valiosa colaboración en el trabajo de investigación.
- A todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron en la realización del presente trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A mis padres, Linder y Yolanda, con el amor y cariño de siempre, mi eterno agradecimiento por los esfuerzos, sacrificios y por su gran apoyo incondicional moral y abnegado que hicieron posible mi formación profesional.

A mis hermanos: Carmen, Saúl y Alejandro (Q.P.D.G), por su confianza, comprensión y cariño que siempre me han demostrado.

A mis sobrinos: Ángela Alexandra, José Manuel, Alexandra Xiomara, Jesús Alejandro, Carlos y Elías, con el cariño de siempre.

ÍNDICE

Página

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivos.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Abono orgánico Bocashi.....	3
2.2. Los abonos orgánicos fermentados.....	4
2.3. Origen de los microorganismos eficientes.....	4
2.4. Microorganismos del suelo.....	6
2.4.1. Población microbiana del suelo.....	6
2.4.2. Importancia de los microorganismos del suelo.....	6
2.4.3. Microorganismos del suelo: Bacterias.....	8
2.4.3.1. Tipos de bacterias encontradas en el suelo.....	9
2.4.3.2. Bacterias autóctonas (actinomicetos).....	9
2.4.3.3. Bacterias fijadoras de nitrógeno.....	10
2.4.4. Microorganismos del suelo: Hongos.....	10
2.4.4.1. Hongos como agente de descomposición.....	11
2.4.5. Clasificación de hongos.....	11
2.4.5.1. División Oomycota (Oomicetes).....	11
2.4.5.2. División Chytridiomycota (Quítridos).....	12
2.4.5.3. División Zygomycota (Zigomicetes).....	12
2.4.5.4. División Ascomycota (Ascomicetes).....	12
2.4.5.5. División Basidiomycota (Basidiomicetes).....	13

2.4.5.6. División Deuteromycota (Hongos imperfectos)	13
2.5. Hongos totales por dilución en placas.....	14
2.6. Enumeración de microorganismos: el número más probable (NMP)..	14
2.7. Bacterias encontradas en el abono orgánico Bocashi.....	15
2.7.1. Pseudomonas:	15
2.7.2. Rhizobium	17
2.8. Fungis encontrados en el abono orgánico Bocashi.....	18
2.8.1. Rhizopus	18
2.8.2. Aspergillus.....	20
2.8.3. Trichoderma	21
2.8.4. Fusarium	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1. Lugar de ejecución.....	25
3.2. Características climatológicas.....	25
3.3. Materiales y equipos	25
3.3.1. Preparación del Bocashi.....	25
3.3.1.1. Insumos	25
3.3.2. Aislamiento e identificación	26
3.3.2.1. Insumos y reactivos.....	26
3.3.3. Equipos materiales de campo y laboratorio	26
3.3.3.1. Equipos.....	26
3.3.3.2. Materiales	26
3.4. Metodología	26
3.3.3.3. Preparación del Bocashi.....	26

3.3.3.4. Aislamiento de fungí y bacterias.....	27
3.3.3.5. Identificación de bacterias y fungí	28
IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1. Aislamiento e identificación de fungí en abono orgánico Bocashi.....	32
4.2. Aislamiento e Identificación de bacterias	32
4.3. Identificación de fungí y bacterias.....	39
4.4. Enumeración de microorganismos viables	44
V.CONCLUSIONES	46
VI.RECOMENDACIONES.....	47
VII. ABSTRACT	48
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
IX. ANEXOS	53

I. INTRODUCCIÓN

En la agricultura el uso de abonos e insumos químicos, no permitió obtener los resultados esperados en la producción de alimentos de calidad, generando al suelo la pérdida de su capacidad productiva causando alteraciones en sus propiedades físicas, químicas y biológicas y en muchos casos la contaminación del recurso suelo afecta principalmente al componente biológico.

En nuestra provincia y en el resto del país actualmente se viene utilizando el Bocashi (término de origen japonés que fue implementada por primera vez hace 30 años en Japón), el cual es la mezcla de la materia orgánica fermentada, económico y de fácil preparación. El principal objetivo del uso del Bocashi es mejorar las características físicas (porosidad, mayor capacidad de retención del agua y reducción de la erosión) y propiedades químicas (menor pérdida y mayor disponibilidad de nutrientes) y biológicas del suelo (mejor equilibrio biológico y disminución de plagas y enfermedades), resultando todo esto en la obtención de una producción agrícola de bajo costo, más saludable para el productor y el consumidor y que no afecta al medio ambiente.

Además de proporcionar nutrientes, el Bocashi contribuye a mejorar el suelo bioaumentando y activando microorganismos que actúan promoviendo la fermentación de la biomasa proporcionando rápidamente condiciones favorables para la actividad de otros microorganismos benéficos para el suelo y las plantas (hongos que forman micorrizas, bacterias y actinomicetos fijadores de nitrógeno y otros) que permiten la disponibilidad de nutrientes para el suelo, etc. En tal sentido se logró contrastar la hipótesis. Para ello se trabajó con los siguientes objetivos:

1.1. Objetivos

1.1.1. General

- Aislar e identificar fungí y bacterias presentes en el abono orgánico Bocashi en el distrito de Daniel Alomia Robles –Tingo María.

1.1.2. Específicos

- Aislar fungí y bacterias que están presentes en el abono orgánico Bocashi.
- Identificar fungí y bacterias aislados de muestra abono orgánico Bocashi.
- Determinar el número de microorganismos por gramo presentes en el abono orgánico Bocashi.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Abono orgánico Bocashi

Es un biofertilizante de origen japonés, del que deriva su nombre “bo-ca-shi”, que significa fermentación. En la antigüedad los japoneses utilizaban sus propios excrementos para elaborarlo y abonar sus arrozales. Se trata de un abono orgánico fermentado; parcialmente estable, de económico y fácil preparación.

Tradicionalmente, para la preparación del Bocashi, los agricultores japoneses usan materia orgánica como semolina de arroz, torta de soya, harina de pescado y suelo de los bosques como inoculante de microorganismos. Estos suelos contienen varios microorganismos benéficos que aceleran la preparación del abono. El Bocashi ha sido utilizado como un mejorador del suelo que aumenta la diversidad microbiana, mejora las condiciones físicas y químicas, previene enfermedades del suelo y lo sule de nutrientes para el desarrollo de los cultivos (GIL *et al.*, 2006).

Bondades del Bocashi:

- Es un abono de fácil preparación.
- Causa menos daño que el uso directo de otros abonos.
- Contribuye a mejorar el suelo activando microorganismos.

- Puede ser elaborado fácilmente por cualquier agricultor, en la cantidad necesaria y utiliza el material que está disponible en la zona.
- Constituye una fuente de nutrientes para las plantas.
- Aumenta el contenido de la materia orgánica en el suelo, mejorando la retención de agua.
- Representa una alternativa más económica que el uso de otros.

La palabra Bocashi es del idioma japonés y para el caso de la elaboración de los abonos orgánicos fermentados, significa cocer al vapor los materiales del abono, aprovechando el calor que se genera con la fermentación aeróbica de los mismos (RESTREPO, 1996).

2.2. Los abonos orgánicos fermentados

La elaboración de los abonos orgánicos fermentados se puede entender como un proceso de semi-descomposición aeróbica (con presencia de oxígeno) de residuos orgánicos por medio de poblaciones de microorganismos, que existen en los propios residuos, con condiciones controladas, y que producen un material parcialmente estable de lenta descomposición en condiciones favorables y que son capaces de fertilizar a las plantas y al mismo tiempo nutrir la tierra (RESTREPO, 1996).

2.3. Origen de los microorganismos eficientes

La tecnología en microorganismos eficaces fue desarrollada en Japón, por los años ochenta por el Doctor Teruo Higa, Ph.D, profesor de

Horticultura de la universidad de Ryukyus en Okinawa. Japón, como una opción viable y sostenible para la producción agrícola y animal dentro de los parámetros orgánicos y biológicos que procuran un manejo razonable de los recursos para no afectar al medio ambiente, así como para lograr productos de alta calidad con bajo costo (MASAKI *et al.*, 2000).

La base tecnológica de EM es la mezcla de diferentes tipos de microorganismos todos ellos benéficos que poseen propiedades de fermentación, producción de sustancias bioactivas, competencia y antagonismo con patógenos, lo cual ayuda a mantener un equilibrio natural entre los microorganismos que conviven en el entorno, trayendo efectos positivos sobre la salud y bienestar del ecosistema (MASAKI *et al.*, 2000).

Los microorganismos eficaces son una mezcla de bacterias fotosintéticas, bacterias ácido lácticas y levaduras en concentraciones mayores a 100 unidades formadoras de colonias por mililitro de solución que se encuentra en estado de latencia y se conocen como EM-1.

2.4. Microorganismos en el proceso de compostaje

URIBE (2003) indica que los grupos más importantes de microorganismos presentes en los abonos orgánicos son las bacterias, hongos y actinomicetes. Y los grupos comprenden tanto especies mesofílicas como termofílicas.

