

**COMPOSTACIÓN ACELERADA DE LA POLLINAZA MEDIANTE MICROORGANISMOS
AEROBIOS PARA SU UTILIZACIÓN COMO ABONO ORGÁNICO**

ANA BELLA NIÑO RIVERA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2005**

**COMPOSTACIÓN ACELERADA DE LA POLLINAZA MEDIANTE MICROORGANISMOS
AEROBIOS PARA SU UTILIZACIÓN COMO ABONO ORGÁNICO**

ANA BELLA NIÑO RIVERA

Proyecto de Grado para optar al título de Bióloga

**Directora
Mariela Carreño de Arango
MSc. Microbiología Industrial**

**Codirectora
Yiseth Caicedo Rivera
Bióloga. Especialista en Ingeniería Ambiental**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2005**

A Dios,
Quién me da Fuerzas para Vivir.

A More,
Por su Apoyo Incondicional
Por todo su Amor y Compresión
Pero Especialmente por Siempre Estar.

Ana Bella

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Mariela Carreño de Arango del Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN), por su orientación y apoyo en la dirección de este proyecto, pero especialmente por su gran amistad y confianza durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

A Yiseth Caicedo, Gerente de INVAGRIN, y Asesora en Residuos Sólidos y Producción más Limpia por su colaboración en la codirección y sobretodo por su gestión en la consecución de la práctica profesional.

Doctor José Urango Gerente Técnico INDUPOLLO por la financiación brindada para llevar a cabo el presente proyecto.

Al personal del Laboratorio de Microbiología del CINBIN por su apoyo en la consecución de los elementos para la realización de los análisis microbiológicos y especialmente a los Doctores Jorge y Mariela por su amistad y acogida como parte de esta gran familia

Al personal de la Granja Avícola "La Rosita": Rafael, Ramón y la Sra. Petrona por su colaboración y ayuda.

A mis compañeros y amigos: Nelsy, Lyda, Lesly, Lili, Claudia, Maria Andrea, Mónica, Lucio, Oscar, Julianita, Juan Pablo, Diego, Enrique Luis y Wilmer, con quienes compartí alegrías y tristezas, preocupaciones y añoranzas.

Al profesor Gregorio y Sra. Judith por su gran amistad.

A Edgar Sanin por todo su amor y comprensión. Por transmitirme fortaleza para afrontar la vida con valor.

A mis familiares, a Nila, Lency, Gina, Efrén y a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron al desarrollo de este proyecto.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEORICO	4
1.1 POLLINAZA	4
1.1.1 Composición química de la pollinaza	5
1.1.2 Usos de la Pollinaza	6
1.1.3 Producción de composta como base para abono orgánico a partir de pollinaza	7
1.2 COMPOSTAJE	9
1.2.1 Compostaje Aerobio	9
1.2.2 Importancia de la elaboración y utilización del compost	9
1.2.3 Mecanismos y parámetros biológicos del compostaje aerobio	11
1.2.4 Principales parámetros de control en el proceso de compostaje	14
1.2.5 Sistemas de compostaje	17
1.2.6 Evaluación de la madurez de un compost	18
1.2.6.1 Test de tipo físico	20
1.2.6.2 Test de tipo biológico	20
1.3 ACCION METABÓLICA DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE LOS RESIDUOS ORGÁNICOS	21
1.3.1 Metabolismo de los carbohidratos	21
1.3.2 Metabolismo de las proteínas	22

1.3.3 Metabolismo de los lípidos	23
1.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS ACELERADORES	23
1.4.1 Ecología microbiana de las especies	24
1.4.2 Etapas del compostaje susceptibles a aceleración	24
1.4.3 Requerimientos enzimáticos de la biodegradación de residuos	25
2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	27
2.1 TOMA DE MUESTRAS	27
2.2 CARACTERIZACIÓN DE LA POLLINAZA	29
2.2.1 Análisis físico-químico del sustrato	29
2.2.2 Análisis microbiológico	29
2.2.2.1 Calidad sanitaria	29
2.2.2.2 Recuento de microorganismos benéficos	31
2.2.2.3 Caracterización microbiológica	31
2.3 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS SEMBRADOS EN LOS MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES	33
2.4 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS OXIGÉNICOS ACELERADORES.	34
2.4.1 Selección del medio de cultivo y adaptación de los microorganismos oxigénicos aceleradores	34
2.5 CURVAS DE CRECIMIENTO DE GRUPOS METABÓLICOS Y BIOAUMENTACION	35
2.5.1 Montajes y Equipos	35
2.5.2 Ensayos preliminares	37
2.5.3 Determinación de la cinética de crecimiento	38

2.5.3.1 Adecuación del medio de cultivo	39
2.5.3.2 Inoculación	40
2.5.3.3 Parámetros evaluados en las curvas de crecimiento de cada grupo de microorganismos	40
2.5.3.4 Cuantificación de la biomasa producida	40
2.5.4 Aplicación sobre residuos Avícolas	42
2.5.4.1 Determinación de la dosificación adecuada del inóculo	42
2.5.4.2 Medición de variables durante el bioproceso.	43
2.6 ANÁLISIS FÍSICO, QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL ABONO ORGÁNICO	45
2.7 ENSAYOS DE RESPUESTA BIOLÓGICA	45
3 RESULTADOS Y ANÁLISIS	47
3.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL SUSTRATO	47
3.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	48
3.2.1 Calidad sanitaria.	48
3.2.2 Recuento de microorganismos benéficos	50
3.2.3 Aislamiento e identificación	52
3.3 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS ACELERADORES	57
3.3.1 Selección del medio de cultivo y adaptación de los microorganismos	76
3.4 CURVAS DE CRECIMIENTO DE GRUPOS METABÓLICOS Y BIOAUMENTACIÓN.	77
3.4.1 Pruebas preliminares.	77
3.4.2 Determinación de la cinética de crecimiento.	77
3.5 APLICACIÓN SOBRE RESIDUOS AVÍCOLAS	82

3.5.1 Desempeño de los microorganismos	82
3.6 BIOENSAYOS DE RESPUESTA BIOLÓGICA	86
4. CONCLUSIONES	98
5. RECOMENDACIONES	100
BIBLIOGRAFÍA	101

