



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

TEMA:

**“CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE BACTERIAS
RESPONSABLES DE LA DESCOMPOSICIÓN DE MATERIA ORGÁNICA
DURANTE LA FABRICACIÓN DE COMPOST”**

Trabajo de graduación, modalidad Trabajo Estructurado de Manera Independiente, presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

LUIS GABRIEL CURIPALLO NUÑEZ

Ambato – Ecuador

2011

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutor del trabajo de investigación: "CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE BACTERIAS RESPONSABLES DE LA DESCOMPOSICIÓN DE MATERIA ORGÁNICA DURANTE LA FABRICACIÓN DE COMPOST", realizado por el Egdo. Luis Gabriel Curipallo Nuñez, certifico que el trabajo fue realizado por la persona indicada. Considero que dicho informe investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos a la evaluación del Tribunal de Grado, que el Honorable Consejo Directivo designe, para su correspondiente estudio y calificación.

Ambato, Mayo del 2011

Dr. Carlos Rodríguez M.; Ph.D

TUTOR DE TESIS

AUTORÍA

El presente trabajo de investigación: "CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE BACTERIAS RESPONSABLES DE LA DESCOMPOSICIÓN DE MATERIA ORGÁNICA DURANTE LA FABRICACIÓN DE COMPOST", es absolutamente original, auténtico y personal, en tal virtud, el contenido, efectos legales y académicos que se desprenden del mismo son de exclusiva responsabilidad del autor.

Ambato, Mayo del 2011

Luis Gabriel Curipallo Nuñez

180415798-8

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Los miembros del tribunal de grado aprueban el presente trabajo de graduación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Mayo del 2011

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

Miembro del Tribunal

Miembro del Tribunal

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi inspiración y mi fortaleza para seguir adelante a pesar de las adversidades, gracias por ayudarme a obtener mis objetivos planteados.

A mi Madre, Rosita por haberme dado la vida. Gracias por tu inmenso amor, por ser el más claro ejemplo de honestidad, responsabilidad y superación. Gracias por educarme, y aconsejarme todos los días.

A mi Padre, Luis por haberme dejado la mejor herencia en la vida, el estudio gracias por haber creído en mi. Gracias por el inmenso amor y amistad que me brindaste siempre te recordarte y respetare.

A mi hermano Vinicio, por haber confiado en mí, por apoyarme y aconsejarme en esos momentos difíciles.

Gabriel

AGRADECIMIENTO

Dejo constancia de mi agradecimiento a:

A la Universidad Técnica de Ambato y en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Bioquímica que me dieron la oportunidad de formar parte de ellas.

A la Universidad Técnica de Ambato, específicamente al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos por permitir desarrollar la parte experimental de mi tesis en sus instalaciones.

Al Dr. Carlos Rodríguez por los conocimientos impartidos a lo largo de la Carrera y por ser la guía para la culminación de este trabajo y por ser un amigo en quien confiar.

A mis amigos, gracias por estar siempre conmigo, gracias por apoyarme y por haberme brindado su amistad, Gaby, por tu inteligencia y tu tenacidad de hacer las cosas; Ricardo, por tu espontaneidad y por ser el mejor amigo a lo largo de la carrera universitaria y fuera de ella; Manuel, por tu sencillez y ganas de superación, Axel por tu franqueza de decir las cosas, Diana, Mónica, Fernanda, Cristina Cevallos y Rosita, gracias por aconsejarnos y ser unas excelentes amigas.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

A. PÁGINAS PRELIMINARES

Tema	i
Aprobación del Tutor	ii
Autoría	iii
Aprobación del Tribunal de Grado	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice general de contenidos	vii
Índice de tablas, gráficos y figuras	xvi
Resumen	xxii

B. TEXTO

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Tema de Investigación	1
1.2. Planteamiento del problema	1
1.2.1. Contextualización	1
1.2.1.1. Macro	1
1.2.1.2. Meso	1

1.2.1.3. Micro	2
1.2.2. Análisis Crítico	2
1.2.2.1. Diagrama Causa – Efecto	2
1.2.2.2. Prognosis	3
1.2.2.3. Formulación del problema	3
1.2.2.4. Interrogantes	4
1.2.2.5. Delimitación	4
1.3. Justificación	4
1.4. Objetivos	5
1.4.1. General	5
1.4.2. Específicos	5
CAPITULO II	
MARCO TEORICO	
2.1. Antecedentes Investigativos	6
2.1.1. Importancia de la descomposición de la materia orgánica	6
2.1.2. Descomposición de la materia orgánica	7
2.1.3. Biodiversidad de microorganismos relacionados a la descomposición de la materia orgánica	8
2.1.4. Aislamiento de microorganismos durante el compostaje	9
2.1.5. Determinación de la actividad amilolítica y celulolítica	10
2.1.5.1. Actividad Amilolítica	10

2.1.5.2. Aislamiento e identificación de cepas microbianas con actividad amilolítica	10
2.1.5.3. Determinación de la actividad celulolítica	10
2.1.5.4. Actividad celulolítica	11
2.1.5.5. Prueba cualitativa de rojo congo	11
2.1.6. Fundamentos de Taxonomía Numérica Microbiana	11
2.1.6.1. Coeficientes que se usan para analizar datos de taxonomía numérica	11
2.1.7. Uso de microorganismos eficientes en el proceso de descomposición	12
2.2. Fundamentación Filosófica	12
2.3. Fundamentación Legal	13
2.3.1. Norma de calidad ambiental para el manejo y disposición final de desechos sólidos	13
2.4. Categorías fundamentales	14
2.5. Hipótesis	15
2.5.1. Hipótesis nula	15
2.5.2. Hipótesis alternante	15
2.6. Señalamiento de variables de las hipótesis	15
CAPITULO III	
METODOLOGÍA	
3.1. Enfoque	16
3.2. Modalidad básica de la investigación	16
3.3. Nivel o tipo de investigación	16
3.4. Población y muestra	16

3.5. Operacionalización de variables	16
3.6. Recolección de información	16
3.6.1. Experimento preliminar	16
3.6.2. Experimento final	18
3.6.2.1. Recolección de muestras	19
3.6.2.2. Determinación del pH de las muestras	20
3.6.3. Aislamiento selectivo de microorganismos	20
3.6.3.1. Determinación de la población y diversidad bacteriana	20
3.6.3.2. Determinación de la población y diversidad de actinomicetes	21
3.6.3.3. Porcentaje de bacterias y actinomicetes	21
3.6.4. Aislamiento y purificación de microorganismos	21
3.6.5. Caracterización macroscópica de los aislamientos	22
3.6.6. Caracterización microscópica	22
3.6.7. Caracterización bioquímica y fisiológica de los aislamientos	23
3.6.7.1. Rango de crecimiento en Función de la Temperatura	23
3.6.7.2. Rango de crecimiento en Función del pH	23
3.6.7.3. Aminoácidos como Fuentes de Carbono y Energía	23
3.6.7.4. Perfil metabólico de carbohidratos	23
3.7. Procesamiento y análisis	24
3.7.1. Diseño Experimental	24
3.7.2. Identificación de las faces de compostaje	24
3.7.3. Población, porcentaje y diversidad de microorganismos	24
3.7.4. Formación de grupos de color	24
3.7.5. Taxonomía numérica de datos fenotípicos	24

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis de los Resultados	29
4.1.1. Experimento preliminar	29
4.1.1.1. Determinación de la temperatura	29
4.1.1.2. Determinación del pH	29
4.1.2. Experimento final	29
4.1.2.1. Determinación de temperatura de la pila de compost	29
4.1.2.2. Determinación del pH de la pila de compost	30
4.1.2.3. Valores de pH y temperatura de las muestras	30
4.1.2.4. Determinación de la población de bacterias y actinomicetes	30
4.1.2.5. Determinación del porcentaje de bacterias y actinomicetes	31
4.1.2.6. Determinación de la diversidad de bacterias y actinomicetes	31
4.1.2.7. Aislamiento y codificación de los microorganismos	32
4.1.2.8. Caracterización macroscópica, microscópica y formación de grupos de color de actinomicetes	32
4.1.2.9. Caracterización macroscópica y microscópica de bacterias	32
4.1.2.10. Caracterización bioquímica y fisiológica de los actinomicetes	33
4.1.2.10.1. Rango de crecimiento en función de la temperatura y pH	33
4.1.2.10.2. Crecimiento de actinomicetes en medios que contenían aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno	33
4.1.2.10.3. Producción de enzimas extracelulares por actinomicetes	34
4.1.2.11. Caracterización bioquímica y fisiológica de bacterias	34
4.1.2.11.1. Rango de crecimiento en función de la temperatura y pH	34
4.1.2.11.2. Crecimiento de bacterias en medios que contenían aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno	34
4.1.2.11.3. Producción de enzimas extracelulares por bacterias	34
4.1.2.12. Comparación de características metabólicas entre actinomicetes y bacterias asociados a las diferentes etapas del proceso de descomposición	35
4.1.3. Procesamiento y análisis	35

4.1.3.1. Número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de compost (ufc/g)	35
4.1.3.2. Porcentaje de bacterias que crecieron en agar nutritivo	35
4.1.3.3. Diversidad de colonias bacterianas en agar nutritivo	35
4.1.3.4. Número de unidades formadoras de colonias de actinomicetes por gramo de compost (ufc/g)	36
4.1.3.5. Porcentaje de actinomicetes que crecieron en agar GYM	36
4.1.3.6. Diversidad de colonias de actinomicetes en agar GYM	36
4.1.3.7. Taxonomía numérica de datos fenotípicos	37
4.2. Interpretación de Datos	37
4.2.1. Experimento preliminar	37
4.2.2. Experimento final	38
4.2.2.1. Experimento de compostaje	38
4.2.2.2. Población y diversidad de microorganismos durante las diferentes etapas de compostaje	39
4.2.2.3. Caracterización fenotípica de los aislamientos	39
4.2.2.4. Taxonomía numérica de datos fenotípicos	40
4.2.3. Discusión general del trabajo investigativo	40
4.3. Verificación de Hipótesis	41
4.3.1. Hipótesis nula	41
4.3.2. Hipótesis alternante	41

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones	43
5.2. Recomendaciones	44

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1. Datos Informativos	45
6.1.1. Título	45
6.1.2. Institución Ejecutora	45
6.1.3. Beneficiarios	45
6.1.4. Ubicación	45
6.1.5. Tiempo Estimado para la Ejecución	45
6.1.6. Equipo Técnico Responsable	45
6.2. Antecedentes de la Propuesta	46
6.3. Justificación	46
6.4. Objetivos	46
6.4.1. Objetivo General	46
6.4.2. Objetivos Especificos	46
6.5. Análisis de Factibilidad	47
6.6. Fundamentación	47
6.7. Metodología – Modelo Operativo	47
6.7.1. Caracterización Fenotípica	47
6.7.1.1. Caracterización macroscópica	47
6.7.1.2. Caracterización microscópica	47
6.7.1.3. Rango de crecimiento en función de la Temperatura	48
6.7.1.4. Rango de crecimiento en función del pH	48
6.7.1.5. Aminoácidos como Fuentes de Carbono y Energía	48
6.7.1.6. Perfil metabólico de carbohidratos	48
6.7.1.7. Análisis de Datos Fenotípicos	49
6.8. Administración	49

C. MATERIALES DE REFERENCIA

Bibliografía

51

Anexos

55

ÍNDICE DE TABLAS**ANEXO A. DATOS EXPERIMENTALES**

Tabla A1. Datos de temperatura del experimento preliminar.

Tabla A2. Duración (días) de cada una de las etapas del experimento preliminar de descomposición

Tabla A3. Datos de pH del experimento preliminar.

Tabla A4. Datos de temperatura de la pila de compost

Tabla A5. Duración (días) de cada una de las etapas del experimento final de descomposición

Tabla A6. Datos de pH de la pila de compost

Tabla A7. Valores de pH y temperatura de los días de muestreo correspondientes a cada una de las etapas del proceso de descomposición

Tabla A8. Número de ufc/g de muestra de bacterias y actinomicetes por fase de descomposición

Tabla A9. Porcentaje de bacterias y actinomicetes por fase de descomposición en agar nutritivo (AN) y agar extracto de malta extracto de levadura (GYM)

Tabla A10. Porcentaje de bacterias y actinomicetes por fase de descomposición tomando en cuenta la población determinada para cada grupo

Tabla A11. Diversidad de colonias de bacterias y actinomicetes por fase de descomposición.

Tabla A12. Codificación de actinomicetes y bacterias aislados de la etapa inicial

- Tabla A13. Codificación de actinomicetes y bacterias aislados de la etapa termofílica
- Tabla A14. Codificación de actinomicetes y bacterias aislados de la etapa estacionaria
- Tabla A15. Codificación de actinomicetes y bacterias aislados de la etapa final
- Tabla A16. Grupos de color formados por los actinomicetes aislados en la etapa inicial
- Tabla A17. Grupos de color formados por los actinomicetes aislados en la etapa termofílica
- Tabla A18. Grupos de color formados por los actinomicetes aislados en la etapa estacionaria
- Tabla A19. Grupos de color formados por los actinomicetes aislados en la etapa final
- Tabla A20. Características de color de cada uno de los grupos de color encontrados en el presente estudio.
- Tabla A21. Distribución y número de actinomicetes de cada grupo de color por etapa de descomposición.
- Tabla A22. Caracterización macroscópica de las bacterias aisladas durante la etapa inicial
- Tabla A23. Caracterización macroscópica de las bacterias aisladas durante la etapa termofílica.
- Tabla A24. Caracterización macroscópica de las bacterias aisladas durante la etapa estacionaria.
- Tabla A25. Caracterización macroscópica de las bacterias aisladas durante la etapa final.
- Tabla A26. Caracterización microscópica de las bacterias aisladas durante el proceso de descomposición.
- Tabla A27. Número de actinomicetes clasificados por rango de crecimiento de acuerdo al pH.
- Tabla A28. Número de actinomicetes que crecieron de acuerdo a diferentes valores de temperatura.
- Tabla A29. Número de actinomicetes que usaron aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno.
- Tabla A30. Actinomicetes productores de celulasas, amilasas y quitinasas
- Tabla A31. Número de bacterias clasificadas por rango de crecimiento de acuerdo al pH.
- Tabla A32. Número de bacterias que crecieron de acuerdo a diferentes valores de temperatura.
- Tabla A33. Número de bacterias que usaron aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno.

Tabla A34. Bacterias productoras de celulasas, amilasas y quitinasas

Tabla A35. Comparación del porcentaje de actinomicetes y bacterias productoras de celulasas y amilasas durante las diferentes etapas de descomposición

ANEXO B. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Tabla B1. Número de ufc/g de bacterias creciendo en agar nutritivo

Tabla B2. Análisis de varianza del número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de compost (ufc/g), en agar nutritivo

Tabla B3. Prueba de Tukey al 5% de significancia para el número de ufc/g de bacterias.

Tabla B4. Porcentaje bacterias creciendo en agar nutritivo

Tabla B5. Análisis de varianza del porcentaje de bacterias en agar nutritivo

Tabla B6. Número de colonias diferentes de bacterias creciendo en agar nutritivo

Tabla B7. Análisis de varianza del número de colonias diferentes de bacterias que crecieron en los platos de agar nutritivo

Tabla B8. Prueba de Tukey al 5% de significancia para número de colonias diferentes de bacterias que crecieron en los platos de agar nutritivo.

Tabla B9. Número de ufc/g de actinomicetes creciendo en agar GYM

Tabla B10. Análisis de varianza del número de unidades formadoras de colonias de actinomicetes en agar GYM

Tabla B11. Prueba de Tukey al 5% de significancia para el número de ufc/g de actinomicetes.

Tabla B12. Porcentaje de actinomicetes creciendo en agar GYM

Tabla B13. Análisis de varianza del porcentaje de actinomicetes en agar GYM

Tabla B14. Prueba de Tukey al 5% de significancia para el porcentaje de actinomicetes en agar GYM.

Tabla B15. Número de colonias diferentes de actinomicetes creciendo en agar GYM

Tabla B16. Análisis de varianza del número de colonias diferentes de actinomicetes que crecieron en los platos de agar GYM

Tabla B17. Prueba de Tukey al 5% de significancia para el número de colonias diferentes de actinomicetes que crecieron en los platos de agar GYM.

Tabla B18. Matriz de código binario usada para taxonomía numérica de los actinomicetes

Tabla B19. Matriz de código binario usada para taxonomía numérica de las bacterias

Tabla B20. Grupos especie formados luego del análisis de la taxonomía numérica de datos fenotípicos de los actinomicetes

Tabla B21. Grupos especie formados luego del análisis de la taxonomía numérica de datos fenotípicos de los actinomicetes de cada etapa degradativa

Tabla B22. Grupos especie formados luego del análisis de la taxonomía numérica de datos fenotípicos de las bacterias

Tabla B23. Grupos especie formados luego del análisis de la taxonomía numérica de datos fenotípicos de las bacterias de cada etapa degradativa

ANEXO C. GRÁFICOS

Figura C1. Evaluación de la temperatura en función del tiempo

Figura C2. Evaluación del pH en función del tiempo.

Figura C3. Comparación de las curvas de temperatura y pH del experimento preliminar.

Figura C4. Evaluación de la temperatura en el proceso de compostaje.

Figura C5. Evaluación del pH en el proceso de compostaje.

Figura C6. Comparación de las curvas de temperatura y pH registradas en el experimento final de compostaje.

Figura C7. Comparación de las curvas de ufc/g de muestra de bacterias y actinomicetes en función de cada una de las etapas de descomposición

Figura C8. Comparación de las curvas de porcentaje de bacterias y actinomicetes en función de cada una de las etapas de descomposición, por medio de aislamiento.

Figura C9. Comparación de las curvas de porcentaje de bacterias y actinomicetes en función de cada una de las etapas de descomposición, por población total

- Figura C10. Número de aislamientos de bacterias y actinomicetes durante las fases de descomposición
- Figura C11. Caracterización microscópica de las bacterias aisladas durante todo el proceso de descomposición
- Figura C12. Caracterización microscópica de las bacterias aisladas en cada una de las fases de descomposición
- Figura C13. Número de actinomicetes que crecieron usando aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno durante cada una de las fases de descomposición
- Figura C14. Número de actinomicetes que produjeron enzimas extracelulares durante las cuatro etapas de descomposición
- Figura C15. Número de bacterias que crecieron usando aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno durante cada una de las fases de descomposición
- Figura C16. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de los actinomicetes
- Figura C17. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de las bacterias
- Figura C18. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de los actinomicetes aislados en la etapa inicial
- Figura C19. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de los actinomicetes aislados en la etapa termofílica
- Figura C20. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de los actinomicetes aislados en la etapa estacionaria
- Figura C21. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de los actinomicetes aislados en la etapa final
- Figura C22. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de las bacterias aisladas en la etapa inicial
- Figura C23. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de las bacterias aisladas en la etapa termofílica
- Figura C24. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de las bacterias aisladas en la etapa estacionaria

Figura C25. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de las bacterias aisladas en la etapa final

ANEXO D. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Medios de Cultivo

Buffers

ANEXO E. PROTOCOLO DE CARACTERIZACION MICROSCOPICA

Tinción de Gram

Tinción de endosporas

Tinción de capsulas

ANEXO F. FOTOGRAFÍAS

ANEXO G. TABLA DE COLORES

RESUMEN

La presente investigación consistió en investigar la biodiversidad, el #ufc/g y el porcentaje de bacterias y actinomicetes de las diferentes etapas de compostaje de la materia orgánica. Para lograrlo se estudiaron los cambios de temperatura, pH, humedad y aireación, de 300Kg de residuos orgánicos compostados a nivel industrial. Para ello se aislaron y caracterizaron 244 actinomicetes de los cuales cincuenta y tres pertenecen a la etapa inicial, cincuenta y cuatro a la etapa termofílica, setenta a la etapa estacionaria y sesenta y siete a la etapa final. También se aislaron 41 bacterias, de las cuales ocho eran de la etapa inicial, nueve de la etapa termofílica, quince de la etapa estacionaria y nueve de la etapa final. Los actinomicetes fueron agrupados por similitud del color del micelio aéreo, sustrato y por presentar o no pigmento difusible, las bacterias no fueron agrupadas ya que las características morfológicas individuales eran únicas. Se formaron en total 26 grupos de color, de los cuales siete pertenecen a la etapa inicial y al etapa final, seis a la etapa termofílica y etapa estacionaria, de estos grupos se tomaron un total de setenta representantes, quince de la etapa inicial y termofílica, y veinte de la etapa estacionaria y final. Esto no sucedió con las colonias bacterianas ya que no se tomaron representantes, todas las 41 bacterias fueron sometidas a pruebas de evaluación. Se analizaron los datos fenotípicos mediante taxonomía numérica para poder evidenciar los grados de proximidad entre las distintas unidades taxonómicas, estableciendo coeficientes de similaridad o distancia. Con la realización del dendrograma global de todos los aislamientos de actinomicetes se pudo formar grupos-especies al 90% de similaridad muy definidos, comprobando que existe grupos-especie, específicos en cada etapa de compostaje, además con la formación de estos grupos-especie se pudo identificar los microorganismos similares que se encontraban al transcurrir el periodo degradativo. Por otra parte la realización del dendrograma global en base a los aislamientos de bacterias, permitió formar grupos- especies con individuos específicos para cada etapa. Los grupos-especie de bacterias y actinomicetes mostraron características morfológicas idénticas, lo que significa que a pesar que poseen características morfológicas similares, estos se encuentran taxonómicamente muy distanciados entre sí. El método cualitativo de la prueba de lugol que consistía en la formación de un halo alrededor de la colonia que haya metabolizado el carbohidrato, en este caso celulosa, almidón y quitina. Mostro claramente que el mayor porcentaje de bacterias y actinomicetes, produjeron enzimas extracelulares tales como; celulasas, quitinasas y amilasas, poniendo en manifiesto que la biodiversidad y el metabolismo de los microorganismos presentes en una pila de compost es muy amplia, pudiendo realizar aislamientos que favorezcan las investigaciones de microorganismos útiles en biotecnología.

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACION

1.1. Tema de Investigación

Caracterización e identificación preliminar de bacterias responsables de la descomposición de materia orgánica durante la fabricación de compost.

1.2. Planteamiento del problema

1.2.1. Contextualización

1.2.1.1. Macro

En el Ecuador el uso de abonos bien descompuestos se ha convertido en la base para el desarrollo de la agricultura orgánica, en la cual se consideran varios factores como el uso de la diversidad microbiana y el manejo ecológico del suelo (Brenes, 2003). El proceso degradativo de la materia orgánica es realizado por microorganismos representados por hongos, bacterias y actinomicetes. Involucra la transformación de macromoléculas complejas a sustancias simples, estables, y fácilmente asimilables por las plantas (Herrán *et al.*, 2008). En la descomposición de la materia orgánica, la humificación y mineralización, son procesos en los cuales materiales orgánicos, que son generalmente insolubles, se transforman a compuestos solubles asimilables por plantas y microbios. También como resultado se liberan o producen compuestos orgánicos útiles en agricultura como los ácidos húmicos, fúlvicos, y huminas (Guerrero, 1996)

1.2.1.2. Meso

En la provincia de Tungurahua la importancia de degradar materia orgánica radica en mejorar los procesos de humificación y mineralización, con el propósito de ayudar el intercambio de cationes y aniones en el suelo, ayudando en la retención, liberación y disponibilidad de nutrientes para la planta. También modifica la estructura del suelo, aumentando la fuerza de cohesión en suelos arenosos, y disminuyendo en suelos arcillosos (Tisdale y Nelson, 1966). Por otro lado, la incorporación de la materia orgánica al suelo mejora la retención del agua, estimula el desarrollo de la planta, disminuye la erosión, y eleva la capacidad tampón (Landeros, 1993). Aporta microelementos tales como Ca y Na en cantidades bajas, y es fuente de carbono para los microorganismos del suelo.

Por medio de su metabolismo aeróbico los microorganismos en la degradación de la materia orgánica, permiten el desprendimiento de CO₂ y H₂O. El proceso de descomposición depende de la relación C:N del sustrato. Relaciones C:N entre 25 hasta 30:1 son consideradas como óptimas para realizar la descomposición. La relación C: N no debe ser alta porque impide el desarrollo de

la población microbiana sin nutrientes adicionales, retrasando el proceso de descomposición. El nivel bajo de C:N permite la volatilización del nitrógeno en forma de amoníaco (NH₃), provocando pérdidas considerables de éste elemento y malos olores (Zhu, 2006).

1.2.1.3. Micro

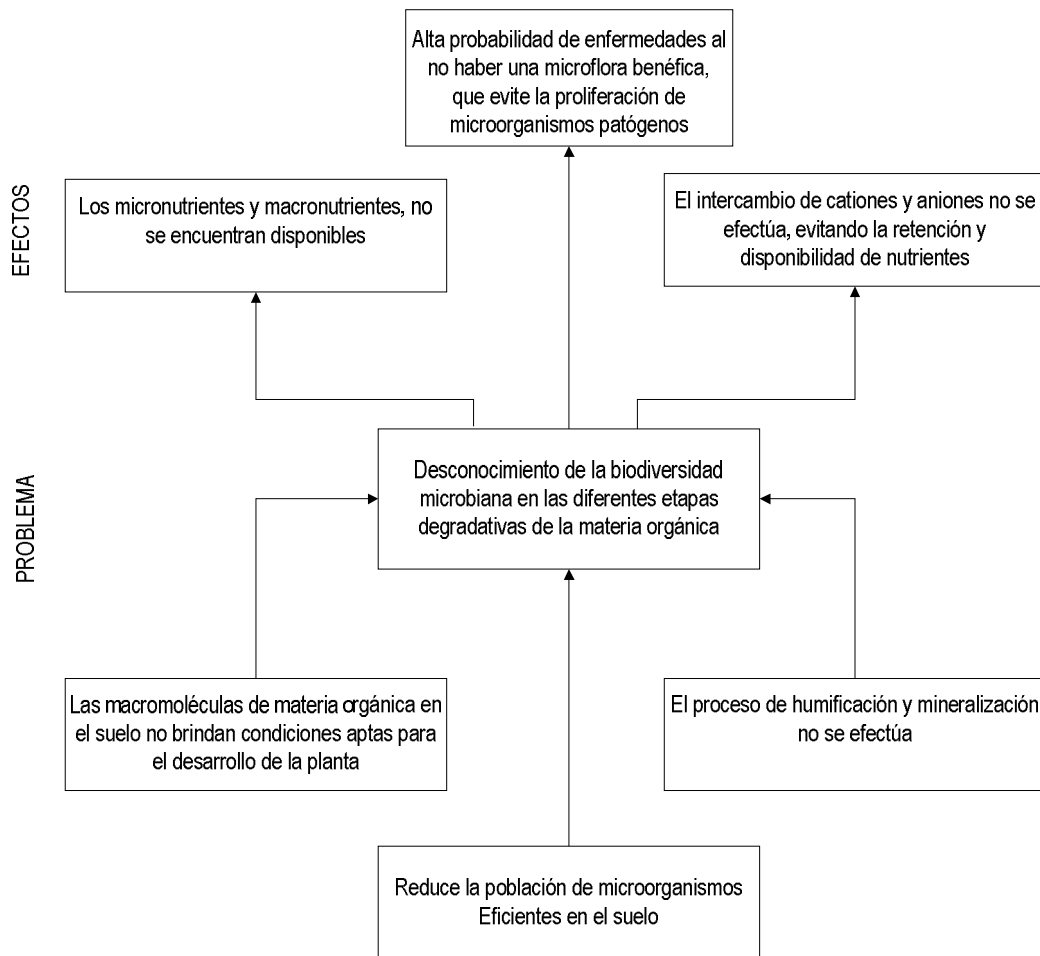
En Ambato la disponibilidad de residuos sólidos orgánicos sin tratar se ha convertido en la contaminación más importante en los últimos años, por tal motivo la identificación de bacterias degradadoras de materia orgánica, según Cariello *et al.* (2007), permiten acelerar el proceso degradativo del abono. Bacterias tales como *Bacillus subtilis*, y *Pseudomonas fluorescens*, son las encargadas de producir alfa amilasas que degradan el almidón, y que junto con bacterias termofílicas producen una diversidad de celulasas. Además, hongos como *Aspergillus fumigatus*, produce proteasas, glucoamilasas y pectinasas. La combinación de estos microorganismos eficientes (ME) reduce el tiempo de descomposición. El proceso es completado con la ayuda de bacterias fototróficas, lactobacilos, levaduras y hongos fermentativos, los que producen vitaminas, ácidos orgánicos, minerales quelatados y antioxidantes, que son producto de la descomposición final. Se ha demostrado también que un buen proceso de compostaje es capaz de controlar patógenos de plantas como *Sclerotinia*, *Phytophthora* y *Mycosphaerella*.

Desde el punto de vista bioquímico, el principal grupo de enzimas hidrolíticas producidas es el de las celulasas. Estas participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos β-1,4 presentes en los polisacáridos celulosa y hemicelulosa. Pueden convertir lignocelulosa en glucosa y azúcares solubles (Sarmiento *et al.*, 2003). Hongos como *Trichoderma reesei* ha mostrado ser uno de los mejores productores de celulasas extracelulares (Vilchez, 2000).

1.2.2. Análisis Crítico

1.2.2.1. Diagrama Causa – Efecto

Ver página siguiente



1.2.2.2. Prognosis

De no llegar a culminar el presente trabajo de investigación microbiológica, se desconocería la biodiversidad microbiana presente en las diferentes etapas de la descomposición de materia orgánica, impidiendo descubrir los distintos microorganismos que actúan en cada una. Además no permitiría conocer las bacterias y actinomicetes capaces de producir enzimas extracelulares, tales como celulasas y amilasas. Asimismo no permitiría obtener un banco de germoplasma de los diferentes aislamientos, capaces de acelerar el proceso degradativo, y se dificultaría la elaboración de un producto, compuesto por microbios eficientes (ME), que actúe como acelerador en el proceso de descomposición.

1.2.2.3. Formulación del problema

¿Es posible que las diferentes etapas de compostaje existan diferencias en la biodiversidad de las poblaciones microbianas presentes en cada una de ellas?

1.2.2.4. Interrogantes

¿Cómo se establece una pila de descomposición de materia orgánica?

¿Cómo se realiza el aislamiento de bacterias y actinomicetes?

¿Cómo se realiza la caracterización macroscópica y microscópica de los microorganismos?

¿Cómo se identifica los diferentes grupos de microorganismos capaces de producir enzimas extracelulares?

1.2.2.5. Delimitación

Campo: Investigación.

Área: Microbiología.

Sub aérea: Biotecnología.

Aspecto: Capacidad biodegradativa de los microorganismos.

Geográfica: Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato (UTA).

Temporal: Enero 2010 – junio 2010

1.3. Justificación

Microorganismos celulolíticos, particularmente representantes de bacterias y actinomicetes, tienen una importancia fundamental en la degradación de la materia orgánica, al reducir macromoléculas a moléculas simples, muchas de las cuales son asimilables por las plantas. Sin embargo, existen pocos estudios acerca de las características de los diferentes grupos de bacterias y actinomicetes que están involucrados en las diferentes etapas de la descomposición de la materia orgánica. Por ello, el presente trabajo está enfocado al aislamiento, caracterización e identificación preliminar de microorganismos involucrados en el proceso de compostaje. La importancia de esta investigación radica en conocer la diversidad de bacterias y actinomicetes, presentes en las diferentes etapas de la preparación de compost, aplicando experimentos para el aislamiento selectivo, y caracterización preliminar de los microorganismos aislados.

Los resultados de la presente investigación permitirán obtener datos básicos acerca de la fracción microbiana responsable en el proceso de compostaje. Por otro lado, se dispondrá de una diversidad de bacterias y actinomicetes en cultivo puro, comenzando así un banco de

germoplasma microbiano, cuyo potencial genético relacionado a la producción comercial de microorganismos eficientes (EM), podrá ser evaluado en futuras investigaciones.

1.4 Objetivos

1.4.1 General

- Caracterizar la fracción bacteriana responsable de la descomposición de materia orgánica durante la fabricación de compost.

1.4.2 Especificos

- Establecer una pila de descomposición de materia orgánica usando abono, cascarilla de arroz y plantas herbáceas para permitir el proceso de compostaje.
- Aislar bacterias y actinomicetes durante las diferentes etapas del compostaje.
- Caracterizar macroscópica y microscópicamente los diferentes cultivos de microbios aislados.
- Determinar la capacidad biodegradativa de bacterias y actinomicetes.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes Investigativos

2.1.1. Importancia de la descomposición de la materia orgánica

El uso de materia orgánica se ha convertido en la base para el desarrollo de la agricultura orgánica, basándose para ello en un manejo ecológico del suelo y nutrición, y en la diversidad estructural de la materia orgánica (Brenes, 2003). Para Gros & Rodríguez (1992), el nivel deseable de materia orgánica en suelos arcillosos es del 2%, en suelos pesados, 1.65%, y 2.5% en suelos arenosos. La materia orgánica del suelo contiene cerca del 5% de nitrógeno, elementos esenciales tales como, P, Mg, Ca, S, y micronutrientes (Graetz, 1997). Según Jhonstom (1991), para que los nutrientes de la materia orgánica estén disponibles en el suelo, deben pasar por procesos de oxidación química y biológica, los mismos que ocurren durante un proceso adecuado de descomposición.