2.5. Microorganismos del suelo

Los microorganismos del suelo juegan un papel importante manteniendo la fertilidad de los suelos, mineralización, elementos esenciales para el crecimiento, tales como oxígeno, nitrógeno, carbón, azufre y fósforo, son reciclados por microorganismos del suelo. La mayoría de los microorganismos que viven en el suelo juegan un papel indispensable en el mantenimiento de la vida sobre este planeta. El suelo contiene una gran variedad de microorganismos (ANDERSON e INGRAM, 1993).

2.5.1. Población microbiana del suelo

La mayoría de los suelos contienen entre 10^8 y 10^{10} microorganismos por gramo de suelo (MADIGAN *et al.*, 2004). Las bacterias son los microorganismos más numerosos en los suelos que pueden llegar hasta 10^8 individuos por gramo de suelo y pueden estar representados por más de 10^4 a 10^6 especies diferentes. Los actinomicetos y los hongos son los siguientes grupos más abundantes, que pueden llegar entre 10^6 y 10^7 individuos por gramo de suelo representados por más de 10^6 especies diferentes (SYLVIA *et al.*, 1999).

2.5.2. Importancia de los microorganismos del suelo

Los microorganismos del suelo, son los componentes más importantes de este. Constituyen su parte viva y son los responsables de la dinámica de transformación y desarrollo. En un solo gramo de tierra, encontramos millones de microorganismos beneficiosos para los cultivos. Estos microorganismos beneficiosos que se encuentran en el suelo, son bacterias,

actinomicetos, fungí, algas y protozoarios. Un suelo fértil es aquel que contiene una reserva adecuada de elementos nutritivos disponibles para la planta, o una población microbiana que libere nutrientes que permitan un buen desarrollo vegetal (GERMIDA, 1993).

2.5.2.1. Microorganismos viables

Los ambientes capaces de albergar vida microbiana reflejan el amplio espectro de la evolución de estos organismos. Se han encontrado especies que viven a temperaturas comprendidas entre el punto de congelación y el punto de ebullición del agua, en agua salada y en agua dulce, en presencia y en ausencia de aire. Algunos han desarrollado ciclos de vida que incluyen una fase de latencia en respuesta a la falta de nutrientes. Los microorganismos se hallan capacitados para acometer una extensa gama de reacciones metabólicas y adaptarse a diferentes ambientes (MADIGAN *et al.*, 2004).

Existen varias clases de microorganismos: fungí, tipo levaduras, bacterias, arqueobacterias, actinomicetos, protozoos, algas, virus. El suelo es uno de los ambientes donde un conjunto ingobernable de microorganismos compiten entre sí para obtener lo que todos ellos necesitan: Nutrientes y energía. Al mismo tiempo, los productos de su metabolismo alteran la composición química del suelo donde habitan. Más aún, los propios microorganismos evolucionan en respuesta a la presión del ambiente (FENCHEL *et al.*, 2000).

2.5.3. Microorganismos del suelo: Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares de un tamaño del orden de la micra. Su número, en los diversos suelos, es muy variable pero en los suelos cultivados supera con mucho al de los otros seres vivos. En un gramo de suelo se ha calculado que viven de unos pocos centenares de millares a algunas decenas de millones de unidades y su actividad metabólica es tan grande que pueden desprender en una hora, a través del proceso respiratorio, varios kilos de dióxido de carbono por hectárea. No están uniformemente distribuidas a lo largo del perfil edáfico y con frecuencia incluso en el mismo horizonte, existen zonas de hacinamiento junto a otras escasamente pobladas (MADIGAN *et al.*, 2004).

La determinación del número de bacterias viables en el suelo es un arduo problema, primero por encontrar un medio en el que crezcan todas al mismo tiempo, que no existe, y segundo porque las bacterias crecen en el suelo como colonias que si no se desintegran antes del recuento, proporcionan un número muy bajo (SCHLEGELI, 1993).

Las bacterias se pueden dividir en dos grandes grupos con respecto a su nutrición: autótrofas y heterótrofas; las primeras utilizan como fuente de carbono al dióxido de carbono y como fuente de nitrógeno a los nitratos y a los compuestos de amonio; las heterótrofas, que representan la gran mayoría, extraen ambos elementos del material orgánico existente en el suelo (SCHLEGELI, 1993).

2.5.3.1. Tipos de bacterias encontradas en el suelo

- **Pseudomonas:** Metabolizan un amplio intervalo de compuestos incluyendo los pesticidas y los hidrocarburos.

- **Nitrosomonas:** Aerobios, pocas exigencias en pH y temperatura. Acción óptima entre 30 y 35 °C (mesófilos). Participa en la nitratación.

- **Nitrobacter:** Sólo son capaces de extraer energía de la oxidación de los nitritos a nitratos y son los responsables de la Nitratación.

- **Clostridium:** Anaerobios, pueden producir reducciones del C-orgánico a metano. Algunos son patógenos para el hombre, por ejemplo *C. tetani*, que producen el tétanos. Y otros pueden fijar nitrógeno atmosférico.

- **Cianobacterias:** (anteriormente conocidas como algas verde - azuladas), viven en o cerca de la superficie del suelo, al precisar luz para la fotosíntesis. Prefieren medios neutros o básicos y con un buen contenido de humedad. Los géneros *Nostoc* y *Anabaena* pueden fijar el N-atmosférico e incorporarlo a los aminoácidos (ALEXANDER, 1998).

2.5.3.2. Bacterias autóctonas (actinomicetos)

Los actinomicetos son organismos procarióticos que forman un grupo importante de bacterias con hifas productoras de micelios y por su morfología miceliar recuerdan a los hongos, pero son más próximos a las bacterias ya que carecen de membrana nuclear y por poseer hifas cuyo diámetro es mucho menor que cualquier tipo de hongo, no poseen pigmentos fotosintéticos, por lo que no fotosintetizan y son saprofitos, por lo que su

densidad poblacional tiene una relación directamente proporcional a la cantidad de materia orgánica presente en el perfil del suelo (SYLVIA *et al.*, 1999).

2.5.3.3. Bacterias fijadoras de nitrógeno

Las bacterias fijadoras de nitrógeno que se desarrollan de forma natural en el suelo, se conocen desde hace más de un siglo. Representan un biofertilizante ecológico y se dividen en dos grandes grupos: Las simbióticas, específicas de las leguminosas, como el *Rhizobium*, y las libres, que viven en el suelo y no necesitan la planta para su reproducción, como el *Azotobacter* y el *Azospirillum*, entre los más importantes en agricultura (SAWADA *et al.*, 2003).

2.5.4. Microorganismos del suelo: Fungí

Los fungí realizan servicios importantes vinculados a la mecánica del agua, el ciclaje de nutrientes y la supresión de enfermedades, conjuntamente con las bacterias, los fungí son importantes como descomponedores en la red alimentaria del suelo. Convierten materia orgánica difícil de digerir en formas que otros organismos pueden utilizar. Las hifas fungales efectúan la unión física de partículas de suelo creando agregados estables que ayudan a aumentar la infiltración del agua y la capacidad del suelo para retener el agua (SCHLEGELI, 1993).

En suelos bien aireados y cultivados, los fungí llegan a constituir la mayor parte del protoplasma de la microflora total, debido no a su mayor número, sino a su mayor diámetro y extensión de sus hifas. Dominan sobre

todo, en las capas orgánicas de los bosques y en los ambientes ácidos (SCHLEGELI, 1993).

2.5.4.1. Fungí como agente de descomposición

Los fungí son los principales agentes de descomposición de la materia orgánica en todos los ambientes ácidos, poseen una red de filamentos o hifas en el suelo y su micelio puede subdividirse en células individuales por medio de paredes transversales o septos. Los micelios se pueden observar fácilmente en los humus tipo mor y moder. Una de las principales actividades de los fungí es la descomposición de la celulosa, hemicelulosa, pectinas, almidón, grasas y compuestos de lignina, participan en la formación del humus y contribuyen al reciclaje de nutrientes y a la estabilidad de agregados mediante la degradación de residuos vegetales y animales (BAATH, 2000).

2.5.5. Clasificación de fungí

2.5.5.1. División Oomycota (Oomicetes)

La división Oomicetes se compone de fungí que se parecen a las algas. Abarca desde organismos unicelulares hasta complejas masas de hifas que no están tabicadas por septos (micelios no septados). Además de producir oosporas, los oomicetes forman zoosporas que se mueven por medio de dos flagelos. Se incluyen en la división los mohos acuáticos, las royas blancas y los mildíus vellosos. La mayoría de los mohos acuáticos viven sobre materia orgánica muerta, aunque *Saprolegnia parasítica*, parásita peces vivos. Las royas blancas y los mildíus vellosos, pertenecientes al orden Peronosporales,

son parásitos de plantas. En algunos mildíus vellosos, por ejemplo en los géneros *Phytophthora* y *Peronospora*, los receptáculos que contienen las zoosporas pueden estar modificados; en ese caso, los receptáculos se parecen a los conidios y funcionan como tales.