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig.1. Control de parámetros mediante sensores	15
Fig.2. Sistemas de compostaje con pilas volteadas y pilas estáticas aireadas	18
Fig.3. Etapas del bioproceso experimental.	28
Fig.4. Análisis de calidad sanitaria del compost	30
Fig.5. Metodología de la caracterización microbiológica de la Pollinaza.	32
Fig.6. Bio-reactor tipo Airlift	35
Fig.7. Baño Termostato	37
Fig.8. Agitación con placa	37
Fig.9. Cámara de Neubauer (40X)	37
Fig.10. Espectrofotómetro	37
Fig.11. Filtración al vacío	37
Fig.12. Centrifuga	37
Fig.13 y 14. Montaje para la realización de las curvas de crecimiento del pool de Bacterias	39
Fig.15 y 16. Serie de 11 frascos de 300 ml con 150 ml de medio de cultivo para las Curvas de Crecimiento del pool de hongos	39
Fig.17 y 18. Recuentos en cámara de Neubauer (40 X)	40
Fig.19. Serie para curvas de Crecimiento de hongos a 26°C sin Agitación.	41

Fig.20. Serie para curvas de Crecimiento de hongos a 26°C con Agitación	41
Fig.21. Serie para curvas de Crecimiento de hongos a 37°C sin Agitación.	41
Fig. 22. Serie para curvas de Crecimiento de hongos a 37°C con Agitación	41
Fig. 23. Esquema para la cuantificación de la biomasa fúngica	42
Fig. 24, 25 y 26. Pilas estáticas para el compostaje de pollinaza	44
Fig.27. Bioensayos de respuesta biológica	46
Fig.28. Semillas de Tomate con Abono orgánico	46
Fig.29. Semillas de tomate con pollinaza sin compostar	46
Fig.30. Semillas de tomate con agua destilada (control)	46
Fig.31. Variación de microorganismos patógenos a través del tiempo de compostaje	49
Fig.32. Descripción macroscópica del cultivo de Bacterias nitrificantes	50
Fig.33. Crecimiento Macroscópico de <i>Rhizobium</i> . Medio LMA para <i>Rhizobium</i>	51
Fig.34. Crecimiento macroscópico de <i>Azotobacter</i> . Medio LMA Modificado	51
Fig.35. Crecimiento macroscópico de <i>Streptomices</i> en Agar Caseína.	51
Fig.36. Crecimiento macroscópico de <i>Lactobacillus</i> en Medio APT.	52
Fig.37. Crecimiento macroscópico de <i>Pseudomonas</i> en Agar Cetrimide.Luz UV.	52
Fig.38. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica (100X) de <i>Klebsiella oxytoca</i> .	58
Fig. 39. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica (100X) de <i>Serratia marcescens</i> .	58

Fig. 40. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica de <i>Enterobacter agglomerans</i> .	59
Fig. 41. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica de <i>Alcaligenes denitrificans</i> .	59
Fig.42. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica de <i>A. calcoaceticus</i>	59
Fig. 43. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica de <i>Pseudomonas putida</i> .	60
Fig. 44. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	61
Fig. 45. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica de <i>Pseudomonas cepacia</i> .	62
Fig. 46. Crecimiento macroscópico de <i>Bacillus subtilis</i> en Agar Kanamicina.	63
Fig. 47. Crecimiento macroscópico de <i>Bacillus macerans</i> y <i>Bacillus megaterium</i> en Agar Kanamicina, Gram de <i>B. magaterium</i> .	63
Fig. 48. Crecimiento macroscópico (AK) y microscópico de <i>Bacillus Licheniformis</i> .	64
Fig. 49. Crecimiento macroscópico (AK) y microscópico de <i>Nocardiacorallina</i> .	64
Fig.50. Crecimiento macroscópico y microscópico de <i>Aspergillus fumigatus</i> .	66
Fig.51. Características microscópicas de <i>Aspergillus flavus</i> .	67
Fig.52. Características macroscópicas de <i>Aspergillus flavus</i> .	68
Fig.53. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Penicillium chrysogenum</i> .	70
Fig. 54. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Cunninghamella achinulata</i> .	71
Fig. 55. Características microscópicas de <i>Cunninghamella Achinulata</i> fotos tomadas de microcultivo sin Azul de lactofenol.	72

Fig.56. Características del crecimiento macroscópico y microscópico de <i>Aspergillus penicillioides</i> .	73
Fig. 57. Características del crecimiento macroscópico de <i>Curvularia spp.</i>	74
Fig. 58. Características del crecimiento macroscópico y microscópico de <i>Trichoderma víride</i> .	75
Fig. 59. Características del crecimiento macroscópico y microscópico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	75
Fig.60. Curva de crecimiento del grupo bacteriano con aireación y sin aireación a 26 y 37°C.	78
Fig.61. Curva de crecimiento del grupo bacteriano con agitación y sin agitación a 26 y 37°C.	79
Fig.62. Curva de crecimiento del grupo bacteriano con diferentes parámetros de temperatura aireación y agitación.	79
Fig.63. Curva de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> con y sin agitación	80
Fig.64. Efecto de la agitación en el crecimiento de Hongos oxigénicos.	82
Fig.65. Efecto de la temperatura en los ensayos de compostaje natural y acelerado	84
Fig.66. Variación de pH en el compostaje natural y acelerado.	85
Fig.67. Etapa inicial del bioensayo de respuesta biológica.	87
Fig.68. Bioensayo evaluación de respuesta biológica al tercer día de germinación.	89
Fig.69 Bioensayo evaluación de respuesta biológica 8 días de Germinación.	90
Fig.70. Porcentaje de germinación de las semillas de tomate en Agua destilada, pollinaza sin compostar y abono orgánico.	90
Fig.71. Longitud del tallo de la plántula de tomate en AD, PC y AO.	91
Fig.72. Longitud de la raíz de la plántula de tomate en AD, P-C y AO	91