El abono bien descompuesto mejora las propiedades químicas del suelo, favoreciendo la reserva de nutrientes para el desarrollo normal de la planta y la capacidad tampón. Facilita también la absorción de nutrientes a través de la membrana celular de las raicillas. Tiene efecto sobre las propiedades biológicas, facilitando el proceso de mineralización, ya que actúa como sustrato para el crecimiento y desarrollo de microorganismos, los que permiten el desdoblamiento de las macromoléculas de la materia orgánica, estimulando así un sistema ecológico equilibrado (Otiniano *et al.*, 2006).

Justus von Liebig (1843), demostró que las plantas precisan de agua y sustancias inorgánicas para su nutrición, en donde el N, P, K constituyen los principales elementos limitantes en el crecimiento de las plantas. Una baja disponibilidad de éstos en el suelo provoca desequilibrios en el vegetal que en muchas ocasiones provocan una predisposición al ataque de plagas y enfermedades. Nutrientes como ciertos minerales, ácidos húmicos y fúlvicos provenientes de la degradación de la materia orgánica, son indispensables para la fertilidad del suelo (Herran *et al.*, 2008).

En algunos sectores vitícolas de Italia, el uso continuo de abonos bien descompuestos en el cultivo de uva, mostró un incremento de materia orgánica en el suelo, fósforo disponible y potasio. También mejoró la porosidad y retención de agua. Las plantas de uva presentaron un follaje vigoroso con un incremento significativo en la producción. El potasio y ácido tartárico del mosto aumentaron significativamente, así como también los grados brix (Pinamonti, 1998), demostrando la importancia de la adición de materiales orgánicos descompuestos de buena calidad.

2.1.2. Descomposición de la materia orgánica

La obtención de abonos descompuestos por vía aeróbica se divide en cuatro fases. En la fase lenta, ocurre un incremento en el número de microorganismos, principalmente mesófilos productores de celulasas. En la siguiente fase, existe un aumento progresivo de la temperatura, debido a la presencia de microorganismos mesófilos aeróbicos con rangos de temperaturas de crecimiento entre 20 a 45°C. La fase termofílica se caracteriza por el incremento de la temperatura a 60°C, pudiendo llegar incluso a 70°C. Predominan principalmente bacterias termofílicas productoras de varias enzimas extracelulares, principalmente de celulasas y glucanasas. Requiere aireación y estabilización de la temperatura, para eliminar patógenos y reducir la pérdida de microorganismos benéficos. Durante la fase final ocurre la maduración, en donde se disminuye gradualmente la temperatura y la degradación de la materia orgánica. La fase de maduración es importante por que es la etapa donde se obtiene organismos antagónicos como bacterias, levaduras y hongos (Garboza & Silvera, 2002).

La materia orgánica al descomponerse pasa por procesos de humidificación y mineralización (Gros & Rodríguez, 1992). En la humidificación los microorganismos actúan sobre la materia orgánica produciendo ciertos compuestos tales como huminas, ácidos húmicos y fúlvicos, con relaciones C:N de 9 y 10, y que representan entre el 75 y 80% del humus total (Otiniano *et al.*, 2006). Las sustancias húmicas enlazan cationes divalentes M^{2+} antes que cationes monovalentes M^+ , evitando la contaminación de suelos que presenten aluminio en su estructura (Coyne, 2000). Por otro lado, la mineralización es lenta. Presenta dos etapas que comprenden, la amonificación, que es el paso del nitrógeno orgánico a amonio, y la nitrificación, que es el paso del amonio a nitrato (Otiniano *et al.*, 2006). El abono facilita la absorción de sustancia peligrosas como; pesticidas, clorofenoles o cloroanilinas (Vangestel, 1996).

Las moléculas orgánicas complejas de gran tamaño son degradadas por procesos hidrolíticos bióticos y abióticos en compuestos de bajo peso molecular, produciéndose una oxidación de los compuestos orgánicos hasta obtener los compuestos inorgánicos simples que los constituyen tales como: CO_2 , H_2S , NH_4^+ , PO_4^{3-} y H_2O que es lo que se conoce como mineralización (Alvarez & Biancucci, 2006).

Durante la descomposición de la materia orgánica los microorganismos transforman el residuo orgánico en presencia de oxígeno y producen biomasa, CO_2 y H_2O . Por lo tanto la disponibilidad de una cantidad adecuada de oxígeno es de gran importancia para el buen desarrollo del proceso, es decir, de la actividad de los microorganismos que lo llevan a cabo. El grado de degradación del material orgánico, es el resultado de la actividad metabólica de una población microbiana mixta, cuyo crecimiento y desarrollo está determinado por diferentes rangos de temperatura. La descomposición de la materia orgánica atraviesa un sistema trifásico: sólido, líquido y gaseoso. La fase sólida está representada por la partícula, constituida tanto por la fracción inorgánica como la fracción orgánica. La partícula interacciona con la fase acuosa que está adherida a su superficie formando una biopelícula con los microorganismos, donde tienen lugar todos los procesos biológicos. Este sustrato interacciona directamente con la fase gaseosa

donde ocurre un intercambio de gases tales como, O_2 y CO_2 . La biopelícula contiene sustrato soluble ya presente o que es producto de la hidrólisis microbiana del sustrato insoluble y de los gases desprendidos en la fase gaseosa. La fracción orgánica contenida en la biopelícula es oxidada por los microorganismos aeróbicos presentes. En la fase gaseosa externa, el oxígeno se difunde en la biopelícula gracias al gradiente de concentraciones creado por el consumo de oxígeno y por la producción de CO_2 por parte de la biomasa. En la biopelícula se distinguen dos zonas: una fina superficie externa, aeróbica y una capa interna, anaeróbica. En la zona anaeróbica el material insoluble se hidroliza enzimáticamente en sustrato soluble y después se transforma por medio de fermentaciones en diferentes productos como ácidos grasos, etc. Los productos resultantes de la fermentación, así como los hidrolizados, pueden ser oxidados después en la zona aerobia. Por lo tanto la presencia de oxígeno en concentraciones adecuadas permitirá la completa degradación de todos los compuestos orgánicos a CO_2 y H_2O (Barrera, 2006).

2.1.3. Biodiversidad de microorganismos relacionados a la descomposición de la materia orgánica.

Varios grupos de microorganismos son los responsables de la descomposición de la materia orgánica. Dentro de las bacterias se encuentran varios grupos, los que principalmente producen enzimas extracelulares como celulasas y glucanasas. Muchas de ellas son termofilicas formadoras de endosporas, siendo las principales responsables, junto con los actinomicetes, de elevar la temperatura durante la fase termofílica. Es posible mencionar que los principales grupos de bacterias aeróbicas mesofílicas y termofílicas son *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides succinogenes*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens* (Ramirez y Cocha, 2003). Bacterias fototrópicas como *Rhodobacter spaeroides* y *Rhodopseudomonas plastrus*, facilitan la formación de ácido giberélico. Por otro lado, bacterias ácido lácticas producen, ácido láctico a partir de los azúcares y carbohidratos, suprimiendo así ciertos patógenos. Facilitan la degradación de las macromoléculas como lignina y celulosa a moléculas simples (Alvarez & Biancucci, 2006). Las principales bacterias ácido lácticas presentes durante el compostaje son *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, y *Streptococcus lactis*.

Los actinomicetes utilizan compuestos carbonados y nitrogenados, como polisacáridos, lípidos, hidrocarburos saturados, fenoles, proteínas y quitinas, los que son degradados mediante la producción de lipasas, amilasas, glucanasas y otras enzimas. En el compost, actinomicetes termofílicos que predominan pertenecen principalmente a los géneros *Microbispora*, *Streptomyces* y *Thermomonospora*, los que degradan celulosa facilitando el proceso de compostaje (Ramirez y Cocha, 2003).

Los hongos también están involucrados en la degradación de polímeros como celulosa y lignina. Levaduras como *Candida utilis* y *Saccharomyces cerevisiae*, debido a la presencia de aminoácidos y azúcares, sintetizan sustancias antimicrobianas, así como también hormonas y enzimas que promueven la división celular. Las secreciones de las levaduras sirven como sustrato para estimular el crecimiento de bacterias ácido lácticas y actinomicetes (Carriello *et al.*,

2007). Hongos relacionados al proceso de compostaje presentan clamidosporas, diferentes tipos de cuerpos fructíferos y esclerocios. Es así que es posible encontrar hongos aeróbicos termófilos como *Humicola insolens*, *Sporotrichum thermophile* y *Thermoascus aurantiacus*, o hongos anaeróbicos mesófilos como *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis*.

2.1.4. Aislamiento de microorganismos durante el compostaje

Molano (2005), manifiesta que cada etapa degradativa del compost permite obtener distintos microorganismos, entre los cuales tenemos hongos, bacterias filamentosas o no filamentosas mesófilas o termófilas que muestran actividad metabólica sobre carbohidratos o fuentes de nitrógeno, debido a la producción de enzimas extracelulares capaces de desdoblar los carbohidratos como también las fuentes de nitrógeno. El proceso de selección microbiana inicia con la caracterización de los diferentes microorganismos que dominan cada etapa del proceso de compostaje. El proceso consiste en definir microorganismos capaces de degradar materia orgánica y compuestos fitosanitarios. Donde se aportan elementos nutricionales mínimos y que cuenta como única fuente de carbono y energía los compuestos fitosanitarios, transcurrida esta selección los microorganismos que han logrado crecer, se traspan a un medio sólido con características similares, permitiendo aislar y seleccionar los microorganismos idóneos para la degradación de este tipo de compuestos, a este tipo de organismos se les crece, en distintas concentraciones, para comprobar su capacidad degradadora sobre estos compuestos. Para el aislamiento de microorganismos degradadores de carbohidratos o aminoácidos, se utiliza este mismo procedimiento lo que cambia, es el sustrato por un aminoácido o carbohidrato (Froni, 1999).

El proceso de tratamiento de residuos sólidos orgánicos involucra parámetros, físicos, químicos y por supuesto microbiológicos, entre los parámetros físicos tenemos humedad, temperatura, oxígeno, y pH. En los parámetros químicos se considera el tipo y cantidad de nutrientes disponibles. El nivel microbiológico tiene una importancia relevante, debido a las reacciones químicas entre, hongos, bacterias y actinomicetes, que actúan como agentes degradadores de la materia orgánica (Molano, 2005).

La utilidad de residuos como sustrato, depende de la disponibilidad de sus elementos de cada macromolécula. Es muy frecuente que los microorganismos solo asimilen compuestos simples, por lo tanto, para que se aproveche una molécula compleja se tiene que romper la molécula en sus unidades constituyentes: Así las proteínas, en aminoácidos y estos en amoníaco, para ser asimilado. El mecanismo de rotura es la reacción enzimática, que es sintetizado por los microorganismos (Froni, 1999).

Un grupo microbiano importante, son los microorganismos ligninolíticos que cumplen un rol crucial en el proceso de compostaje, debido a su capacidad para degradar compuestos recalcitrantes como pesticidas o efluentes industriales. El aislamiento de microorganismos ligninolíticos se efectúa, sometiendo residuos lignocelulósicos a un proceso de compostaje, la intervención de los microorganismos ligninolíticos durante el compostaje es de suma importancia,

ya que contribuyen a incrementar la biodisponibilidad del sustrato favoreciendo así la humificación. Estas actividades son desarrolladas por microorganismos, mesófilos y termófilos (López *et al.*, 2005).

2.1.5. Determinación de la actividad amilolítica y celulolítica

2.1.5.1. Actividad amilolítica

Los microorganismos amilolíticos tienen gran importancia en procesos biotecnológicos, mediante la producción de enzimas extracelulares capaces de catalizar reacciones bioquímicas (Sarmiento *et al.*, 2003). El almidón principal polisacárido, que se compone de un polímero de glucosa compuesto de dos maneras, amilosa como molécula lineal, y la amilopectina como molécula ramificada. En la actualidad se han venido desarrollando procesos enzimáticos que permitan transformar el almidón en glucosa o fructosa, dando origen a nuevos productos con mayor poder edulcorante y menor costo en relación con el azúcar de caña. El proceso de hidrólisis enzimática del almidón hasta glucosa, se lleva a cabo en dos etapas, licuefacción y sacarificación, por lo que ha sido necesario cultivar y manipular microorganismos productores de enzimas amilolíticas (Sanchez *et al.*, 2005). La amiloglucosidasa, o alfa - 1,4 glucohidrolasa es una glucoproteína que contiene dos sitios activos unidos por un puente glicosilado compuesto por manosa, y galactosa, con un pH óptimo para la hidrólisis entre 4.3 y 4.5, y rompe fácilmente enlaces glicosídicos alfa- 1,4 y alfa - 1,6. Esta enzima extracelular es producida por los hongos *Aspergillus*, *Candida*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Saccharomyces*, y de los géneros bacterianos *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, y una glucoamilasa de *Flavobacterium* (Sarmiento *et al.*, 2003).

2.1.5.2. Aislamiento e identificación de cepas microbianas con actividad amilolítica

El crecimiento sobre medios de cultivo, donde la única fuente de energía sea el almidón, dan a evidenciar la respuesta positiva frente al prueba de lugol, permitiendo conocer si un microorganismo produce de forma extracelular amilasas capaces de degradar almidón. En la prueba cualitativa de lugol, se considera como positiva aquellas colonias que presentan la formación de un halo transparente alrededor de la colonia, luego de haber añadido lugol en la superficie del agar. El principio de esta prueba se basa en la incapacidad que presenta el lugol para pigmentar las zonas en la que el almidón ha sido hidrolizado por acción enzimática. Este fenómeno se observa cuando se expone el cultivo a acción del lugol durante un periodo aproximado de 3 minutos (Sanchez *et al.*, 2005).

2.1.5.3. Determinación de la actividad celulolítica

La celulosa es un importante polisacárido, que posee cadenas de glucosa unidas por puentes de hidrogeno, es el almacén de las paredes celulares, la degradación de la celulosa da como resultado moléculas de glucosa, la hidrólisis se da por reacción enzimática catalizado por celulasas (Gaitán y Pérez, 2007).

2.1.5.4. Actividad celulolítica

La endo B -1,4 glucanasa ataca los enlaces B-1,4 de la región interna de la macromolécula, como resultado se obtiene fragmentos solubles de oligosacáridos. La exo B – 1,4 glucanasa separa el disacárido celobiosa de los extremos de la macromolécula para luego ser consumido por la celulasa, la B – glucosidasas hidrolizan la celobiosa hasta glucosa (Ramirez y Coha 2003).

2.1.5.5. Prueba cualitativa de rojo congo

Para la determinación cualitativa de actividad celulolítica se utiliza medios de cultivo, que contengan celulosa para permitir estimar cualitativamente la producción de enzimas extracelulares. El fundamento de esta prueba es que permite evidenciar la hidrólisis de polisacáridos debido a que el colorante forma complejos con las moléculas no hidrolizadas, facilitando diferenciar entre un microorganismo celulolítico y un no celulolítico, por la formación de un halo alrededor de la colonia bacteriana (Gaitán y Pérez, 2007).

2.1.6. Fundamentos de taxonomía numérica microbiana

La taxonomía es la ciencia de la clasificación constituida por dos sub disciplinas principales, la identificación y la nomenclatura. La taxonomía se basa en análisis fenotípicos para la clasificación, pero debido al pequeño tamaño de las bacterias y a su estructura, aporta relativamente poca información sobre sus raíces evolutivas. Las relaciones filogenéticas entre los procariotes se conoce a partir de los análisis genotípicos (Stanier *et al.*, 1996).

En microbiología la unidad taxonómica básica es la especie, una especie procarote puede definirse de manera más precisa a partir de las secuencias de ARNr, si dos procariotes cuyo ARNr 16S tenga un 97% o más de secuencias idénticas es muy probable que pertenezcan a la misma especie. Los géneros se agrupan en familias, las familias en órdenes, y los órdenes en divisiones hasta alcanzar el nivel taxonómico más alto que es el dominio. En taxonomía microbiana a los caracteres morfológicos se les puede añadir criterios bioquímicos, químicos y genéticos (Stanier *et al.*, 1996).

2.1.6.1. Coeficientes que se usan para analizar datos de taxonomía numérica

Con el objetivo de evaluar objetivamente la similaridad entre microorganismos, se hace necesario establecer coeficientes numéricos que dan cuenta de los grados de proximidad entre las distintas unidades taxonómicas, estas unidades se denominan OTUs, o unidades operativas taxonómicas que pueden establecer coeficientes de similaridad o distancia. Los métodos numéricos son procedimientos matemáticos que permiten cuantificar el parecido entre unidades taxonómicas, tomando en cuenta los niveles de los caracteres observados. El más utilizado es el SSM, que es el coeficiente de concordancia simple, que se define como la proporción de características que coinciden entre dos OTUs. Este método se utiliza para variables cualitativas.

Este índice toma valores de 0 o 1 indistintamente, donde cero significa ningún patrón en común y uno significa patrones idénticos (Stanier *et al.*, 1996).

Su fórmula es la siguiente:

$$SSM (X1 - X2) = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

Donde:

X1 – X2 = Son las dos especies comparadas.

a= Número de lugares donde tanto X1 como X2 se ha encontrado.

b = Número de lugares donde X1 se ha encontrado pero X2 no.

c = Número de lugares donde X2 se ha encontrado pero X1 no

d= Número de lugares donde X1 y X2 no se ha encontrado.

2.1.7. Uso de microorganismos eficientes en el proceso de descomposición

Los microorganismos eficientes EM, consiste en un cultivo mixto de organismos benéficos, que son aplicados como inoculantes en el suelo o en la fabricación de una pila de compost, con el propósito de incrementar la diversidad microbiana. Los EM contienen especies seleccionadas de microorganismos tales como: bacterias ácido lácticas, bacterias fotosintéticas, levaduras, hongos y actinomicetes. Los cuales deben coexistir en un cultivo líquido (Herrán *et al.*, 2008).

En las plantas los microorganismos eficientes generan un mecanismo de supresión de insectos y enfermedades, consumen los exudados de raíces, hojas, flores y frutos, evitando la propagación de organismos patógenos y desarrollo de enfermedades. Favorecen la floración, fructificación y maduración, por poseer efectos hormonales en zonas meristemáticas. En la degradación de la materia orgánica permiten acelerar el proceso degradativo, además mejoran las características físicas, químicas y biológicas. La aplicación de materia orgánica con microorganismos eficientes ayuda a controlar las poblaciones de microorganismos patógenos, permitiendo el desarrollo ideal de las plantas (Garboza & Silvera, 2002).

2.2. Fundamentación filosófica

La presente investigación se basa en el paradigma positivista, que tiene como escenario de investigación un diseño preestructurado y esquematizado. Según Reichart y Cook (1986), su lógica de análisis está orientada a lo confirmatorio, reduccionista, verificación, inferencial e hipotético deductivo mediante el análisis respectivo. Además la realidad es única y fragmentable en partes que se pueda manipular independientemente, y la relación sujeto-objeto es independiente por este enfoque, la realidad es algo exterior, ajeno, objetivo, puede y debe ser

estudiado y por lo tanto considerado. La importancia de esta investigación radica en poder saber qué tipo de microorganismos actúan en cada fase degradativa del compostaje. Los aislamientos microbianos de cada fase son de suma importancia en biotecnología, ya que permitiría obtener una biodiversidad microbiana útil para investigaciones científicas futuras.

2.3. Fundamentación legal

2.3.1. Norma de calidad ambiental para el manejo y disposición final de desechos sólidos

La presente norma técnica es dictada bajo el amparo de la ley de Gestión Ambiental y del Reglamento a la Ley de Gestión Ambiental para la prevención y control de la contaminación ambiental y se somete a las disposiciones de éstos, es de aplicación obligatoria y rige en todo el territorio nacional. Esta norma establece los criterios para el manejo de los desechos sólidos no peligrosos, desde su generación hasta su disposición final.

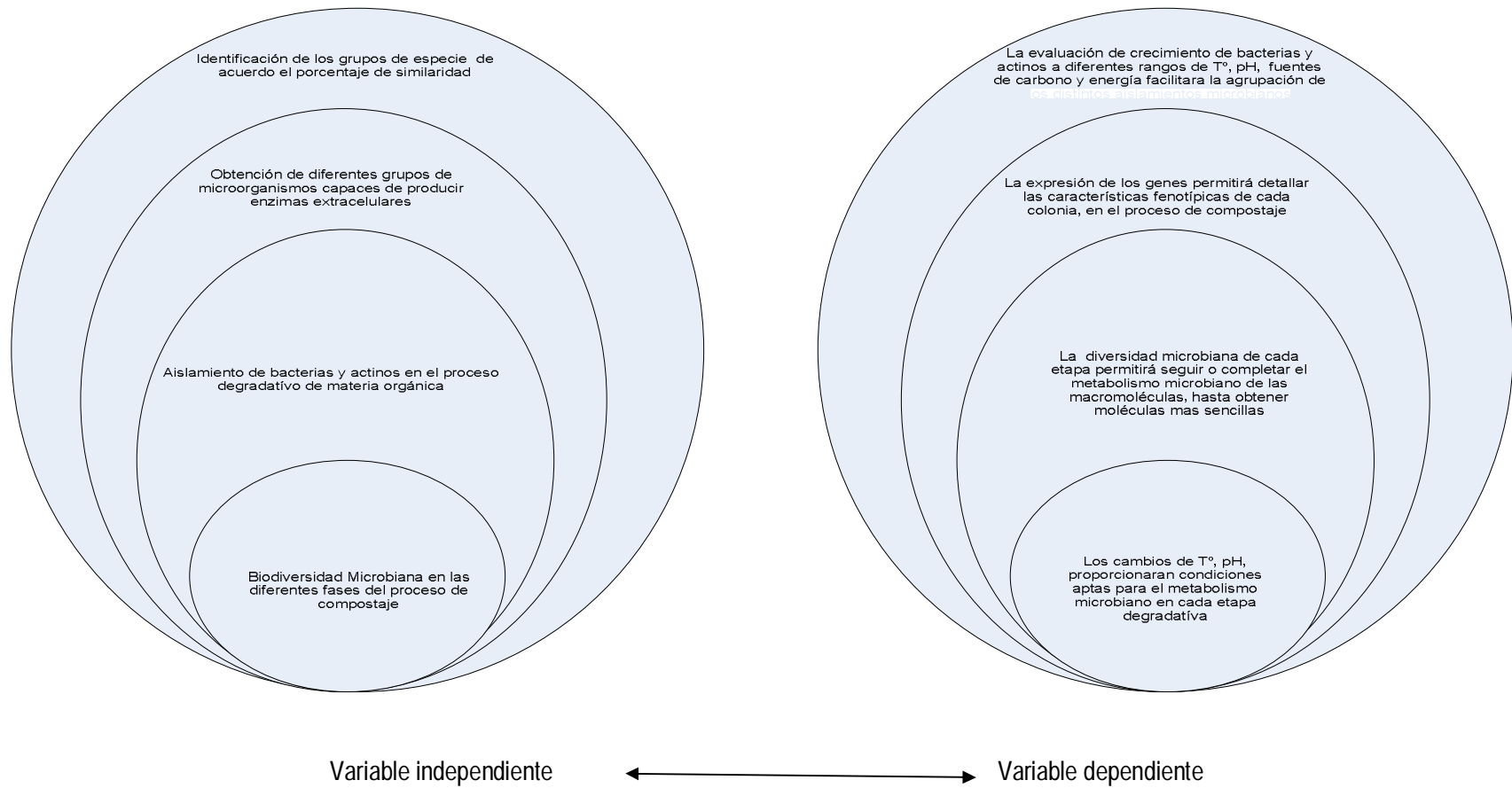
Las actividades de manejo de desechos sólidos deberán realizarse en forma tal que se eviten situaciones como:

Contaminación del aire, suelo o agua.

Generación de olores objetables, polvo y otras molestias.

Disposición final no sanitaria de los desechos sólidos.

2.4. Categorías fundamentales



2.5. Hipótesis

2.5.1. Hipótesis nula

No existen diferencias en la población y diversidad de los grupos-especie de bacterias y actinomicetes durante las diferentes etapas del proceso de compostaje.

2.5.2. Hipótesis alternante

Existen diferencias en la población y diversidad de los grupos-especie de bacterias y actinomicetes durante las diferentes etapas del proceso de compostaje.

2.6. Señalamiento de variables de las hipótesis

- Número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de compost (ufc/g)
- Número de ufc/g de compost de actinomicetes
- Porcentaje de actinomicetes
- Caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos
- Rango de crecimiento relacionado a temperatura
- Rango de crecimiento relacionado a pH
- Diferentes aminoácidos como única fuente de energía y materia.
- Perfil metabólico de uso de carbohidratos
- Análisis de composición nutricional del compost en sus diferentes fase

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1. Enfoque

La investigación tuvo un enfoque predominantemente cuantitativo.

3.2. Modalidad básica de la investigación

Experimental

3.3. Nivel o tipo de investigación

Básica exploratoria

3.4. Población y muestra

Se estableció una pila de compost de aproximadamente 300 Kilogramos, a partir de la cual se tomaron muestras representativas durante las cuatro fases de descomposición.

3.5. Operacionalización de variables

Ver página siguiente.

3.6. Recolección de Información

3.6.1. Experimento preliminar

Un experimento preliminar se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la UTA. El experimento consistió en determinar la variación de temperatura y pH durante el proceso del compostaje de materia orgánica, para poder identificar las diferentes fases en la descomposición. Con las cantidades establecidas en la Tabla 1 se obtuvo una relación C: N de 24:1. Los datos de temperatura y pH se tomaron cada 2 días. Cada semana se realizó la remoción de la materia orgánica, con el propósito de permitir la entrada de oxígeno, y facilitar así la descomposición aeróbica de los materiales. Durante la duración del ensayo preliminar se registraron los valores diarios de temperatura y pH. El experimento fue establecido para determinar la delimitación de las cuatro fases de la descomposición de materia orgánica, esto es, la fase inicial, termofílica, estacionaria, y finalmente la de descenso o maduración.

HIPOTESIS	VARIABLE	CONCEPTO	INDICADORES	INDICES	INSTRUMENTOS	
No existen diferencias en la población y diversidad de los grupos-especie de bacterias y actinomicetes durante las diferentes etapas del proceso de compostaje.	Dependiente	Población y diversidad microbiana durante las diferentes fases de compostaje	Población microbiana	Número de ufc/g	Calculadora Software estadístico NTSys. Microsoft Excel.	
			Grupos especie identificados en los dendrogramas respectivos de acuerdo al porcentaje de similitud	Similitudes mayores al 80% indican miembros de un mismo grupo especie		
	Independientes	Temperaturas durante las diferentes fases de descomposición. Cambios de pH durante las diferentes fases de descomposición. Características fenotípicas como producto de la expresión visible de los genes de cada individuo.	Temperatura	Temperatura	Valores en °C	Termómetro
			pH	pH	Valores entre 0 y 14	pHmetro digital
			Características macroscópicas	Características macroscópicas	Coloración del micelio del sustrato, esporas y cualquier producción de pigmento difusible	Microsoft Excel.
					Presencia o ausencia de micelio aéreo. Evaluación por código binario. Presencia =1. Ausencia = 0	Microsoft Excel.
		Características microscópicas	Características microscópicas	Tipo de morfología de la cadenas de esporas (Tabla 1). Tinción gram. Endosporas y cápsulas	Microscopio	
		Características fisiológicas de crecimiento a diferentes rangos de temperatura y pH	Características fisiológicas de crecimiento a diferentes rangos de temperatura y pH	Presencia o ausencia de crecimiento. Evaluación por código binario. Presencia =1. Ausencia = 0		

3.6.2. Experimento final.

Luego de haber identificado las cuatro etapas de compostaje en el experimento preliminar, se procedió a elaborar una nueva pila de compost a nivel industrial, de aproximadamente 300 kilogramos, la cual sirvió para el muestreo de cada etapa degradativa, permitiendo los aislamientos selectivos de bacterias y actinomicetes. El compostaje fue establecido en la parroquia urbana de Pelileo Grande, cantón San Pedro de Pelileo. Se usaron materiales que comúnmente se encuentran disponibles en la zona. Los materiales, cantidades que se usaron y la relación C/N están descritos en la Tabla 2. A partir de ésta pila se procedió a aislar bacterias y actinomicetes de las etapas inicial, termofílica, estacionaria, y final, determinadas durante el proceso de compostaje. Para ello, se tomaron los registros de temperatura y pH durante 50 días, que corresponde a la duración total del experimento final.

Tabla 1. Materiales utilizados durante el experimento preliminar de descomposición

Material	C/N	%N	Cantidad (g)	% Humedad	Nitrógeno (g)	Carbono (g)
Abono de cuy	12/1	4,00%	250	30,00%	7,000	84,000
estiércol de ganado vacuno	19/1	2,00%	300	30,00%	4,200	79,800
Lechuga	25/1	2,00%	100,86	50,00%	1,009	25,215
Malas hierbas	35/1	0,90%	129,87	50,00%	0,584	20,455
cebolla	15/1	2,65%	100	65,00%	0,928	13,913
tierra	40/1	1,00%	750	20,00%	6,000	240,000
cáscara de papa	25/1	1,00%	95,6	35,00%	0,621	15,535
alfalfa	15/1	2,70%	77,96	50,00%	1,052	15,787
césped	40/1	1,50%	49,87	30,00%	0,524	20,945
					21,918	515,649
				Relación C/N		24

Tabla 2. Materiales utilizados durante el experimento final de compostaje

Material	C/N	%N	Cantidad (Kg)	% Humedad	Nitrógeno (Kg)	Carbono (Kg)
abono de cuy	12/1	4,00%	50	30,00%	1,400	16,800
estiércol de ganado vacuno	19/1	2,00%	100	30,00%	1,400	26,600
cascarilla	120/1	0,30%	150	5,00%	0,428	51,300
Malas hierbas	35/1	0,90%	5	50,00%	0,023	0,788
alfalfa	15/1	2,70%	10	50,00%	0,135	2,025
césped	40/1	1,50%	10	30,00%	0,105	4,200
					3,490	101,713
				Relación C/N		29

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Los materiales fueron homogenizados y cortados a pedazos pequeños. Posteriormente se mezclaron en forma uniforme, y se humedecieron en 40 litros de agua con melaza (1 litro melaza por cada 20 litros agua). Finalmente se procedió a realizar una pila de aproximadamente 1 metro de alto, la misma que se cubrió con un plástico negro. Datos de temperatura y pH fueron recolectados diariamente. Para la determinación de la temperatura se utilizó un termómetro de mercurio el cual fue colocado en el interior de la materia orgánica durante 30 minutos. La determinación de pH se explica en detalle más adelante.

En función del registro de temperatura se identificó las diferentes fases en la descomposición de la materia orgánica. Para cada una de las fases, esto es, inicial, termofílica, estacionaria, y final, se procedió a recolectar una muestra compuesta. Para ello, con la ayuda de un barreno estéril se tomó varias muestras individuales en la pila de compost, para preparar la compuesta, representativa de cada etapa. Esta fue colocada en un frasco estéril y transportada a los laboratorios de la FCIAL para su análisis.

3.6.2.1. Recolección de muestras

Se recolectaron cuatro muestras compuestas, representativas de cada una de las fases de descomposición. La primera muestra se recolectó al establecimiento del experimento, que

correspondió a la fase inicial de descomposición. La segunda muestra se recolectó luego de que se llegó al final de la fase estacionaria, esto es el día 23. La tercera muestra correspondió al final de la fase estacionaria y se recolectó en el día 25, y finalmente la última muestra fue recolectada el día 50, al final de la toma de datos y por ende el final de la fase de maduración del proceso de descomposición.

3.6.2.2. Determinación del pH de las muestras

Para determinar el pH de las muestras, se pesaron 20 gramos de suelo, los que fueron colocados en un vaso de precipitación de 100 ml. Luego se añadió 50 ml de agua destilada, y se mezcló con una cuchara por el lapso de 5 minutos. Las muestras se dejaron en reposo por una hora, y una vez transcurrido ese tiempo, se procedió a tomar las lecturas correspondientes de las muestras, con la ayuda de un pH-metro.

3.6.3. Aislamiento selectivo de microorganismos

3.6.3.1. Determinación de la población y diversidad bacteriana

Cada una de las muestras fue usada para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFCs) por gramo de muestra, el porcentaje y la diversidad de bacterias. Para ello se usó el método de difusión en placa y diluciones. Para preparar la dilución 1/10 se pesaron 10 gramos de suelo, los que se colocaron en una botella que contenía 90 ml de agua de llave estéril. La suspensión resultante fue agitada por 1 hora. Una vez transcurrido éste tiempo se prepararon las diluciones 1/10², 1/10³, 1/10⁴, 1/10⁵ y 1/10⁶. Cien microlitros (100 µl) de las diluciones 1/10³, 1/10⁴, 1/10⁵ y 1/10⁶ fueron colocados y extendidos por duplicado, sobre la superficie de cajas petri que contenían agar nutritivo suplementado con nistatin, a una concentración de 75 µg/ml, y ajustado su pH a 7.0. Las cajas inoculadas fueron incubadas a 26°C por una semana. Luego de la incubación se procedió a contar el número de colonias de bacterias y actinomicetes presentes en cada una de las cajas. Además se anotó el número de colonias diferentes. El número de ufc por gramo de suelo fue calculado para aquellas diluciones en las que el número de colonias se encuentre en un rango entre 30 hasta 300, usando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g suelo} = \frac{N \times FD \times Vt}{Vi \times S}$$

Fuente: Rodríguez (2004)

Donde:

N Número de colonias

FD Dilución en la cuál se contó N (Ej: Cuento realizado en la dilución $1/10^3$, $FD = 1 \times 10^3$).