2.5.5.2. División Chytridiomycota (Quítridos)

Los quitridiomicetes son considerados parientes cercanos de los oomicetes. En algunos sistemas de clasificación se colocan entre los protistas, en lugar de entre los fungí.

2.5.5.3. División Zygomycota (Zigomicetes)

Se caracterizan por formar zigosporas con gruesas paredes, de origen sexual y esporangiosporas no nadadoras, de origen asexual. El moho negro del pan (*Rhizopusnigricans*), produce masas de hifas sobre pan, fruta y otros alimentos envejecidos. Otros son parásitos de las moscas y de otros insectos. Tienen esporangiosporas sencillas dentro de unos receptáculos; en el interior de cada uno de estos receptáculos se desarrollan unas estructuras que llegan a independizarse y funcionar como conidios. Esta división también comprende fungí parásitos de amebas, nematodos y artrópodos.

2.5.5.4. División Ascomycota (Ascomicetes)

También llamados fungí con forma de saco, producen un número determinado de ascosporas en el interior de unas bolsas semejantes a vesículas, denominadas ascas. Con la excepción de algunas levaduras y otros

pocos organismos, los ascomicetes tienen hifas bien desarrolladas, por lo general con un único núcleo en cada hifa. Ciertas células se transforman en binucleadas poco antes de la formación de los sacos esporales. La unión de los núcleos se da en las ascas jóvenes; tras la posterior división, suelen producirse ocho núcleos, los cuales darán lugar a las ascosporas. Algunos ascomicetes tienen sólo una ascospora; otros pueden tener varios cientos (MAHON y MANUSELIS, 1995).

2.5.5.5. División Basidiomycota (Basidiomicetes)

La división Basidiomicetes comprende numerosos y variados tipos de fungí, cuyas estructuras reproductoras son basidios que se localizan en las puntas de las hifas, sobre unos salientes con forma de tallo. Lo normal es que, en cada basidio, se formen cuatro basidiosporas. Los basidios pueden ser con forma de maza, cilíndricos u ovals.

2.5.5.6. División Deuteromycota (Fungí imperfectos)

Son fungí sin ciclos sexuales conocidos. Entre sus miembros se encuentran parásitos que enferman a las plantas y animales. Las enfermedades humanas más comunes causadas por este grupo son infecciones de la piel y de las membranas mucosas. Algunos revisten importancia económica porque se emplean para producir ciertos quesos y antibióticos (penicilina) (MAHON y MANUSELIS, 1995).

2.6. Fungí totales por dilución en placas

Los fungí tienen hábitats muy diversos; sin embargo, la mayoría son terrestres y habitan en el suelo, desempeñando una actividad importante en la mineralización del carbono orgánico. Cuando se compara fungí con las bacterias, en general, estos tienen requerimientos nutricionales muy simples, pero su desarrollo es más lento, por lo que requieren mayor tiempo de incubación para su cultivo. En el aislamiento, cultivo y cuenta de la mayoría de los fungí se aprovechan ciertas características especiales de ellos, como su tolerancia a pH ácido y su preferencia por medios de cultivo con gran cantidad de azúcar fácilmente degradable. Además, su resistencia a la penicilina y estreptomicina permite usar estos antibióticos, los que al ser agregados a los medios de cultivo reducen el número de bacterias contaminantes. En la preparación de los medios de cultivo para fungí con frecuencia se prefiere usar mezclas de vegetales (agar-papa, agar-harina de maíz, etc) y otras sustancias naturales (RAMÍREZ *et al.*, 1992).

2.7. Enumeración de microorganismos: El número más probable (NMP)

Una estrategia eficiente de estimación de densidades poblacionales especialmente cuando una evaluación, cuantitativa de células individuales no es factible. La técnica se basa en la determinación de presencia o ausencia (pos o neg) en réplicas de diluciones consecutivas de atributos particulares de microorganismos presentes en muestras de suelo u otros ambientes. Por lo tanto, un requisito importante de este método es la necesidad de poder reconocer un atributo particular de la población (es) en el medio de

crecimiento a utilizarse, el estimado de densidad poblacional se obtiene del patrón de ocurrencia de ese atributo en diluciones y el uso de unas tablas.

Algunas de las ventajas del NMP son la capacidad de estimar tamaños poblacionales basados en atributos relacionados a un proceso (selectividad) por ejemplo se puede determinar la densidad poblacional de organismos que pueden nodular leguminosas en una muestra de suelo usando el método de infección de plantas; provee una recuperación uniforme de las poblaciones microbianas de suelos diversificados; determina sólo organismos vivos y activos metabólicamente, y suele ser más rápido e igual de confiable que los métodos tradicionales de esparcimiento en platos de cultivo, entre otros. En este ejercicio, se utilizará una variante de esta metodología para estimar la densidad total de bacterias presentes en una muestra. El atributo particular a utilizarse será la capacidad de microorganismos a formar colonias en medios sólidos de crecimiento (WONMACK y COLWELL, 2000).

2.8. Bacterias encontradas en el abono orgánico Bocashi

2.8.1. Pseudomonas:

Pertenece al reino de las bacterias del filo proteo bacteria, clase Gammaproteo bacteria, la orden Pseudomonadales, familia Pseudomonadaceae, género *Pseudomonas*. Metabolizan un amplio intervalo de compuestos incluyendo los pesticidas y los hidrocarburos. El más conocido es la *P. putida* (ALEXANDER, 1998).

Las bacterias gram negativas están representadas principalmente por el género *Pseudomonas* que coloniza una gran variedad de microambientes debido a su versatilidad nutricional. A pesar de su número no excesivamente alto tienen importancia ecológica (SAWADA *et al.*, 2003).

Las *Pseudomonas* son bacilos gram negativos, dotados de motilidad y aerobios, algunos de los cuales producen pigmentos hidrosolubles, se distribuyen ampliamente en el suelo, agua, plantas y animales. La capacidad para producir pigmentos como pioverdina (fluoresceína) y piocianina es una característica importante para la identificación de especies de *Pseudomonas*, algunas de ellas elaboran sólo fluoresceína (ej. *Ps. fluorescens*) y otras ambos pigmentos (ej. *Ps. aeruginosa*). La piocianina solamente es producida por *Ps. aeruginosa* aunque no todas las cepas de esta especie la producen. Algunas cepas producen pigmentos rojo oscuro piorrubinao el pigmento negro piomelanina (JAWETZ *et al.*, 2002).

Las *Pseudomonas* pueden crecer en un medio mineral con iones de amonio o nitrato y un solo compuesto orgánico que funciona como única fuente de carbono y energía. La ganancia energética es obtenida por respiración aeróbica, no por fermentación y su crecimiento es rápido.

Abundan en la superficie de las raíces, ya que son versátiles en su metabolismo y pueden utilizar varios sustratos producidos por las mismas, pero no establecen una relación simbiótica con la planta. *Pseudomonas* en general pertenecen a un grupo llamado “estimuladores del crecimiento vegetal

que poseen la propiedad de producir estas sustancias, cuyas principales ventajas son las de estimular la germinación de las semillas, acelerar el crecimiento de las plantas especialmente en sus primeros estadios, inducir la iniciación radicular e incrementar la formación de raíces y pelos radiculares. Las principales sustancias estimuladoras producidas son de tipo hormonal como auxinas, giberelinas y citoquininas, pero también producen sustancias de otro tipo como aminoácidos y promotores específicos del crecimiento. Estos efectos se dan siempre que sea adecuada la concentración de organismos en el sistema radicular y en el suelo haya suficiente cantidad de materia orgánica (BUCHANAN y GIBBONS, 1990).

2.8.2. Rhizobium

Pertenece al dominio de las bacterias, del filo Proteobacteria, clase Proteobacteria alfa, orden Rhizobiales, familia Rhizobiaceae, género *Rhizobium*, la especie *Rhizobium* sp (ALEXANDER, 1998).

Es un género de bacterias gram negativas de perfil desuelo que fijan nitrógeno atmosférico. Pertenece a un grupo de bacterias fijadoras de nitrógeno que se denominan colectivamente rizobio, viven en simbiosis con determinadas plantas formando nódulos en la raíz, a las que aportan nitrógeno necesario para que la planta viva y está a cambio le da cobijo (SAWADA *et al.*, 2003).

Una de las interacciones más interesantes y destacadas entre bacterias y plantas son la que se dan entre las leguminosas y las bacterias gram negativas fijadoras de nitrógeno. Las leguminosas son un grupo amplio que incluye plantas de importancia económica como trébol, frejol, soya. La asociación *Rhizobium* – leguminosas constituye una autentica simbiosis, ya que claramente hay una participación de cada miembro. La fijación de nitrógeno beneficia a la planta que crece en suelos pobres en ese elemento, mientras que para los rhizobios el nódulo es un ambiente que protege y nutre, (MADIGAN *et al.*, 2004).