Fig.73. Histograma de Normalidad de porcentaje de germinación	92
Fig. 74. Histograma de Normalidad longitud del tallo del tomate.	93
Fig.75. Histograma de Normalidad de longitud de la raíz del tomate.	93
Fig.76. Diferencias entre el porcentaje de germinación y los tratamientos AD, PC y AO.	94
Fig.77. Diferencias entre la LT y los tratamientos AD, P-C y AO.	94
Fig.78. Diferencias entre longitud raíz y los tratamientos AD, PC y AO.	95

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Riqueza media de los diferentes tipos de estiércol	6
Tabla 2. Composición en porcentaje de las excretas de varios animales domésticos	6
Tabla 3. Resumen de las condiciones de un proceso de compostaje Ideal	19
Tabla 4. Concentración de Microorganismos en un compost final.	19
Tabla 5. Análisis físico- químico de la pollinaza y el abono orgánico.	47
Tabla 6. Análisis de calidad sanitaria de la Pollinaza y el Abono Orgánico.	48
Tabla 7. Recuento de microorganismos benéficos.	50
Tabla 8. Descripción macroscópica y microscópica de las cepas aisladas de la pollinaza.	53
Tabla 9. Pruebas bioquímicas de microorganismos entéricos. (Cepas 1-9).	54
Tabla 10. Pruebas bioquímicas de las Cepas 10, 11 y 12.	55
Tabla 11. Pruebas bioquímicas de las Cepas 13, 14, 15 y 16.	55
Tabla 12. Especies de microorganismos oxigénicos que fueron aislados de la pollinaza.	56
Tabla 13. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Aspergillus fumigatus</i> y <i>Aspergillus flavus</i> .	65
Tabla 14. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Penicillium chrysogenum</i> y <i>Cunninghamella achinulata</i> .	69
Tabla 15. Crecimiento cualitativo de las especies en diferentes sustratos.	76

Tabla 16. Datos del crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con y sin agitación.	80
Tabla 17. Datos del crecimiento de Hongos a 26 y 37°C, con y sin agitación mecánica.	81
Tabla 18. Datos promedios de temperatura y pH del compostaje natural y acelerado de la pollinaza.	83

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Medios de cultivo para microorganismos benéficos.	106
Anexo 2. Curva patrón de Mcfarland.	108
Anexo 3. Clasificación taxonómica de los microorganismos oxigénicos aislados de la pollinaza.	109
Anexo 4. Análisis de competitividad de los microorganismos oxigénicos aislados de la pollinaza.	110
Anexo 5. Crecimiento de bacterias con diferentes parámetros de temperatura, aireación y agitación.	111

RESUMEN

TITULO: COMPOSTACIÓN ACELERADA DE LA POLLINAZA MEDIANTE MICROORGANISMOS AEROBIOS PARA SU UTILIZACION COMO ABONO ORGÁNICO*.

AUTOR: NIÑO RIVERA, ANA BELLA**

PALABRAS CLAVES: Pollinaza, Compostaje, Abono Orgánico, Microorganismos aerobios, Producción Limpia.

DESCRIPCION:

Entre los abonos utilizados actualmente se destaca la pollinaza, cuya composición en macronutrientes mejora las características fisicoquímicas del suelo y se utiliza como fertilizante en una amplia variedad de cultivos de tipo comercial. Con la realización del presente proyecto se pretendió obtener un bioproducto comercializable constituido por un selecto grupo de microorganismos aerobios (bacterias y hongos nativos) caracterizados por su capacidad de elaborar sistemas enzimáticos efectivos en la degradación acelerada de la pollinaza y con mayores ventajas competitivas en el mercado de los abonos orgánicos.

Se realizó la caracterización físico-química y microbiológica del sustrato, el aislamiento e identificación de los microorganismos aerobios en las etapas mesofílicas del compostaje, así mismo se efectuó un estudio de las variables de mayor incidencia en la bioaumentación de las especies (aireación, concentración de sustrato, temperatura y agitación) obteniéndose unas condiciones apropiadas para su crecimiento, y posterior aplicación a los residuos orgánicos para finalmente realizar bioensayos de respuesta biológica con extractos acuosos del Abono Orgánico y así comprobar su eficacia en el porcentaje de germinación, crecimiento de la raíz y el tallo de la plántula de Tomate.

Entre los resultados obtenidos vale la pena destacar que se aislaron de la pollinaza 19 especies de bacterias pertenecientes a los ordenes Pseudomonadales, Enterobacteriales, Burkholderiales, Bacillales y Actinomycetales, y 8 especies de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Trichoderma*, y *Saccharomyces* los cuales presentaron una disminución de un 30 % en el tiempo de compostaje y el logro de la temperatura máxima de la etapa termofílica hasta de 72°C. En los ensayos de respuesta biológica evaluados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) el tratamiento con pollinaza compostada presentó mayor porcentaje de germinación (80%) y mayor longitud de crecimiento de la plántula de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Obteniéndose así un abono de orgánico de óptima calidad y sin patógenos.

* Proyecto de Grado.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, UIS, Directora: Mariela Carreño Mcs

ABSTRACT

TITLE: ACCELERATE COMPOSTING OF POULTRY MANURE BY MEANS OF AEROBICS MICROORGANISMS TO BE USE IT AS ORGANIC FERTILIZER*.

AUTHOR: NIÑO RIVERA, ANA BELLA**

KEY WORDS: Poultry manure, Compost, Organic Fertilizer, Aerobics Microorganisms, Clear Production.

DESCRIPTION:

Between fertilizers used nowadays is remarkable the poultry manure, whose micronutrient composition improves the physic-chemistry features of the soil. It is used as a fertilizer in a wide variety of cultivations. With the present project, we tried to obtain a marking bioproduct constituted by a select group of aerobics microorganisms (bacteria and native mushrooms). It is characterized by their capacity to elaborate enzymatic systems effective in the quick degradation of the poultry manure and with more competitive advantages in the market of the organic manure.

We carried out the physical-chemical and microbiological characterization of the substrate, the isolation and identification of the aerobics microorganisms in the mesofilic stages of the compost. Besides, we studied the variables of more incidence in the bioincreasing of the species (air, substrate concentration, temperature and agitation) obtaining appropriate conditions for its growth and subsequent application to the organic residuals. Finally, we carried out biotest of biological answer with watery extracts of the organic manure so in this way its effectiveness was checked in the germination percentage, growth of the root and the stem of the Tomato plant.