Vt Volumen de la dilución 1/10, en mililitros

Vi Volumen inoculado en mililitros

S Cantidad de suelo utilizada para preparar la dilución 1/10

3.6.3.2. Determinación de la población y diversidad de actinomicetes

Para preparar la dilución 1/10 se pesaron 10 gramos de suelo, los que se colocaron en una botella que contenía 90 ml de agua de llave estéril. La suspensión resultante fue agitada por 1 hora. Una vez transcurrido éste tiempo se preparo la dilución $1/10^2$, la que se coloco en un baño maría a 55°C por 6 minutos. A partir de ésta se prepararon las diluciones $1/10^3$, $1/10^4$ y $1/10^5$. Cien microlitros ($100 \mu\text{l}$) de las diluciones $1/10^2$, $1/10^3$, $1/10^4$, y $1/10^5$ fueron colocados y extendidos por duplicado, sobre la superficie de cajas petri que contenían agar glucosa extracto de levadura extracto de malta (agar GYM, Anexo D) suplementado con nistatin, a una concentración de $75 \mu\text{g/ml}$, y rifampicina ($5 \mu\text{g/ml}$), y ajustado a pH 5.5. Las cajas inoculadas fueron incubadas a 26°C por dos semanas. Luego de la incubación se procedió a contar el número de colonias de bacterias y de actinomicetes presentes en cada una de las cajas. Además se anoto también el número de colonias diferentes de actinomicetes y de bacterias. El número de ufc/g de suelo fue calculado de la misma manera descrita anteriormente.

3.6.3.3. Porcentaje de bacterias y actinomicetes

Inicialmente, con los resultados del número de ufc/g de bacterias y actinomicetes obtenidos tanto en AN, y en agar GYM, se procedió a calcular el porcentaje de cada grupo. En el caso de bacterias se usaron solo los datos obtenidos en AN. En el caso de los actinos, se utilizó los datos de agar GYM. La segunda determinación del porcentaje se realizó considerando que el 100% de la población correspondía a la sumatoria del número de ufc/g calculados para cada grupo en su respectivo medio de aislamiento selectivo.

3.6.4. Aislamiento y purificación de microorganismos

Los platos que presentaron crecimiento visible y diversidad de colonias de bacterias y actinomicetes se escogieron para proceder con el aislamiento y purificación de las cepas. Con la ayuda de un palillo estéril se tomo una colonia, para inocularla mediante estría simple en platos tetrapetri que contengan agar GYM o agar nutritivo AN, para aislar actinomicetes y bacterias, respectivamente. Los platos fueron incubados a 28°C por dos semanas (GYM), y 72 horas (AN). Aquellos cultivos que estaban puros fueron repicados en estría compuesta en nuevos platos con medio de cultivo.

3.6.5. Caracterización macroscópica de los aislamientos

Los cultivos puros obtenidos se agruparon de acuerdo a la coloración y morfología de las colonias. Para la determinación del color del micelio del sustrato, micelio aéreo y pigmento difusible se utilizó una tabla de colores (Anexo G), estableciendo grupos de color mediante la determinación de similitud en sus pigmentaciones.

3.6.6. Caracterización microscópica

Los microorganismos aislados fueron usados para preparar muestras que se observaron bajo el microscopio. Para las bacterias se determinó tinción de Gram, presencia de endosporas y cápsulas (Anexo E). En el caso de los actinomicetes se determinó la morfología del micelio aéreo de acuerdo a las características que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de los diferentes tipos de morfología de las cadenas de esporas

SÍMBOLO	TIPO	DESCRIPCIÓN
S	Espiral	Cadenas de esporas formando espirales abiertas o cerradas en el micelio aéreo
R	Rectas	Cadenas de esporas rectas, cortas o largas.
RA	Incompletas	Cadenas de esporas en forma de ganchos, espirales incompletas, o onduladas.
E	Esporangios	Estructuras en forma de saco o bolsa que contiene en su interior esporas.
M	Esporas simples	Esporas individuales aparecen en las hifas del micelio aéreo.

3.6.7. Caracterización bioquímica y fisiológica de los aislamientos

3.6.7.1. Rango de crecimiento en función de la temperatura

Se inocularon 5 µl de suspensiones de esporas previamente preparadas, sobre la superficie de agar GYM y AN, para actinomicetes y bacterias, respectivamente. Los platos inoculados fueron incubados a una temperatura de 50°C, 37°C y 4°C durante 2, 4 y 5 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluaron las cajas para observar el crecimiento de los actinomicetes y bacterias, el mismo que se evaluó mediante código binario. Al actinomicete o bacteria que presentó crecimiento, se le asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

3.6.7.2. Rango de crecimiento en función del pH

Se inocularon 5 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de agar GYM o AN, para actinomicetes y bacterias, respectivamente, ajustado a los pHs 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, y 9.5. El pH se ajustó con la ayuda de sistemas de búferes (Anexo D), evitando cambios en el pH debido al metabolismo de los microorganismos. Las cajas se incubaron a 26°C durante 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluaron las cajas para observar el crecimiento de los actinomicetes y bacterias, el mismo que se evaluó mediante código binario. Al actinomicete o bacteria que presentó crecimiento, se asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

3.6.7.3. Aminoácidos como fuentes de carbono y energía

Se determinó la capacidad de utilización de distintos aminoácidos como fuentes de carbono y energía por los microorganismos. Se utilizaron los siguientes aminoácidos: treonina, alanina, valina, tirosina, glicina. Para la preparación del medio de cultivo se utilizó un medio basal (Anexo D). Sobre la superficie del medio se inocularon 5 µl de las suspensiones de esporas. Las cajas se incubaron durante siete días a 26°C. Posteriormente, se evaluaron las cajas tomando en cuenta la presencia o ausencia de crecimiento. Al actinomicete o bacteria que presentó crecimiento, se asignó 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

3.6.7.4. Perfil metabólico de carbohidratos

Se determinó la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas para la utilización de los carbohidratos almidón, celulosa, y quitina. Para la preparación del medio de cultivo se utilizaron los polisacáridos mencionados anteriormente, los que fueron añadidos a agar GYM y AN, para dar una concentración final de 1% (p/v) de cada uno de ellos. Sobre la superficie del medio estéril se inocularon 5 µl de las suspensiones de esporas o células. Las cajas se incubaron durante siete días a 26°C. Posteriormente, se evaluaron tomando en cuenta la presencia o ausencia de halos alrededor del sitio de inoculación. En el caso del almidón se cubrió la superficie de la caja con lugol para observar la producción del halo. La evaluación fue realizada

mediante código binario. La presencia del halo fue asignada como 1, en caso contrario, es decir, ausencia de halo, 0.

3.7. Procesamiento y análisis

3.7.1. Diseño experimental

Se implementó un diseño completamente al azar (DCA), con un solo factor de estudio, donde se analizó la población y diversidad microbiana en cada fase de descomposición de la materia orgánica. Los niveles del factor de estudio fueron los siguientes:

A0: Etapa Inicial

A1: Etapa Exponencial

A2: Etapa Estacionaria

A3: Etapa de Descenso

Luego se realizó un análisis de varianza para la población de bacterias y actinomicetes, porcentaje de bacterias y actinomicetes, y diversidad microbiana. En caso de encontrar diferencias significativas entre los tratamientos se procedió a separar las medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia.

3.7.2. Identificación de las fases de compostaje

Tanto para el experimento preliminar como para la pila de compostaje se procedió a realizar un gráfico con los datos diarios de temperatura y el pH, en función del tiempo. Las diferentes fases fueron determinadas de acuerdo a las temperaturas alcanzadas.

3.7.3. Población, porcentaje y diversidad de microorganismos

Con los números de ufc/g de la muestra y con los datos de diversidad de colonias se realizó un análisis de varianza estableciendo la existencia de diferencias significativas, luego se separó las medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia.

3.7.4. Formación de grupos de color

Los datos de color de la parte aérea, reverso de la colonia y pigmento difusible fueron usados para agrupar a todos los cultivos de actinomicetes similares en los denominados grupos de color.

3.7.5. Taxonomía numérica de datos fenotípicos

Con los resultados de las pruebas fenotípicas se construyó una base de datos, en código binario, con el número de pruebas o características estudiadas. Las codificaciones respectivas para los datos obtenidos de actinomicetes y bacterias se encuentran reportadas en las Tablas 4 y 5, respectivamente. La información fue procesada en el software estadístico NTSys, en el que primeramente se calcularon los porcentajes de similitud entre los actinomicetes estudiados,

usando el coeficiente de simple coincidencia (S_{SM}). Finalmente los porcentajes fueron utilizados para construir un dendrograma mediante el uso del algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) del mismo programa. Una vez obtenido éste gráfico, se identificó los grupos especie basados en un coeficiente de similitud mayor al 90%, y se determinó el número, distribución y diversidad durante las diferentes etapas del compostaje.

Tabla 4. Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica de datos fenotípicos para los actinomicetes.

Número Prueba	Prueba	Descripción	Código
1	pH	Crecimiento en medio de cultivo al pH respectivo ajustado con búfers	3,5
2			4,5
3			5,5
4			6,5
5			7,5
6			8,5
7			9,5
8	Temperatura	Agar GYM incubado a las temperaturas respectivas	4 °C
9			37 °C
10			50 °C
11	Hidrólisis	celulosa	Cel
12		quitina	Qui
13		almidón	Alm
14	Fuente única de carbono y nitrógeno	tirosina	Tyr
15		glicina	Gli
16		treonina	Tre
17		valina	Val
18		alanina	Ala
19	Producción de	micelio aéreo	Mar
20		pigmento difusible	Pdf

Fuente: Rodríguez (2004)

Tabla 4. Continuación....

Número Prueba	Prueba	Descripción	Código
21	Color micelio aéreo	367 manilla	Mll
22		365 vellum	Vll
23		217 sea green	Sgr
24		white	Whi
25		384 light straw	Lst
26		356 golden yellow	Gye
27		352 pale cream	Pcr
28		447 salmon pink	Spi
29		568 (368) apricot	Apr
30		Color micelio sustrato	320 (410) light brown
31	358 light buff		Lbu
32	218 grass green		Ggr
33	352 pale cream		Pcr
34	593 rail red		Rre
35	568 (368) apricot		Apr
36	363 bold yellow		Bye
37	107 srtrong blue		Sbl

Fuente: Rodríguez (2004)

Tabla 5. Codificación de la información para las pruebas de taxonomía numérica de datos fenotípicos para las bacterias.

Número Prueba	Prueba	Descripción	Código
1	pH	Crecimiento en medio de cultivo al pH respectivo ajustado con búfers	3,5
2			4,5
3			5,5
4			6,5
5			7,5
6			8,5
7			9,5
8	Temperatura	Agar AN incubado a las temperaturas respectivas	4 °C
9			37 °C
10			50 °C
11	Hidrólisis	celulosa	Cel
12		quitina	Qui
13		almidón	Alm
14	Fuente única de carbono y nitrógeno	tirosina	Tyr
15		glicina	Gli
16		treonina	Tre
17		valina	Val
18		alanina	Ala
19	Color de la colonia	568 (368) apricot	Apr
20		352 pale cream	Pcr
21		White	Whi
22		363 bold yellow	Bye

Fuente: Rodríguez (2004)

Tabla 5. Continuación.....

Número Prueba	Prueba	Descripción	Código
23	Forma de la colonia	circular	Cir
24		irregular	Irr
25		lobulada	Lob
26		ramificada	Ram
27	Caracterización microscópica	bacilar	Bac
28		cocoide	Coc
29		gram positiva	Gpo
30		gram negativa	Gne
31		cápsulas	Cap
32		endosporas	End

Fuente: Rodríguez (2004)

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis de los Resultados

4.1.1. Experimento preliminar

4.1.1.1. Determinación de la temperatura

En la Tabla A1 (Anexo A), se muestra los datos de variación de temperatura del experimento preliminar, donde se puede identificar claramente las cuatro fases de la descomposición de la materia orgánica. Al establecimiento del experimento preliminar, la temperatura inicial fue de 22 °C, llegando en dos semanas a 40°C, luego descendió a 33 °C al finalizar el mes de compostaje. En la Figura C1 (Anexo C), se muestra la curva de temperatura en función del tiempo, donde se observa claramente las cuatro etapas. La etapa inicial fue la más larga, ya que duro trece días (Tabla A2, Anexo A). No se registraron mayores variaciones de temperatura durante este tiempo. Las siguientes dos etapas transcurrieron rápidamente, llegando a la fase final de maduración en siete días, la temperatura alcanzada de 40°C fue la ideal logrando eliminar patógenos gracias a que se proliferaron microorganismos termofílicos antagonicos.

4.1.1.2. Determinación del pH

En la Tabla A3 (Anexo A), se muestra los datos de pH del experimento preliminar. El valor inicial de pH fue de 9.1. Durante toda la etapa inicial, los valores de pH fluctuaron entre valores altos y bajos, entre 8.6 y 9.1. Sin embargo, todo lo contrario se puede observar durante la fase termofílica (días 14-16), en donde el pH disminuye drásticamente durante la etapa (Figura C2, Anexo C). Finalmente, la tendencia de los valores de pH durante las fases estacionarias y de maduración fue hacia valores más bajos que los registrados al inicio. El valor final medido al día 30 fue de 8.3. La Figura C3 (Anexo C), muestra la comparación de las curvas de temperatura y pH en función del tiempo. Claramente se puede observar el efecto del incremento de la actividad microbiana en el pH y temperatura, los que parecen tener una relación proporcionalmente inversa. En la fase termofílica, la temperatura aumenta rápidamente, mientras que el pH disminuye, evidenciando que el metabolismo microbiano en cada etapa degradativa influye ya que a mayor actividad metabólica menor rango de pH.

4.1.2. Experimento final

4.1.2.1. Determinación de temperatura de la pila de compost

En la Tabla A4 (Anexo A), se registran los valores diarios de temperatura del compostaje durante un periodo de cincuenta días. La temperatura inicial fue de 21°C. La Figura C4 (Anexo C),

muestra la curva de temperatura en función del tiempo. La fase inicial (a) fue muy corta, ya que duró solamente dos días. Al tercer día la temperatura comenzó a incrementarse rápidamente hasta alcanzar 45°C, a los diez días. Esta segunda fase se denominó termofílica 1 (b1), debido a que esta no fue la temperatura máxima que se alcanzó durante el ensayo. Posteriormente la temperatura se estabilizó alrededor de 40°C, hasta el día 19. Esta fase se denominó como estacionaria 1 (c1). A partir del día 20, hasta el día 22, la temperatura se incrementó rápidamente hasta los 54°C, esta se convertiría en la temperatura máxima alcanzada durante el presente experimento. A esta fase se le denominó como termofílica 2 (b2). Luego, la temperatura se mantuvo en esos valores por dos días, en la fase estacionaria 2 (c2), para finalmente descender gradualmente hasta los 25°C registrados el último día del ensayo, durante la fase final o de maduración (d). Los detalles de la duración de cada fase se encuentran resumidos en la Tabla A5 (Anexo A).

4.1.2.2. Determinación del pH de la pila de compost

En la Tabla A6 (Anexo A), se muestran los valores registrados del pH durante los cincuenta días del experimento. El valor inicial fue de 9.37. En la Figura C5 (Anexo C), se puede observar la misma tendencia que el experimento preliminar, es decir, el pH disminuye conforme la actividad microbiana aumenta, excepto en la fase termofílica 2 (b2), en donde el pH aumenta en lugar de disminuir. El valor final de pH registrado al día 50 fue de 8.3. La cantidad de protones (H⁺) registrada al inicio del experimento, aumentó aproximadamente diez veces, de lo que se puede inferir en los valores de pH obtenidos. La comparación de las dos curvas en el mismo gráfico (Figura C6, Anexo C), muestra la misma tendencia que en el experimento anterior, excepto en la fase termofílica 2, en donde tanto la temperatura como el pH aumentaron considerablemente durante ese tiempo. Todo lo contrario a lo observado en el experimento preliminar, el pH alcalino alcanzado en la pila de compost fue normal evidenciando la correcta relación C/N, que fue de 29:1.

4.1.2.3. Valores de pH y temperatura de las muestras

La Tabla A7 (Anexo A), muestra los resultados de pH y temperatura de cada muestra compuesta recolectada en las diferentes etapas de compostaje. El valor de pH de la muestra de la etapa inicial fue de 9.37, el valor de pH de la etapa termofílica fue de 9.37, de la etapa estacionaria fue de 9.00, mientras que para la muestra de la etapa final se obtuvo un pH de 8.30. En lo referente a la temperatura, el valor más alto se presentó al final de la etapa estacionaria con 54.33°C, mientras que el valor más bajo se presentó al final del experimento, durante la etapa de maduración, con 25.67°C.

4.1.2.4. Determinación de la población de bacterias y actinomicetes.

La Tabla A8 (Anexo A), muestra el número de ufc/g de bacterias y actinomicetes en cada una de las etapas de descomposición. El valor más bajo encontrado fue para las bacterias al final de la

etapa termofílica con $2,21 \times 10^6$ ufc/g, mientras que el valor más alto fue calculado para los actinomicetes en la etapa final con $9,05 \times 10^7$ ufc/g. El incremento neto de la población es prácticamente idéntico en los dos grupos de microorganismos. Desde el inicio, hasta el final del compostaje, el incremento en el caso de las bacterias fue 11.1 veces, mientras que en los actinomicetes fue 11.3 veces. La Figura C7 (Anexo C), muestra la comparación de las curvas de población vs tiempo, entre bacterias y actinomicetes. La tendencia de las dos es prácticamente la misma, excepto en la última etapa en la que claramente existe una disminución de la población de bacterias, mientras que todo lo contrario ocurre con los actinomicetes, los que alcanzan el valor máximo de todo el ensayo evidenciando el dominio que poseen los actinomicetes en el proceso degradativo.

4.1.2.5. Determinación del porcentaje de bacterias y actinomicetes.

Los resultados de los porcentajes de cada uno de los grupos se muestran en la Tabla A9 (Anexo A). Es necesario recordar que los porcentajes fueron determinados en medios de cultivo diferentes, ya que en el caso de las bacterias se lo hizo en agar nutritivo, y en el caso de los actinomicetes en agar glucosa extracto de levadura extracto de malta. Por eso los valores no suman el 100%. Se nota claramente que las bacterias no llegan a constituir el 100% de la población en ninguna etapa del proceso de descomposición, en los platos que contenían agar nutritivo (AN). Todo lo contrario sucede con los actinomicetes, ya que en la fase 3 y 4 fueron los únicos que crecieron en agar glucosa extracto de levadura extracto de malta (GYM), por eso se reporta que el 100% de microbios creciendo en esos platos correspondió a la morfología típica de un actinomicete. La Figura C8 (Anexo C) muestra la comparación de las curvas del porcentaje de bacterias y actinomicetes en cada uno de los días de muestreo. La tendencia es igual en todas las fases, excepto en la segunda, en la cual, los actinomicetes aumentan en términos de porcentaje, mientras que las bacterias disminuyen. En las otras etapas, las tendencias son similares entre los dos grupos.

Un resultado más preciso de la relación entre bacterias y actinomicetes se muestra en la Tabla A10 (Anexo A). Al considerar la sumatoria de ufc/g de cada uno como el 100% de la población, y luego sacar los porcentajes respectivos para cada grupo, es evidente que el porcentaje de actinomicetes es mayor que el de las bacterias en todas las etapas de descomposición. La Figura C9 (Anexo C) grafica los mismos resultados. Se observa que existe una relación entre el porcentaje de la población de cada uno de los grupos de microbios, y la etapa del proceso de compostaje. Hasta la etapa termofílica, el porcentaje de actinomicetes tiende a crecer, sin embargo, durante la fase estacionaria, en donde la temperatura se mantuvo alrededor de los 54°C por tres días, la población de actinomicetes disminuye, debido a un incremento más rápido en la población de bacterias. Mientras que en la etapa termofílica la población de actinomicetes aumenta 10 diez veces, la de las bacterias lo hace mas de 22 veces. En la última fase, la fracción correspondiente a los actinomicetes se incrementa, mientras que la de las bacterias disminuye.

4.1.2.6. Determinación de la diversidad de bacterias y actinomicetes.

La Tabla A11 (Anexo A) muestra la diversidad de colonias de bacterias y actinomicetes por cada etapa de descomposición. Es evidente que los actinomicetes son más diversos que las bacterias en cada una de las etapas. El valor mayor se presenta en la etapa termofílica, mientras que el menor al inicio del proceso de descomposición. En el caso de las bacterias la diversidad mayor se alcanzó al final de la etapa termofílica, y el valor menor durante la fase estacionaria. Se observa también que luego de la etapa termofílica, la diversidad de bacterias disminuyó considerablemente, algo que no sucede en el caso de los actinomicetes.

4.1.2.7. Aislamiento y codificación de microorganismos

Doscientos cuarenta y cuatro actinomicetes y cuarenta y un bacterias fueron aislados y purificados a partir de los platos de aislamiento de las cuatro etapas de descomposición. Los detalles de la codificación y origen de cada aislamiento, por etapa de recolección, se muestran en las Tablas A12, A13, A14 y A15 del Anexo A. Tanto en bacterias como en actinomicetes se aislaron los números más altos a partir de la muestra correspondiente a la etapa estacionaria. Lo mismo se encontró para el número más bajo de aislamientos, que para los dos grupos correspondió a la etapa inicial (Figura C10, Anexo C), comprobando la adaptación de los microorganismos a la etapa estacionaria, evidenciando la proliferación de microorganismos termofílicos.

4.1.2.8. Caracterización macroscópica, microscópica y formación de grupos de color de actinomicetes

Para cada etapa de descomposición se formaron los grupos de color de acuerdo a la determinación del color del micelio de sustrato, micelio aéreo y pigmento difusible. En las Tablas A16, A17, A18 y A19 del Anexo A, se muestran los diferentes grupos de color, con los diferentes actinomicetes que los conforman. Los códigos que se encuentran en color rojo se escogieron como representantes para las pruebas fisiológicas y bioquímicas. En la Tabla A20 (Anexo A) se encuentran las coloraciones del micelio aéreo, micelio del sustrato, pigmento difusible y la caracterización microscópica de los once diferentes grupos de color hallados durante las cuatro etapas de descomposición. En la Tabla A21 (Anexo A) se muestra la distribución y el número de actinomicetes de cada grupo de color, en cada etapa del proceso de descomposición. Cinco grupos de color fueron ubicados solamente en una etapa de descomposición. Así, los grupos 1, 2, 3 y 6 correspondieron a la fase inicial, mientras que el grupo 11 solamente en la etapa final. Los miembros de los grupos 4, 5 y 7 fueron encontrados en todas las fases de la descomposición. Finalmente, los grupos 8, 9 y 10 se hallaron desde la segunda etapa (termofílica), hasta el final. Los grupos de color con más individuos fueron aquellos que se distribuyeron durante las cuatro etapas, sin embargo, los grupos 1, 2 y 11, deben ser considerados también debido al alto

número de individuos, a pesar de estar presentes en solo una etapa de descomposición de los materiales.

4.1.2.9. Caracterización macroscópica y microscópica de bacterias

Las Tablas A22, A23, A24 y A25 (Anexo A) muestran los resultados de la caracterización macroscópica de las bacterias aisladas durante las cuatro etapas de descomposición. La gran mayoría de bacterias presentan coloraciones blancas y tuvieron una velocidad muy rápida de crecimiento, ya que al final del tiempo de incubación cubren por completo la superficie del medio de cultivo. La Tabla A26 (Anexo A) muestra los resultados de la caracterización microscópica de las bacterias aisladas en cada una de las etapas de descomposición. En la Figura C11 (Anexo C), se puede observar que la mayoría de bacterias son gram positivas de forma bacilar. La formación de cápsulas y endosporas ocurre en menos del 50% de los cultivos aislados. La Figura C12 (Anexo C) muestra en forma más detallada la caracterización microscópica, por etapas de descomposición. Se nota que en las primeras dos etapas hay presencia de bacterias gram positivas y gram negativas, que presentan formas bacilares o cocoides. Sin embargo, en la fase estacionaria se nota que todas las bacterias son gram positivas, y la mayoría presentan forma bacilar. En la última fase no se detectó la presencia de bacterias en forma de cocos, ya que todos los aislamientos presentaron forma bacilar, y solamente uno de los nueve aislamientos fue una bacteria gram negativa.

4.1.2.10. Caracterización bioquímica y fisiológica de los actinomicetes

4.1.2.10.1. Rango de crecimiento en función de la temperatura y pH

La Tabla A27 (Anexo A), muestra el número de actinomicetes clasificados según el rango de crecimiento de pH. La gran mayoría prefiere crecer en un rango de pH que va desde 5.5 hasta 9.5. Esta tendencia se observó tanto en cada una de las etapas de descomposición, así como también en el total general del experimento. Así, cincuenta del total de 70 representantes crecen en el rango de pH antes mencionado. El número en cada una de las etapas es variable, sin embargo, en todas muestran ser el grupo mayoritario. Los resultados indican también que estos prefieren crecer en condiciones alcalinas. Solamente trece de los setenta crecieron en valores de pH iguales o menores a 4.5, lo cual tiene lógica ya que valores alcalinos se registraron en la pila de compostaje, rangos de pH que fluctuaban de 8.1-9.5.

En lo relacionado a la temperatura, la Tabla A28 (Anexo A) muestra el número de actinomicetes que crecieron en los valores estudiados. La gran mayoría crecen a 37°C, con resultados variables a 50°C. Es evidente que durante las fases termofílica y estacionaria, los números de actinomicetes que crecen a éstas temperaturas aumentan. En la fase estacionaria crecieron quince actinomicetes a 50°C, un incremento de diez individuos al comparar con la etapa anterior. Solamente un cultivo creció a 4°C durante todo el experimento, y fue aislado durante la etapa final de descomposición.

4.1.2.10.2. Crecimiento de actinomicetes en medios que contenían aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno

La Tabla A29 (Anexo A) muestra el número de actinomicetes que crecieron en los diferentes medios de cultivo usando aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno, en relación a las diferentes etapas de descomposición. En la etapa inicial y termofílica, la gran mayoría de actinomicetes crecieron usando los cinco aminoácidos. En la etapa inicial, solamente un cultivo no pudo crecer en ningún aminoácido, y otro no creció en valina. El resto crecieron normalmente. En la etapa termofílica, solamente el aminoácido valina fue usado por todos los cultivos. Catorce de los quince actinomicetes usaron el resto de aminoácidos. Para las etapas estacionaria y final, se nota claramente que existe diversidad en la forma de utilizar los aminoácidos. Al comparar las dos fases, solamente en la final es posible encontrar un aminoácido que fue usado por todos los actinomicetes escogidos para esta prueba. Esto se nota con más claridad en la Figura C13 (Anexo C), donde se grafica el número de actinomicetes que usaron cada aminoácido por fase de descomposición.

4.1.2.10.3. Producción de enzimas extracelulares por actinomicetes

La Tabla A30 (Anexo A) muestra el número de actinomicetes en los que se detectó la producción de enzimas extracelulares para la degradación de los polisacáridos celulosa, almidón y quitina. Se puede observar que en las etapas iniciales, las actinomicetes productores de celulasas y amilasas están en mayor número que en las etapas finales. El gráfico C14 (Anexo C) muestra claramente la tendencia. Conforme avanza el proceso de descomposición, la cantidad de actinomicetes que producen celulasas y amilasas disminuye, mientras que los que producen quitinasas aumentan.

4.1.2.11. Caracterización bioquímica y fisiológica de las bacterias

4.1.2.11.1. Rango de crecimiento en función de la temperatura y pH

La Tabla A31 (Anexo A) muestra el número de bacterias clasificadas según el rango de crecimiento de pH. Solamente se encontraron dos rangos, en los que, 37 de cuarenta y uno crecen entre 6,5 a 9,5. Solamente tres crecen a pH 6,5. No se encontraron bacterias que puedan crecer a pHs menores a 6,5. Es evidente que las bacterias estudiadas prefieren crecer en pH neutros y alcalinos.

En lo relacionado a la temperatura, la Tabla A32 (Anexo A) muestra el número de bacterias que crecieron en los valores estudiados. La gran mayoría crecen a 37°C, con números menores a 50°C. A 4°C solamente una bacteria creció a partir de la etapa termofílica. Es evidente que durante las fases termofílica y estacionaria, los números de bacterias que crecen a éstas temperaturas aumentan.

4.1.2.11.2. Crecimiento de bacterias en medios que contenían aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno

La Tabla A33 (Anexo A), muestra el número de bacterias que crecieron en los diferentes medios de cultivo usando aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno, en relación a las diferentes etapas de descomposición. La utilización es variable, no encontrándose un patrón definido en las diferentes etapas. Del análisis de la Figura C15 (Anexo C), se desprende que solamente en la etapa estacionaria, las bacterias estudiadas usan todos los aminoácidos. En el resto de etapa, el porcentaje de uso es variable. Esto podría demostrar que la diversidad de bacterias en la etapa termofílica es más baja que en resto de etapas.

4.1.2.11.3. Producción de enzimas extracelulares por bacterias

La Tabla A34 (Anexo A), muestra el número de bacterias que produjeron enzimas extracelulares para la degradación de los polisacáridos celulosa, almidón y quitina. Es evidente que durante las etapas termofílica y estacionaria, la mayoría de bacterias presenta características celulolíticas y amilolíticas. A diferencia de lo observado en los actinomicetes, la producción de quitinasas durante estas fases también es considerable.

4.1.2.12. Comparación de características metabólicas entre actinomicetes y bacterias asociados a las diferentes etapas del proceso de descomposición

La Tabla A35 (Anexo A), presenta resultados muy interesantes al comparar el porcentaje de actinomicetes y bacterias celulolíticas y amilolíticas presentes en las diferentes etapas en el proceso de compostaje. Es evidente que existen diferencias marcadas en el rol que cada grupo de microbios poseen en las diferentes etapas de descomposición. Así, los actinomicetes parecen ser los que participan en mayor importancia en la transformación de los materiales celulolíticos durante la etapa termofílica. En cambio, las bacterias son las que dominan en la etapa inicial, estacionaria y final. En lo referente a la producción de amilasas ocurre todo lo contrario, porque son los actinomicetes los que aparentemente son más importantes durante la fase inicial, termofílica y final, mientras que las bacterias solamente lo son durante la fase estacionaria, así tenemos que el 93% de bacteria son celulolíticas en la etapa estacionaria, mientras que el 87% de actinomicetes son celulolíticos en la etapa termofílica.

4.1.3. Procesamiento y análisis

4.1.3.1. Número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de compost (ufc/g)

Los resultados para esta variable se muestran en la Tabla B1 (Anexo B). El análisis de varianza se presenta en la Tabla B2 (Anexo B), el mismo reveló la existencia de diferencias altamente

significativas entre los tratamientos. Al realizar la separación de medias por la prueba de Tukey al 5% de significancia (Tabla B3, Anexo B), los tratamientos 2 y 3, que corresponden a las etapas estacionaria y final, respectivamente, se ubicaron en el mismo nivel, mientras que los tratamientos 0 y 1, que corresponden a las etapas inicial y termofílica, se ubicaron en el nivel siguiente, sin mostrar diferencias estadísticas entre ellos. El número más alto de ufc/g de compost se calculó para las bacterias durante la etapa estacionaria (5.04×10^7 ufc/g), mientras que el valor más bajo se encontró en la etapa termofílica (2.21×10^6).

4.1.3.2. Porcentaje de bacterias que crecieron en agar nutritivo

Los resultados para esta variable se muestran en la Tabla B4 (Anexo B). El análisis de varianza reveló que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos, tal como se indica en la Tabla B5 (Anexo B). El porcentaje más alto se encontró en la fase inicial, en donde constituyeron el 73% de la fracción microbiana. El valor más bajo se obtuvo en la etapa termofílica, en donde se calculó un 58.8% de bacterias presentes en los platos de agar nutritivo.

4.1.3.3. Diversidad de colonias bacterianas en agar nutritivo

Los resultados para esta variable se muestran en la Tabla B6 (Anexo B). El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos, tal como se indica en la Tabla B7 (Anexo B). Al realizar la separación de medias por la prueba de Tukey al 5% de significancia (Tabla B8, Anexo B), se obtuvieron tres niveles. La diversidad más alta se encontró en la etapa termofílica con 11 colonias diferentes, mientras que la menor diversidad se identificó para la etapa estacionaria con solo tres colonias diferentes.