2.9. Fungí encontrados en el abono orgánico Bocashi

2.9.1. Rhizopus

Pertenece al reino Fungí, de la división Zygomycota, la clase Zygomycetes, orden Mucorales, familia Mucoraciae, del género *Rhizopus*. Es un género de mohos que incluyen especies cosmopolitas de hongos filamentosos hallados en el suelo, degradando frutos y vegetales, heces animales, y residuos. *Rhizopus* de la familia de las Mucoraceae, ampliamente usado como arrancador para la producción casera de tempeh. Las esporas producen un micelio blanquecino, esponjoso, uniendo a los granos de soja y creando una "torta" comestible de granos de soja parcialmente fermentados (COOK y BAKER, 1989).

Las especies de *Rhizopus* producen esporas asexuales y sexuales. Los esporangiosporos asexuales se producen dentro de una estructura

aguzada, el esporangio, son genéticamente idénticos a su padre. En *Rhizopus*, el esporangio es soportado por una gran columela apofisada, y el esporangióforo asoma entre rizpodes distintivos. Cigosporos negros se producen después de dos fusiones compatibles de micelios durante la reproducción sexual. Y hacen colonias que pueden ser genéticamente diferentes de sus padres.

En la identificación de fungí encontramos fungí no benéficos que se encuentran en el suelo alrededor del mundo y afecta muchas especies vegetales y animales y es difícil de controlar. Existe una gran diversidad de cepas de *Fusarium* sp, de las cuales algunas son patogénicas y su gran mayoría son saprófitas pueden ser utilizadas como controladores biológicos. (COOK y BAKER, 1989).

La mayoría de las especies son saprofitas y son unos miembros relativamente abundantes de la microbiota del suelo. Las esporas del fungí son fácilmente reconocibles al microscopio por su forma de media luna o de canoa. Son patógenos facultativos, capaces de sobrevivir en el agua y suelo alimentándose de materiales en descomposición. Son importantes agentes de contaminación en los laboratorios de microbiología (WHO, 1999).

Se encuentra con frecuencia en suelos con arena, en el compost, en el polvo de las casas, en la pulpa de la madera, estiércol, panales de abejas, nidos y plumas de aves y en diferentes frutos y semillas. Las esporas de estos hongos no son abundantes en el aire libre, aunque su frecuencia

aumenta en lugares donde hay humedad y se acumula vegetación muerta (CASAS, 1989).

2.9.2. *Aspergillus*

Pertenecientes al reino fungí, al filo Ascomycota, de la clase Eurotiomycetes, orden Eurotiales, familia Trichocomaceae, del género *Aspergillus*.

El *Aspergillus* es un género de alrededor de 200 fungí (mohos), y es ubicuo. Los fungí se pueden clasificar en dos formas morfológicas básicas: las levaduras y las hifas. El *Aspergillus* es un fungí filamentosos (compuesto de cadenas de células, llamadas hifas), el tipo de fungí opuesto a las levaduras, éstas últimas compuestas de una sola célula redondeada. El hábitat natural del *Aspergillus* son el heno y el compostaje.

La estructura microscópica del *Aspergillus* es única. Tienen hifas tabiculares y conidióforas cuya cabeza está localizada en el extremo de una hifa compuesta por una vesícula rodeada por una corona de fiálides en forma de botella directamente insertadas sobre la vesícula, de las fiálides se desprenden las esporas (conidios). Otras estructuras se encuentran en ciertas especies y no en otras, por ejemplo, las células de Hüle (COOK y BAKER, 1989).

El género *Aspergillus* ocupa el ámbito terrestre desde hace 450 millones de años y utiliza el aire para la dispersión de sus esporas, los *Aspergillus*, son elementos clave en la formación y mantenimiento de los

ecosistemas edáficos, por su extraordinaria capacidad y versatilidad para degradar (DE HOOG y GUARRO, 1995).

Existe escasa información en la literatura sobre el hecho de que las macromoléculas extracelulares son capaces de penetrar a través de las paredes de las células de las raíces hacia los tejidos de éstas, los resultados experimentales admiten dos explicaciones: La primera es que el incremento en la actividad de la amilasa en el suelo induce un aumento de la amilasa del árbol. La segunda, que la amilasa del *Aspergillus* penetra desde la solución del suelo en el sistema de transporte de agua de la planta, y es transportada hacia las partes superiores del árbol. La aparición de amilasa en las agujas y hojas es registrada por PAGE y la decoloración, con el fin de excluir la posibilidad de una inducción de la enzima genética de amilasa por una alta actividad de amilasa en el suelo, la amilasa de *Aspergillus* fue etiquetada con la tinta fluorescente inisothiocyanat (FITC). El *Aspergillus* sp., es un fungí termo tolerante, lo cual interviene en la regulación de poblaciones patógenas a través de la producción de antibióticos (DE HOOG y GUARRO, 1995).

2.9.3. Trichoderma

Pertenece al reino fungí, división Ascomycota, la sub división Pezizomycotina, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales, familia Hypocreaceae, del género *Trichoderma*. El *Trichoderma* es el enemigo natural de muchas enfermedades entre ellas, las que pertenecen a los géneros *Rhizoctonia*, *Mucor*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Botrytis*,

Colletotrichum, y muchos géneros más; además ayuda a reducir la incidencia de nematodos. La particularidad de las cepas de *Trichoderma* es que están potencializadas para el control de patógenos resistentes a los fungicidas de uso común (CERVANTES, 2008).

Trichoderma es un fungí de gran importancia a nivel agrícola gracias a las diversas ventajas que ofrece como agente de control biológico, para la protección de plantas frente al ataque de fitopatógenos causantes de enfermedades de importancia económica, como es el caso de los cultivos hortícolas (BASTOS, 1996).

Algunas especies del género *Trichoderma* son muy comunes en diversos suelos, principalmente en suelos ácidos y ricos en materia orgánica. Estas especies son fáciles de aislar, de cultivar y de propagar en diversos sustratos y la mayoría presentan un buen micoparasitismo (BENÍTEZ *et al.*, 2004).

Las especies de *Trichoderma* han sido investigadas como agentes de control biológico de enfermedades fúngicas por cerca de 70 años (COOK y BAKER, 1989), pero es solo recientemente que las cepas han comenzado a ser comercialmente aprovechables. El éxito de las cepas de *Trichoderma* es debido a su alta capacidad reproductiva, habilidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes, capacidad para modificar la rizósfera, *Trichoderma sp.* Es un fungí que sobrevive al calor solar y posee mecanismos de antibiosis, competencia,

micoparasitismo e hidrólisis enzimática, los cuales son útiles en actividades de control biológico. Es un fungí que posee acción enzimática a través de las quitinasas, las cuales degradan quitina, componente presente en los huevos de los nematodos (BASTOS, 1996).

2.9.4. Fusarium

Perteneciente a la división Ascomycota, la clase Euascomycetes, orden Hypocreales, familia Hypocreaceae, género *Fusarium*.

Es un fungí que se encuentra en el suelo alrededor del mundo y afecta muchas especies vegetales y animales y es difícil de controlar. Existe una gran diversidad de cepas de *Fusarium* sp, de las cuales algunas son patogénicas y su gran mayoría son saprófitas pueden ser utilizadas como controladores biológicos (COOK y BAKER, 1989).

De las especies más importantes económicamente tenemos a *Fusarium oxysporum* que ataca a un sin número de cultivos de clima templado y tropical incluyendo café. La fusariosis o marchitez vascular es la principal enfermedad causada por este patógeno (GONSALVEZ y FERREIRA, 2001). La fusariosis o marchitez Vascular del cafeto "Rootrot", produce una desintegración o pudrición de parte o todo el sistema radicular de la planta (AGRIOS, 1988). La fusariosis ha sido reportada en semilleros y viveros de café causando daño irreversible que puede causar pérdidas de plantas hasta el

50% (PROCAFE, 1997). Cuando los daños son severos *Fusarium oxysporum* puede destruir el sistema radical en más de 90% (TRONCONI *et al.*, 1997).

Fusarium es un extenso género de fungí filamentosos ampliamente distribuido en el suelo y en asociación con plantas. La mayoría de las especies son saprofitas y son unos miembros relativamente abundantes de la microbiota del suelo. Las esporas son fácilmente reconocibles al microscopio por su forma de media luna o de canoa. Algunas especies producen micotoxinas en los cereales y que pueden afectar a la salud de personas y animales si estas entran en la cadena alimentaria. La principal toxina producida por estas especies de *Fusarium* son fumonisinas y trichothecenos.

Son patógenos facultativos, capaces de sobrevivir en el agua y suelo alimentándose de materiales en descomposición. Son importantes agentes de contaminación en los laboratorios de microbiología (WHO, 1999)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en el distrito de Daniel Alomía Robles - Pendencia Baja; para la elaboración y toma de muestras del abono orgánico Bocashi y en el Laboratorio de Microbiología General, de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS); ubicado en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región de Huánuco, para aislar e identificar la población fúngica y bacteriana.

3.2. Características climatológicas

Ecológicamente de acuerdo a la clasificación de las zonas de vida y el diagrama bioclimático de HOLDRIDGE(1987), la ciudad de Tingo María se encuentra en la formación vegetal de bosque muy húmedo premontano sub tropical (bmh - PST).