We isolated remarkably from the poultry manure 19 bacteria species belonging to the orders Pseudomonadales, Enterobacteriales, Burkholderiales, Bacillales and Actinomycetales. T was found 8 species of mushrooms of the genus *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Trichoderma*, and *Saccharomyces*. These species presented a decrease of 30% in the time of compost and the maximum temperature of the termofilic stage until of 72°C. In the tests of the biological answer evaluated statistically through the Analysis of Variance (ANOVA). The treatment with composted poultry manure presented both higher germination percentage (80%) and the length of growth from the tomato plant (*Lycopersicon esculentum*) was bigger than the test of biological answer. We obtained organic manure of good quality and without pathogen.

* Thesis Project.

** Science Faculty, Biology School, UIS, Mariela Carreño Mcs. Director

INTRODUCCIÓN

Los residuos sólidos como subproducto de la actividad avícola por su escala de producción, penetración en el mercado y nivel tecnológico es el región de mayor aporte en cuanto a volumen de residuos animales dentro de los que se destacan la pollinaza y la gallinaza que por su inadecuado manejo causa perjuicios sobre la salud humana, y se constituye en un problema de contaminación ambiental ocasionando serios impactos negativos al suelo por infiltraciones de aguas residuales; al aire por emisiones de amoníaco y otros olores ofensivos que atraen vectores; al agua superficial y subterránea por descargas directas y por último, el considerable impacto visual de estos residuos apilados sin control alguno en las granjas.

Estos residuos generados contienen materia orgánica, nutrientes y energía que bien podrían ser empleados en la producción de abono orgánico de manera acelerada y controlada, disminuyendo el impacto ambiental negativo generado; además de obtener beneficios económicos por ahorros en tasas retributivas, venta de productos procesados y cumplimiento del compromiso social y ambiental.¹

El sector avícola del país, representa la industria más dinámica de la actividad agropecuaria y en la Costa Atlántica se posiciona con mejores perspectivas para el futuro inmediato.² De acuerdo con la política nacional ambiental, la mayor exigencia se hace, en el manejo, tratamiento y disposición final de los residuos sólidos generados por las empresas avícolas enfatizando en la adopción de procesos agroindustriales amigables con el entorno y en el desarrollo del sector productivo en la región, a través de la difusión y aplicación de conceptos de ecoeficiencia, producción mas limpia y tecnologías ambientales.

La elaboración de los abonos orgánicos ocupa un lugar muy importante en la agricultura actual, ya que contribuye al mejoramiento de las estructuras y fertilización del suelo, además con la utilización de estos se puede reducir el

¹ TUCKER, Robert. Guía para el control y la prevención de la contaminación industrial, Sector Criadero de Aves, Subsector Productores Avícolas. Santiago de Chile. 1998 p.11

² *Ibid.*, p.8.

uso de insumos externos y aumentar la eficiencia de los recursos de la comunidad protegiendo al mismo tiempo la salud humana y el ambiente.³

Es importante destacar que actualmente se presenta en el mundo la tendencia a la producción y consumo de productos alimenticios obtenidos de manera "limpia", es decir, sin el uso (o en una mínima proporción) de insecticidas, biocidas, fertilizantes sintéticos, etc. En Colombia la producción orgánica posee cada vez más un creciente mercado, al que deben ingresar los productores con el sello verde, certificando que la producción se ajusta o cumple las normas establecidas obteniendo precios altos de venta y justificando la inversión realizada para establecer y mantener un cultivo orgánico.⁴

La utilización de la fertilización biológica implica el manejo de microorganismos y organismos vivos para suplir en parte o totalmente los fertilizantes químicos con la diferencia que en la elaboración no se forman gases tóxicos ni malos olores. El volumen producido se puede adaptar a las necesidades del agricultor, no causa problemas en el almacenamiento y transporte, desactiva los agentes patógenos, muchos de ellos perjudiciales en los cultivos como causantes de enfermedades. Además el producto permite ser utilizado inmediatamente después de la preparación y como punto más importante tiene un bajo costo de producción.⁵

Vale la pena mencionar que actualmente el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial y el Ministerio de Agricultura, adelantan la legislación pertinente para la fabricación y posterior venta de estos subproductos debido a la creciente oferta y a la actual demanda tanto a nivel nacional e internacional, garantizando así la calidad y el cumplimiento de la normatividad ambiental.

Al plantearse la necesidad de diseñar un proceso que permita eliminar la problemática de la pollinaza a partir de la generación de un bien como puede ser el biocompost (apreciado fertilizante orgánico), se debe tener bien claro que no solo se persigue un beneficio, sino evitar un perjuicio. Por ello se resalta la importancia de este proyecto en la disminución del impacto

³ MEDRANO, José. Subproductos agrícolas y su utilización en sistemas integrados de producción. Compendio de alternativas no tradicionales para la alimentación de rumiantes. CORPOICA, 1994.p.15

⁴ Ibid., p.19

⁵ BONGCAM, Elkin. Guía para compostaje y manejo de suelos. Ciencia y Tecnología Convenio Andrés Bello. Bogotá, 2003. p.12.

ambiental negativo que presentan la mayoría de las granjas avícolas debido a la inadecuada disposición temporal o final de este residuo.

Debido al inconveniente que presenta la utilización de estiércoles y lodos como agentes aceleradores de los procesos de biodegradación, en los últimos años se han desarrollado conglomerados de microorganismos que mediante su metabolismo individual y sinérgico permiten mejorar el proceso del compostaje obteniéndose un producto estable, con buen poder fertilizante é higiénicamente sano.

Con la realización del presente proyecto se pretendió obtener un bioproducto comercializable constituido por un selecto grupo de microorganismos oxigénicos (bacterias y hongos nativos) caracterizados por su capacidad de elaborar sistemas enzimáticos efectivos en la degradación acelerada de la pollinaza y con mayores ventajas competitivas en el mercado de los abonos orgánicos.