4.1.3.4. Número de unidades formadoras de colonias de actinomicetes por gramo de compost (ufc/g)

Los resultados para esta variable se muestran en la Tabla B9 (Anexo B). El análisis de varianza reveló la existencia de diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Tabla B10, Anexo B). Al realizar la separación de medias por la prueba de Tukey al 5% de significación (Tabla B11, Anexo B), se encontró la misma tendencia que para el número de ufc/g de bacterias. Los tratamientos 2 y 3 se ubicaron en el nivel estadístico más alto, en donde el valor mayor de ufc/g fue calculado para la etapa final de descomposición (9.05×10^7). Los tratamientos iniciales compartieron el nivel más bajo, siendo el tratamiento correspondiente a la fase termofílica el que arrojó el menor número de ufc/g de compost (8.01×10^6). Comparando la población del inicio del experimento, con la del final, se puede observar que esta última se incrementa más de diez veces.

4.1.3.5. Porcentaje de actinomicetes que crecieron en agar GYM

Los resultados para esta variable se muestran en la Tabla B12 (Anexo B). El análisis de varianza reveló la existencia de diferencias altamente significativas entre los tratamientos, tal como se

indica en la Tabla B13 (Anexo B). Al realizar la separación de medias por la prueba de Tukey al 5% (Tabla B14, Anexo B), se pudo evidenciar que los tratamientos 2 y 3, correspondientes a la etapa estacionaria y final, mostraron que el 100% de colonias que crecieron en los platos con agar GYM, mostraban la morfología típica de los actinomicetes. El valor más bajo se obtuvo al inicio del proceso de compostaje en donde el 85.2% correspondieron a colonias de actinomicetes. Es evidente que la fracción de actinomicetes aumenta conforme el proceso de compostaje avanza.

4.1.3.6. Diversidad de colonias de actinomicetes en agar GYM

Los resultados para esta variable se muestran en la Tabla B15 (Anexo B). El análisis de varianza mostro diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Tabla B16, Anexo B). Al realizar la separación de medias por la prueba de Tukey al 5% de significancia (Tabla B17, Anexo B), se obtuvieron 3 niveles estadísticos. La mayor diversidad de actinomicetes se obtuvo durante la etapa termofílica, con 33 colonias diferentes. La diversidad de la fase estacionaria se ubicó en el mismo nivel estadístico que el calculado para la etapa anterior. La diversidad más baja fue obtenida al inicio del experimento con 24 colonias diferentes.

4.1.3.7. Taxonomía numérica de datos fenotípicos

Las Tablas B18 y B19 (Anexo B) muestran las matrices de código binario usadas para calcular la similaridad entre actinomicetes y bacterias, durante las cuatro fases de descomposición. Los resultados de los análisis de taxonomía numérica se muestran en los dendrogramas de las Figuras C16 y C17 (Anexo C). Es evidente la existencia de varios grupos especie, tanto para los actinomicetes como para las bacterias. En el primer caso se pudo identificar 20 grupos especie (Tabla B20, Anexo B), diez formados por un solo miembro, y diez grupos multimiembros. El grupo más grande y diverso es el número 1, con 19 integrantes, los que fueron encontrados en cada una de las cuatro fases de descomposición. Doce grupos mostraron ser específicos solo para una de las etapas. Los grupos especie 10 contenía actinomicetes que fueron aislados durante la fase inicial y termofílica. Por el contrario, los miembros del grupo 15 crecieron solamente durante las dos últimas fases de descomposición. La diversidad encontrada en los grupos de color de los actinomicetes se comprueba y tiene cierta correlación con el análisis individual de los datos fenotípicos de los actinomicetes representantes de cada una de las etapas de descomposición. Los resultados se muestran en los dendrogramas de las Figuras C18, C19, C20 y C21 (Anexo C). La Tabla B21 (Anexo B) muestra el resumen de los grupos especie identificado en cada uno de los dendrogramas.

El análisis de los grupos especie de las bacterias se muestra en la Tabla B22 (Anexo B). Veinte y cuatro grupos fueron identificados, de los cuales, 11 presentaron más de un integrante, mientras que 13 estaban conformados por un solo individuo. A diferencia del caso anterior, no se

encontraron grupos con un número elevado de miembros, ya que los más numerosos fueron los grupos 7 y 8, con 4 cultivos de bacterias. Ningún grupo estuvo formado por miembros aislados durante las cuatro etapas de descomposición. El análisis individual de datos fenotípicos de las bacterias aisladas en cada una de las fases de descomposición muestra la diversidad encontrada en cada una de ellas. Las Figuras C22, C23, C24 y C25 (Anexo C) muestran estos resultados. La Tabla B23 (Anexo B) muestra el resumen de los grupos especie identificado en los dendrogramas.

4.2. Interpretación de Datos

4.2.1. Experimento preliminar

El experimento preliminar fue establecido para identificar las cuatro fases de compostaje, esto es, inicial, termofílica, estacionaria y final, usando condiciones controladas. Se cuidó de mezclar materiales de tal manera que la relación carbono nitrógeno se encuentre entre 24 a 30 a 1, ya que esa es una relación óptima para la descomposición. La temperatura no se incrementó a niveles muy altos, ya que en la fase termofílica se alcanzaron solamente 40°C. Esto es entendible desde el punto de vista que la cantidad de material a descomponer fue muy reducido, sin embargo, las cuatro fases se identificaron claramente. Estos datos fueron usados para replicar las condiciones en una pila más grande, usando condiciones controladas. Se pudo observar también una relación directamente inversa entre el pH y la temperatura durante la fase termofílica, ya que se nota un incremento rápido de la temperatura, mientras que el pH disminuye. El incremento en el número de microorganismos termofílicos y termotolerantes ocurre por un metabolismo óptimo a éstas temperaturas, provocando una producción elevada de enzimas y ácidos orgánicos que probablemente son los responsables de una variación tan drástica en el pH, reportes de (Garboza & Silvera, 2002) manifiestan que debido al metabolismo de microorganismos mesófilos y termófilos que comienzan a alimentarse de proteínas y azúcares permiten el descenso del pH de la pila de compost.

4.2.2. Experimento Final

4.2.2.1. Experimento de compostaje

La tendencia observada en el experimento preliminar se encontró otra vez en el experimento final. Las cuatro etapas se identificaron, sin embargo se notó una variación importante, ya que la fase termofílica se alcanzó luego de una primera fase termofílica inicial (b1), y fase estacionaria intermedia (c1). Luego de éstas, las temperaturas alcanzadas fueron similares a las que comúnmente se encuentran en procesos de descomposición (alrededor de 55°C). Una vez que se llegó a esta fase, el proceso continuó sin problema, hasta llegar a la fase final de maduración. La variación del pH estuvo relacionada con el metabolismo, es decir, a mayor crecimiento, existió una disminución del valor de pH, indicando un aumento en el número de protones. La única desviación a ésta tendencia se encontró al llegar a la fase estacionaria b2, en donde el valor de

pH aumenta. Esto puede deberse a una disminución del metabolismo total de los microbios debido a la disminución de la población por las altas temperaturas alcanzadas durante ésta fase, provocando que un número menor de enzimas y ácidos orgánicos que influirían en la disminución de protones y por lo tanto un incremento en los valores de pH. Además, el número de días que la pila de compost paso a altas temperaturas fue de alrededor de 5, suficientes como para influir directamente en la población microbiana, la cual cumple un rol significativo ya que contribuyen a incrementar la biodisponibilidad del sustrato. Estas actividades son desarrolladas por microorganismos, mesófilos y termófilos con características ligninolíticas (López et al., 2005).

4.2.2.2. Población y diversidad de microorganismos durante las diferentes etapas de compostaje

Los números de ufc/g de compost de bacterias y actinomicetes muestran diferencias importantes entre los dos grupos. El efecto de la temperatura alcanzadas durante la fase termofílica b2 y estacionaria c2, tuvo un impacto mayor en las bacterias que en los actinomicetes, ya que los valores mayores siempre se encontraron para los actinomicetes. Además, esto se demuestra también con los porcentajes de cada grupo y con el número de colonias diferentes (diversidad) encontrados durante cada etapa. Como se puede ver en los resultados, existe un mayor número de actinomicetes diferentes que de bacterias, y de hecho, se nota que no hay un efecto de la temperatura en la disminución de la diversidad de actinomicetes, algo que sí se observa en el caso de las bacterias.

Otro análisis interesante se obtiene de la distribución de los diferentes grupos de color de los actinomicetes, formados por los cultivos puros obtenidos luego del aislamiento y purificación. Su distribución no es uniforme, ya que hay grupos asociados a fases específicas de la descomposición. Así, de once grupos, 5 son específicos, 3 se distribuyen en todas las etapas de descomposición, y tres aparecen desde la etapa termofílica hasta el final. Esto demostraría la sucesión de los diferentes grupos de actinomicetes que son responsables del proceso de descomposición, y que de hecho están relacionadas a los efectos que la temperatura tiene sobre cada uno de ellos. Los cuatro grupos de la etapa inicial no resisten las temperaturas elevadas de las fases termofílica y estacionaria, por lo que probablemente todos son mesófilos, y por lo tanto sus células no resisten las temperaturas elevadas, y por eso no se los encuentra en el resto de etapas.

En lo referente a las bacterias, estas fueron aisladas en números mucho menores que el de los actinomicetes. Por lo tanto su diversidad también fue menor. Sin embargo, es importante mencionar que la mayoría fueron identificadas como bacilos gram positivos, los que a partir de la fase termofílica constituyeron la mayoría de bacterias aisladas. Estos resultados son razonables, ya que la mayoría de estas bacterias presentaron endosporas, lo que les permitiría resistir las condiciones de temperaturas altas alcanzadas durante las fases antes mencionadas. Lo cual concuerda con las investigaciones de (Ramírez y Cocha, 2003), que manifiesta que los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, son los que preponderan en el compostaje debido a la producción de

enzimas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones. Además algunas especies de *Bacillus*, y *Pseudomonas*, poseen la capacidad enzimática para degradar diversos componentes de la pared celular de ciertos hongos. El género *Bacillus* presenta esporas con alta resistencia a los agentes físicos y químicos que constituyen una forma de resistencia al stress ambiental, poseen además la capacidad de degradar la materia orgánica formando ácidos orgánicos que solubilizan el fósforo y ayudan en el fitocontrol de patógenos.

4.2.2.3. Caracterización fenotípica de los aislamientos

La determinación de rangos de crecimiento de temperatura y pH mostraron resultados lógicos, ya que la mayoría de actinomicetes crecen en rangos amplios de pH, con valores máximos de pH alrededor de 9,5. Los datos de pH de la pila de compost se encuentran en valores mayores a 8, por lo que el encontrar actinomicetes y bacterias creciendo en pHs alcalinos, tiene mucha relación. En lo referente a la temperatura, hay una gran cantidad de actinomicetes que crecen a temperaturas de 50°C, incrementándose su número a partir de la etapa termofílica de descomposición. La misma tendencia se encuentra en las bacterias, las que en su mayoría crecen hasta un pH de 9,5 y el porcentaje de aquellas que crecen a temperaturas altas se incrementa luego de la etapa termofílica.

Por otro lado, la caracterización bioquímica de los microorganismos aislados también arrojó datos interesantes. En las primeras etapas de descomposición, aparentemente los actinomicetes son los responsables de la producción de enzimas extracelulares, principalmente celulasas, las que se encargan de la degradación de materiales de origen vegetal. Así mismo, éstos producen una mayor cantidad de amilasas, lo que tiene sentido, ya que la disponibilidad de mono y disacáridos permitiría la estimulación de la producción de este tipo de moléculas. Al pasar a las siguientes etapas, sobre todo a las fases estacionaria y final, las bacterias son las que toman la posta, y estas comienzan a producir más celulasas y amilasas que los actinomicetes. Esto concuerda también con la disminución de materiales de origen vegetal, ricos en celulosa. Es probable que los actinomicetes presentes en las últimas etapas sean los responsables de la humificación del compost, paso necesario que determina la calidad del producto final de la descomposición. Cada etapa degradativa de una pila de compost permite obtener distintos microorganismos, entre los cuales tenemos: hongos, bacterias y actinomicetes, mesófilos o termófilos que muestran actividad metabólica sobre carbohidratos o fuentes de nitrógeno, esto debido a la producción de enzimas extracelulares capaces de desdoblar los carbohidratos como también las fuentes de nitrógeno, manifiesta Molano (2005).

4.2.2.4. Taxonomía numérica de datos fenotípicos

Los diferentes grupos especie formados mostraron cierta coherencia con los grupos de color y diversidad encontrados principalmente en la caracterización macroscópica de los actinomicetes. Varios grupos de bacterias y actinomicetes fueron encontrados en todas las fases de

descomposición, convirtiéndolos en microorganismos que resisten las temperaturas altas que se alcanzaron durante las fases termofílica y estacionaria. Sin embargo, varios grupos especie fueron específicos, lo que puede ser interpretado como que hay diversos grupos de microbios que probablemente cumplen funciones específicas durante cada una de las etapas de descomposición. También es importante resaltar que la selección de los grupos especie se realizó usando un porcentaje alto de similaridad (90%), por lo que la homogeneidad de los grupos es muy alta.

4.2.3. Discusión general del trabajo investigativo

El presente estudio pretendió entender la dinámica de cambios de las diferentes fracciones microbianas responsables de la descomposición de la materia orgánica. Para ello se realizaron estudios de población, diversidad y metabolismo de bacterias y actinomicetes. Los hongos no fueron considerados debido a que no se encontraron diferencias durante los cuatro muestreos realizados. Los hongos fueron identificados dentro de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Mucor*, y aparecieron siempre en cantidad similares. Los experimentos preliminares y final de compostaje permitieron comprobar lo que ya se conoce en la literatura, esto es, que la descomposición de la materia orgánica ocurre en cuatro etapas claramente diferenciadas: inicial, termofílica, estacionaria y final. Se encontró que los actinomicetes son más numerosos y diversos que las bacterias, durante cada una de las cuatro etapas. Esto es interesante, ya que generalmente se atribuye a las bacterias el proceso de descomposición, lo que en la presente investigación no se encontró. Es más, los Actinomicetes probablemente son más importantes durante las fases estacionaria y final del compostaje, siendo los responsables de la humificación de los materiales orgánicos y dándole el olor a tierra húmeda, característico de un material bien descompuesto. También se logró demostrar que los Actinomicetes no necesariamente prefieren pHs alcalinos para su desarrollo, ya que un buen número logró crecer en pHs inferiores a 4.5, los que son considerados como ácidos.

Otro resultado interesante fue el encontrar que los Actinomicetes son más diversos que las bacterias aisladas de la pila de compost o sea, no solamente que se encuentran en números mayores, sino que también hay un mayor número de Actinomicetes diferentes asociados a cada una de las etapas de descomposición. Estos resultados fueron comprobados tanto por la caracterización macroscópica de los aislamientos, como con la construcción de los dendrogramas basados en la similaridad de datos fenotípicos. Por supuesto, esto no quiere decir que las bacterias no son importantes para la descomposición, porque de hecho lo son, sino que se ha encontrado que los Actinomicetes también juegan un rol muy importante durante el proceso. Además, el rol de los actinomicetes en el suelo y descomposición de materia orgánica, esta tomando cada vez más importancia, en donde existen argumentos para pensar que éste grupo de microbios podrían ser considerados como indicadores de calidad de suelo o compost. Mientras más abundantes y diversos sean los actinomicetes, la calidad microbiana y nutricional del suelo es mayor (Rodríguez, C. 2011, comunicación personal).

Los resultados obtenidos han permitido tener una mejor idea de la diversidad biológica y metabólica de bacterias y actinomicetes, asociados al proceso de descomposición de la materia orgánica, y su posible rol e interacción entre ellas. Se han sentado las bases para estudios posteriores basados en técnicas moleculares que permitan conocer con exactitud la identificación de éstos microorganismos. Además, es necesario realizar un estudio detallado de la composición química relacionada a cada una de las cuatro fases de transformación de la materia orgánica.

4.3. Verificación de Hipótesis

4.3.1. Hipótesis nula (H0)

No existen diferencias en la población y diversidad de los grupos-especie de bacterias y actinomicetes durante las diferentes etapas del proceso de compostaje.

4.3.2. Hipótesis alternante (H1)

Existen diferencias en la población y diversidad de los grupos-especie de bacterias y actinomicetes durante las diferentes etapas del proceso de compostaje.

Luego de analizar los resultados de población y diversidad de los grupos-especie de bacterias y actinomicetes de las cuatro etapas de compostaje "se acepta la hipótesis alternante (H₁)" afirmando que existen diferencias entre los grupos-especie de actinomicetes y bacterias.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- La dinámica y actividad de los microorganismos durante el periodo degradativo de residuos sólidos, estuvieron relacionados con las propiedades físico-químicas, tales como el pH y temperatura, llegando a 54°C en la etapa termofílica, temperatura ideal para eliminar patógenos y proliferase microorganismos productores de enzimas extracelulares, el pH de 9.37 en la etapa inicial y de 8.30 en la etapa final del proceso de compostaje permitió obtener microorganismos que toleran rangos de pH, que van desde 5.5-9.0.
- En el aislamiento de bacterias degradadoras de materia orgánica el mayor # ufc/g se encontró en la etapa estacionaria con un valor de 5.04×10^7 , la mayor tasa de diversidad estuvo en la etapa termofílica con 11.0 representantes, mientras que el porcentaje mas elevado de crecimiento estuvo en la etapa inicial alcanzando el 73,0%.
- En el aislamiento de actinomicetes, el mayor # ufc/g se encontró en la etapa final con un valor de 9.05×10^7 , la mayor tasa de diversidad estuvo en la etapa termofílica con 33 representantes, mientras que el porcentaje mas elevado de crecimiento estuvo en las etapas estacionaria y final alcanzando el 100.0%.
- Con la prueba cualitativa de lugol se determino la producción de enzimas extracelulares tales como, amilasas, celulasas. Siendo los actinomicetes celulolíticos y amilolíticos los que actúan en la etapa termofílica y estacionaria en porcentajes de 87% y 60% respectivamente, mientras que las bacterias celulolíticas y amilolíticas actúan en la etapa estacionaria con porcentajes de 93% y 60% respectivamente.
- La mayoría de actinomicetes presentaron cadenas de esporas rectas largas, mientras que las bacterias eran gram positivas que poseían, forma bacilar con presencia de endosporas y cápsulas, estas características microscópicas se obtuvieron en mayor porcentaje al finalizar la etapa termofílica es decir al iniciar la etapa estacionaria.

- Los dendrogramas individuales en base a los datos fenotípicos de actinomicetes y bacterias permitieron evidenciar la existencia de diversidad de colonias en cada fase de compostaje.
- Los dendrogramas globales de actinomicetes y bacterias en base a los datos fenotípicos, de los setenta representantes de actinomicetes y 41 bacterias, permitió obtener veinte grupos especie de actinomicetes y veinticuatro grupos especie de bacterias. El punto de corte de la similaridad de los grupos fue del 90%.
- Se comprobó la existencia de diferentes grupos-especie de actinomicetes y bacterias que actúan en las etapas degradativas de la pila compostaje.

5.2. Recomendaciones

- Realizar pruebas de evaluación de actividad antimicrobiana de los aislamientos obtenidos, en contra de patógenos humanos y de plantas.
- Determinar cuantitativamente la producción de enzimas extracelulares, tales como celulasas, amilasas y quitinasa.
- Obtener un bioproducto en base a microorganismos que degraden celulosa, almidón y quitina, para acelerar el proceso de compostaje.

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1. Datos informativos

6.1.1. Título

Obtención de consorcio bacteriano capaz de producir enzimas extracelulares para acelerar el proceso de compostaje.

6.1.2. Institución ejecutora

Universidad Técnica de Ambato (UTA).

6.1.3. Beneficiarios

Investigadores y estudiantes de Universidades y Escuelas Politécnicas del país. Centros de Investigaciones en Biotecnología. Empresas privadas relacionadas a Agrobiotecnología.

6.1.4. Ubicación

UTA. Colombia S/N y Chile. Ciudadela Ingahurco. Ambato.

6.1.5. Tiempo estimado para la ejecución

Tres meses.

6.1.6. Equipo técnico responsable

Docentes, Investigadores y Estudiantes trabajando en experimentos de aislamientos selectivo para la búsqueda de microorganismos útiles en biotecnología.

6.2. Antecedentes de la propuesta

Un consorcio bacteriano esta compuesto por varios microorganismos, tales como hongos, bacterias y actinomicetes capaces se ayudase mutuamente, es decir en un periodo de compostaje se producen microorganismos que son específicos de la etapa degradativa que ayudan a desdoblar cada compuesto orgánico, desde el más simple al más complejo. Entonces la obtención de un consorcio bacteriano busca una simbiosis de microorganismos eficientes aislados en cada una de las etapas de compostaje de los residuos sólidos orgánicos, capaces de producir metabolitos secundarios que aceleren la degradación y reduzcan el tiempo de compostaje. La investigación "Caracterización e identificación preliminar de bacterias

responsables de la descomposición de materia orgánica durante la fabricación de compost”, demostró que la realización de pruebas fenotípicas permite identificar cultivos con características morfológicas y fisiológicas similares, usando taxonomía numérica, además se asegura la obtención de representantes útiles en el proceso de producción de enzimas extracelulares. La fase final de la investigación mencionada demostró la existencia de distintas poblaciones microbianas en cada etapa de compostaje y que además el porcentaje de producción de metabolitos secundarios es muy elevado por parte de las bacterias y actinomicetes aislados.

6.3. Justificación

El estudio “Caracterización e identificación preliminar de bacterias responsables de la descomposición de materia orgánica durante la fabricación de compost”, demostró que existen microorganismos específicos que actúan en cada etapa de compostaje, produciendo cambios de temperatura y pH, además que existe un porcentaje muy significativo de bacterias y actinomicetes que producen enzimas extracelulares para facilitar el desdoblamiento de compuestos orgánicos. Con la realización de taxonomía numérica de datos fenotípicos se formaron grupos-especie que nos permitirá saber que microorganismos son útiles en la producción de enzimas extracelulares, además nos proporcionara la información de los microorganismos específicos presentes en cada una de las etapas degradativas. La implementación de esta metodología significaría un ahorro considerable de recursos económicos, debido a la disminución en el número de actinomicetes y bacterias que se usarían en la determinación de la producción de enzimas extracelulares para la formación del consorcio bacteriano

6.4. Objetivos

6.4.1. General

- Determinar cuantitativamente la capacidad de producción de enzimas extracelulares para acelerar el proceso de compostaje.

6.4.2. Específicos

- Determinar las características macroscópicas y microscópicas de los aislamientos.
- Identificar los aislamientos similares mediante la taxonomía numérica de los datos fenotípicos obtenidos.
- Identificar los microorganismos que pueden formar consorcios capaces de acelerar la degradación de la materia orgánica.
- Realizar un estudio económico.

6.5. Análisis de factibilidad

La viabilidad de la "Obtención de consorcio bacteriano capaz de producir enzimas extracelulares para acelerar el proceso de compostaje" se asegura con los resultados obtenidos en la investigación "Caracterización e identificación preliminar de bacterias responsables de la descomposición de materia orgánica durante la fabricación de compost.". Además, el cumplimiento adecuado de los objetivos específicos planteados en ésta propuesta garantizarán el cumplimiento del objetivo general.

Por otro lado, los siguientes resultados de la investigación en la que se basa la propuesta, permiten que los resultados de la presente propuesta sean alcanzados sin ningún inconveniente.

- La selección de los grupos taxonómicos en los datos fenotípicos fue realizado con un porcentaje de similitud del 90%, valor que es elevado y que asegura que todos los individuos dentro del grupo posean las características morfológicas y fisiológicas prácticamente similares.
- La parte de la fundamentación legal, que se ampara en la ley de Gestión Ambiental y en el Reglamento a la Ley de Gestión Ambiental para la prevención y control de la contaminación ambiental
- Obtención de consorcio bacteriano capaz de producir enzimas extracelulares para acelerar el proceso de compostaje.

6.6. Fundamentación

La investigación "Caracterización e identificación preliminar de bacterias responsables de la descomposición de materia orgánica durante la fabricación de compost.", es la base científica que permite la formulación de la presente propuesta.

6.7. Metodología – modelo operativo

6.7.1. Caracterización fenotípica

6.7.1.1. Caracterización macroscópica

Para la determinación del color del micelio del sustrato, micelio aéreo y pigmento difusible se utilizara una tabla de colores (British Standard Specification for colours for identification coding and special purposes), a los cultivos se les crecera en agar extracto de malta (GYM) a pH 5.5. Además se reportará la presencia o ausencia de micelio aéreo en las colonias y la producción de pigmentos difusibles. Los platos serán incubados a 28°C por siete días.

6.7.1.2. Caracterización microscópica

La determinación de la morfología del micelio aéreo será determinada solamente en aquellos cultivos que presenten crecimiento de ésta estructura en sus colonias. Para ello se usarán cubreobjetos estériles, que serán colocados sobre el micelio aéreo y retirados con una pinza para ser colocados en un porta objetos y poder saber microscópicamente su estructura. Para las bacterias se determinara tinción de Gram, presencia de esporas y cápsulas.

6.7.1.3. Rango de crecimiento en función de la temperatura

Se inocularan 5 µl de suspensiones de esporas previamente preparadas, sobre la superficie de agar GYM y AN, para actinomicetes y bacterias, respectivamente. Los platos inoculados seran incubados a una temperatura de 50°C, 37°C y 4°C durante 2, 4 y 5 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluarán las cajas para observar el crecimiento de los actinomicetes y se evaluara mediante código binario. Al actinomicete o bacteria que presente crecimiento, se le asignara 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

6.7.1.4. Rango de crecimiento en función del pH

Se inoculara 5 µl de las suspensiones de esporas en la superficie de agar GYM o AN, para actinomicetes y bacterias, respectivamente, ajustando a los pHs 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, y 9.5. El pH se ajustara con la ayuda de sistemas de búferes para evitar cambios en el pH debido al metabolismo de los microorganismos. Las cajas se incubaran a 26°C durante 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación se evaluarán las cajas para observar el crecimiento de los actinomicetes y se evaluara mediante código binario. Al actinomicete o bacteria que presente crecimiento, se asignara 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

6.7.1.5. Aminoácidos como fuentes de carbono y energía

Para probar la capacidad de utilización de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, se utilizarán distintos aminoácidos. Para la preparación del medio de cultivo se utilizará un medio basal. Sobre la superficie del medio se inocularán 5 µl de la suspensión de esporas. Las cajas se incubarán a 28°C durante 48 horas. Se evaluará tomando en cuenta la presencia o ausencia de crecimiento. Si el actinomicete o bacteria presenta crecimiento, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de crecimiento, 0.

6.7.1.6. Perfil metabólico de carbohidratos

Para probar la capacidad de de producir las enzimas extracelulares, se utilizarán distintos carbohidratos. Para la preparación del medio de cultivo se utilizará un medio basal. Sobre la superficie del medio se inocularán 5 µl de la suspensión de esporas. Las cajas se incubarán a 28°C durante 48 horas. Se evaluará tomando en cuenta la presencia o ausencia de la formación de un halo alrededor de la colonia. Luego de haber colocado lugol sobre en el medio de cultivo durante 15 minutos de .Si el actinomicete o bacteria presenta el halo, se asignará 1, en caso contrario, es decir, ausencia de halo, 0.

6.7.1.7. Análisis de datos fenotípicos

Con los resultados de las pruebas fenotípicas se construirá una base de datos, en código binario, con el número de pruebas o características estudiadas. Posteriormente la información será procesada en el software estadístico NTSys, en el que primeramente se calcularán los porcentajes de similitud entre los actinomicetes estudiados. Finalmente, con la ayuda del mismo programa se procederá a obtener un dendrograma basado en la similitud entre los microorganismos. Una vez obtenido éste gráfico, se procederá a identificar los grupos especie basados en un coeficiente de similitud mayor al 90%.

6.8. Administración

INDICADORES A MEJORAR	SITUACIÓN ACTUAL	RESULTADOS ESPERADOS	ACTIVIDADES	RESPONSABLES
Obtención de consorcio bacteriano.		Formación de consorcio bacteriano para acelerar el proceso degradativo.	Caracterización macroscópica de los aislamientos. Caracterización microscópica de los aislamientos que presentan esporulación.	Docente
Búsqueda de enzimas extracelulares a partir de actinomicetes y bacterias. Búsqueda de enzimas extracelulares a partir de actinomicetes y bacterias seleccionadas por taxonomía numérica.	Búsqueda de enzimas extracelulares a partir de actinomicetes y bacterias.	Identificación de enzimas extracelulares a partir de actinomicetes y bacterias seleccionadas por taxonomía numérica.	Crecimiento de los cultivos en distintas temperaturas, pHs y distintas fuentes de carbono y nitrógeno. Crecimiento en carbohidratos para evaluación cualitativa de producción de enzimas extracelulares Análisis de datos fenotípicos.	Investigador Estudiante

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

6.9. Previsión de la evaluación

PREGUNTAS BÁSICAS	EXPLICACIÓN
¿Quiénes solicitan evaluar?	Docentes Investigador
¿Por qué evaluar?	Proporciona información del proceso de obtención de consorcio bacteriano para la búsqueda de enzimas extracelulares.
¿Para qué evaluar?	Para identificar los grupos-especie basados en la similitud que permitan seleccionar actinomicetes y bacterias que producen enzimas extracelulares.
¿Qué evaluar?	Datos obtenidos a partir de taxonomía numérica.
¿Quién evalúa?	Docente
¿Cuándo evaluar?	Al finalizar las pruebas de taxonomía numérica.
¿Cómo evaluar?	Revisando los datos obtenidos previo a la realización de una matriz en código binario.
¿Con qué evaluar?	Programa NTSys.

Elaborado por: Gabriel Curipallo 2010

BIBLIOGRAFÍA

ALVAREZ, PAÚL. & BIANCUCCI, MAXIMILIANO., 2006, *Ciclo del carbono: Materia orgánica y Humus.* Universidad Nacional del Comahue. Microbiología Ambiental. 40-45

BARRERA, R.,2006, Compostaje de residuos sólidos orgánicos. *Aplicación de técnicas respirométricas en el seguimiento del proceso.* Barcelona. 40p

BRENES, L., 2003, *Producción orgánica. Manejo integral de plagas y agroecológica.* 70: 7-18

CARIELLO, M.; CASTAÑEDA, L.; RIOBO, L. & JIMENA GONZÁLEZ., 2007, *Inoculante de microorganismos endógenos para acelerar el proceso de compostajes en residuos sólidos urbanos, facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de entre Ríos, Argentina.* 26-37.

COYNE. M., 2000, *Microbiología del suelo.* Ed: Parninfo. Capítulo 25. 15-29

FRIONI, L., 1999, *Procesos microbianos.* Editorial fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Cordova Argentina. 10-20

GARBOZA, LIVIA. & SILVERA CARLOS., 2002, *El papel de la materia orgánica en los ecosistemas. Edición especial, Danac.* 70-80

GAITAN, M. & PEREZ, I., 2007, *Aislamiento y Evaluación de Microorganismos Celulolíticos a partir del compostaje de residuos vegetales frescos.* Microbiología industrial. Tercera Edición. Bogotá, D.C. 9-16

GUERRERO, A., 1996, *El suelo, los abonos y la fertilización de los cultivos.* Ediciones Mundi Prensa, Bilbao, España. 102-115.

GRAETZ,H.A.,1997, *Fertilización de los suelos con materia orgánica.* Mexico. 80p

GROS, A. & RODRIGUEZ, A., 1992, *Suelos y fertilización.* Traducido por: F Luna Orozco. Trillas. México. 50-70

HERRÁN, J.; SAÑUDO, R.; MARTÍNEZ, G.; RUIZ, R. & PORTUGAL, VÍCTOR., 2008, *Importance of organic manures.* Rev. Ciencia y tecnología. 1: 57-67.

JUSTUS VON LIEBIG., 1843, *Residuos orgánicos y agricultura.* Universidad de Alicante. Servicio de publicaciones. 100-108

JHONSTOM, A. E.,1991, *Soil fertility and soil organic matter. In: advances in soil organic matter research: agriculture and the environment.* Ed. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 45-61.

LANDEROS, F., 1993, *Monografía de los ácidos húmicos y fulvicos.* Tesis, área de hortalizas y flores, facultad de agronomía, Universidad Católica de Valparaíso, Quillota, Chile. 75-96.

LOPEZ, M.; GARCIA, M.; ELORRIETA, A.; SUAREZ, F. & MORENO, J., 2005, *Aislamiento y Selección de Microorganismos Ligninolíticos a partir de residuos vegetales sometidos a compostaje.* Departamento de Biología. Almería. 1-5.

MOLANO, ANDRES., 2005, *Proceso de control para un sistema de compost tipo windrow mediante estimado de parámetros biológicos y biogénicos.* Edición Red Revistas Científicas de América Latina, Caribe, España Y Portugal. 1-10.

OTINIANO, A.; FLORIAN, L.; BLAS, R. & BELLO SEGUNDO., 2006, *La materia orgánica, importancia y experiencias de su uso en la agricultura.* Edición. Idesia. Chile. 49-61

PINAMONTI, F., 1998, *Compost mulch effects on soil fertility, nutritional status and performance of garpevine.* 51: 239-248.