3.3. Materiales y equipos

3.3.1. Preparación del Bocashi

3.3.1.1. Insumos del Bocashi

5 Sacos de gallinaza, 1,5 sacos de carbón, 5 sacos de tierra, 8 litros de melaza de caña, 5 litros de M.E activado, 3 sacos de cascarilla de arroz.

3.3.2. Para el aislamiento e identificación

3.3.2.1. Insumos y reactivos

Agar, medio M77, rojo de metilo, caldo de peptona, prueba de indol, sulfato de potasio, reactivo Kovac, cloruro de sodio, prueba de Voges Pros Kauer, extracto de levadura, prueba de citrato, manitol, medio TSI, sulfato de hierro, medio de LIA, rojo congo, prueba de ureasa, antibiótico ceftriaxona, medio agar rosa de Bengala de Martín.

3.3.3. Equipos materiales de campo y laboratorio

3.3.3.1. Equipos

Balanza analítica, autoclave, estufa, baño María, cámara fotográfica digital.

3.3.3.2. Materiales

Tubos de ensayo, pipeta de 10 ml, matraz, embudo, papel filtro, laminas y laminillas, gradilla, mechero, algodón, palana, libreta de campo, frasco de vidrio esterilizado, machete, pinza, esmalte transparente de uñas, varilla de vidrio, vaso de precipitación, placas petry, espátula, ansa.

3.4. Metodología

3.4.1. Preparación del Bocashi

Se colocó por capas cada uno de los ingredientes: tierra negra, carbón, gallinaza y cascarilla de arroz, y se mezcló hasta homogenizar, la melaza se disolvió en agua y el agua se aplica uniformemente mientras se va revolviendo todos los ingredientes. Solamente se aplica la necesaria, una forma

efectiva de saber el punto, es cuando exprime un puñado de la mezcla, esta forma un terrón, pero cuando usted empuja el terrón con su dedo debe romperse fácilmente (CACD, 2009).

El primer día se dejó a una altura de 1 metro (si la cantidad lo permite) y cubrir con mantas o costales.

El segundo día después de voltear se dejó a 50 centímetros de altura la mezcla y a partir del cuarto día se deja a una altura de 30 centímetros, el día 15 guardar en costales la mezcla, sólo si esta fría.

Al mes y medio de haber preparado el Bocashi, se extrajo la muestra en frascos de vidrio esterilizados, para aislar fungí y bacterias en el laboratorio de microbiología.

3.4.2. Aislamiento de fungí y bacterias

3.4.2.1. Para aislar bacterias

Se pesó 10 g de la muestra del Bocashi, adicionamos en caldo peptonado y filtrar, sacar 1 ml para las diluciones $10^1, 10^2, 10^3, 10^4$, de la última dilución (10^4), sembrar por diseminación en superficie en inóculo de 0.25 ml en placas con medio M 77 y luego llevar a incubación a temperatura de ambiente, por un periodo de 72 horas.

3.4.2.2. Para aislar fungí

Se pesó 10 g de la muestra del Bocashi, adicionamos en caldo peptonado y filtrar, sacamos 1 ml para las diluciones $10^1, 10^2, 10^3, 10^4$, de la última dilución (10^4), sembramos por profundidad un inóculo de 1 ml de la

muestra luego se adicionó el agar rosa de bengala más antibiótico (ceftriaxona de 1 g). Dejamos incubar a temperatura ambiente por un periodo de 8 días luego observa los resultados. De todas las colonias crecidas en el medio rosa de bengala se hizo un micro cultivo de cada colonia.

3.4.3. Identificación de bacterias y fungí

Después de realizar el aislamiento de las placas con sus respectivos medio procedimos a la identificación tanto para bacterias como fungí.

3.4.3.1. Para la identificación de bacterias

Se utilizaron los medios: caldo de peptona, caldo RMVP, caldo VP medio citrato, medio TSI, medio LIA, rojo de metilo, medio Ureasa.

De todas las colonias que se aislaron en el medio M77 se cogió una sola colonia con el ansa de siembra, se sembró en todos con medios de cultivo diferenciales, dejamos incubar a 37°C por 48 horas y leemos los resultados, agregamos reactivos de confirmación a los tubos que corresponda y observar el cambio de color.

Para la prueba de Indol. Se agregó 3 o más gotas del reactivo de Kovac al tubo con caldo peptona. Si da en anillo rojo es positivo a indol (metabolitos proteicos), anillo anaranjado negativo al indol.

Para la prueba de rojo de metilo (RM). Se agregó 2 a 3 gotas de colorante rojo de metilo a uno de los tubos con caldo MRVP, si da color rojo es positivo a rojo de metilo, si da color anaranjado es negativo a rojo de metilo.

Prueba de voges pros kauer (VP). Al otro tubo con caldo MRVP se agregó 2 a 3 gotas de K OH al 4% luego se añadió gotas de reactivo alfa naftol se espera entre 10 a 20 min. Una coloración rosado nos indica positivo a VP, coloración amarilla nos indica negativo a VP. Luego para las otras pruebas de citrato TSI, LIA, Urea, se observaron el viraje de color de cada prueba, para observar con una tabla de pruebas bioquímicas la especie o género de cada microorganismo.

3.4.3.2. Para la identificación de fungí

Se realizó micro cultivos, los materiales que utilizamos, una placa petry conteniendo un soporte de vidrio en forma de u con un porta y cubre objeto todo esterilizado un día antes (esto es la placa del micro cultivó), luego se utilizó placas petry con medio agar de saboroud mas antibiótico (ceftrioxona de 1 g), para hacer cubitos divididos 20 x 20 x 10 mm que cada cubito se colocó sobre el porta objeto dentro de la placa del micro cultivo, (el espesor del medio depositado dentro de la placa de micro cultivo no debe ser mayor de 10 mm), luego se procedió a elegir una colonia de la muestra aislada por cada placa de micro cultivo, con la ayuda de un ansa micológica, tomamos un inóculo y lo trasladamos sobre el cubito del medio de saboroud que se ha colocado en el porta objeto dentro de la placa del microcultivo colocamos el cubre objeto sobre el cubito y colocamos un algodón húmedo, dejamos en

incubación por un periodo de 10 días a temperatura ambiente y diariamente verificar si el algodón está húmedo. Pasado los 10 días de incubación retirar suavemente con ayuda de una pinza el cubre objeto de la placa de micro cultivo y colocarlo sobre un porta objeto limpio y esterilizado y se coloca 3 a 4 gotas de azul de AMANN luego con papel secante, se absorbe el exceso de colorante sellamos los lados laterales con esmalte de uñas transparente, el cubito sacamos del medio y llevamos a un recipiente con solución sulfocromica, retiramos el porta objeto de la placa de micro cultivó y agregamos 3 gotas de azul de AMANN, añadimos un cubre objeto limpio y sellamos con el esmalte trasparente de uñas y llevamos al microscopio .

3.4.3.3. Aislamiento de *Rhizobium*

Se pesó 10 g de la muestra del Bocashi, se adicionó en caldo peptonado y filtro, se sacó 1 ml para las diluciones $10^1, 10^2, 10^3, 10^4$, se sembró por estrías en medio LMA (medio levadura manitol agar), la dilución. Se incubó a temperatura ambiente por un periodo de 72 horas se observó los resultados. Se sometió a una coloración gram el crecimiento de cada dilución y se observó en el microscopio.

3.4.3.4. Enumeración de microorganismos a partir de materia orgánica (abono Bocashi)

Se pesó 10 g de la muestra del Bocashi, adicionamos en caldo peptonado y filtro se sacó 1ml para las diluciones $10^1, 10^2, 10^3, 10^4$, de la última dilución(10^4), se sembró por profundidad un inóculo de 1 ml utilizando el medio de playcount más manitol (1%), dejamos incubar a temperatura

ambiente de (26°C a 29°C) por 48 horas y se realizó el recuento de colonias utilizando el equipo para contar las colonias, aplicamos la fórmula de enumeración de microorganismos por gramo (LÓPEZ, 1990).

$$\text{M.O /g de muestra} = C \times I \times f$$

Dónde: m. o /g= es microorganismos por gramo de suelo

C = Número de colonias

I = Inóculo de siembra

F = Factor de dilución

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento e identificación de fungí

a. Aislamiento e identificación de *Trichoderma* sp

En la Figura 1 observamos una muestra en nivel de colonia, aislada en medio rosa de bengala y la Figura 2 muestra, al fungí del genero *Trichoderma* microscópicamente a 400 X. BASTOS (1996), menciona a nivel de cultivo una característica notoria es la presencia del color verde en la placa petry proveniente del abono orgánico Bocashi. BENÍTEZ *et al.* (2004), mencionan que *Trichoderma* es un fungí que ofrece ventajas como agente de control biológico, para la protección de plantas frente al ataque de fitopatógenos causantes de enfermedades de importancia económica.