1. MARCO TEORICO

1.1 POLLINAZA

La pollinaza es uno de los residuos sólidos más importantes en términos de la posibilidad de afectar significativamente el ambiente en las granjas de producción, debido a su composición y a las grandes cantidades generadas.

La población avícola colombiana está compuesta por 380 millones de pollos y 24 millones de ponedoras. Si un pollo produce diariamente 150 gramos de pollinaza húmeda y cada gallina 100 gramos de gallinaza, y si el precio de venta oscila entre 75 mil y 80 mil pesos la tonelada (ya deshidratada), estamos frente a una cifras impresionantemente grandes en cuanto al dinero que este subproducto puede representar para los Avicultores como ingreso adicional al proveniente de su negocio de huevos y de carne.⁶

En una alta proporción, en Colombia no se le adiciona nada a la gallinaza ni a la pollinaza; en una investigación que abarco 86 granjas avícolas, la Corporación Nacional para la Investigación Agropecuaria, CORPOICA encontró que solo en 5 o 6 la procesan. Sin embargo, poco a poco se ha ido extendiendo la práctica de llevar a cabo un análisis de suelos y a partir de sus resultados enriquecerla con diferentes nutrientes, lo que da origen a formulaciones específicas para cada cultivo en particular.⁷

Algunos avicultores y procesadores de pollinaza en Colombia la definen como una materia prima fundamental, potenciada hoy por la tendencia mundial, cada vez mayor de eliminar los químicos en la fertilización. Le anotan como principales ventajas, frente a los abonos químicos:

- Neutralidad del pH
- Favorece un mejor intercambio tanto catiónico como aniónico en el suelo
- Retiene hasta el 80-90% de agua.

⁶ MUNEVAR, German. Estiércol que se convierte en plata, Cartagena, 1998. p.22.

⁷ *Ibid.*, p.24.

- Promueve la formación de estructuras finas.
- Ablanda los suelos pesados.
- Actúa en todos los procesos de oxidación y reducción.
- Produce nutrientes en estado inorgánico que aprovechan la fauna y la flora del suelo, además, los ácidos del humus cambian la apariencia del suelo, tornándolo oscuro, situación que favorece la retención de calor y su permanencia en el suelo por mayor tiempo.⁸

1.1.1 Composición química de la pollinaza En general los estiércoles son una mezcla de las camas de los animales con sus deyecciones, que han sufrido fermentaciones más o menos avanzadas. Se trata de un bioabono de naturaleza órgano-mineral, con un bajo contenido de elementos minerales. Su Nitrógeno se encuentra casi exclusivamente en forma orgánica y el Fósforo y el Potasio al 50 % en forma orgánica y mineral; pero su composición varía entre límites muy amplios, dependiendo de la especie animal, la naturaleza de la cama, la alimentación recibida, la elaboración y manejo del montón, etc.⁹

La composición de la pollinaza depende de la alimentación de las aves, que puede ser más o menos rica en nitrógeno y que varía en cada una de las etapas de su vida productiva. El contenido de proteína de la pollinaza varía de acuerdo al tipo de cama que se utilice pero se encuentra en un rango de 17.2 a 22.7%. El 50% del nitrógeno presente en la pollinaza es proteína verdadera, la cual es alta en Glicina, y un poco baja en Arginina, Lisina, Metionina y Cistina. El calcio se encuentra en el orden de 3% y el fósforo de 1.5% el alto contenido de Calcio constituye una limitante nutricional de la pollinaza. Se conoce que el valor máximo de calcio en una dieta no debe exceder el 2%, en condiciones practicas esto no debe ser mayor de 1.2 - 1.5%.¹⁰

El estiércol del caballo es más rico que el de la oveja, el del cerdo y el del la vaca. El de aves de corral, pollinaza o gallinaza, es el más concentrado y rico en elementos nutritivos, principalmente nitrógeno y fósforo.

En la siguiente tabla se muestra la riqueza media de diferentes tipos de estiércoles:

⁸ BONGCAM, Op. cit., p. 14.

⁹ CAICEDO, Y. La importancia de los Abonos Orgánicos en la nueva agricultura. Tierra Palmera, FEDEPALMA. 2000. Vol. 9, p.8.

¹⁰ MUNEVAR, Op. cit., p. 25.

Tabla 1. Riqueza media de los diferentes tipos de estiércol

Producto	Materia Seca %	Contenido de los elementos nutritivos en Kg.t ⁻¹				
		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	MgO	S
De vacuno	32	7	6	8	4	--
De oveja	35	14	5	12	3	0.9
De cerdo	25	5	3	5	1.3	1.4
De caballo	100	17	18	18	--	--
Purines	8	2	0.5	3	0.4	--
Gallinaza	28	15	16	9	4.5	--

Fuente: García S. 1987.

En la tabla 2 se representa la composición de las excretas de algunos animales, las cuales pueden ser utilizadas como un ingrediente más para la elaboración de compost.¹¹

Tabla 2. Composición en porcentaje de las excretas de varios animales domésticos

Tipo de estiércol	Macronutrientes					Micronutrientes				
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn	H ₂ O
Gallinaza	2,43	2,67	4,80	5,70	0,50	11	4,25	-	2,64	19
Bobinaza	2,11	1,60	5,76	0,87	0,44	1,20	7,63	-	132	75
Porcinaza	2,32	4,72	3,90	3,25	8,77	8,8	643	-	422	62
Equinos	2,65	1,95	2,92	-	-	-	-	-	-	65

Fuente: Restrepo R, 2001.

1.1.2 Usos de La Pollinaza. La pollinaza se utiliza como abono en la gran mayoría de cultivos gracias a sus altos contenidos de nutrientes, los cuales ayudan a mejorar el follaje de las plantas.

¹¹ RESTREPO, R. Elaboración de Abono orgánicos fermentados y biofertilizantes foliares, 2001 p.13.