PRIEST, F. & AUSTIN, B., 1993, *Evolución Sistemática y Taxonomía Microbiana.* Editorial Acribia. 1-20

RAMIREZ PABLO & COHA JUANA., 2003, *Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celolítica.* Laboratorio de microbiología molecular, Facultad de Ciencia Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 67-77

SARMIENTO, VC.; VARGAS, DH.; PEDROZA, AM.; MATIZ, A. & POUTOU, RA., 2003, *Producción de α -amilasa con células libres e inmovilizadas de Thermus sp.* Laboratorio de Biotecnología Aplicada. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Bogotá, D.C., Colombia. 1-10.

SÁNCHEZ, H.; CLAUDIA, P.; MEJIA, G.; CARLOS, E.; FIGUEROA, M.; ESQUIVIA, M. ;

AGUDELO, E.; LINA, M.; ZAPATA, G. & GÓMEZ, M., 2005, *Estudio de cepas nativas amilolíticas.* Doceava Edición. Colombia. 21-28

STANIER, R.; INGRAHAM, J.; WHEELIS, M. & PAINTER, P., 1996, *Modern Bacterial Taxonomy.* Editorial Reverte. 1-7

TISDALE, S. L. & W. NELSON., 1966, *Soil Fertility and Fertilizers.* Segunda Edición. Macmillan Company. New York, Estados Unidos. 514-518.

VANGESTEL, C.A.M., 1996, *Phytotoxicity of some chloroanilines and chlorophenols in relation to bioavailability in soil.* *Water, Air and Soil Pollution 2:* 119-132

VILCHEZ, A., 2000, *Determinación de actividad celulolítica de cepas nativas degradadoras de materia orgánica.* 60-93

ZHU, NENGWU.,2006, *Effect of low initial C/N ratio on aerobic composting of swine manure with rice straw.* Bioresource Technology. **1:** 9-13.

ANEXOS

ANEXO A
DATOS EXPERIMENTALES

Tabla A1. Datos de temperatura del experimento preliminar de la elaboración de compost

Días	Temperaturas			Promedio
0	22,0	21,5	22,0	21,83
2	24,2	25,0	24,8	24,67
4	24,5	24,6	24,8	24,63
7	24,0	24,5	25,0	24,50
9	26,5	26,0	26,0	26,17
11	25,0	25,5	26,0	25,50
13	25,0	24,8	25,0	24,93
16	38,0	37,5	37,0	37,50
18	38,0	38,0	37,0	37,67
20	40,0	39,0	40,0	39,67
23	34,0	35,0	34,5	34,50
25	35,0	35,0	36,0	35,33
28	35,0	36,0	35,0	35,33
30	34,0	33,0	34,0	33,67

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla A2. Duración (días) de cada una de las etapas del experimento preliminar de descomposición

Fase	Tipo de Fase	Calendario	Duración (días)
a	Inicial	0-13	13
b	Termofílica	14-16	3
c	Estacionaria	17-20	4
d	Maduración	21-30	10

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A3. Datos de pH del experimento preliminar de la elaboración de compost

Días	pH			Promedio
0	9,0	9,3	9,1	9,13
2	8,8	9,0	8,4	8,73
4	8,4	8,5	8,9	8,60
7	9,0	8,9	8,6	8,83
9	9,0	9,1	8,8	8,97
11	8,8	9,1	9,0	8,97
13	9,0	9,1	9,1	9,07

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla A3. Continuación...

Días	pH			Promedio
16	8,7	8,5	8,5	8,57
18	8,8	8,7	8,7	8,73
20	8,6	8,6	8,7	8,63
23	8,4	8,6	8,6	8,53
25	8,6	8,7	8,6	8,63
28	8,5	8,4	8,6	8,50
30	8,3	8,4	8,2	8,30

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla A4. Datos de temperatura de la pila de compost

Días	Temperaturas			Promedio
0	22	20	21	21,00
1	24	24	23	23,67
2	24	25	25	24,67
3	28	27	28	27,67
4	35	35	35	35,00
5	38	38	38	38,00
6	38	38	38	38,00
7	38	38	37	37,67
8	37	38	37	37,33
9	42	45	41	42,67
10	45	45	46	45,33
11	40	40	40	40,00
12	38	39	40	39,00
13	39	40	38	39,00
14	39	37	39	38,33
15	38	36	36	36,67
16	38	39	39	38,67
17	38	39	39	38,67
18	40	40	40	40,00
19	40	39	40	39,67
20	45	46	45	45,33
21	48	48	49	48,33
22	54	55	55	54,67

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla A4. Continuación...

Días	Temperaturas			Promedio
23	55	54	54	54,33
24	56	53	55	54,67
25	48	51	50	49,67
26	38	37	37	37,33
27	37	37	36	36,67
28	34	35	35	34,67
29	34	35	35	34,67
30	33	35	34	34,00
31	32	33	32	32,33
32	30	28	30	29,33
33	24	26	24	24,67
34	30	30	30	30,00
35	30	30	30	30,00
36	30	30	29	29,67
37	29	28	29	28,67
38	29	28	29	28,67
39	28	28	29	28,33
40	28	29	29	28,67
41	28	28	28	28,00
42	28	28	28	28,00
43	28	27	28	27,67
44	25	24	25	24,67
45	26	25	26	25,67
46	26	24	26	25,33
47	26	25	26	25,67
48	26	24	26	25,33
49	26	26	25	25,67
50	25	26	26	25,67

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla A5. Duración (días) de cada una de las etapas del experimento final de descomposición de la materia orgánica

Fase	Tipo de Fase	Calendario	Duración (días)
a	Inicial	0-2	2
b1	Termofílica 1	3-10	8
c1	Estacionaria 1	11-19	9
b2	Termofílica 2	20-22	3
c2	Estacionaria 2	23-24	2
d	Maduración	25-50	26

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A6. Datos de pH de la pila de compost

Días	pH			Promedio
0	9,30	9,45	9,36	9,37
1	9,15	9,10	9,00	9,08
2	9,00	9,00	9,00	9,00
3	8,40	8,90	8,87	8,72
4	9,00	9,00	9,00	9,00
5	8,44	8,44	8,35	8,41
6	8,55	8,80	8,70	8,68
7	8,42	8,81	8,41	8,55
8	8,35	8,44	8,55	8,45
9	8,90	8,91	8,61	8,81
10	8,14	8,14	8,28	8,19
11	8,16	8,20	8,18	8,18
12	8,25	8,21	8,44	8,30
13	8,40	8,44	8,47	8,44
14	8,15	8,23	8,16	8,18
15	8,44	8,41	8,18	8,34
16	8,35	8,21	8,28	8,28
17	8,15	8,00	8,15	8,10
18	8,10	8,10	8,00	8,07
19	8,66	8,44	8,56	8,55
20	8,44	8,50	8,30	8,41
21	8,90	8,80	8,90	8,87
22	8,90	9,00	8,90	8,93

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla A6. Continuación...

Días		pH		Promedio
23	9,30	9,45	9,36	9,37
24	9,15	9,10	9,00	9,08
25	9,00	9,00	9,00	9,00
26	8,45	8,40	8,35	8,40
27	8,45	8,41	8,41	8,42
28	8,41	8,42	8,41	8,41
29	8,44	8,66	8,75	8,62
30	8,15	8,16	8,44	8,25
31	8,44	8,50	8,30	8,41
32	8,55	8,80	8,70	8,68
33	8,35	8,21	8,28	8,28
34	8,35	8,21	8,28	8,28
35	8,44	8,50	8,30	8,41
36	8,10	8,40	8,51	8,34
37	8,62	8,65	8,49	8,59
38	8,55	8,60	8,55	8,57
39	8,05	8,45	8,61	8,37
40	8,45	8,15	8,60	8,40
41	8,40	8,10	8,40	8,30
42	8,38	8,10	8,41	8,30
43	8,41	8,40	8,10	8,30
44	8,15	8,30	8,14	8,20
45	8,15	8,36	8,26	8,26
46	8,10	8,41	8,60	8,37
47	8,40	8,32	8,38	8,37
48	8,10	8,40	8,51	8,34
49	8,36	8,38	8,38	8,37
50	8,10	8,43	8,36	8,30

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.0

Tabla A7. Valores de pH y temperatura de los días de muestreo correspondientes a cada una de las etapas del proceso de descomposición

Fase	Día	pH	Temperatura (°C)
Inicial	0	9.37	21.00
Termofílica	23	9.37	54.33
Estacionaria	25	9.00	49.67
Final	50	8.30	25.67

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A8. Número de ufc/g de muestra de bacterias degradadoras de materia orgánica y actinomicetes por fase de descomposición

Fase	Número de ufc/g	
	Bacterias	Actinomicetes
Inicial	3,65E+06	8,42E+06
Termofílica	2,21E+06	8,01E+06
Estacionaria	5,04E+07	8,01E+07
Final	4,05E+07	9,05E+07

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A9. Porcentaje de bacterias degradadoras de materia orgánica y actinomicetes por fase de descomposición en agar nutritivo (AN) y agar extracto de malta extracto de levadura (GYM)

Fase	Porcentaje (%)	
	Bacterias	Actinomicetes
Inicial	73,02%	85,22%
Termofílica	58,77%	87,41%
Estacionaria	69,44%	100,00%
Final	67,28%	100,00%

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A10. Porcentaje de bacterias y actinomicetes por fase de descomposición tomando en cuenta la población determinada para cada grupo

Fase	Porcentaje del total de la población		
	Bacterias	Actinomicetes	Total
Inicial	30,2%	69,8%	100,00%
Termofílica	21,6%	78,4%	100,00%
Estacionaria	38,6%	61,4%	100,00%
Final	30,9%	69,1%	100,00%

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A11. Diversidad de colonias de bacterias degradadoras de materia orgánica y actinomicetes por fase de descomposición.

Fase	Diversidad de colonias	
	Bacterias	Actinomicetes
Inicial	7	24
Termofílica	11	33
Estacionaria	3	32
Final	4	28

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A12. Codificación de actinomicetes y bacterias aislados de la etapa inicial

Código	Medio	p H	Dilución	Microbio
APM-001	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-002	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-003	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-004	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-005	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-006	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-007	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-008	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-009	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-010	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-011	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-012	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-013	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-014	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A12. Continuación.....

Código	Medio	p H	Dilución	Microbio
APM-015	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-016	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-017	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
APM-018	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-019	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-020	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-021	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-022	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-023	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-024	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-025	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-026	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-027	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-028	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-029	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-030	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-031	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-032	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-033	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-034	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-035	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-036	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-037	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-038	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-039	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-040	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-041	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-042	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-043	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-044	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
APM-045	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-046	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
APM-047	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-048	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-049	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A12. Continuación.....

Código	Medio	p H	Dilución	Microbio
APM-050	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-051	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-052	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
APM-053	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
BPM-001	AN	7	1/10 ⁴	Bacteria
BPM-002	AN	7	1/10 ³	Bacteria
BPM-003	AN	7	1/10 ⁵	Bacteria
BPM-004	AN	7	1/10 ³	Bacteria
BPM-005	AN	7	1/10 ⁶	Bacteria
BPM-006	AN	7	1/10 ⁴	Bacteria
BPM-007	AN	7	1/10 ³	Bacteria
BPM-008	AN	7	1/10 ³	Bacteria

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A13. Codificación de actinomicetes y bacterias aislados de la etapa termofílica

Código	Medio	p H	Dilución	Microbio
ASM-001	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ASM-002	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-003	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-004	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-005	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-006	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-007	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-008	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-009	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-010	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-011	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-012	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-013	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-014	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-015	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-016	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-017	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-018	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-019	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-020	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A13. Continuación.....

Código	Medio	p H	Dilución	Microbio
ASM-021	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-022	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-023	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-024	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-025	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-026	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-027	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-028	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-029	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-030	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-031	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-032	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-033	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-034	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-035	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-036	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-037	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-038	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-039	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-040	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-041	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-042	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ASM-043	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ASM-044	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-045	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-046	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-047	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-048	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-049	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-050	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-051	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-052	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ASM-053	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ASM-054	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
BSM-001	AN	7	1/10 ⁶	Bacteria
BSM-002	AN	7	1/10 ³	Bacteria
BSM-003	AN	7	1/10 ³	Bacteria

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A13. Continuación.....

Código	Medio	p H	Dilución	Microbio
BSM-004	AN	7	1/10 ⁵	Bacteria
BSM-005	AN	7	1/10 ³	Bacteria
BSM-006	AN	7	1/10 ³	Bacteria
BSM-007	AN	7	1/10 ⁶	Bacteria
BSM-008	AN	7	1/10 ⁶	Bacteria
BSM-009	AN	7	1/10 ⁶	Bacteria

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A14. Codificación de actinomicetes y bacterias aislados de la etapa estacionaria

Código	Medio	p H	Dilución	Microbio
ATM-001	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-002	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-003	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-004	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-005	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-006	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-007	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-008	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-009	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-010	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-011	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ATM-012	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ATM-013	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-014	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-015	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
ATM-016	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
ATM-017	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-018	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-019	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-020	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-021	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-022	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-023	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-024	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-025	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A14. Continuación.....

Código	Medio	p H	Dilución	Microbio
---------------	--------------	------------	-----------------	-----------------

ATM-026	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-027	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-028	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-029	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ATM-030	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ATM-031	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ATM-032	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-033	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-034	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-035	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-036	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-037	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-038	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-039	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-040	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-041	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-042	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-043	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-044	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-045	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-046	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-047	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-048	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-049	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ATM-050	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ATM-051	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ATM-052	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ATM-053	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-054	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-055	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-056	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-057	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-058	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-059	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-060	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-061	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-062	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A14. Continuación.....

Código	Medio	p H	Dilución	Microbio
---------------	--------------	------------	-----------------	-----------------

ATM-063	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ATM-064	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
ATM-065	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
ATM-066	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
ATM-067	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-068	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ATM-069	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ATM-070	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
BTM-001	AN	7	1/10 ⁴	Bacteria
BTM-002	AN	7	1/10 ⁴	Bacteria
BTM-003	AN	7	1/10 ⁶	Bacteria
BTM-004	AN	7	1/10 ⁶	Bacteria
BTM-005	AN	7	1/10 ⁶	Bacteria
BTM-006	AN	7	1/10 ⁵	Bacteria
BTM-007	AN	7	1/10 ⁵	Bacteria
BTM-008	AN	7	1/10 ⁵	Bacteria
BTM-009	AN	7	1/10 ⁵	Bacteria
BTM-010	AN	7	1/10 ⁵	Bacteria
BTM-011	AN	7	1/10 ⁵	Bacteria
BTM-012	AN	7	1/10 ⁵	Bacteria
BTM-013	AN	7	1/10 ⁵	Bacteria
BTM-014	AN	7	1/10 ⁴	Bacteria
BTM-015	AN	7	1/10 ⁴	Bacteria

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A15. Codificación de actinomicetes y bacterias aislados de la etapa final

Código	Medio	p H	Dilución	Microbio
ACM-001	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ACM-002	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ACM-003	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
ACM-004	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ACM-005	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ACM-006	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ACM-007	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ACM-008	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ACM-009	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A15. Continuación.....

Código	Medio	p H	Dilución	Microbio
ACM-010	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ACM-011	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ACM-012	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ACM-013	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ACM-014	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ACM-015	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ACM-016	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ACM-017	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ACM-018	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ACM-019	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ACM-020	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ACM-021	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ACM-022	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ACM-023	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ACM-024	GYM	5,5	1/ 10 ⁴	Actinomicete
ACM-025	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
ACM-026	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ACM-027	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
ACM-028	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
ACM-029	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ACM-030	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ACM-031	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ACM-032	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ACM-033	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ACM-034	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ACM-035	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
ACM-036	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ACM-037	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ACM-038	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ACM-039	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ACM-040	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ACM-041	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ACM-042	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ACM-043	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ACM-044	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ACM-045	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ACM-046	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A15. Continuación.....

Código	Medio	p H	Dilución	Microbio
ACM-047	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ACM-048	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ACM-049	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ACM-050	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ACM-051	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ACM-052	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ACM-053	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ACM-054	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ACM-055	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
ACM-056	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ACM-057	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ACM-058	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ACM-059	GYM	5,5	1/10 ⁵	Actinomicete
ACM-060	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ACM-061	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ACM-062	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ACM-063	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ACM-064	GYM	5,5	1/10 ⁴	Actinomicete
ACM-065	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
ACM-066	GYM	5,5	1/10 ²	Actinomicete
ACM-067	GYM	5,5	1/10 ³	Actinomicete
BCM-001	AN	7	1/10 ⁶	Bacteria
BCM-002	AN	7	1/10 ⁶	Bacteria
BCM-003	AN	7	1/10 ⁶	Bacteria
BCM-004	AN	7	1/10 ⁶	Bacteria
BCM-005	AN	7	1/10 ⁵	Bacteria
BCM-006	AN	7	1/10 ⁵	Bacteria
BCM-007	AN	7	1/10 ⁴	Bacteria
BCM-008	AN	7	1/10 ⁵	Bacteria
BCM-009	AN	7	1/10 ⁶	Bacteria

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A16. Grupos de color formados por los actinomicetes aislados en la etapa inicial

Grupo de color	Color		Pigmento difusible	Códigos
	Micelio Aéreo	Micelio de sustrato		
1	367 manilla	320 (410) light brown	brown	APM-016, APM-048, APM-046, APM-001, APM-035, APM-040, APM-024, APM-022, APM-049, APM-038, APM-017, APM-036, APM-031, APM-028, APM-029, APM-030
2	365 vellum	358 light buff	-	APM-026, APM-006, APM-039, APM-051, APM-052, APM-032, APM-011, APM-053, APM-047, APM-045, APM-027, APM-042, APM-009, APM-010, APM-014, APM-002, APM-003, APM-004, APM-005, APM-034, APM-033, APM-019, APM-020, APM-021, APM-050
3	217 sea green	218 grass green	-	APM-018, APM-044
4	white	352 pale cream	-	APM-023, APM-008, APM-013, APM-012
5	384 light straw	320 (410) light brown	-	APM-015, APM-025
6	356 golden yellow	593 rail red	-	APM-037, APM-043
7	352 pale cream	320 (410) light brown	brown	APM-041, APM-007

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A17. Grupos de color formados por los actinomicetes aislados en la etapa termofílica

Grupo de color	Color		Pigmento difusible	Códigos
	Micelio Aéreo	Micelio de sustrato		
1	447 salmon pink	568 (368) apricot	-	ASM-001, ASM-002, ASM-003
2	367 manilla	320 (410) light brown	brown	ASM-004, ASM-024, ASM-025, ASM-026, ASM-027, ASM-028, ASM-029, ASM-030, ASM-031, ASM-032, ASM-033, ASM-034, ASM-035, ASM-036, ASM-042, ASM-053
3	365 vellum	358 light buff	-	ASM-005, ASM-006, ASM-007, ASM-008, ASM-009, ASM-010, ASM-011, ASM-012, ASM-013, ASM-014, ASM-015, ASM-016, ASM-017, ASM-018, ASM-019, ASM-020, ASM-021, ASM-022, ASM-023, ASM-037, ASM-038, ASM-043, ASM-044, ASM-045, ASM-049, ASM-054
4	352 pale cream	352 pale cream	-	ASM-039, ASM-040, ASM-041
5	white	352 pale cream	-	ASM-046, ASM-047, ASM-048
6	384 light straw	352 pale cream	-	ASM-050, ASM-051-ASM-052

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A18. Grupos de color formados por los actinomicetes aislados en la etapa estacionaria

Grupo de color	Color			Códigos
	Micelio Aéreo	Micelio de sustrato	Pigmento difusible	
1	352 pale cream	363 bold yellow	-	ATM-038,ATM-037,ATM-009, ATM-020,ATM-047
2	384 light straw	358 light buff	-	ATM-069,ATM-011,ATM-005, ATM-019,ATM-046,ATM-051, ATM-067
3	white	352 pale cream	-	ATM-001,ATM-015,ATM-016, ATM-065,ATM-070,ATM-060, ATM-058
4	217 sea green	320 (410) light brown	brown	ATM-039,ATM-036,ATM-034, ATM-033,ATM-024,ATM-008, ATM-003,ATM-002,ATM-049, ATM-062,ATM-056
5	217 sea green	218 grass green	-	ATM-035,ATM-032,ATM-030, ATM-029,ATM-028,ATM-025, ATM-010,ATM-007,ATM-006, ATM-023,ATM-021,ATM-018, ATM-017,ATM-055,ATM-052, ATM-045,ATM-044,ATM-043,ATM-042,ATM-059, ATM-057
6	365 vellum	358 light buff	-	ATM-031,ATM-027,ATM-026, ATM-004,ATM-022,ATM-014, ATM-013,ATM-012,ATM-053, ATM-054,ATM-050,ATM-048, ATM-041,ATM-040,ATM-068, ATM-066,ATM-064,ATM-063, ATM-061

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A19. Grupos de color formados por los actinomicetes aislados en la etapa final

Grupo de color	Color			Códigos
	Micelio Aéreo	Micelio de sustrato	Pigmento difusible	
1	217 sea green	320 (410) light brown	brown	ACM-048,ACM-042,ACM-013, ACM-034,ACM-055,ACM-049, ACM-006,ACM-020
2	365 vellum	107 srtrong blue	107 srtrong blue	ACM-029,ACM-008,ACM-002, ACM-022,ACM-015
3	352 pale cream	363 bold yellow	-	ACM-026,ACM-040,ACM-038, ACM-031,ACM-043,ACM-011, ACM-004,ACM-018,ACM-032
4	white	352 pale cream	-	ACM-033,ACM-025,ACM-012, ACM-005,ACM-019
5	568 (368) apricot	568 (368) apricot	-	ACM-009,ACM-001,ACM-016, ACM-023
6	365 vellum	358 light buff	-	ACM-027,ACM-056,ACM-041, ACM-035,ACM-054,ACM-047, ACM-014,ACM-007,ACM-066, ACM-067,ACM-065,ACM-021, ACM-028
7	217 sea green	218 grass green	-	ACM-024,ACM-037, ACM-039,ACM-036,ACM-030, ACM-053,ACM-050,ACM-051, ACM-052,ACM-044,ACM-045, ACM-046,ACM-010,ACM-003, ACM-017,ACM-063,ACM-064, ACM-059,ACM-060,ACM-061, ACM-062,ACM-058,ACM-057

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A20. Características de color de cada uno de los grupos de color encontrados en el presente estudio.

Grupo de Color	Sustrato	Aéreo	Pigmento Difusible	Caracterización microscópica
1	217 sea green	218 grass green	-	Cadenas de esporas rectas, largas
2	352 pale cream	320 (410) light brown	brown	Cadenas de esporas rectas, cortas
3	356 golden yellow	593 rail red	-	Esporas individuales
4	365 vellum	358 light buff	-	Cadenas de esporas incompletas
5	367 manilla	320 (410) light brown	brown	Cadenas de esporas rectas, largas
6	384 light straw	320 (410) light brown	-	Cadenas de esporas incompletas en forma de bastones
7	white	352 pale cream	-	Cadenas de esporas rectas, cortas
8	352 pale cream	352 pale cream	-	Cadenas de esporas incompletas
9	384 light straw	352 pale cream	-	Cadenas de esporas incompletas
10	447 salmon pink	568 (368) apricot	-	Cadenas de esporas rectas, cortas
11	217 sea green	218 grass green		Cadenas de esporas rectas, cortas

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A21. Distribución y número de actinomicetes de cada grupo de color por etapa de descomposición.

Grupo de Color	Inicial	Termofilica	Estacionaria	Final	Total
1	16				16
2	25				25
3	2				2
4	4	16	7	5	32
5	2	26	7	9	44
6	2				2
7	2	3	19	13	37
8		3	5	8	16
9		3	11	5	19
10		3	21	4	28
11				23	23
Total	53	54	70	67	244

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A22. Caracterización macroscópica de las bacterias aisladas durante la etapa inicial

Código	Color	Forma	Observaciones
BPM-001	568 (368) apricot	Circular	-
BPM-002	352 pale cream	Lobulada	-
BPM-003	352 pale cream	-	Cubre toda la caja
BPM-004	352 pale cream	-	Cubre toda la caja
BPM-005	white	Ramificada	Cubre toda la caja
BPM-006	363 bold yellow	-	Cubre toda la caja
BPM-007	white	Circular	-
BPM-008	352 pale cream	Circular	-

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A23. Caracterización macroscópica de las bacterias aisladas durante la etapa termofílica.

Código	Color	Forma	Observaciones
BSM-001	568 (368) apricot	Circular	-
BSM-002	352 pale cream	-	Cubre toda la caja
BSM-003	352 pale cream	-	Cubre toda la caja
BSM-004	white	-	Cubre toda la caja
BSM-005	568 (368) apricot	Circular	-
BSM-006	568 (368) apricot	Circular	-
BSM-007	352 pale cream	Circular	-
BSM-008	white	Ramificada	Cubre toda la caja
BSM-009	white	Circular	-

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A24. Caracterización macroscópica de las bacterias aisladas durante la etapa estacionaria.

Código	Color	Forma	Observaciones
BTM-001	white	Lobulada	-
BTM-002	352 pale cream	Irregular	Cubre toda la caja
BTM-003	352 pale cream	Irregular	Cubre toda la caja
BTM-004	white	-	Cubre toda la caja
BTM-005	352 pale cream	Ramificada	Cubre toda la caja
BTM-006	white	Irregular	Cubre toda la caja
BTM-007	white	-	Cubre toda la caja
BTM-008	352 pale cream	Lobulada	-
BTM-009	white	Irregular	Cubre toda la caja
BTM-010	white	-	Cubre toda la caja
BTM-011	white	-	Cubre toda la caja
BTM-012	white	-	Cubre toda la caja
BTM-013	white	-	Cubre toda la caja
BTM-014	white	Ramificada	-
BTM-015	white	-	Cubre toda la caja

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A25. Caracterización macroscópica de las bacterias aisladas durante la etapa final.

Código	Color	Forma	Observaciones
BCM-001	352 pale cream	Irregular	-
BCM-002	white	Circular	-
BCM-003	white	Lobulada	-
BCM-004	white	Ramificada	-
BCM-005	white	-	Cubre toda la caja
BCM-006	white	Circular	-
BCM-007	Translúcida	Circular	-
BCM-008	white	-	Cubre toda la caja
BCM-009	white	Circular	-

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A26. Caracterización microscópica de las bacterias aisladas durante el proceso de descomposición.

Fase	Forma Célula		Tinción Gram		Presencia de	
	Bacilar	Cocoide	Positiva	Negativa	Cápsulas	Endosporas
Inicial	6	2	7	1	4	0
Termofílica	7	2	7	2	5	2
Estacionaria	13	2	15	0	4	11
Final	9	0	8	1	5	4
Total	35	6	37	4	18	17

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A27. Número de actinomicetes clasificados por rango de crecimiento de acuerdo al pH.

Rango	Inicial	Termofílica	Estacionaria	Final	Total
3.5-9.5	0	0	0	1	1
4.5-9.5	2	6	2	2	12
5.5-6.5	0	0	1	2	3
5.5-7.5	1	0	0	0	1
5.5-8.5	0	0	2	1	3
5.5-9.5	12	9	15	14	50
Total	15	15	20	20	70

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A28. Número de actinomicetes que crecieron de acuerdo a diferentes valores de temperatura.

Temperatura	Inicial	Termofílica	Estacionaria	Final
4°C	0	0	0	1
37°C	15	15	20	19
50°C	6	5	15	10

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A29. Número de actinomicetes que usaron aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno.

Etapa	Tirosina	Glicina	Treonina	Valina	Alanina	Nº de cultivos
Inicial	14	14	14	13	14	15
Termofílica	14	14	14	15	14	15
Estacionaria	14	15	17	19	17	20
Final	18	17	17	17	20	20
Total	60	60	62	64	65	70

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A30. Actinomicetes productores de celulasas, amilasas y quitinasas

Etapa	Producción de			Nº de cultivos estudiados
	Celulasas	Quitinasas	Amilasas	
Inicial	11	10	13	15
Termofílica	13	8	9	15
Estacionaria	9	12	6	20
Final	7	16	8	20

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A31. Número de bacterias clasificadas por rango de crecimiento de acuerdo al pH.

Rango	Inicial	Termofilica	Estacionaria	Final	Total
6,5-9,5	6	9	15	7	37
6,5	1	0	0	2	3
Total	8	9	15	9	41

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A32. Número de bacterias que crecieron de acuerdo a diferentes valores de temperatura.

Temperatura	Inicial	Termofilica	Estacionaria	Final
4°C	0	1	1	1
37°C	7	7	13	6
50°C	2	6	13	3

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A33. Número de bacterias que usaron aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno.

Etapa	Tirosina	Glicina	Treonina	Valina	Alanina	Nº de cultivos
Inicial	6	6	6	7	5	8
Termofilica	7	8	8	9	7	9
Estacionaria	15	15	15	14	15	15
Final	5	3	6	5	7	9
Total	33	32	35	35	34	41

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A34. Bacterias productoras de celulasas, amilasas y quitinasas

Etapa	Producción de			N° de cultivos estudiados
	Celulasas	Quitinasas	Amilasas	
Inicial	6	6	2	8
Termofilica	4	9	4	9
Estacionaria	14	14	9	15
Final	6	4	1	9

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

Tabla A35. Comparación del porcentaje de actinomicetes y bacterias productoras de celulasas y amilasas durante las diferentes etapas de descomposición

Etapa	Actinomicetes		Bacterias	
	Celulolíticos	Amilolíticos	Celulolíticos	Amilolíticos
Inicial	73%	87%	75%	25%
Termofilica	87%	60%	44%	44%
Estacionaria	45%	30%	93%	60%
Final	35%	40%	67%	11%

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010

ANEXO B
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Tabla B1. Número de ufc/g de bacterias creciendo en agar nutritivo

Tratamiento	Fase compostaje	R1	R2	Promedio
0	Inicial	3420000	3870000	3,65x10 ⁶
1	Termofílica	2070000	2340000	2,2x10 ⁶
2	Estacionaria	45450000	55350000	5,04x10 ⁷
3	Final	47250000	33750000	4,05x10 ⁷

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B2. Análisis de varianza del número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de compost (ufc/g), en agar nutritivo

Fuente de Variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
Tratamientos	3	3.72x10 ¹⁵	1.24x10 ¹⁵	35.331	0,0000**
Error	4	1.40x10 ¹⁴	3.51x10 ¹³		
Total	7	3.86x10 ¹⁵			

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B3. Prueba de Tukey al 5% de significancia para el número de ufc/g de bacterias.

Tratamientos		Medias**	
2	Etapa Estacionaria	5.04x10 ⁷	A
3	Etapa Final	4.05x10 ⁷	A
0	Etapa Inicial	3.61x10 ⁶	B
1	Etapa Termofílica	2.21x10 ⁶	B

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B4. Porcentaje bacterias creciendo en agar nutritivo

Tratamiento	Fase compostaje	R1	R2	Promedio
0	Inicial	67,9%	78,2%	73,0%
1	Termofílica	54,1%	63,4%	58,8%
2	Estacionaria	64,3%	74,5%	69,4%
3	Final	68,2%	66,4%	67,3%

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B5. Análisis de varianza del porcentaje de bacterias en agar nutritivo

Fuente de Variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
Tratamientos	3	220.905	73.635	1.965	0.2614 ns
Error	4	149.930	37.482		
Total	7	370.835			

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B6. Número de colonias diferentes de bacterias creciendo en agar nutritivo

Tratamiento	Fase compostaje	R1	R2	Promedio
0	Inicial	7	6	7
1	Termofílica	12	10	11
2	Estacionaria	3	2	3
3	Final	3	4	4

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B7. Análisis de varianza del número de colonias diferentes de bacterias que crecieron en los platos de agar nutritivo

Fuente de Variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
Tratamientos	3	87.375	29.125	33.286	0.0027**
Error	4	3.500	0.875		
Total	7	90.875			

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B8. Prueba de Tukey al 5% de significancia para número de colonias diferentes de bacterias que crecieron en los platos de agar nutritivo.

Tratamientos		Medias**	
1	Termofílica	11.0	A
0	Inicial	7.0	A
3	Final	4.0	B
2	Estacionaria	3.0	C

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B9. Número de ufc/g de actinomicetes creciendo en agar GYM

Tratamiento	Fase compostaje	R1	R2	Promedio
0	Inicial	8145000	8685000	8,42X10 ⁶
1	Termofílica	8910000	7110000	8,01X10 ⁶
2	Estacionaria	70200000	90000000	8,01X10 ⁷
3	Final	90450000	90450000	9,05X10 ⁷

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B10. Análisis de varianza del número de unidades formadoras de colonias de actinomicetes en agar GYM

Fuente de Variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
Tratamientos	3	1.20x10 ¹⁶	4.00x10 ¹⁵	80.791	0,0005**
Error	4	1.98x10 ¹⁴	4.94x10 ¹³		
Total	7	1.22x10 ¹⁶			

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B11. Prueba de Tukey al 5% de significancia para el número de ufc/g de actinomicetes.