BENÍTEZ *et al.* (2004), indican que el *Trichoderma* es uno de los fungí que se encuentra en el Bocashi y ha sido utilizado por los agricultores japoneses como un mejorador del suelo aumentando la diversidad microbiana, las condiciones físicas y químicas y previniendo enfermedades.



Figura 1. Colonia de *Trichoderma* sp en medio agar rosa de bengala.



Figura 2. Hifas y esporangios de *Trichoderma* sp observados a 400 X.

b. Aislamiento e identificación *Aspergillus* sp

En las Figuras 3 y 4 se presenta la muestra aislada e identificada al fungí del género *Aspergillus* sp. DE HOOG y GUARRO (1995), mencionan que su hábitat natural es el compostaje y es clave en la formación y mantenimiento de los ecosistemas edáficos, por su extraordinaria capacidad y versatilidad para degradar gran parte de restos orgánicos vegetales.

Así mismo, el *Aspergillus* presenta macromoléculas extracelulares que son capaces de penetrar a través de las paredes de las células de las raíces hacia los tejidos de estas. La amilasa del *aspergillus* penetra desde la solución del suelo en el sistema de transporte de agua de la planta, y es transportada hacia las partes superiores del árbol. La aparición de amilasa en las agujas y hojas lo hace a un más benéfico para el suelo y planta.



Figura 3. Colonias de *Aspergillus* sp en medio rosa de bengala.



Figura 4. *Aspergillus* sp observado a 400 X.

c. Aislamiento e identificación de *Fusarium* sp

En las Figuras 5 y 6, se presenta la identificación de una muestra aislada a nivel de cultivo del género *Fusarium* sp. COOK y BAKER (1989), mencionan que el *Fusarium* sp, es un fungí con capacidad patogénica que se encuentra en el suelo alrededor del mundo y afecta muchas especies vegetales y animales y es difícil de controlar. Existe una gran diversidad de cepas de *Fusarium* sp, de las cuales algunas son patogénicas y su gran mayoría son saprófitas descomponen la materia orgánica pueden ser utilizadas como controladores biológicos.

Del mismo modo, WHO (1999), indica que mayormente ataca a cultivos tropicales y templados como cacao, café, llegando a causar pudrición a la raíz y son facultativos capaces de vivir en el suelo y el agua .En el caso del Bocashi se encuentra este género pero no pudimos determinar si la especie encontrada tenía capacidad patogénica, debido a que no se hizo los ensayos para tal fin, por no ser los objetivos de esta investigación.



Figura 5. Colonias de *Fusarium* sp en medio rosa de bengala.



Figura 6. Hifas y esporangios de *Fusarium* sp observados a 400 X.

d. Aislamiento e identificación de *Rhizopus* sp

En las Figuras 7 y 8 observamos colonia aislada e identificada del fungí que pertenece al género *Rhizopus* sp. CASAS (1989), menciona la frecuencia que se encuentra en suelos con arena, compost, en el polvo de las casas, estiércol y en diferentes frutos y semillas estos fungí son abundantes en el aire libre y con periodicidad aumenta en lugares donde hay humedad y se acumula vegetación muerta. Así mismo, (COOK y BAKER, 1989), indica que es un género de microorganismo que presenta capacidad patogénica que incluye especies filamentosas halladas en el suelo degradando frutos y vegetales.

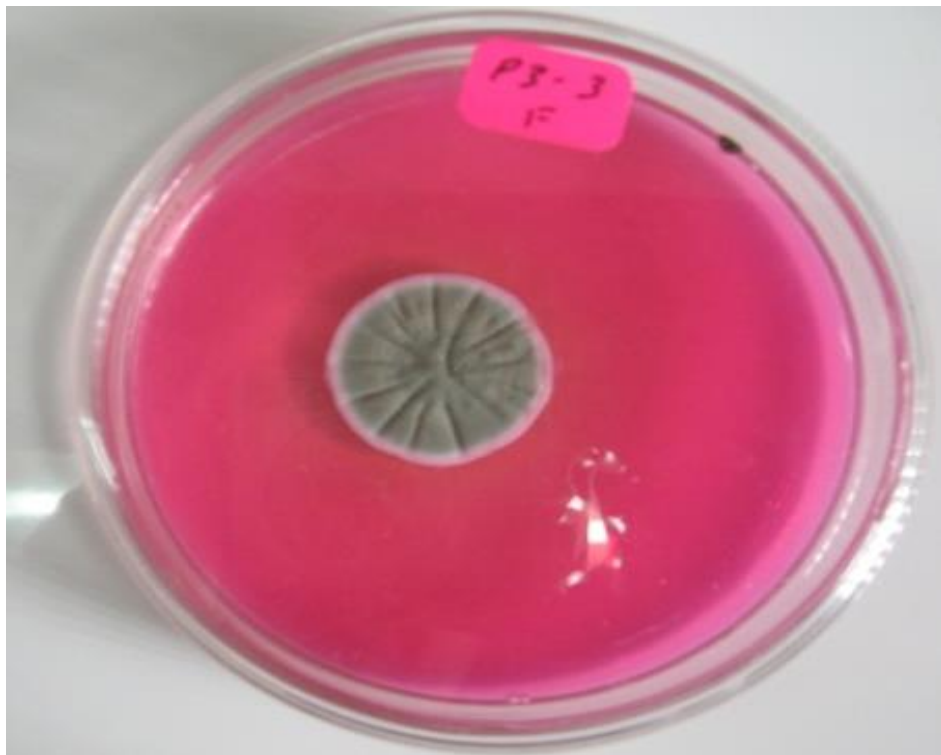


Figura 7. Colonias de *Rhizopus* sp en medio rosa de bengala.



Figura 8. *Rhizopus* sp observados a 400 X.

4.2. Aislamiento e Identificación de bacterias

Después del aislamiento utilizamos las diferentes pruebas bioquímicas para identificación de bacterias.

a. Aislamiento e identificación de *Pseudomonas* sp

En las Figuras 9 y 10 se presenta el aislamiento e identificación de la bacteria del género *Pseudomonas*.

GRANT y LONG (1999) mencionan que el Bocashi es un estimulador orgánico que presenta *Pseudomonas*, que coloniza una gran variedad de microambientes debido a su versatilidad nutricional. A pesar de su número no excesivamente mayor tiene un alto nivel de importancia ecológica

alto. Asimismo, BUCHANAN Y GIBBONS (1990), indica las *Pseudomonas* abundan en la superficie de las raíces y en general pertenecen a un grupo llamado “Estimuladores del crecimiento vegetal” por poseer la propiedad de producir sustancias aceleradoras del crecimiento vegetal. Las principales sustancias estimuladoras producidas de tipo hormonal como giberelinas, auxinas.

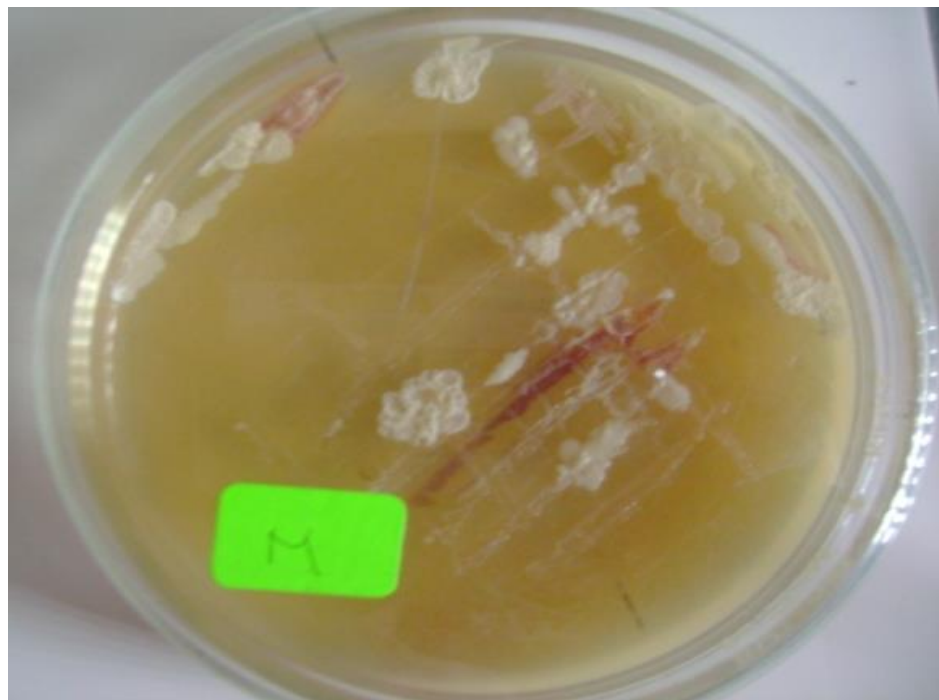


Figura 9. Colonias de *Pseudomonas* sp en medio M77.



Figura 10. *Pseudomonas* sp observada a 1000 X.

b. Aislamiento e identificación *Rhizobium* sp

En las Figuras 11 y 12 se presenta muestra aislada e identificada de la bacteria del genero *Rhizobium* sp.