En Colombia se usa en el área agrícola sin ninguna técnica ya que se aplica en estado bruto, ocasionado pérdidas en su composición por no tener coadyuvantes para la protección de los elementos disponibles como el Nitrógeno. Las pérdidas se ocasionan también al mantener esta pollinaza al aire libre en donde se evaporan sus componentes y se lavan con las lluvias. De acuerdo con las cifras medias de su composición antes indicadas, un estercolado de 30 toneladas supone un aporte por hectárea de 120 Kg de nitrógeno, 75 Kg de Anhídrido fosfórico y 165 Kg de Oxido de Potasio. Por tanto, puede decirse que el estiércol es a la vez una enmienda y un abono.¹²

El estiércol fresco puede ser utilizado en compostaje de superficie directamente. Se usa sobretodo en cultivos exigentes en abonado que toleran bien la materia orgánica fresca, como es el caso de la papa, remolacha, tomate, así como en frutales y viñedos.

En clima seco el aporte debe realizarse dos meses antes de la siembra y en caso de que sea húmedo, tres meses antes. En suelos arcillosos se aplica muy maduro y con bastante anticipación a la siembra, mientras que en los arenosos será poco maduro y las aplicaciones serán mas frecuentes y en menor cantidad. Los aportes en los suelos calizos deben ser frecuentes y débiles y en suelos ácidos se realizara una enmienda de caliza que active y favorezca la descomposición de la materia orgánica.

La pollinaza fresca es muy agresiva a causa de su elevada concentración en nitrógeno y para mejorar el producto conviene que se composte en montones. Con más razón se compostará si procede de granjas intensivas, mezclándose con otros materiales orgánicos que equilibren la mezcla, enriqueciéndolo si fuera necesario con fósforo y potasio naturales; algunos agricultores rechazan el estiércol procedente de la cría industrial de pollos y gallinas debido a que frecuentemente contiene residuos de antibióticos y de otras sustancias de desecho.¹³

1.1.3 Producción de composta como base para abono orgánico a partir de Pollinaza Esta alternativa permite mostrar las ventajas de utilizar de una manera técnica la pollinaza en la producción de un abono orgánico. Hasta ahora siempre se ha utilizado la pollinaza en su forma natural, ya sea por que

¹² RIVERO & CARRACEDO. Efecto del uso de la gallinaza sobre algunos parámetros de fertilidad química de dos suelos de pH contrastante. Revista Facultad Agronómica, 1999. Vol. 25 p.83

¹³ *Ibid.*, p.90

no se conocen los procedimientos de tratamiento o simplemente por que no se ha identificado las ventajas económicas de procesar el producto.

La base principal del abono orgánico es la composta, la cual se obtiene mediante un proceso natural de biodegradación, por la acción de los microorganismos oxigénicos, Termofilicos, Gram-positivos, bacilos endosporados benéficos quienes reducen y transforman los desechos orgánicos en una biomasa bacteriana ácida y, requiere de un medio que favorezca la proliferación bacteriana que debe tener las siguientes características: 30% de Oxígeno, una proporción adecuada de nutrientes, 15 a 30 partes de Carbono por una parte de nitrógeno, 45 a 55% de agua, una temperatura alrededor de 72°C y tiempo que incluye dos períodos consecutivos de 10-14 días.¹⁴

El material del período inicial se llama composta de primer tratamiento, en cuya masa comienzan a proliferar los primeros microorganismos que inician la degradación del material usado como sustrato, para lo cual se hace necesario un continuo movimiento de aireación. Posteriormente, este material se denomina composta de segundo tratamiento, en donde la reducción es avanzada, la temperatura es más uniforme y estable, y la población de patógenos disminuye considerablemente. El material puede continuar reaccionando y conservarse hasta por más de 6 meses.¹⁵

Para mantener uniforme la temperatura dentro del compost es importante la aireación y el movimiento del material para remover las bacterias, así como acelerar la acción bacteriana, larvícida y virucida dentro de todo el material. Una vez formada la composta y si se quiere mejorar, es necesario mezclar con roca fosfórica y potasa para suplir los requerimientos de fósforo y potasio, necesarios para la formulación de un abono complejo. Las cantidades de roca fosfórica y de potasa dependerán del tipo de abono a producir pero es conveniente decir que la mezcla no requiere de técnicas complejas ni equipos especializados para que de buenos resultados. De igual manera, es preciso comentar que aumentando la aireación e inoculación con microorganismos altamente degradadores, se disminuye el tiempo de compostación¹⁶.

¹⁴ CAICEDO, Yiseth. Efectos del proceso de fermentación sobre la microbiota fúngica de la gallinaza. Tesis de Grado UIS, Bucaramanga, 2002. p. 35.

¹⁵ RIVERO, Op. cit., p. 85.

¹⁶ TCHOBANOGLIOUS, G. Gestión integral de Residuos Sólidos. 1994, España. p.67.

1.2 COMPOSTAJE

1.2.1 Compostaje Aerobio El compostaje es un proceso biológico aerobio, que bajo condiciones de aireación, humedad y temperaturas controladas y combinando bases mesófilas (temperatura y humedad medias) y termófilas (temperatura superior a 45%), transforma los residuos orgánicos degradables, en un producto estable e higienizado, aplicable como abono o sustrato. Es decir, el compostaje es:

- Una técnica de estabilización y tratamiento de residuos orgánicos biodegradables. El calor generado durante el proceso (fase termófila) va a destruir las bacterias patógenas, huevos de parásitos y muchas semillas de malas hierbas que pueden encontrarse en el material de partida, dando lugar a un producto higienizado.
- Una técnica biológica de reciclaje de materia orgánica que al final de su evolución da humus, factor de estabilidad y fertilidad del suelo.
- El resultado de una actividad biológica compleja, realizado en condiciones particulares; el compostaje no es, por tanto, un único proceso. Es, en realidad, la suma de una serie de procesos metabólicos complejos procedentes de la actividad integrada de un conjunto de microorganismos. Los cambios químicos y especies involucradas en el mismo varían de acuerdo a la composición del material que se quiere compostar.¹⁷

El compost es el producto de la fermentación controlada de la materia orgánica presente en los Residuos Sólidos Orgánicos, durante el proceso se desinfecta y estabiliza el residuo, con lo que el producto resultante debe garantizar la inocuidad para el medio ambiente, el cual puede ser aprovechado como abono orgánico o como sustrato.¹⁸

1.2.2 Importancia de la elaboración y utilización del compost. El compostaje es una alternativa de tratamiento de desechos orgánicos y al mismo tiempo al mejoramiento de la calidad de los suelos; dentro de la problemática del manejo de los Residuos Orgánicos la importancia se encuentra en que el compostaje permite:

¹⁷ NEGRO, M. Producción y Gestión del Compost. Zaragoza: Centro de Técnicas Agrarias, 2000. N°. 88, p.2.