Tratamientos		Medias**	
3	Final	9.05x10 ⁷	A
2	Estacionaria	8.01x10 ⁷	A
0	Inicial	8.42x10 ⁶	B
1	Termofílica	8.01x10 ⁶	B

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B12. Porcentaje de actinomicetes creciendo en agar GYM

Tratamiento	Fase compostaje	R1	R2	Promedio
0	Inicial	85,8%	84,6%	85,2%
1	Termofílica	88,0%	86,8%	87,4%
2	Estacionaria	100,0%	100,0%	100,0%
3	Final	100,0%	100,0%	100,0%

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B13. Análisis de varianza del porcentaje de actinomicetes en agar GYM

Fuente de Variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
Tratamientos	3	380.22	126.74	352.055	0.0000**
Error	4	1.44	0.36		
Total	7				

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B14. Prueba de Tukey al 5% de significancia para el porcentaje de actinomicetes en agar GYM.

Tratamientos		Medias**	
2	Estacionaria	100.0	A
3	Final	100.0	A
1	Termofilica	87.4	B
0	Inicial	85.2	B

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B15. Número de colonias diferentes de actinomicetes creciendo en agar GYM

Tratamiento	Fase compostaje	R1	R2	Promedio
0	Inicial	25	23	24
1	Termofilica	32	33	33
2	Estacionaria	32	32	32
3	Final	28	28	28

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B16. Análisis de varianza del número de colonias diferentes de actinomicetes que crecieron en los platos de agar GYM

Fuente de Variación	g.l	SC	CM	Fc	Probabilidad
Tratamientos	3	94.375	31.458	50.333	0.0012**
Error	4	2.500	0.625		
Total	7	96.875			

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B17. Prueba de Tukey al 5% de significancia para el número de colonias diferentes de actinomicetes que crecieron en los platos de agar GYM.

Tratamientos		Medias**	
1	Termofílica	33	A
2	Estacionaria	32	A
3	Final	28	B
0	Inicial	24	C

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B18. Matriz de código binario usada para taxonomía numérica de los actinomicetes

Código	pH							Temperatura °C			Bioquímicas								Macro	MICELIO AEREO								MICELIO DEL SUSTRATO								
	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	4	37	50	Cel	Qui	Alm	Tyr	Gli	Tre	Val	Ala	Mar	Pdf	Mll	Vll	Sgr	Whi	Lst	Gye	Pcr	Spi	Apr	Lbr	Lbu	Ggr	Pcr	Rre	Apr	Bye
APM-005	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
APM-008	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
APM-010	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
APM-011	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
APM-014	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
APM-015	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
APM-016	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
APM-018	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
APM-022	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
APM-031	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
APM-036	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
APM-037	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
APM-041	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
APM-049	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
APM-050	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ASM-002	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
ASM-011	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
ASM-016	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
ASM-017	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
ASM-025	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
ASM-026	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B18. Continuación...

Código	pH							Temperatura °C			Bioquímicas							Macro							MICELIO AEREO							MICELIO DEL SUSTRATO						
	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	4	37	50	Cel	Qui	Alm	Tyr	Gli	Tre	Val	Ala	Mar	Pdf	Mll	VII	Sgr	Whi	Lst	Gye	Pcr	Spi	Apr	Lbr	Lbu	Ggr	Pcr	Rre	Apr	Bye	Sbl	
ASM-029	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
ASM-032	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
ASM-035	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
ASM-040	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
ASM-043	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
ASM-047	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
ASM-051	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
ASM-053	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
ASM-054	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
ATM-001	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
ATM-002	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
ATM-005	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
ATM-007	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
ATM-010	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
ATM-020	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
ATM-025	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
ATM-026	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
ATM-028	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
ATM-038	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
ATM-042	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
ATM-048	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B18. Continuación...

Código	pH							Temperatura °C			Bioquímicas						Macro					MICELIO AEREO							MICELIO DEL SUSTRATO								
	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	4	37	50	Cel	Qui	Alm	Tyr	Gli	Tre	Val	Ala	Mar	Pdf	Mll	Vll	Sgr	Whi	Lst	Gye	Pcr	Spi	Apr	Lbr	Lbu	Ggr	Pcr	Rre	Apr	Bye	Sbl
ATM-049	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ATM-051	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
ATM-052	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
ATM-053	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
ATM-056	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
ATM-061	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
ATM-064	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
ATM-070	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
ACM-001	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
ACM-004	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
ACM-006	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
ACM-008	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
ACM-014	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
ACM-015	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
ACM-018	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
ACM-020	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
ACM-021	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
ACM-022	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
ACM-030	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
ACM-033	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
ACM-038	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B18. Continuación...

Código	pH							Temperatura °C			Bioquímicas					Macro			MICELIO AEREO						MICELIO DEL SUSTRATO											
	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	4	37	50	Cel	Qui	Alm	Tyr	Gli	Tre	Val	Ala	Mar	Pdf	MII	VII	Sgr	Whi	Lst	Gye	Pcr	Spi	Apr	Lbr	Lbu	Ggr	Pcr	Rre	Apr	Bye
ACM-044	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
ACM-049	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
ACM-050	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
ACM-053	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
ACM-063	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
ACM-065	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
ACM-067	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B19. Matriz de código binario usada para taxonomía numérica de las bacterias

Código	pH							Temperatura °C			Bioquímicas					Macroscópicas						Microscópicas											
	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	4	37	50	Cel	Qui	Alm	Tyr	Gli	Tre	Val	Ala	Apr	Pcr	Whi	Bye	Cir	Irr	Lob	Ram	Bac	Coc	Gpo	Gne	Cap	End	
BPM-001	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0		
BPM-002	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0		
BPM-003	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0		
BPM-004	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0		
BPM-005	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0		
BPM-006	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0		
BPM-007	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0		
BPM-008	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	
BSM-001	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B19. Continuación...

Código	pH						Temperatura °C				Bioquímicas						Macroscópicas						Microscópicas								
	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	4	37	50	Cel	Qui	Alm	Tyr	Gli	Tre	Val	Ala	Apr	Pcr	Whi	Bye	Cir	Irr	Lob	Ram	Bac	Coc	Gpo	Gne	Cap
BSM-002	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
BSM-003	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
BSM-004	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
BSM-005	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
BSM-006	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
BSM-007	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
BSM-008	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1
BSM-009	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
BTM-001	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
BTM-002	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
BTM-003	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
BTM-004	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
BTM-005	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1
BTM-006	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
BTM-007	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
BTM-008	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
BTM-009	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
BTM-010	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
BTM-011	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
BTM-012	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
BTM-013	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
BTM-014	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1
BTM-015	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B19. Continuación...

Código	pH						Temperatura °C			Bioquímicas							Macroscópicas							Microscópicas								
	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	4	37	50	Cel	Qui	Alm	Tyr	Gli	Tre	Val	Ala	Apr	Pcr	Whi	Bye	Cir	Irr	Lob	Ram	Bac	Coc	Gpo	Gne	Cap	End
BCM-001	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
BCM-002	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
BCM-003	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1
BCM-004	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	
BCM-005	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
BCM-006	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1
BCM-007	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
BCM-008	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
BCM-009	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B20. Grupos especie formados luego del análisis de la taxonomía numérica de datos fenotípicos de los actinomicetes

Código	ID grupo especie	Fase de descomposición	Número de integrantes
APM005			
ATM004			
APM014			
ASM054			
ATM061			
ACM014			
ATM053			
ASM011			
ASM017			
APM010	1	P,S,T,C	19
ATM026			
APM050			
APM011			
ASM016			
ASM043			
ATM048			
ACM067			
ACM021			
ACM065			
ATM005	2	T	2
ATM051			
ACM008			
ACM015	3	C	3
ACM022			
APM008			
ATM001	4	P,T,C	3
ACM033			
ASM047			
ATM070	5	S,T	3
ASM051			
APM041	6	P	1
ASM040	7	S	1
ACM018	8	C	1
APM015	9	P	1

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B20. Continuación...

Código	ID grupo especie	Fase de descomposición	Número de integrantes
APM016			
APM049			
ASM032			
APM36			
ASM053			
ASM026	10	P,S	11
ASM025			
ASM029			
APM031			
ASM025			
APM022			
APM018	11	P,T	2
ATM042			
APM037	12	P	1
ATM002			
ATM049			
ACM049	13	T,C	5
ACM020			
ACM006			
ATM056	14	T	1
ATM007			
ATM025			
ATM052			
ACM063			
ATM028	15	T,C	10
ACM030			
ACM044			
ACM050			
ACM053			
ATM010			
ASM002	16	S	1
ACM001	17	C	1
ATM020	18	T	1
ATM038	19	T,C	2
ACM004			
ACM038	20	C	1

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B21. Grupos especie formados luego del análisis de la taxonomía numérica de datos fenotípicos de los actinomicetes de cada etapa degradativa

Código	ID grupo especie	Fase de descomposición	Número de integrantes
APM005			
APM014			
APM010	1	P	5
APM050			
APM011			
APM015	2	P	1
APM037	3	P	1
APM008	4	P	1
APM016			
APM049			
APM036	5	P	5
APM031			
APM022			
APM041	6	P	1
APM018	7	P	1
ASM002	1	S	1
ASM011			
ASM017			
ASM054	2	S	5
ASM016			
ASM043			
ASM040	3	S	1
ASM047	4	S	2
ASM051			
ASM025			
ASM032			
ASM026	5	S	6
ASM035			
ASM029			
ASM053			
ATM001	1	T	1
ATM070	2	T	1
ATM005	3	T	2
ATM051			
ATM026			
ATM061	4	T	4
ATM064			
ATM053			
ATM048	5	T	1
ATM002	6	T	2
ATM049			

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B21. Continuación...

Código	ID grupo especie	Fase de descomposición	Número de integrantes
ATM007			
ATM025			
ATM052	7	T	5
ATM028			
ATM010			
ATM042	8	T	1
ATM056	9	T	1
ATM020	10	T	1
ATM038	11	T	1
ACM001	1	C	1
ACM004	2	C	1
ACM018	3	C	1
ACM038	4	C	1
ACM006	5	C	2
ACM049			
ACM020	6	C	1
ACM030			
ACM050			
ACM053	7	C	5
ACM044			
ACM063			
ACM008			
ACM015	8	C	3
ACM022			
ACM014	9	C	2
ACM067			
ACM021	10	C	2
ACM065			
ACM033	11	C	1

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B22. Grupos especie formados luego del análisis de la taxonomía numérica de datos fenotípicos de las bacterias

Código	ID grupo especie	Fase de descomposición	Número de integrantes
BPM001 BSM005 BSM006	1	PRIMERA, SEGUNDA	3
BSM001	2	SEGUNDA	1
BPM003 BPM004 BSM002	3	PRIMERA, SEGUNDA	3
BTM002 BTM003	4	TERCERA	2
BTM007 BTM008	5	TERCUARTAERA	2
BCM001	6	CUARTA	1
BPM005 BSM008 BTM005 BTM014	7	PRIMERA,SEGUNDA, TERCERA	4
BTM001 BCM005 BTM011 BTM013	8	TERCERA, CUARTA	4
BTM010 BTM012	9	TERCERA	2
BSM004	10	SEGUNDA	1
BTM015 BCM008	11	TERCERA, CUARTA	2
BCM003	12	CUARTA	1
BSM003	13	SEGUNDA	1
BTM006 BTM009	14	TERCERA	2
BTM004	15	TERCERA	1
BPM002	16	PRIMERA	1
BSM007	17	SEGUNDA	1
BPM006	18	PRIMERA	1
BPM007 BSM009	19	PRIMERA,SEGUNDA	2
BCM006	20	CUARTA	1
BCM002	21	CUARTA	1
BCM004	22	CUARTA	1
BPM008 BCM007	23	PRIMERA, CUARTA	2
BCM009	24	CUARTA	1

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Tabla B23. Grupos especie formados luego del análisis de la taxonomía numérica de datos fenotípicos de las bacterias de cada etapa degradativa

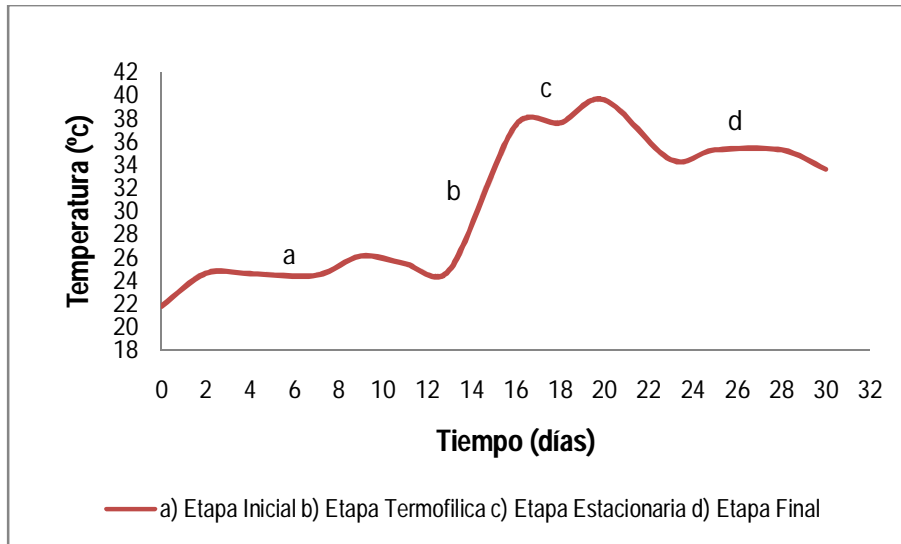
Código	ID grupo especie	Fase de descomposición	Número de integrantes
BPM001	1	P	1
BPM003	2	P	1
BPM004	3	P	1
BPM005	4	P	1
BPM002	5	P	1
BPM006	6	P	1
BPM007	7	P	1
BPM008	8	P	1
BSM001	1	S	1
BSM002	2	S	1
BSM003	3	S	1
BSM005	4	S	2
BSM006			
BSM004	5	S	1
BSM008	6	S	1
BSM007	7	S	1
BSM009	8	S	1
BTM001			
BTM011	1	T	3
BTM013			
BTM005	2	T	2
BTM014			
BTM015	3	T	1
BTM010	4	T	2
BTM012			
BTM002	5	T	2
BTM003			
BTM007	6	T	2
BTM008			
BTM004	7	T	1
BTM006	8	T	2
BTM009			
BCM001	1	C	1
BCM003	2	C	1
BCM005	3	C	1
BCM002	4	C	1
BCM006	5	C	1
BCM004	6	C	1
BCM008	7	C	1
BCM007	8	C	1
BCM009	9	C	1

Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

ANEXO C

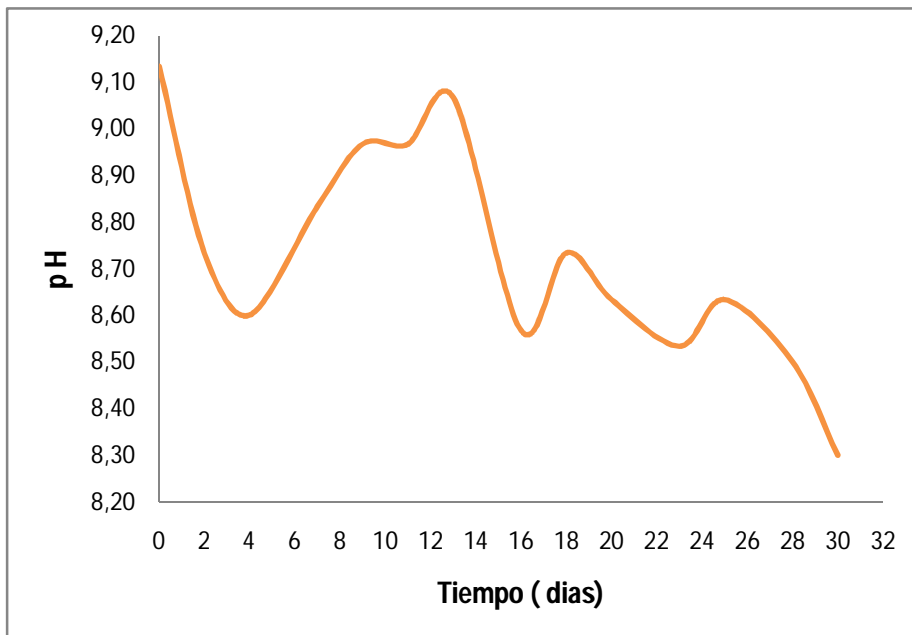
GRÁFICOS

Figura C1. Evaluación de la temperatura en función del tiempo del compost a nivel de laboratorio



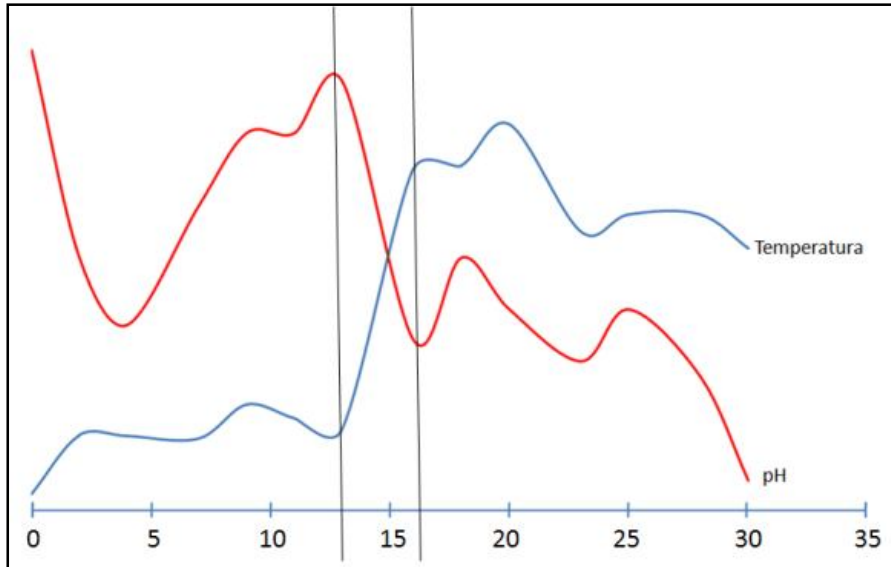
Elaborado por: Gabriel Curipallo 2010.

Figura C2. Evaluación del pH en función del tiempo del compost a nivel de laboratorio



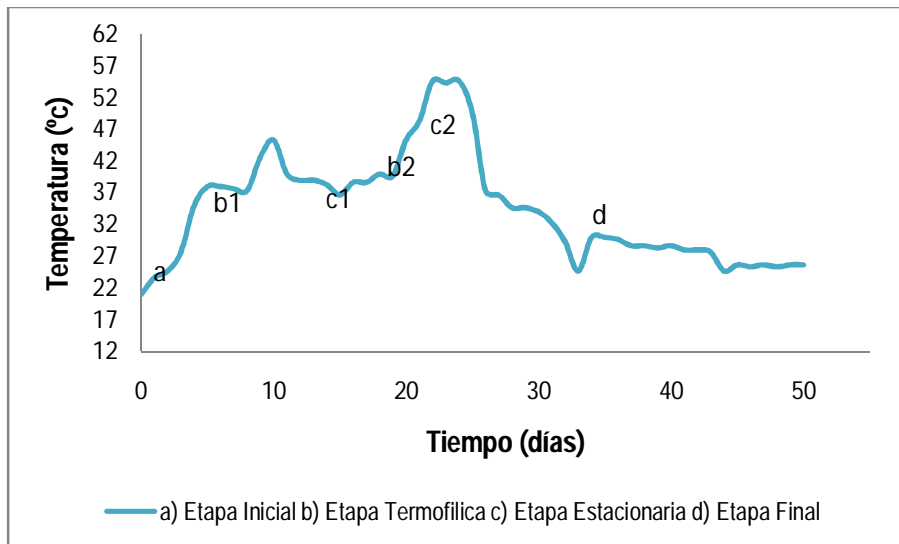
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C3. Comparación de las curvas de temperatura y pH del experimento a nivel de laboratorio



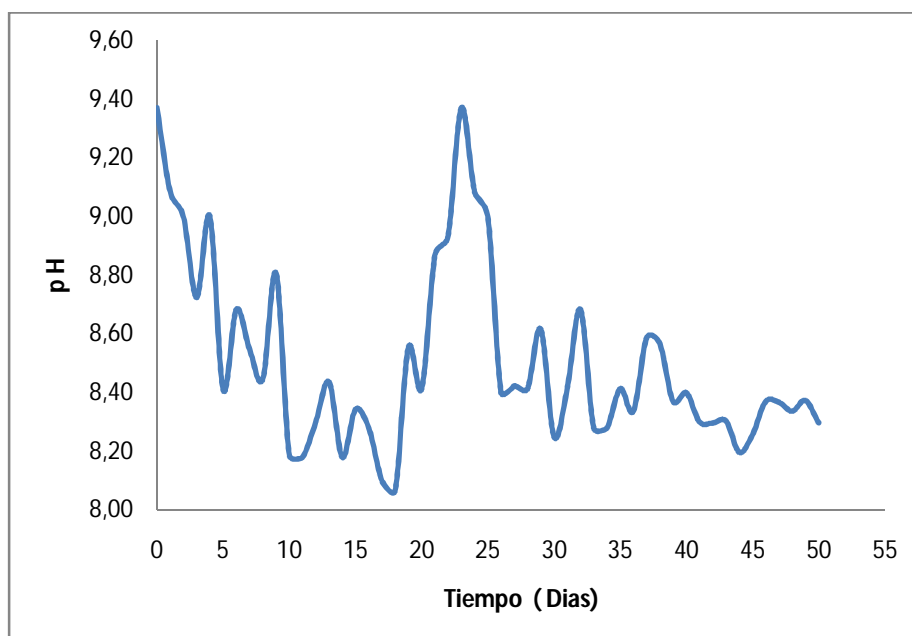
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C4. Evaluación de la temperatura en el proceso de compostaje.



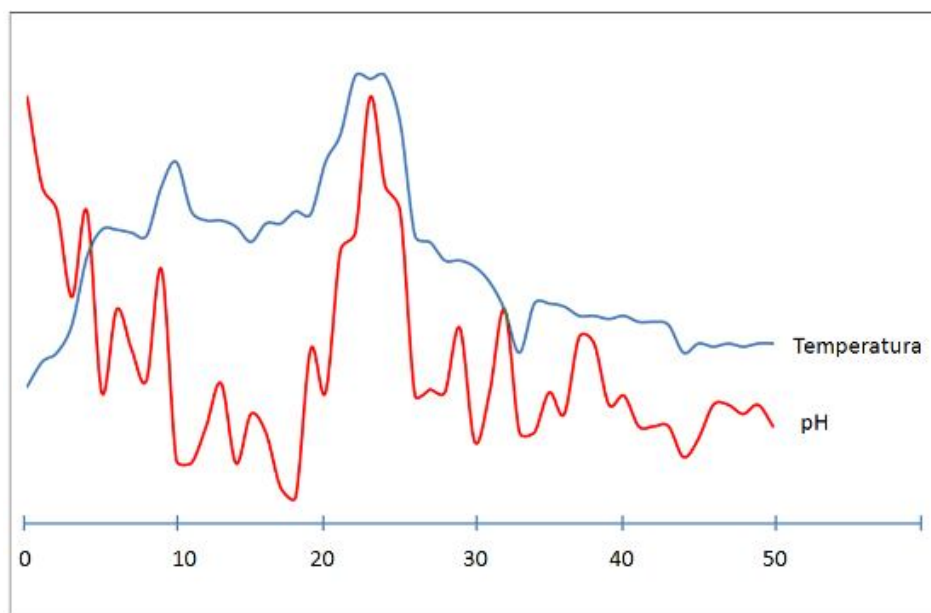
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C5. Evaluación del pH en el proceso de compostaje.



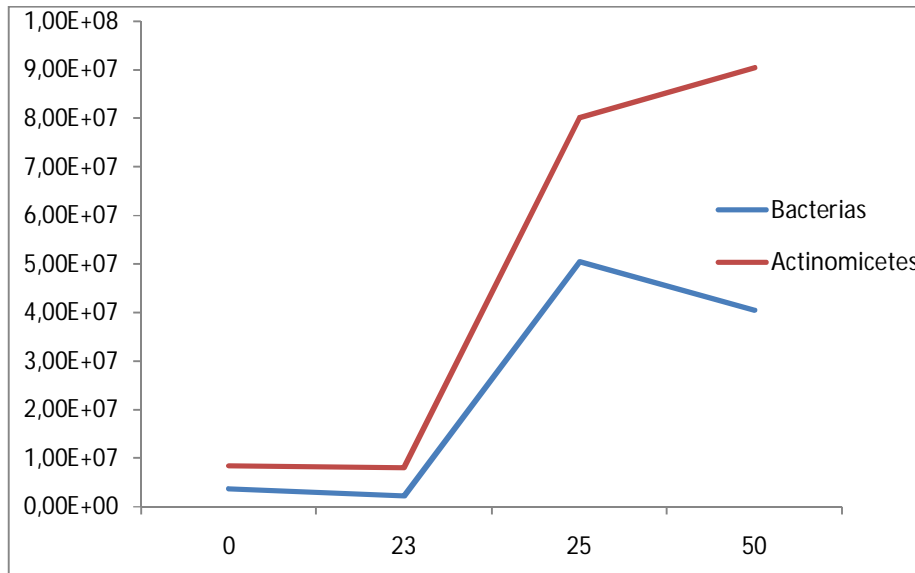
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C6. Comparación de las curvas de temperatura y pH registradas en el experimento final de compostaje.



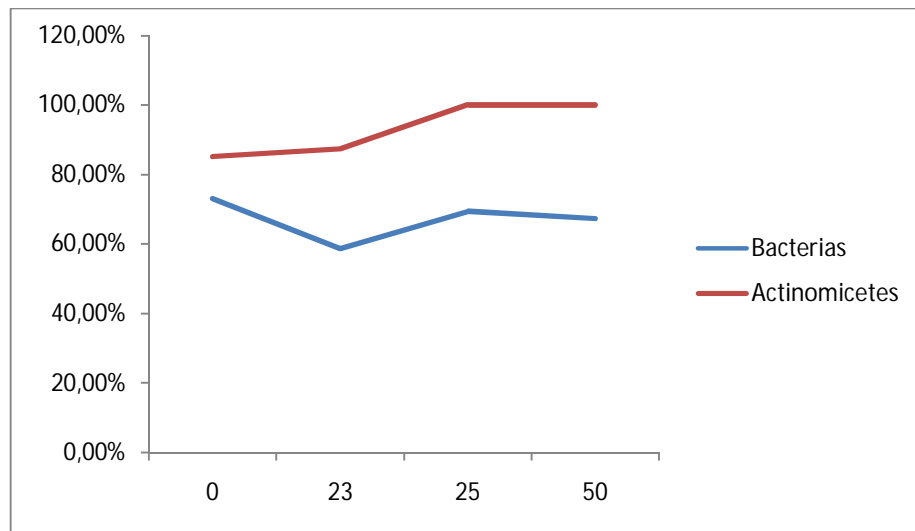
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C7. Comparación de las curvas de ufc/g de muestra de bacterias y actinomicetes en función de cada una de las etapas de descomposición



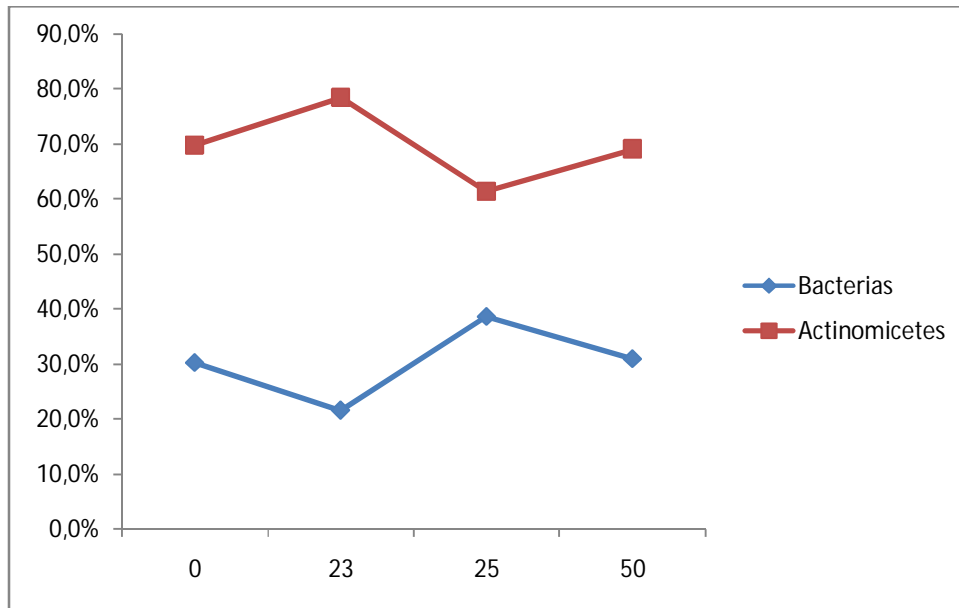
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C8. Comparación de las curvas de porcentaje de bacterias y actinomicetes en función de cada una de las etapas de descomposición, por medio de aislamiento.