El Bocashi es un abono que contiene mucho *Rhizobium* en su composición, una de las interacciones más interesantes y destacadas entre bacterias y plantas son las que se dan entre las leguminosas y las bacterias gram negativas fijadoras de nitrógeno. Las leguminosas son un grupo amplio que incluye plantas de importancia económica como trébol, frejol, soya. La asociación *Rhizobium* – leguminosas constituye una autentica simbiosis, ya que claramente hay una participación de cada miembro. La fijación de nitrógeno beneficia a la planta que crece en suelos pobres en ese elemento, mientras que para los rhizobios el nódulo es un ambiente que protege y nutre, (MADIGAN *et al.*, 2004).



Figura 11. Colonias de *Rhizobium* sp en medio M77.

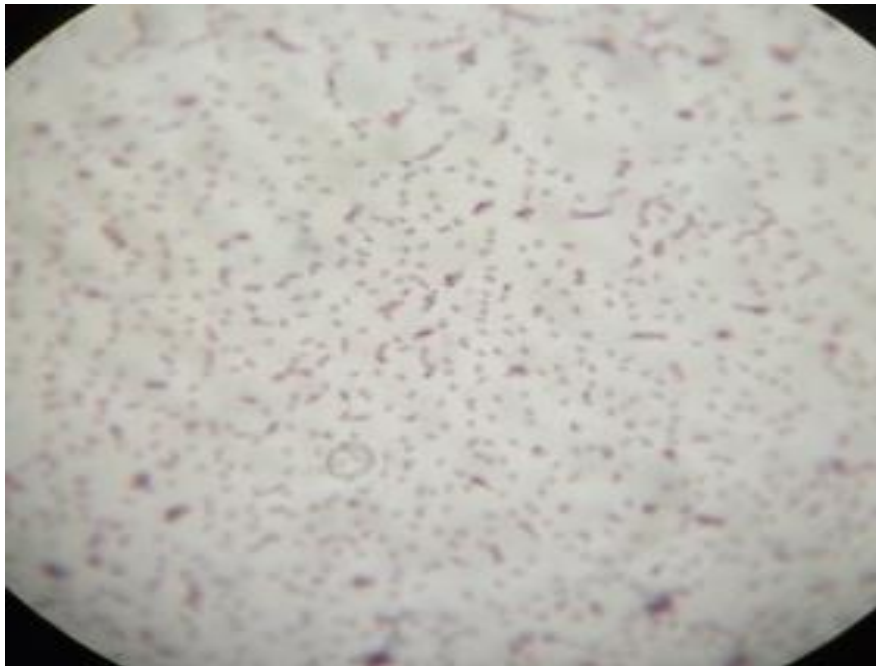


Figura 12. Bacterias del género *Rhizobium* sp a 1000 X.

4.3. Identificación de fungí y bacterias en abono orgánico

Bocashi

En el Cuadro 1, se muestra las bacterias, de los géneros *Pseudomonas* sp, *Rhizobium* sp, y fungí del género *Trichoderma* sp, *Aspergillus* sp, benéficos para el suelo y encontramos fungí con capacidad patogénica del género *Fusarium* sp y *Rhizopus* sp. Este resultado, comparado con lo citado por URIBE (2003), indica que los fungí desintegran la materia orgánica haciéndola asimilable para las plantas. Asimismo BASTOS (2006), menciona que los agentes patógenos producen pérdidas económicas a los cultivos. URIBE (2003), indica que los grupos más importantes de microorganismos presentes en los abonos orgánicos son las bacterias, fungí y actinomicetes.

Cuadro 1. Bacterias y fungí identificadas en abono orgánico Bocashi

Bacterias	Fungí	Capacidad patogénica del género
<i>Pseudomona</i> sp	<i>Trichoderma</i> sp	No
<i>Rhizobium</i> sp	<i>Aspergillus</i> sp	No
	<i>Fusarium</i> sp	Si
	<i>Rhizopus</i> sp	Si

4.4. Microorganismos viables presentes en el abono orgánico Bocashi

Los microorganismos del suelo juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la fertilidad de los suelos mineralizando. La mayoría de los microorganismos que viven en el suelo son indispensables en el mantenimiento de la vida sobre este planeta. El suelo contiene una gran variedad de microorganismos (ANDERSON e INGRAM, 1993).

La mayoría de los suelos contienen entre 10^8 y 10^{10} microorganismos por gramo de suelo (MADIGAN *et al.*, 2004). Las bacterias son los microorganismos más numerosos y están representados por más de 10^4 a 10^6 especies diferentes, los hongos son los siguientes individuos por gramo de suelo representados por más de 10^6 especies diferentes (SYLVIA *et al.*, 1999).

En el Cuadro 2, el Bocashi. Presenta microorganismos con una población de individuos que está en el rango de $10,573 \times 10^4$ hasta $12,300 \times 10^4$ m. o/ g de abono.



Figura 13. Colonias para la enumeración de microorganismos viables del abono orgánico Bocashi.

Cuadro 2. Microorganismos viables por gramo de abono orgánico Bocashi.

Muestras	Promedio de m .o /g de abono orgánico
1	$10,573 \times 10^4$
2	$12,300 \times 10^4$
3	$7,666 \times 10^4$

V. CONCLUSIONES

1. Se aisló e identificó dos géneros de fungí benéficos para el suelo como *Trichoderma* sp y *Aspergillus* sp. Ydos géneros de fungí con capacidad patogénica para los cultivos y plantaciones forestales, como son *Fusarium* sp y *Rhizopus* sp.
2. Se logró aislar e identificar dos géneros de bacterias gran negativas como *Pseudomonas* sp y *Rhizobium* sp.
3. El número promedio de microorganismos presentes en el abono orgánico Bocashi por muestra está en un rango de $7,666 \times 10^4$ a $10,573 \times 10^4$ m. o / g.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar trabajos similares utilizando otros tipos de pruebas para el aislamiento y otras técnicas de medios de cultivo de Fungí y Bacterias.
2. Realizar estudios de la población microbiana presentes en este abono orgánico Bocashi en diferentes condiciones ecológicas.

VII. ABSTRACT

The research was conducted in the district Alomía Daniel Robles–Pendencia Drops to an., where the compost produced Bocashi (AOB) And the Genera IMicrobiology Laboratory of the Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), located in the district of Rupa Rupa, province of Leoncio Prado, Huanuco, to isolate and identify bacteria, fungi and enumeration of microorganisms gram AOB.

This investigation determined the major bacterial and fungal genera present in the AOB. To isolate bacteria and fungi was used 10g sample of AOB (prepared with inputs from the area) for serial dilutions on solid medium to isolate bacteria, and fungi M77rose bengalin the middle, then ring the isolated colonies and perform identification of bacteria and fungi for biochemical differentiation by micro culture (morphological contrast). Was isolated and identified 04generaof fungi from samples of AOB, *Trichoderma* sp, *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp, *Rhizopus* sp, of which the last two genera are present pathogenicity can affect the plant s and was isolated and identified 02 genera of gram negative bacteria *Pseudomonas* sp, *Rhizobium* sp. the number of the present microorganisms in the Bocashi organic fertilizer was an araverage of 7, 666x10⁴to 10, 573 x10⁴m.o/g fertilizer. Showing tha the AOB has a high microbial load typical of a fertile soil and genera of bacteria and fungi that are actively involved in the process of mineralization of organic matter and nutrient uptake through symbiosis.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M.1998. Introducción a la microbiología del suelo. 2a edic. Mexico. 62 p.
- AGRIOS, G. N. 1988.Plant pathology, 3a edic. Academic Press. New York. 803 p.
- ANDERSON, M; INGRAM, S.1993. Tropical soil biology and fertilityand book methods. 2ed. United of Kingdom. C.A.B. International. 128 p.
- ARENAS, R. 2003. Micología Médica ilustrada. 2a edic. McGraw Hill, S. A., México. 352p.
- BAATH, E. 2000. Growth rates of bacterial communities in soils at varying pH: a comparison of the thymidine and leucine incorporation techniques. Microb. Ecol, Florida.327p.
- BANRRETT, H. 1998. Division of plant and soil sciences west Virginia University Margontowm, Virginia. 900 p.
- BASTOS, C. 1996. Mycoparasitic nature of the antagonisms between Trichoderma viride and Fitopatologia Brasileria, Basil. 54 p.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, M.; LIMÓN, M.; CODÓN, A. 2004.Biocontrolmechanism of Trichoderma strains. EE.UU. Florida. 260 p.
- BUCHANAN, R.; GIBBONS, N. 1990.Bergy's manual of determinative bacteriology.8aedic.Williams and Wilkins; Baltimore, Maryland.246 p.