¹⁸ MAYEA, S. Producción de composta a partir de la inoculación con microorganismos. Cuba: Ministerio de Agricultura, 1992. p.28.

- Disminuir los niveles de contaminación que producen los residuos orgánicos por el proceso natural de descomposición, el mismo que genera gas metano, Amoniaco, proliferación de vectores transmisores de enfermedades y roedores.
- Utilizar de una manera ambientalmente segura los residuos orgánicos.
- Aumentar las posibilidades de producción de viveros y jardines en zonas urbanas o poblaciones en proceso de crecimiento que no cuentan con terrenos fértiles para ello.
- Aumentar el nivel de la oferta de abonos orgánicos.
- Crear una conciencia ambiental en las industrias avícolas y en general a la población en cuanto a la recuperación y utilización de los desechos orgánicos con un valor agregado¹⁹.

La utilización del compost a nivel agrícola, permite en el suelo:

- Mejorar las propiedades Físicas aumentando la permeabilidad y retención hídrica y gaseosa de los suelos, mediante la formación de agregados, haciendo más sueltos y porosos los terrenos compactos y enmendando los arenosos.
- Aportar macronutrientes N; P; K y micronutrientes.
- Aumentar la disponibilidad favorable de nitrógeno para las plantas (pues la materia tiene una mayor relación C/N).
- Mejorar la capacidad de intercambio catiónico del suelo
- Disminuir la rapidez del flujo suplementario de sustancias nutritivas del suelo y por lo tanto mejorar la capacidad de crecimiento de las plantas.
- Contribuir mediante la utilización de abono orgánico, a la formación de humus permanente.
- Aumentar la desintegración de sustancias difícilmente solubles
- Reducir los niveles de utilización de fertilizantes químicos nocivos
- Ejercer una acción patógeno-supresora, ya varios microorganismos pertenecientes al compost, han demostrado ser un factor biológico inhibidor para hongos y mohos patógenos que atacan los órganos de sostén y absorción de nutrientes en ciertas plantas.²⁰

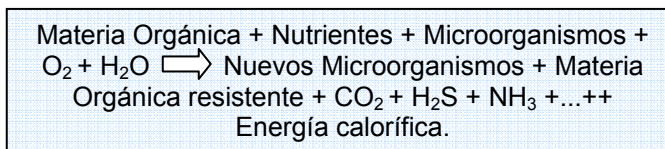
Como consecuencia de esta acción directa, el compost puede tener varios usos, por ejemplo:

¹⁹ NEGRO, M. Op. cit., p. 12

²⁰ Ibid., p.17

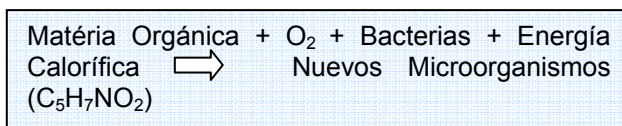
- El mejoramiento de suelos agrícolas o erosionados
- La implementación de huertos familiares, escolares o comunitarios.
- Reforestación
- Viveros y jardines ornamentales para asentamientos poblacionales urbanos, semi urbanos o rurales.
- Semilleros.
- Afirmación de taludes.²¹

1.2.3 Mecanismos y parámetros Biológicos del compostaje aerobio. La fermentación aerobia consiste en la asimilación de la materia orgánica por parte de microorganismos en presencia de oxígeno y nutrientes, de acuerdo a la siguiente reacción;



Este proceso de fermentación aerobia de la materia orgánica se produce en tres fases secuenciales desde las primeras descomposiciones microbianas de la materia orgánica hasta la estabilización del producto con la producción de H₂O y CO₂.²² Estas fases son las siguientes:

- **Fase mesotérmica I (10-40°C).** En esta fase se caracteriza por una reacción de síntesis, consistente en la asimilación de elementos nutritivos, de materia orgánica, por parte acción de los microorganismos, utilizando una parte de los compuestos orgánicos como fuente de energía y otra para formar nueva masa de microorganismos. Las reacciones globales corresponden a:



En este proceso se producen oxidaciones aeróbicas por parte de la microflora mesófila (Bacterias y Actinomicetos) en concomitancia con fermentaciones facultativas de la materia orgánica. Además se dan procesos

²¹ Ibid., p.18

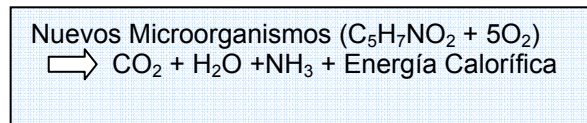
²² TCHOBANOGLIOUS, George. Gestión integral de Residuos Sólidos. Madrid. 1994. p.47.

de nitrificación y oxidación de compuestos reducidos de azufre, fósforo etc. La participación de Hongos se da al inicio de esta etapa y al final del proceso en áreas muy específicas de las pilas de compostaje. La actividad metabólica incrementa paulatinamente la temperatura, la falta de disipación de calor produce un incremento aun mayor de temperatura y favorece el desarrollo de la microflora termófila que se encuentra en estado latente en los residuos. La duración de esta etapa es variable²³.

- **Fase termófila (40-75°C).** En esta segunda fase se producen reacciones de auto-oxidación de los microorganismos cuando comienza a faltar la materia orgánica usada como alimento en la fase mesófila. En su desarrollo se liberan los nutrientes usados previamente en la síntesis de nuevas células.

Si la compactación y la ventilación son adecuadas se producen visibles emanaciones de vapor de agua. El CO₂ se produce en volúmenes importantes y se difunden desde el núcleo a la corteza, este gas juega un papel fundamental en el control de larvas de insectos, pues este gas es letal para ellas.