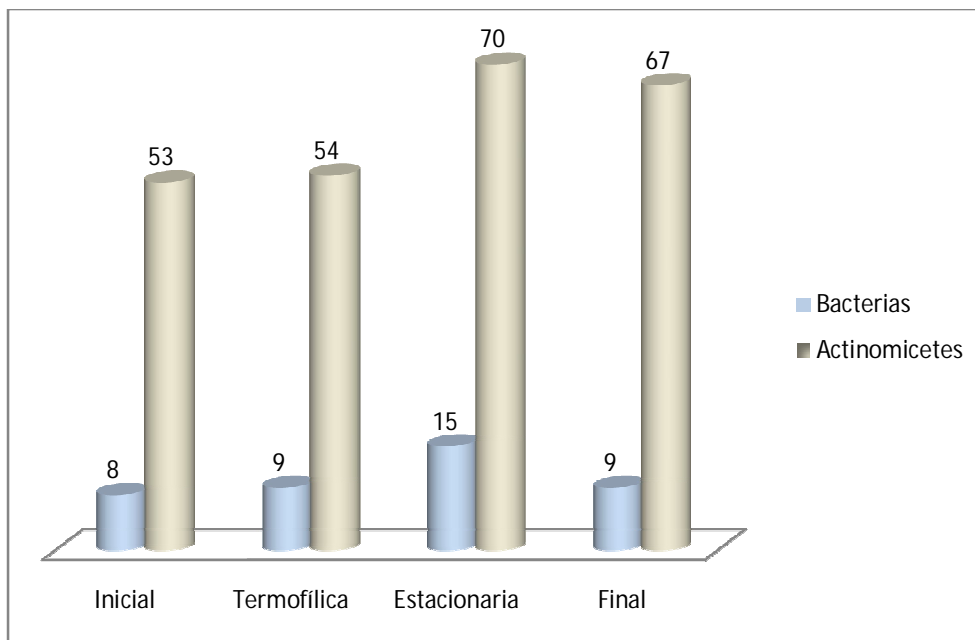
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C9. Comparación de las curvas de porcentaje de bacterias y actinomicetes en función de cada una de las etapas de descomposición, por población total



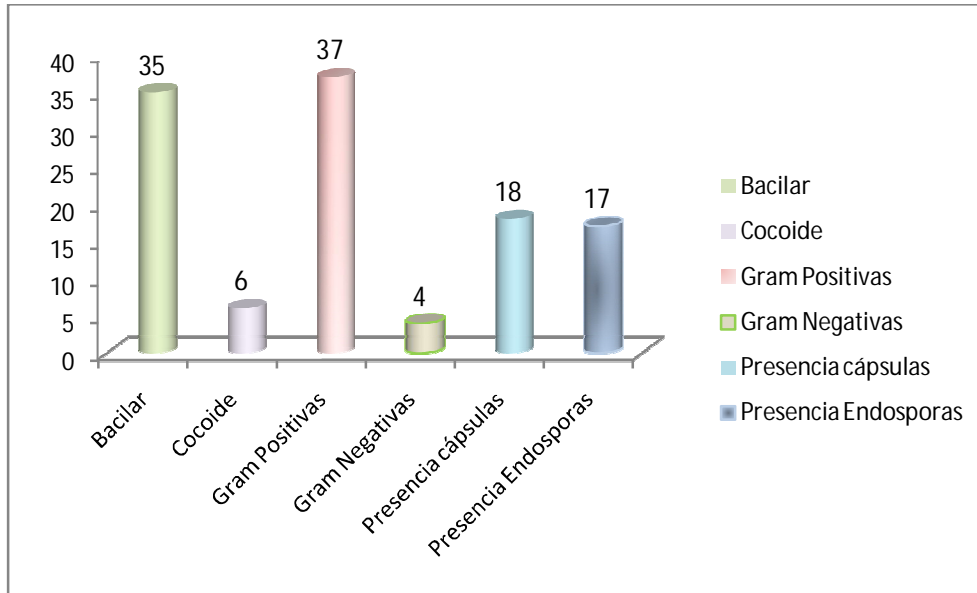
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C10. Número de aislamientos de bacterias y actinomicetes durante las fases de descomposición



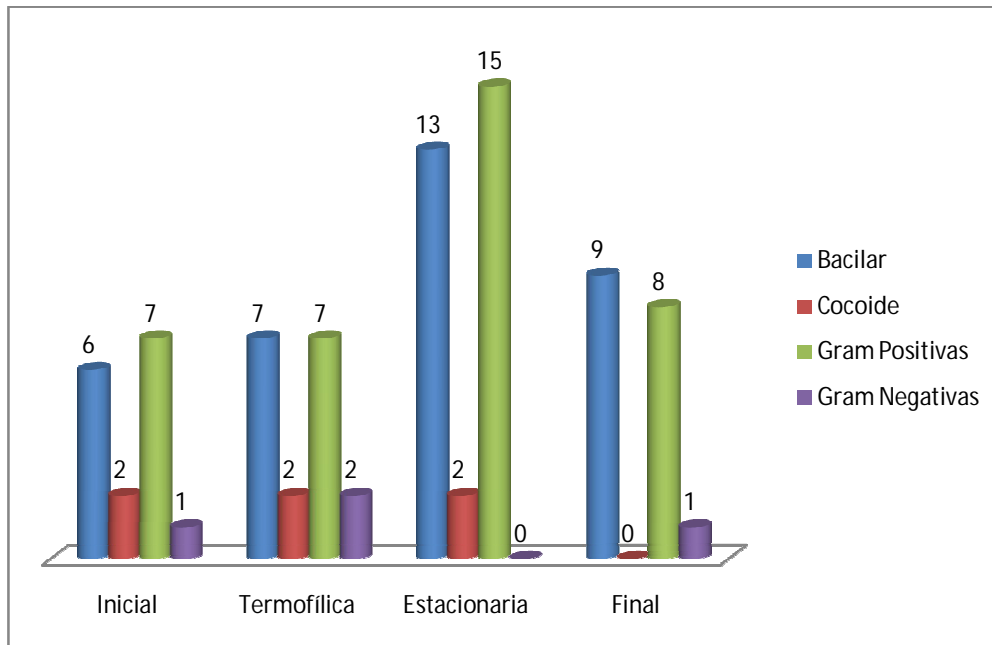
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C11. Caracterización microscópica de las bacterias aisladas durante todo el proceso de descomposición



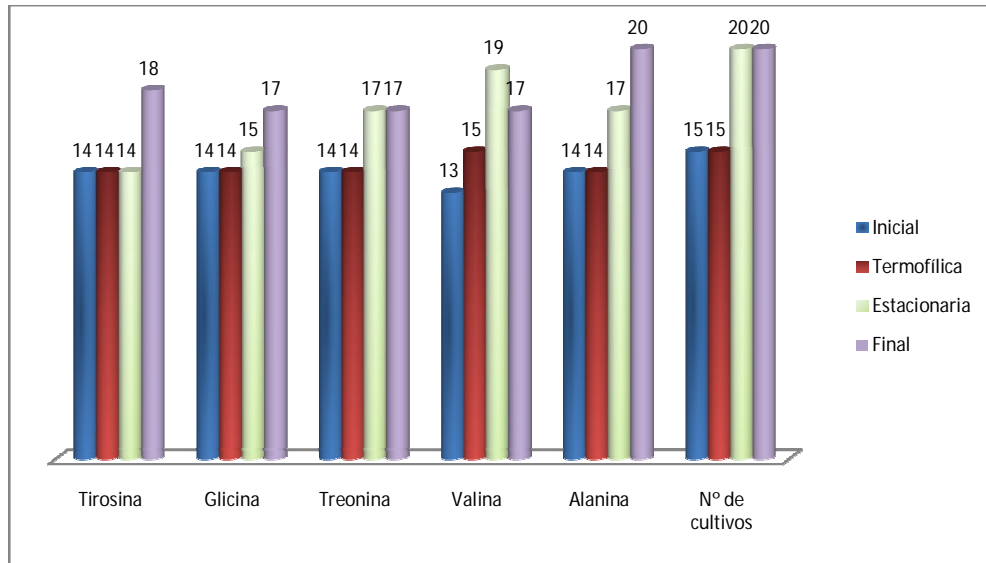
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C12. Caracterización microscópica de las bacterias aisladas en cada una de las fases de descomposición



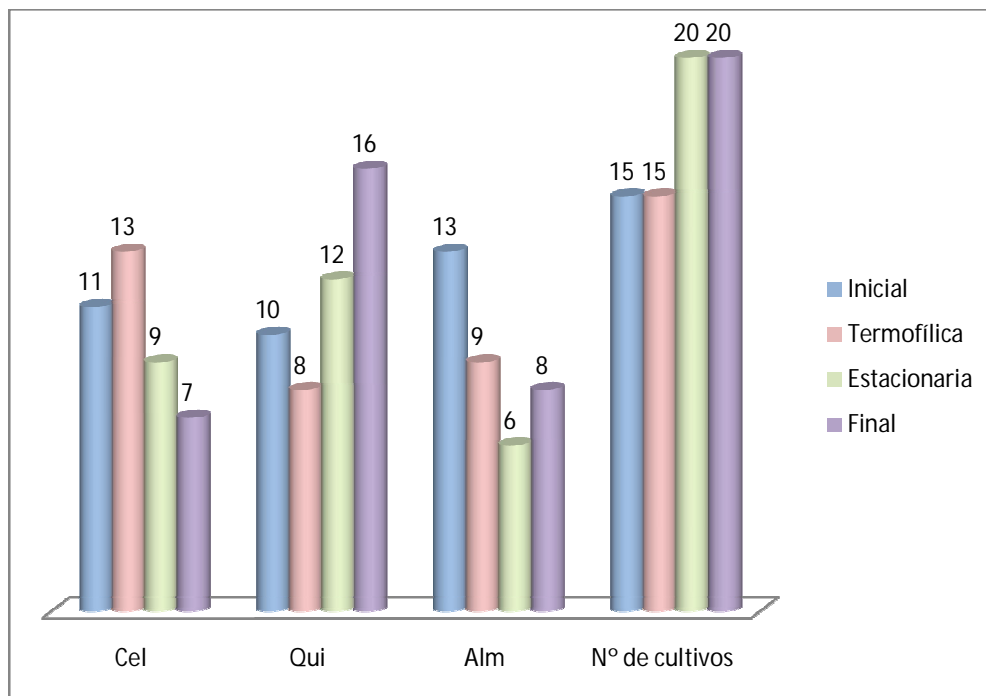
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C13. Número de actinomicetes que crecieron usando aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno durante cada una de las fases de descomposición



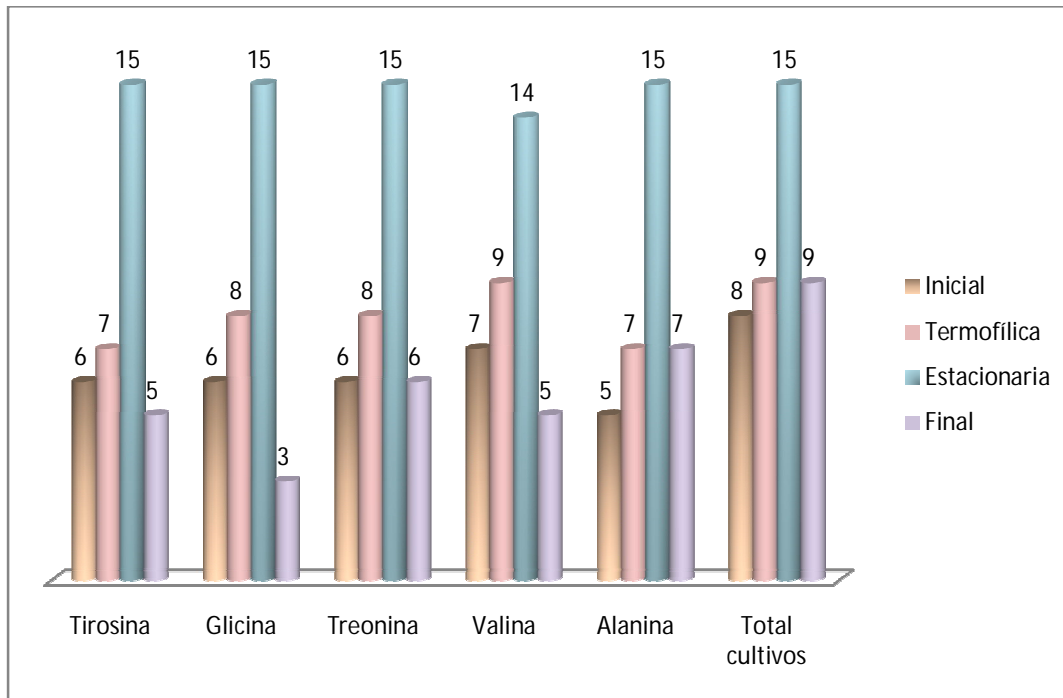
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C14. Número de actinomicetes que produjeron enzimas extracelulares durante las cuatro etapas de descomposición



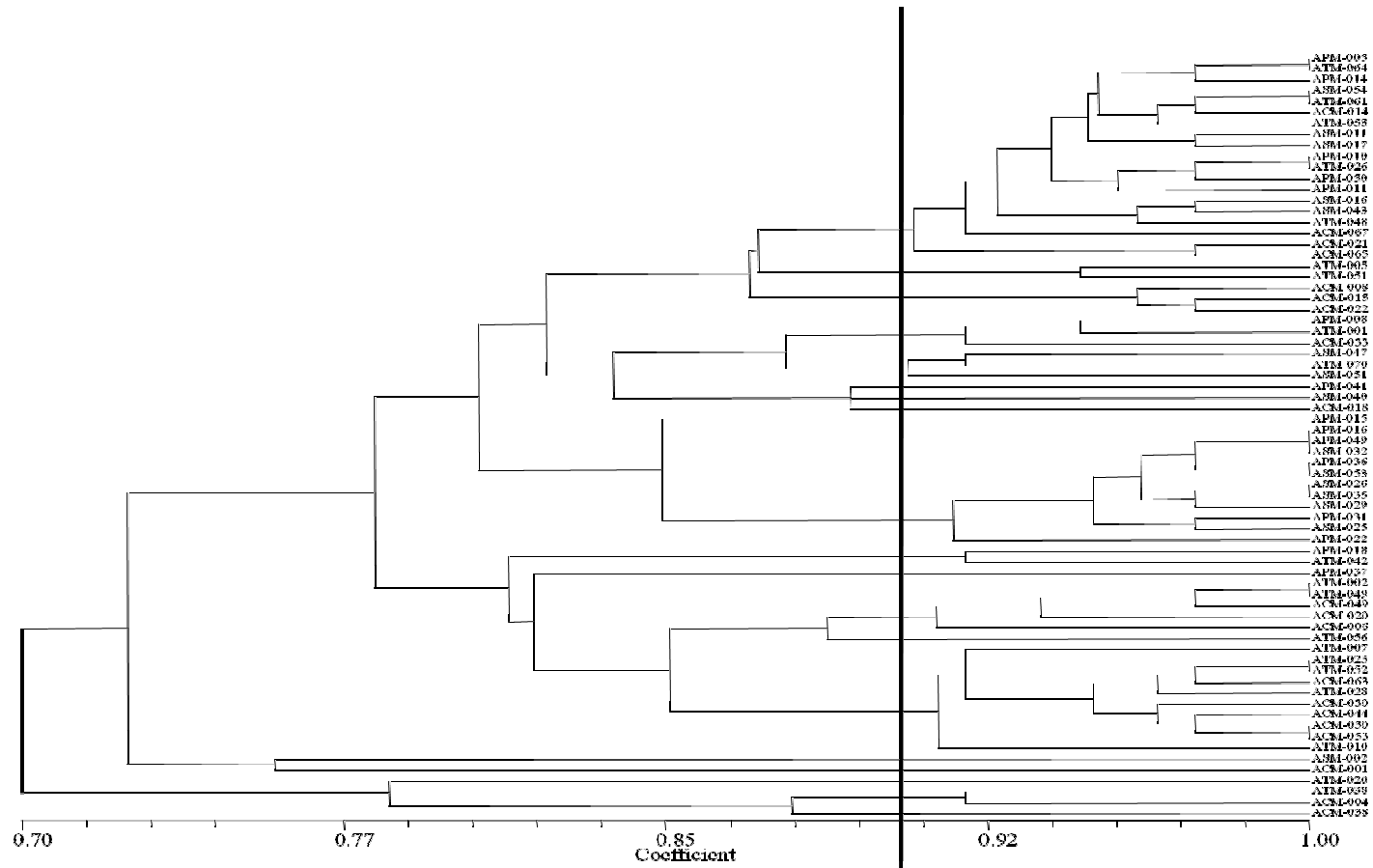
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C15. Número de bacterias que crecieron usando aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno durante cada una de las fases de descomposición



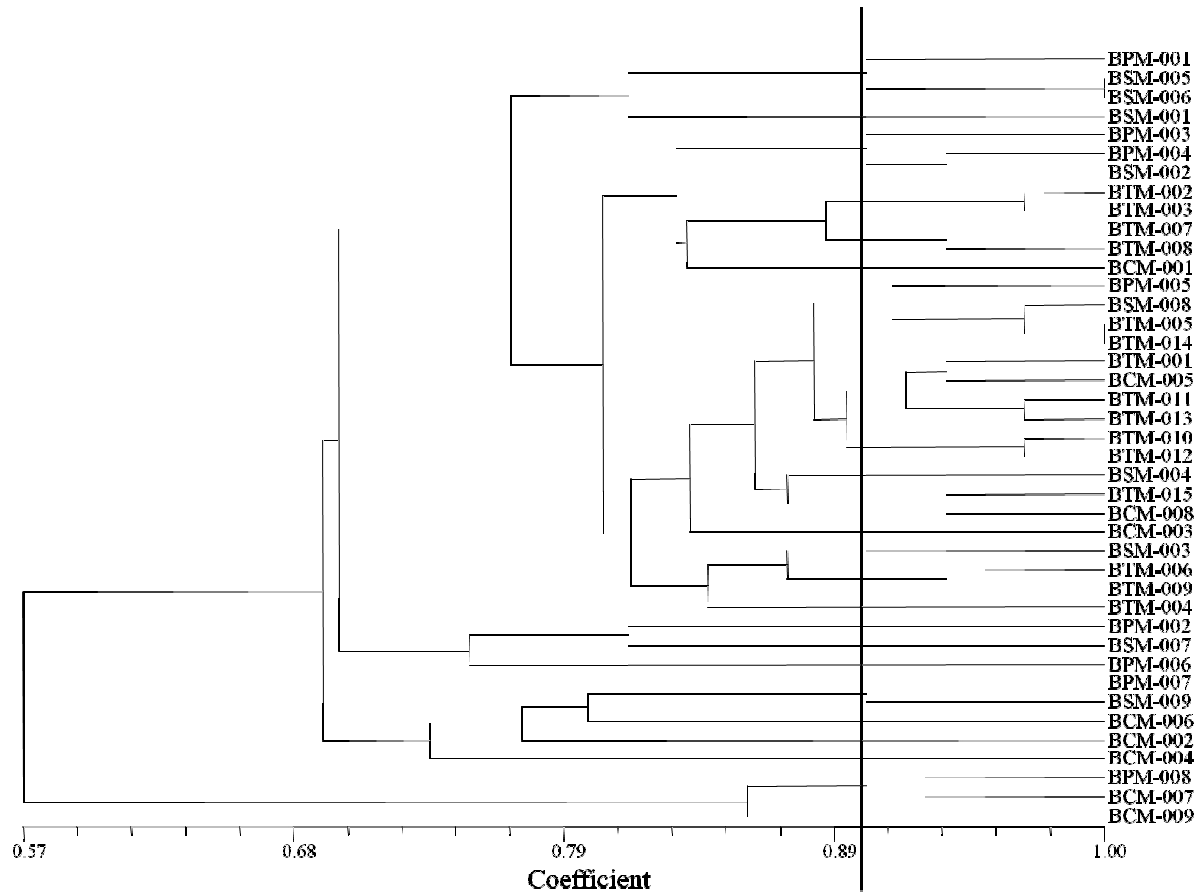
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C16. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de los actinomicetes



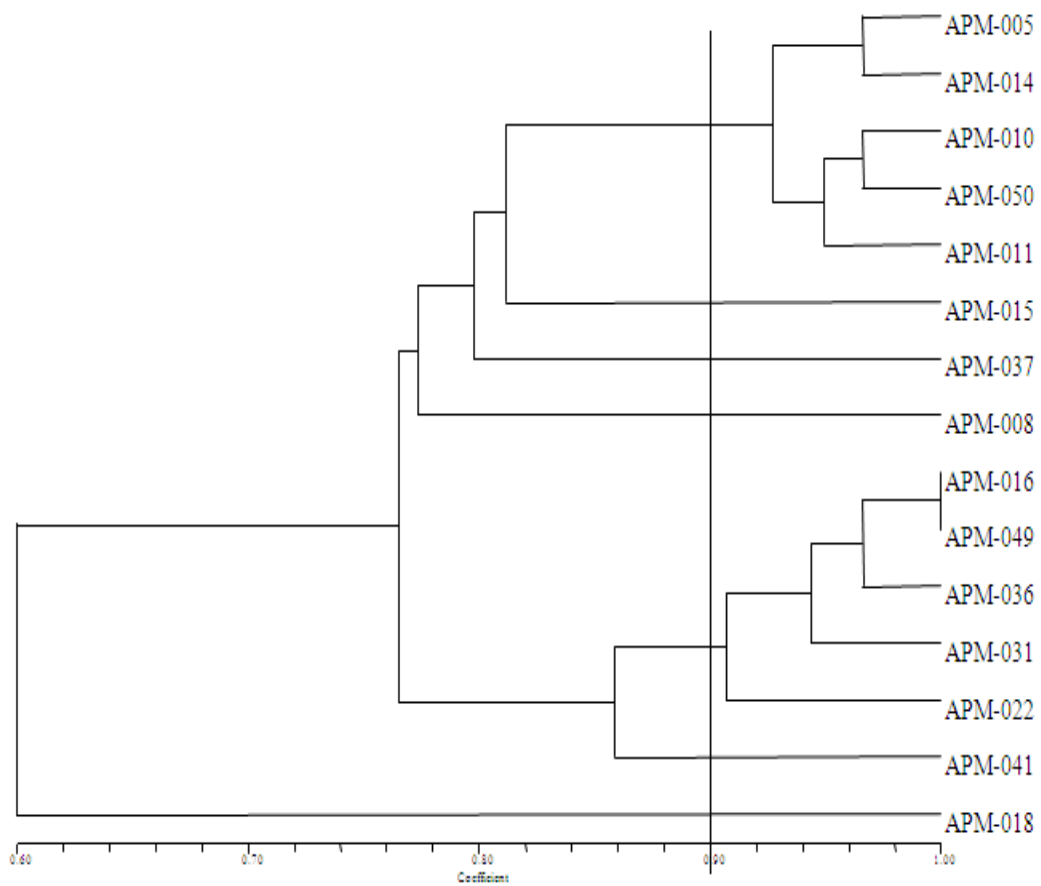
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C17. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de las bacterias



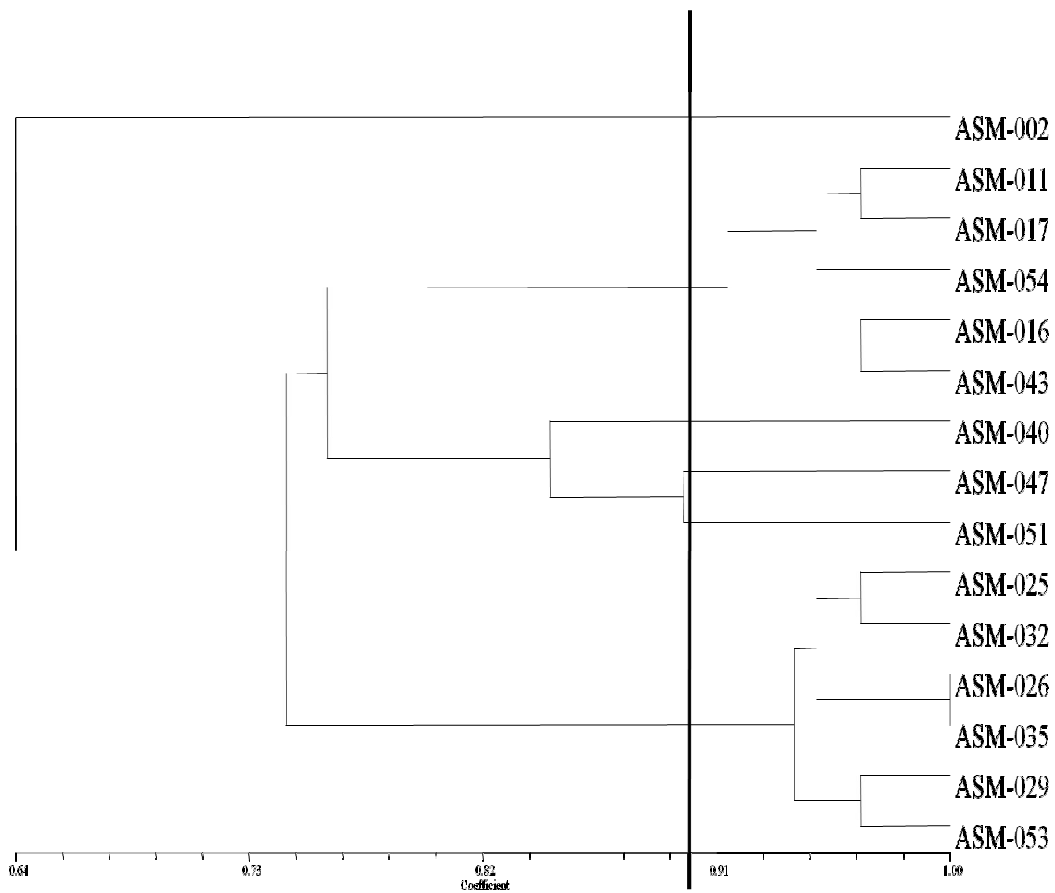
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C18. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de los actinomicetes aislados en la etapa inicial



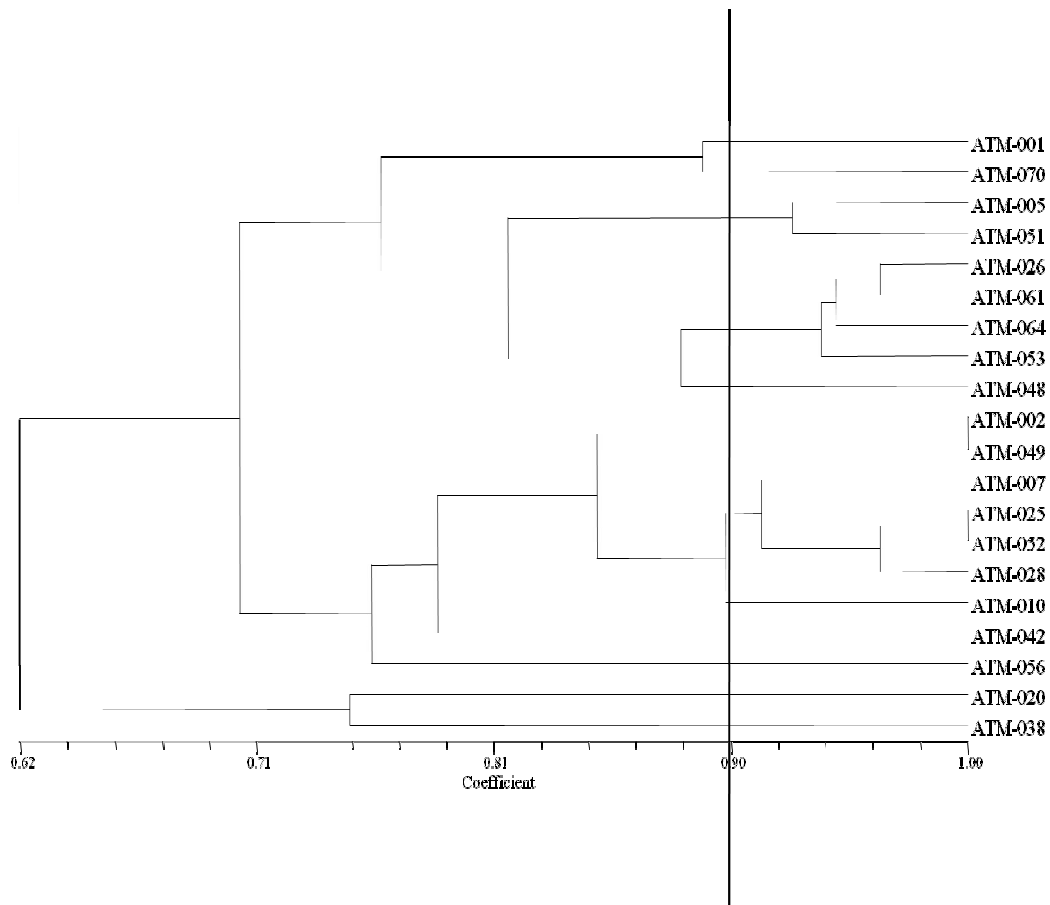
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C19. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de los actinomicetes aislados en la etapa termofílica



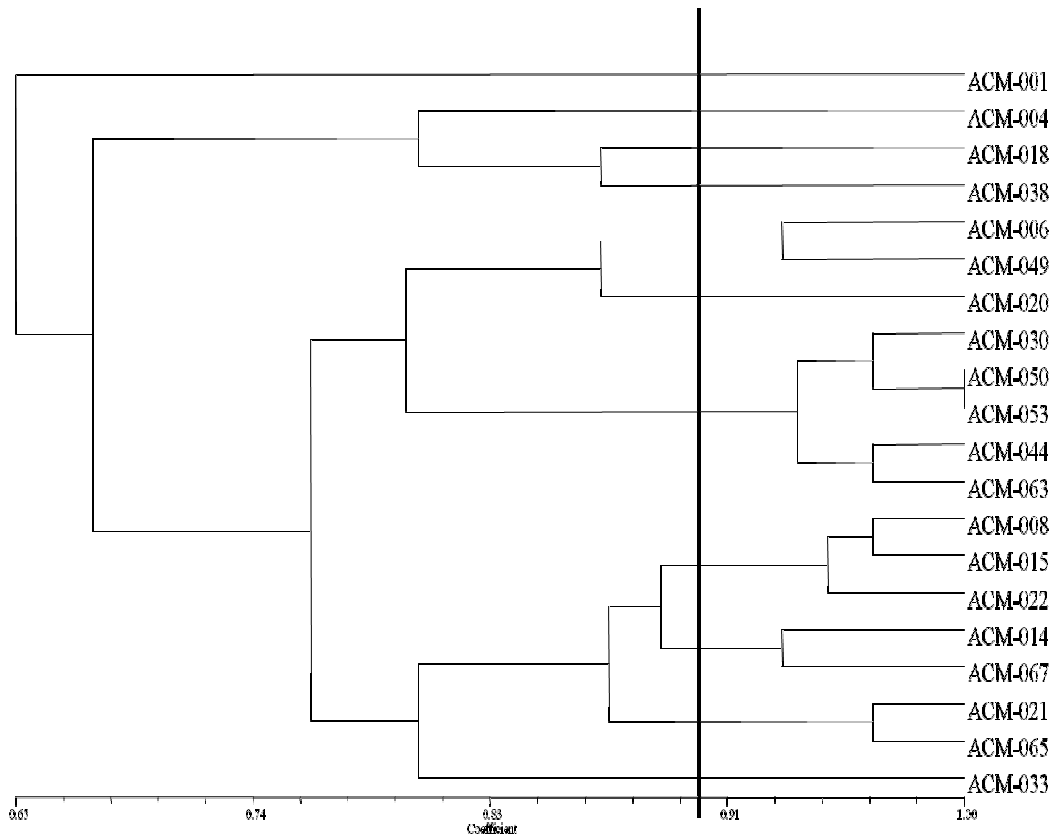
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C20. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de los actinomicetes aislados en la etapa estacionaria



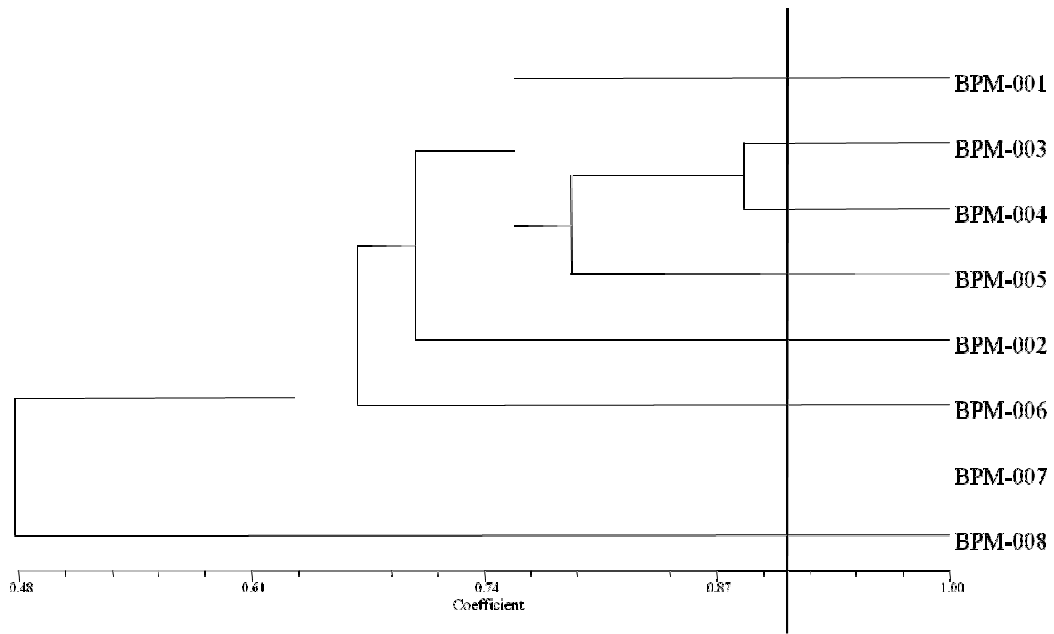
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C21. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de los actinomicetes aislados en la etapa final



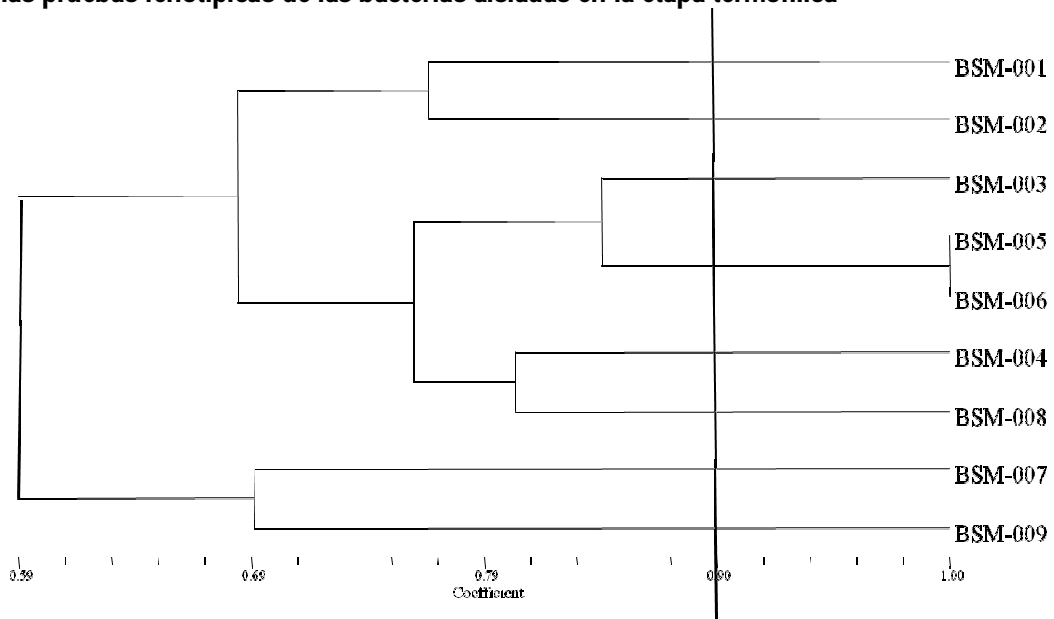
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C22. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de las bacterias aisladas en la etapa inicial



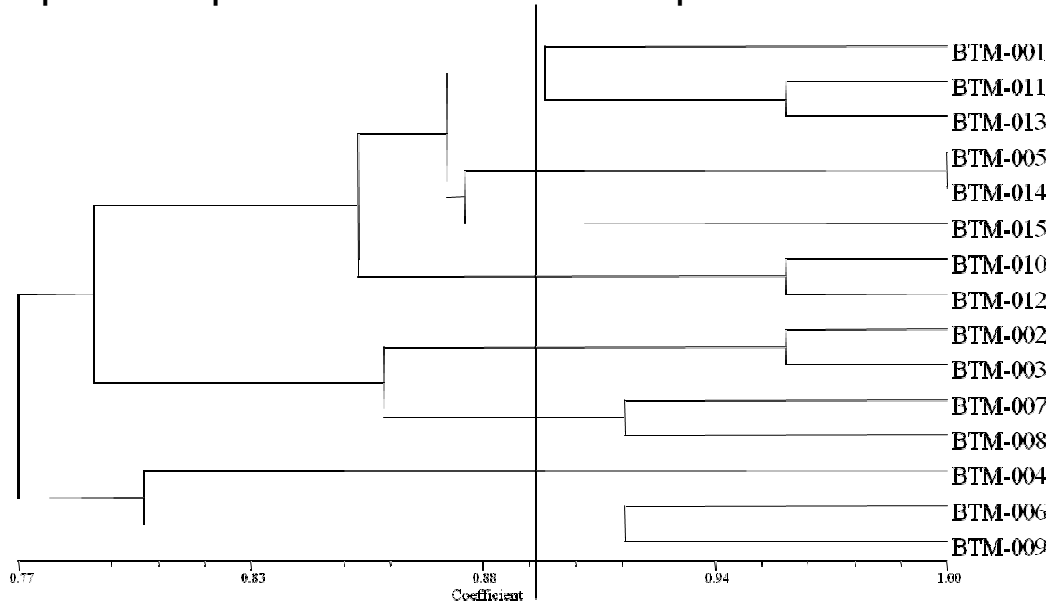
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C23. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de las bacterias aisladas en la etapa termofílica



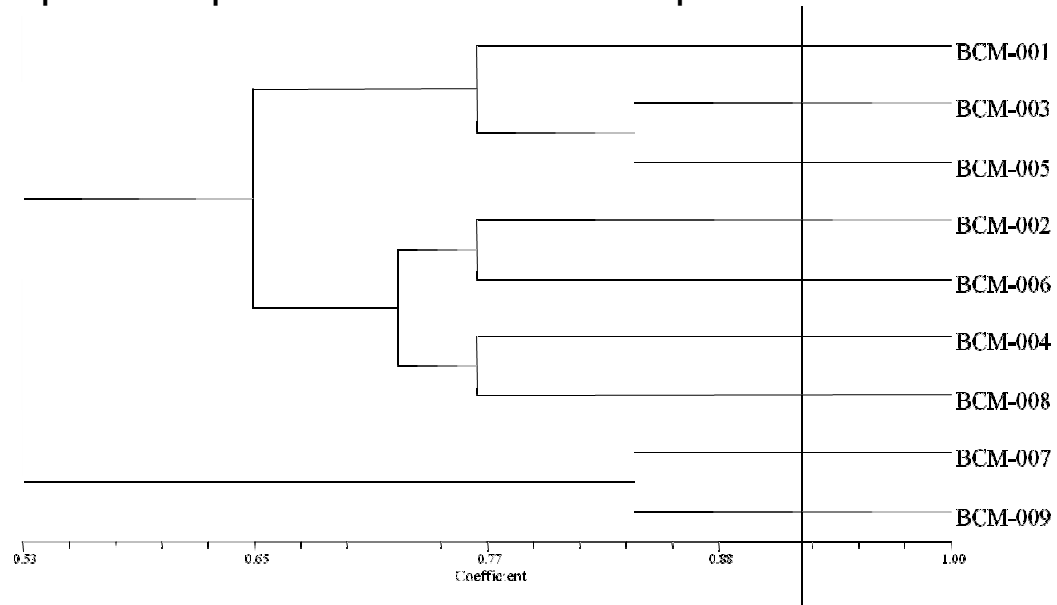
Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C24. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de las bacterias aisladas en la etapa estacionaria



Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

Figura C25. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud S_{SM} calculado a partir de las pruebas fenotípicas de las bacterias aisladas en la etapa final



Elaborado por: Gabriel Curipallo, 2010.