- COOPERATIVA AGRARIA CAFETALERA DIVISORIA (CACD). 2009. Manual para bosques locales abonos y biofermentos orgánicos. Tingo María, Perú. 40 p.
- CASAS, G. 1989. Micología General. Ediciones de la Biblioteca. Caracas, Venezuela. 488p.
- CERVANTES, A. 2008. Escuela familiar agraria Campomar, hongos Benéficos Costa Rica. 260p.
- COOK, J.; BAKER, K. 1989. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Minnesota. The American Phytopathological Society. 539 p.
- DE HOOG, S.; GUARRO, J. 1995. Atlas of clinical fungi. Baarn: Central bureau voor Schimmel cultures, 198 p.
- DONAHUE, R.; MILLER, R.; SHICKLUNA, J. 1981. Introducción a los suelos y al crecimiento de las plantas. Madrid, España, 624 p.
- FENCHEL, T.; KING, G.; BLACKBURN, H. 2000. Bacterial Biogeochemistry. 2a edic. Academic Press, San Diego, cap.1.
- GERMIDA, J. 1993. Cultural methods for soil microorganisms. In: Soil sampling and methods of analysis. Canadian Society of Soil Science. Canadá, 275p.
- GIL, M.; RUEDA, M.; SALGADO, A. 2006. Guía de uso de la tecnología EM Bogotá Colombia. 45 p.
- GONSALVEZ, A.; FERREIRA, S. 2001. *Fusarium* Primer; General Information Summary. Department of Plant Pathology, College of Tropical and

- Agriculture and Human Resources. University of Hawaii at Manoa. Hawaii
120 p.
- GRANT, D.; LONG, E. 1999. Microbiología ambiental Capítulo edit. Acribia, S.A.
Colombia, 223 p.
- HOLDRIDGE, L. 1987. Ecología base en zonas de vida. San José, Costa Rica.
210 p.
- JAWETZ, B.; MELNICK, ADELBERG. 2002. Microbiología Médica, 17a edic.
México. 380p.
- LOPEZ, C. 1990. Manual teórico practico microbiología, Bioquímica Clínica
Chiclayo, Perú 193 p.
- MADIGAN, T.; MARTINKO, J.; PARKER, J. 2004. Brock-Biology of
Microorganisms. 2a edic. NJ. 150p.
- MAHON, C.; MANUSELIS, G. 1995. Of Diagnostic Microbiology. Philadelphia,
W.B. Saunders 290 p.
- MASAKI, S.; LEBLANC, H.; TABORA, P. 2000. Bocashi, Guacimo, Limon
Costa Rica 1-25 p.
- PROCAFE. 1998. Boletín Técnico. Manejo integrado de enfermedades en
viveros de café. 2ed. Fundación Salvadoreña para investigaciones del
café. El Salvador 340 p.
- RAMIREZ, G.; LUNA, B.; MEJÍA, A.; VELÁZQUEZ, O.; TSUZUK, R. 1992. En
Manual de prácticas de microbiología general. Laboratorio de
microbiología experimental. Facultad de Química, UNAML. Lima, Perú.
223p.

- RESTREPO, M. 1996. Abonos orgánicos fermentados experiencia de agricultores de Centroamérica. OIT, PSST, CEDECE 51 p.
- SAWADA, H.; KUYKENDALL, D.; YOUNG, J. 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 155 p.
- SCHLEGELI, H. 1993. General microbiology. Cambridge University Press, Hojaya. 169 p.
- SYLVIA, D.; FUHRMANN, J.; HARTEL, P.; ZUBERER, D. 1999. Principles and applications of soil microbiology. United States of America. Hall. Inc. EE.UU. 480 p.
- TRONCONI, N.; PINEDA, C.; ORDOÑEZ, M. 1997. Memoria 6to Seminario Nacional de Investigación y transferencia en Caficultura. Evaluación de productos químicos para el control de *Fusarium* sp. en semilleros. Tegucigalpa, Honduras. 305 p.
- URIBE LORÍO, L. 2003. Calidad microbiológica e inocuidad de abonos orgánicos. In *Abonos orgánicos: principios, aplicaciones e impacto en la agricultura*, Salvador. 184 p.
- WONMACK, E.; COLWELL, R. 2000. Virioplankton viruses in aquatic ecosystems *Microbiol.* 114 p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 1999. Microbiology [En Línea]: TOXIC EFECTS (<http://www.Toxic effects/of mycotoxin in humans.htm>, documento, 06 de Jul. 2009).

ANEXOS



Figura 13. Recogiendo muestra del abono orgánico Bocashi.



Figura 14. Muestras puestas en frascos esterilizado para llevar a laboratorio de Microbiología General.



Figura15. Filtrando el abono Bocashi para las diluciones y sembrar.



Figura16. Trasladando al baño María el medio de cultivo preparado.



Figura 17. Siembra en medio de cultivo M 77.



Figura 18. Enumeración de bacterias.



Figura 19. Colonias de fungí en medio rosa de bengala.

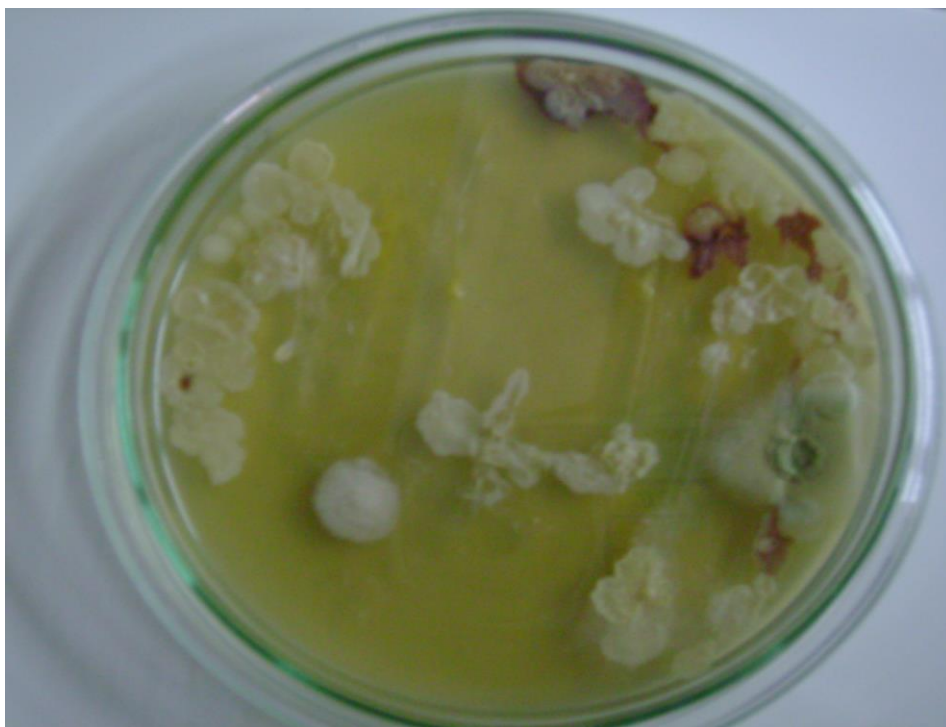


Figura 20. Colonias de bacterias en medio M77.



Figura 21. Observando en el microscopio la muestra identificada.

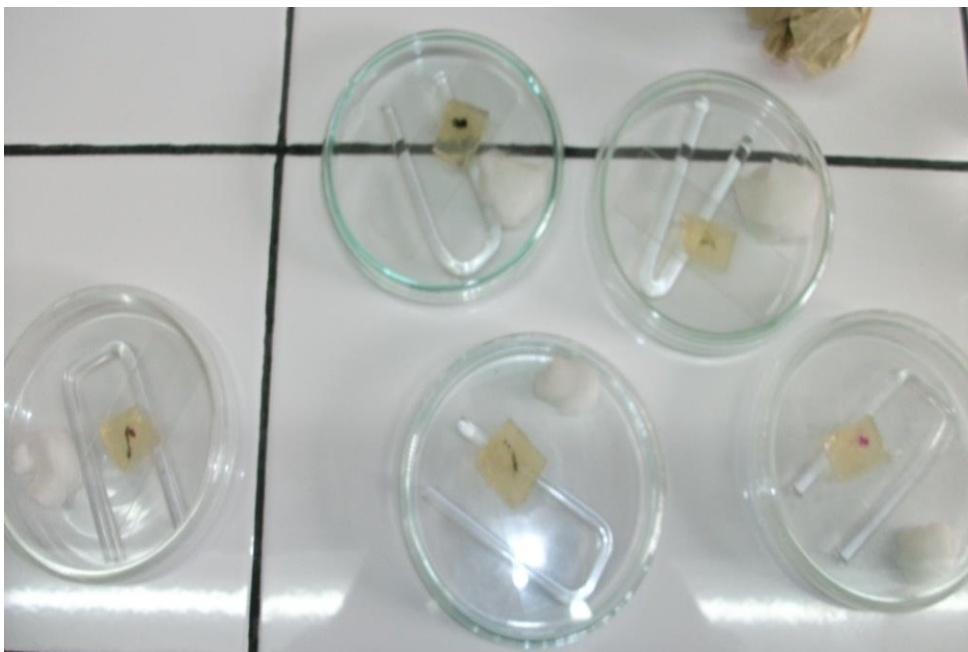


Figura 22. Microcultivos de fungí preparados para incubación T° ambiente.



Figura 23. Observación microscópica de microorganismos.