ANEXO D
MEDIOS DE CULTIVO Y
SOLUCIONES

MEDIOS DE CULTIVO

Agar GYM

Glucosa	4.00 g
Extracto de levadura	10.00 g
Extracto de malta	10.00 g
CaCO ₃	2.00 g
Agar	15.00 g
Agua	1000.00 ml

Agar nutriente

Agar nutriente	23.00 g
Agua	1000.00 ml

Medio Basal para Fuentes de Carbono y Nitrógeno

Aminoácido	1.00 g
K ₂ HPO ₄	0.50 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50 g
Agar	15.00 g
Agua	1000.00 ml

BUFERS

Búfer de Fosfato di Básico de Sodio y Ácido Cítrico

Solución de Ácido cítrico 0.1 M (PM: 210.14 g)

Solución de Fosfato di básico de Sodio 0.2 M (PM: 141.98 g)

Se prepara un volumen final de 100 ml:

pH	0.1 M Ácido Cítrico (ml)	0.2 M Na₂HPO₄ (ml)
2.6	89.10	10.90
3.0	79.45	20.55
3.5	69.75	30.25
4.0	61.45	38.55
4.5	54.57	45.43
5.0	48.50	51.50
5.5	43.13	56.87
6.0	36.85	63.15
6.5	29.04	70.96
7.0	17.65	82.35
7.5	7.62	92.38

Búfer de Hidróxido de Sodio y Ácido Bórico

Solución de Hidróxido de Sodio 0.2 M (PM: 40.00 g)

Solución de Ácido Bórico 0.2 M (PM: 61.80 g)

Se prepara un volumen final de 100 ml:

pH	0.2 M Ácido Bórico (ml)	0.2 M NaOH (ml)
8.5	75.00	25.00
9.5	55.00	45.00

ANEXO E

PROTOCOLO DE

CARACTERIZACIÓN

MICROSCÓPICA

Tinción de GRAM

Metodología

1. Sobre el frotis colocar Cristal Violeta o Violeta de Genciana, dejar actuar durante un minuto y lavar con agua destilada.
2. Colocar lugol sobre la placa, dejar actuar un minuto y lavar con agua destilada.
3. Dispersar alcohol al 90%. dejar actuar durante 30 segundos y retirar el alcohol con agua destilada.
4. Contrarrestar con safranina durante treinta segundos y lavar con agua destilada.
5. Secar la placa teñida.
6. Utilizar el microscopio óptico, visualizar y localizar el microorganismo, de ser necesario utilizar el objetivo de inmersión .
7. Diferenciar entre bacterias gram- (teñidas de color rosáceo), o gram+ (teñidas de color violeta o azul).

Tinción de Endosporas

Preparación de placa para la tinción

1. Colocar sobre una rejilla resistente al calor los frotis fijados, a su vez ubicar la rejilla sobre una olla con agua en constante ebullición.
2. Incorporar sobre las placas verde malaquita durante 10
3. Retirar la rejilla del calor y lavar el exceso de colorante con abundante agua destilada.
4. Verter safranina durante 1 minuto y lavar con abundante agua destilada el exceso de colorante.
5. Dejar secar las placas preparadas.
6. Utilizar el microscopio óptico, visualizar y localizar el microorganismo, de ser necesario utilizar el objetivo de inmersión

Tinción de Cápsulas

Preparación de placa para la tinción

1. Añadir sobre la placa cristal violeta al 1% durante 2min.
2. Lavar con sulfato de cobre al 20%.
3. Realizar un último lavado con agua destilada.
4. Secar al ambiente sin realizar movimientos verticales para evitar la pérdida de material bacteriano.
5. Utilizar el microscopio óptico, visualizar y localizar el microorganismo, de ser necesario utilizar el objetivo de inmersión.

Caracterización microscópica de actinomicetes

1. Colocar sobre el actinomicete esporulado un cubreobjetos esteril
2. Con una pinza retirar el cubreobjetos y colocar en le porta objetos
3. El porta objetos deberá contener en los bordes esmalte para sostener el cubreobjetos
4. Utilizar el microscopio óptico, visualizar y localizar tipo de cadena del actinomicete

ANEXO F
FOTOGRAFIAS

Elaboración de compost a nivel industrial



Pila de compost



protección pila de compost



materia orgánica degradada

Aislamientos de Actinomicetes



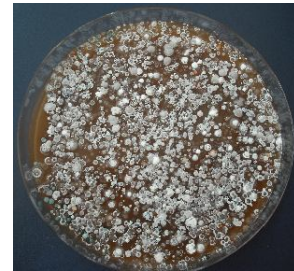
Etapa inicial



Etapa estacionaria



Etapa termofílica

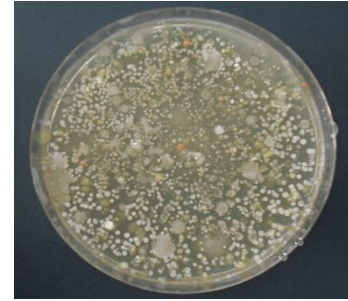


Etapa final

Aislamientos de bacterias degradadoras de materia orgánica



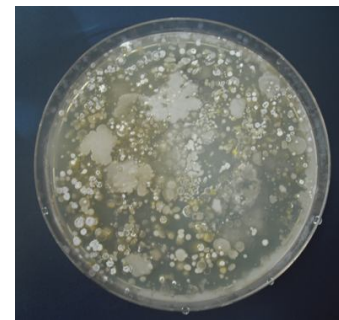
Etapa inicial



Etapa estacionaria

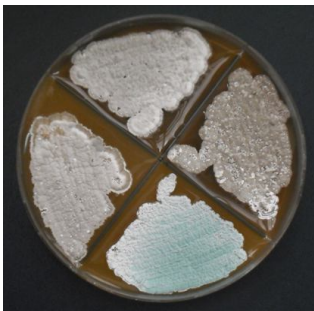


Etapa termofílica



Etapa final

Aislamiento y purificación de Actinomicetes



Aislamiento y purificación de bacterias degradadoras de materia orgánica



Cultivos puros para obtención de biomasa y caracterización microscópica de Actinomicetes y bacterias degradadoras de materia orgánica



Actinomicete en estría compuesta

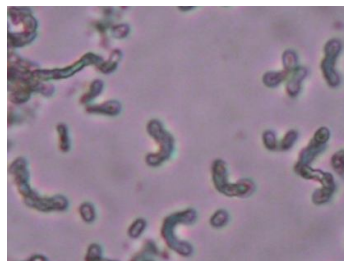


Bacteria en estría compuesta

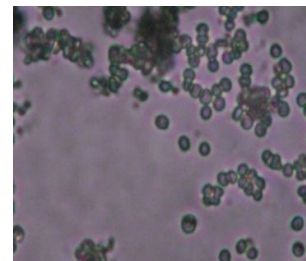
Caracterización microscópica de Actinomicetes



Cadena recta larga

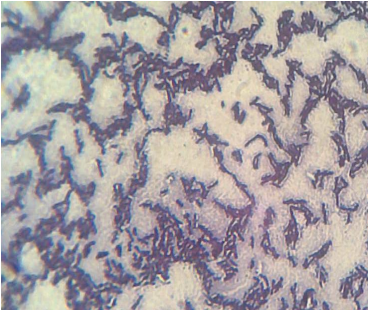


Cadena incompleta



Esporas individuales

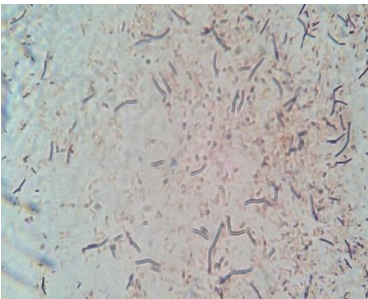
Caracterización microscópica de bacterias



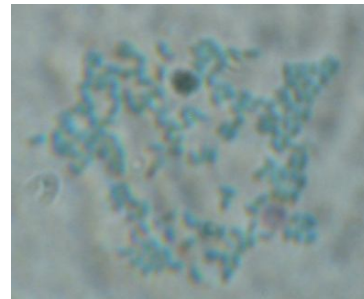
Tinción de gram (+)



Tinción de gram (-)



Presencia de cápsula

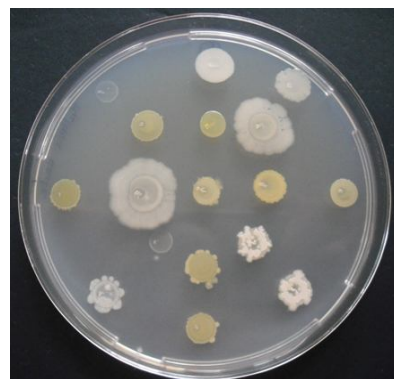


Presencia de endosporas

Taxonomía numérica de Actinomicetes y bacterias degradadoras de materia orgánica

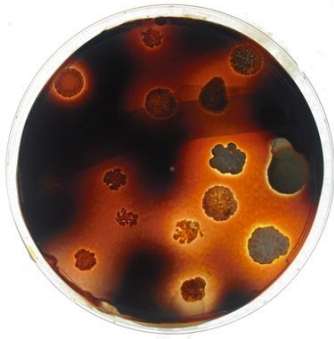


Taxonomía de Actinomicetes

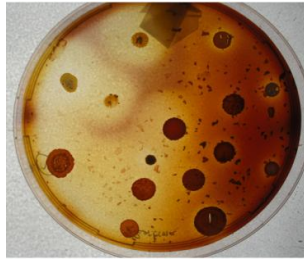


Taxonomía de bacterias

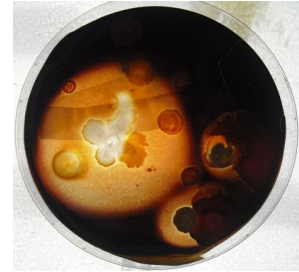
Enzimas extracelulares producidas por Actinomicetes y bacterias degradadoras de materia orgánica



Degradación de celulosa



Degradación de quitina



Degradación de almidón

ANEXO G

TABLA DE COLORES

**(British Standard
Specification for colours for
identification, coding and
special purposes)**

Ref. No.	Name	Surface finish of individual colour cards	Colorimetric values under CIE standard illumination D ₆₅			Approximate Munsell reference	Page with colour sample
			Chromaticity coordinates		Luminance factor, β		
			x	y			
101	Sky blue	gloss	0.287	0.351	0.345	5BG 6/4	7
103	Peacock blue	gloss	0.240	0.302	0.116	5B 3/6	7
104	Azure blue	gloss	0.226	0.233	0.083	5PB 3/6	7
		matt	0.218	0.223	0.073	5PB 3/6	—
105	Oxford blue	gloss	0.248	0.245	0.049	7.5PB 2/6	7
106	Royal blue	gloss	0.291	0.296	0.039	10PB 1/1	7
107	Strong blue	gloss	0.209	0.240	0.148	2.5PB 4/10	17
108	Aircraft blue	gloss	0.219	0.196	0.060	7.5PB 2/10	17
		matt	0.221	0.199	0.057	7.5PB 2.5/8	—
109	Middle blue	gloss	0.214	0.249	0.095	10B 3/8	7
110	Roundel blue	gloss	0.232	0.214	0.064	7.5PB 2/8	7
		matt	0.230	0.212	0.059	7.5PB 2.5/6	—
112	Arctic blue	gloss	0.246	0.300	0.314	7.5B 6/6	7
113	Deep Saxe blue	gloss	0.239	0.292	0.112	7.5B 3/6	7
166	French blue	gloss	0.205	0.195	0.120	7.5PB 3.5/12	17
		matt	0.202	0.190	0.115	7.5PB 3/12	—
172	Pale roundel blue	matt	0.265	0.287	0.431	2.5PB 7/4	7
175	Light French blue	gloss	0.215	0.227	0.191	5PB 4.5/12	17
210	Sky	gloss	0.331	0.366	0.426	5GY 7/2	9
		matt	0.331	0.368	0.437	5GY 7/2	—
216	Eau-de-Nil	gloss	0.335	0.405	0.444	7.5GY 7/4	9
217	Sea green	gloss	0.343	0.441	0.326	7.5GY 6/6	9
218	Grass green	gloss	0.328	0.459	0.177	7.5GY 4.5/8	17
220	Olive green	gloss	0.338	0.406	0.085	5GY 3/6	9
221	Brilliant green	gloss	0.309	0.457	0.136	10GY 4/8	17
		matt	0.307	0.457	0.133	10GY 4/8	—
223	Middle bronze green	gloss	0.334	0.383	0.078	5GY 3/2	9
224	Deep bronze green	gloss	0.324	0.368	0.061	2.5GY 2/4	9
		matt	0.323	0.365	0.063	2.5GY 2/2	—
225	Light Brunswick green	gloss	0.314	0.441	0.105	7.5GY 3.5/7	9
226	Middle Brunswick green	gloss	0.292	0.389	0.073	5G 2/6	9
227	Deep Brunswick green	gloss	0.294	0.364	0.060	10GY 2/4	9
228	Emerald green	gloss	0.259	0.414	0.173	7.5G 4/8	17
241	Dark green	gloss	0.330	0.361	0.090	10Y 3/2	9
		matt	0.331	0.360	0.086	10Y 3/2	—
262	Bold green	gloss	0.262	0.438	0.191	2.5G 5/8	17
267	Deep chrome green	gloss	0.288	0.391	0.104	2.5G 3/4	9
280	Verdigris green	gloss	0.283	0.403	0.251	5G 5/6	9
283	Aircraft grey green	gloss	0.322	0.376	0.207	7.5GY 5/2	9
		matt	0.321	0.379	0.195	7.5GY 5/2	—
285	NATO green	matt	0.334	0.362	0.091	10Y 3/1	9
298	Olive drab	gloss	0.341	0.375	0.078	10Y 3/2	9
		matt	0.339	0.375	0.075	10Y 3/2	—

Fuente: Rodríguez (2004)

Ref. No.	Name	Surface finish of individual colour cards	Colorimetric values under CIE standard illumination D ₆₅			Approximate Munsell reference	Page with colour sample
			Chromaticity coordinates		Luminance factor, β		
			x	y			
309	Canary yellow	gloss	0.447	0.483	0.624	5Y 9/14	17
		matt	0.448	0.487	0.657	5Y 9/14	—
310	Primrose	gloss	0.403	0.448	0.664	7.5Y 8.5/8	11
320	Light brown	gloss	0.429	0.398	0.179	7.5YR 4.5/6	11
337	Very dark drab	gloss	0.336	0.357	0.081	7.5Y 2/2	11
		matt	0.338	0.358	0.079	7.5Y 3/2	—
352	Pale cream	gloss	0.380	0.401	0.626	5Y 9/6	11
353	Deep cream	gloss	0.409	0.421	0.648	2.5Y 8.5/8	11
355	Lemon	gloss	0.471	0.471	0.532	2.5Y 8/12	17
		matt	0.467	0.468	0.553	2.5Y 8/12	—
356	Golden yellow	gloss	0.485	0.454	0.496	10YR 7/14	17
		matt	0.485	0.456	0.484	10YR 7/12	—
358	Light buff	gloss	0.415	0.407	0.470	10YR 7/6	11
		matt	0.416	0.406	0.459	10YR 7/6	—
361	Light stone	gloss	0.384	0.388	0.393	10YR 7/4	11
		matt	0.389	0.392	0.376	10YR 7/4	—
363	Bold yellow	gloss	0.471	0.475	0.615	2.5Y 8/14	17
365	Vellum	gloss	0.344	0.369	0.627	7.5Y 8.5/2	11
		matt	0.345	0.371	0.606	7.5Y 8.5/2	—
367	Manilla	gloss	0.354	0.371	0.681	2.5Y 8.5/2	11
368	(See 568)						
369	Biscuit	gloss	0.373	0.380	0.651	10YR 8/4	11
384	Light straw	gloss	0.360	0.381	0.569	5Y 8/4	11
388	Beige	gloss	0.370	0.382	0.495	2.5Y 7/4	11
389	Camouflage beige	matt	0.343	0.364	0.315	5Y 6/2	11
410	(See 320)						
411	Middle brown	gloss	0.413	0.380	0.100	7.5YR 3/6	13
412	Dark brown	gloss	0.382	0.351	0.068	5YR 2/4	13
414	Golden brown	gloss	0.461	0.397	0.163	5YR 4/8	13
436	Dark camouflage brown	matt	0.345	0.346	0.074	5YR 3/1	13
437	(See 337)						
445	Venetian red	gloss	0.451	0.350	0.094	10R 3/8	13
447	Salmon pink	gloss	0.400	0.361	0.421	2.5YR 7/6	13
454	Pale roundel red	matt	0.378	0.327	0.360	10RP 7/6	13
499	Service brown	gloss	0.360	0.357	0.074	10YR 2.5/4	11
		matt	0.365	0.360	0.069	10YR 2.5/2	—
537	Signal red	gloss	0.548	0.334	0.144	7.5R 4.5/16	17
		matt	0.555	0.331	0.149	7.5R 4.5/14	—
538	Cherry	gloss	0.529	0.322	0.104	5R 3.5/16	17
		matt	0.534	0.325	0.116	5R 3.5/14	—
539	Currant red	gloss	0.539	0.325	0.123	7.5R 4/14	17
541	Maroon	gloss	0.353	0.325	0.046	5R 2/8	13
542	Ruby	gloss	0.403	0.274	0.087	7.5RP 3/10	13

Fuente: Rodríguez (2004)

Table 1. (concluded)							
Ref. No.	Name	Surface finish of individual colour cards	Colorimetric values under CIE standard illumination D ₆₅			Approximate Munsell reference	Page with colour sample
			Chromaticity coordinates		Luminance factor, β		
			x	y			
557	Light orange	gloss	0.517	0.393	0.274	2.5YR 6/14	17
		matt	0.517	0.392	0.284	2.5YR 6/14	—
564	Bold red	gloss	0.553	0.330	0.147	8.75R 4/14	17
568	Apricot	gloss	0.502	0.421	0.334	7.5YR 6/14	17
592	International orange	gloss	0.545	0.355	0.184	10R 5/16	17
593	Rail red	gloss	0.561	0.345	0.181	8.75R 5/17	17
626	Camouflage grey	matt	0.304	0.328	0.321	10B 6/1	15
627	Light aircraft grey	gloss	0.317	0.338	0.435	N 7.25	15
		matt	0.319	0.339	0.428	N 7	—
630	French grey	gloss	0.323	0.356	0.327	5GY 6/1	15
631	Light grey	gloss	0.308	0.341	0.310	7.5G 6/1	15
		matt	0.308	0.342	0.314	7.5G 6/1	—
632	Dark Admiralty grey	gloss	0.299	0.321	0.149	10B 4/0.5	15
		matt	0.300	0.322	0.146	10B 4/0.5	—
637	Medium sea grey	gloss	0.301	0.324	0.273	10B 5.5/1	15
		matt	0.303	0.326	0.270	10B 6/1	—
638	Dark sea grey	gloss	0.300	0.318	0.142	5PB 4/1	15
		matt	0.299	0.316	0.139	2.5PB 4/2	—
641	(See 241)						
642	Night	gloss	0.310	0.327	0.047	N 1	15
		matt	0.310	0.326	0.039	N 1.75	—
676	Light weatherwork grey	gloss	0.300	0.325	0.382	2.5PB 6.5/2	15
677	Dark weatherwork grey	gloss	0.296	0.315	0.146	5PB 4/2	15
692	Smoke grey	gloss	0.272	0.303	0.237	10B 5/4	15
693	Aircraft grey	gloss	0.307	0.334	0.234	10BG 5/1	15
694	Dove grey	gloss	0.313	0.339	0.261	5GY 5/1	15
697	Light Admiralty grey	gloss	0.297	0.334	0.479	10BG 7.5/2	15
		matt	0.298	0.336	0.490	10BG 7.5/2	—
796	Dark violet	gloss	0.304	0.244	0.092	7.5P 3/7	17
797	Light violet	gloss	0.304	0.286	0.359	5P 6.5/6	13

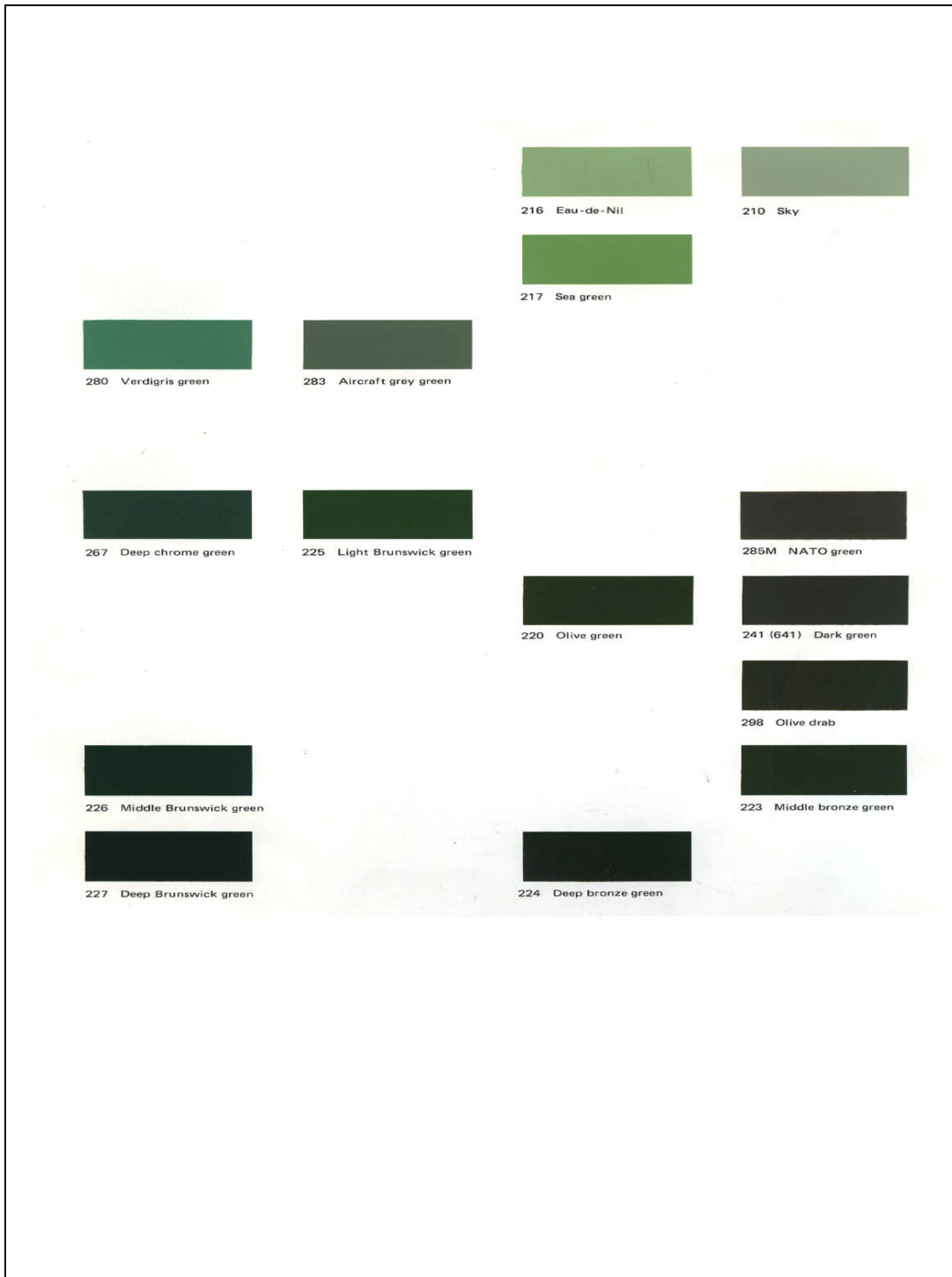
Fuente: Rodríguez (2004)

Ref. No.	Name	Surface finish of individual colour cards	Colorimetric values under CIE standard illumination D ₆₅			Approximate Munsell reference
			Chromaticity coordinates		Luminance factor, β	
			x	y		
102	Turquoise blue	gloss	0.254	0.332	0.213	7.5BG 5/5
111	Pale blue	gloss	0.281	0.347	0.414	5BG 7/4
114	Rail blue	gloss	0.233	0.290	0.068	2.5B 2/6
115	Cobalt blue	gloss	0.236	0.250	0.221	5PB 5/8
174	Oriental blue	gloss	0.242	0.315	0.247	2.5B 5.5/6
222	Light bronze green	gloss	0.371	0.431	0.129	2.5GY 4/6
		matt	0.368	0.429	0.130	2.5GY 4/4
275	Opaline green	gloss	0.305	0.386	0.383	2.5G 7/6
278	Light olive green	gloss	0.352	0.413	0.232	5GY 5/4
350	Dark earth	gloss	0.367	0.370	0.145	10YR 4/2
		matt	0.374	0.374	0.141	10YR 4/2
359	Middle buff	gloss	0.435	0.413	0.349	10YR 6/8
360	(See 460)					
366	Light beige	gloss	0.371	0.385	0.593	2.5Y 8/4
446	Red oxide	gloss	0.428	0.348	0.081	10R 2.5/7
450	(See 350)					
453	Shell pink	gloss	0.335	0.332	0.594	10RP 8/3
460	Deep buff	gloss	0.420	0.394	0.270	7.5YR 5.5/6
473	Gulf red	gloss	0.429	0.335	0.073	10R 2/6
489	Leaf brown	gloss	0.421	0.367	0.120	5YR 3/6
540	Crimson	gloss	0.447	0.319	0.065	5R 2/8
633	RAF blue grey	gloss	0.291	0.315	0.073	7.5B 2/2
		matt	0.289	0.315	0.067	7.5B 2/2
634	Slate	gloss	0.325	0.358	0.146	5GY 4/1
635	Lead	gloss	0.309	0.344	0.010	5G 3/1
636	PRU blue	gloss	0.274	0.307	0.155	10B 4/3
		matt	0.273	0.308	0.151	10B 4/3
640	Extra dark sea grey	gloss	0.296	0.317	0.112	10B 3.5/1
		matt	0.296	0.315	0.108	10B 3.5/1
671	Middle graphite	gloss	0.303	0.323	0.092	10B 3/1

Fuente: Rodríguez (2004)



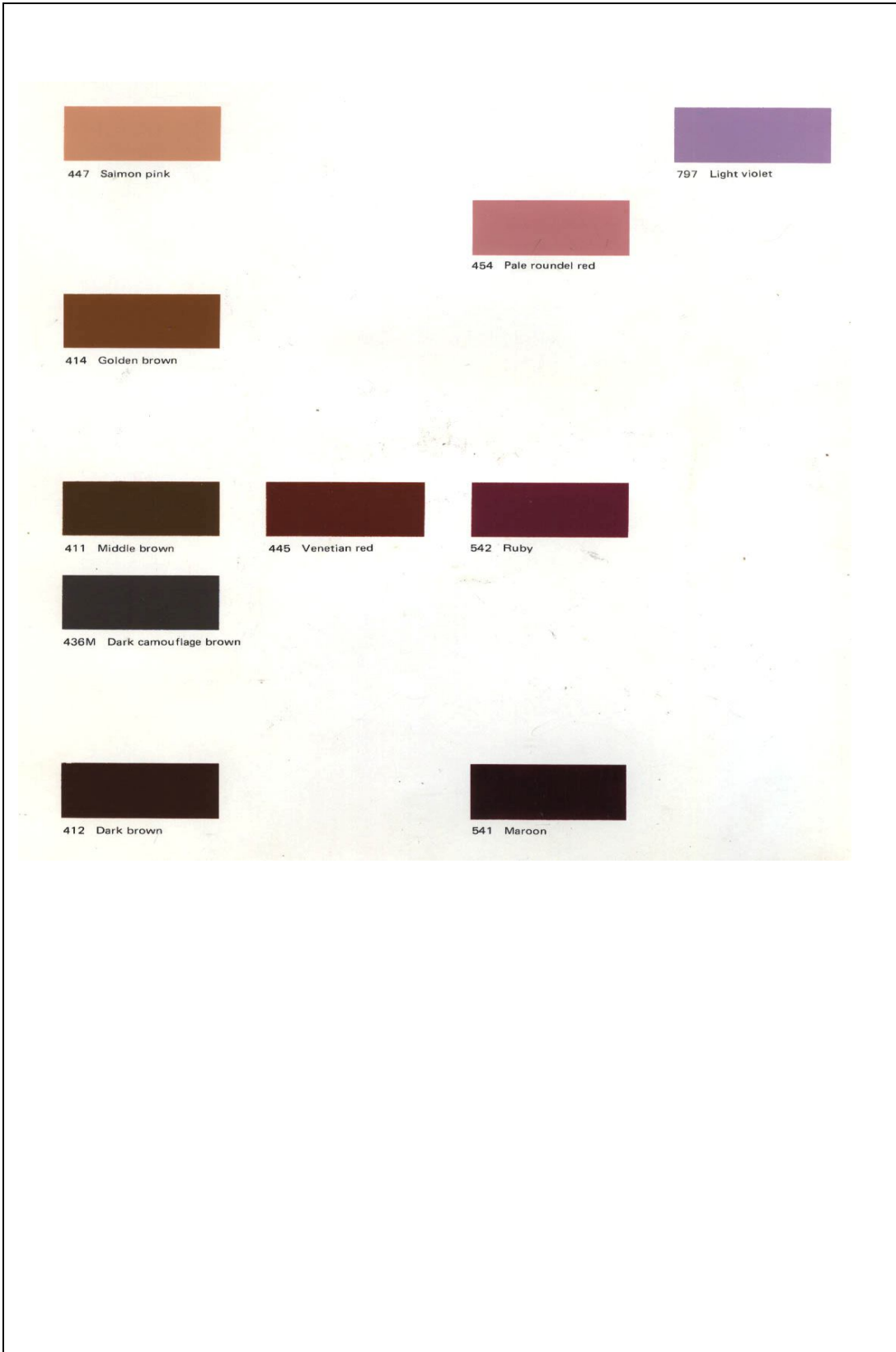
Fuente: Rodríguez (2004)



Fuente: Rodríguez (2004)



Fuente: Rodríguez (2004)



Fuente: Rodríguez (2004)



Fuente: Rodríguez (2004)