En el curso de las fases sucesivas de asimilación, una fracción de los microorganismos es transformado en H₂O y CO₂, de tal forma que la masa orgánica disminuye. La reacción global es:



Al aumentar la temperatura empiezan a proliferar bacterias y sobre todo hongos termófilos que se desarrollan desde los 40°C hasta los 60°C. Estas especies empiezan a degradar la celulosa y la lignina, con lo cual la temperatura sube hasta los 70°C, apareciendo poblaciones de actinomicetos y bacterias formadoras de esporas. Durante varios días se mantiene a esta temperatura, en una fase de actividad biológica lenta, en la que se produce la pasteurización del medio. Aunque la celulosa y la lignina a estas temperaturas se atacan muy poco, las ceras, proteínas y hemicelulosas se degradan rápidamente.

²³ Ibid., p.48.

Este proceso comienza por encima de 40°C, provocando una disminución del crecimiento de la microflora mesófila la cual es sustituida por la termófila al igual que se eliminan la mayoría de mesófilos patógenos, hongos y elementos biológicos indeseables. Esta etapa es crucial para la higienización del material, por lo que es conveniente mantener las condiciones que permitan su máxima prolongación.

Estas temperaturas inician, sin embargo, una nueva explosión de actividad por parte de microorganismos termófilos contenidos en la materia orgánica, conduciendo a condiciones mesófilas hasta la metabolización completa de los sustratos simples quedando los materiales más resistentes degradándose a ritmos mucho más lentos.²⁴

Fase Mesotérmica II. Cuando la materia orgánica se ha consumido, la temperatura empieza a disminuir alcanzando niveles iguales o inferiores a los 40°C en este momento las bacterias y los hongos mesófilos, reinviden el interior del compost utilizando como fuente de energía los materiales mas resistentes a la biodegradación, tales como la celulosa y lignina presentes en los residuos. La temperatura descenderá paulatinamente hasta presentarse en valores muy cercanos a la temperatura ambiente, en estos momentos se dice que el material se presenta estable biológicamente y se da por terminado el proceso. A esta etapa se le conoce generalmente como **etapa de maduración**.²⁵

Desde el punto de vista microbiológico la finalización del proceso de compostaje se tipifica por la disminución de actividad metabólica a niveles mínimos. Las poblaciones microbianas se presentan en fase de muerte por agotamiento de nutrientes. El proceso de compostaje es, pues, una compleja interacción entre el sustrato, los microorganismos, la aireación y la producción de agua y de calor.

En los procesos industriales de compostaje a través del compostaje aerobio, donde se apila la materia orgánica, existen zonas interiores de las pilas con menor presencia de oxígeno y, por lo tanto, menor actividad microbiana de carácter aerobio. Un correcto volteo de la pila reinicia el proceso debido a la

²⁴ Ibid., p.50.

²⁵NEGRO, M. Op. cit., p. 10

presencia de materiales poco degradados que se hallaban situados en el interior de la masa original.²⁶

1.2.4 Principales parámetros de control en el proceso de compostaje.

En el proceso de compostaje el principio básico más importante es el hecho de que se trata de un proceso biológico llevado a cabo por microorganismos, y por tanto, tiene todas las ventajas y limitaciones de este tipo de procesos. Según esto, los factores que afectan a los microorganismos son los que requieren mayor control a lo largo del proceso. Entre estos factores están: La aireación, el contenido en humedad y temperatura, pH, los factores nutricionales y la relación C/N.²⁷

Aireación: Es un factor importante en el proceso de compostaje y, por tanto, un parámetro a controlar. Como ya se ha comentado, el proceso de compostaje es un proceso aerobio, se necesita la presencia de oxígeno para el desarrollo adecuado de los microorganismos. La aireación tiene un doble objetivo, aportar por una parte el oxígeno suficiente a los microorganismos y permitir al máximo la evacuación del Dióxido de carbono producido. La aireación debe mantenerse en unos niveles adecuados teniendo en cuenta además que las necesidades de oxígeno varían a lo largo del proceso, siendo bajas en la fase mesófila, alcanzando el máximo en la fase termófila y disminuyendo de nuevo al final del proceso.

La aireación no debe ser excesiva, puesto que pueden producir variaciones en la temperatura y en el contenido en humedad. Así, por ejemplo, un exceso de ventilación podría provocar evaporación que inhibiría la actividad microbiológica hasta parar el proceso de compostaje, con lo que podría dar la impresión de que el proceso había concluido. Por otra parte, el exceso de ventilación incrementaría considerablemente los gastos de producción.

Humedad: La humedad es un factor muy relacionado con el anterior. Los microorganismos necesitan agua como vehículo para transportar los nutrientes y elementos energéticos a través de la membrana celular. La humedad óptima se puede situar alrededor del 55% aunque varía dependiendo del estado físico y tamaño de las partículas, así como del sistema empleado para realizar el compostaje. Si la humedad disminuye demasiado, disminuye la actividad microbiana con lo cual el producto obtenido será biológicamente inestable. Si la humedad es demasiado alta, el

²⁶ TCHOBANOGLOUS, G. Op. cit., p. 10

²⁷ NEGRO, M. Op. cit., p. 7

agua saturará los poros e interferirá la distribución del aire a través del compost. En procesos en los cuales los principales componentes sean substratos tales como aserrín, astillas de madera, paja, hojas secas, se necesita una mayor humedad, mientras en materiales como los residuos de alimentación, etc., la humedad necesaria es mucho menor.

Temperatura: Durante el proceso de compostaje la temperatura varía dependiendo de la actividad metabólica de los microorganismos. De acuerdo a este parámetro, el proceso de compostaje se puede dividir en cuatro etapas: mesófila, termófila, enfriamiento y maduración.

Figura 1. Control de parámetros mediante sensores



Inicialmente, los residuos se encuentran a temperatura ambiente, enseguida los microorganismos crecen y la temperatura sube considerablemente, a los pocos días se alcanzan los 40°C (fase mesófila), la temperatura sigue subiendo hasta alcanzar valores comprendidos entre 60-70°C (fase termófila), la mayor parte de los microorganismos iniciales mueren y son reemplazados por otros resistentes a esa temperatura. A partir de los 60°C, los hongos termófilos cesan su actividad y la reacción se lleva a cabo por las bacterias formadoras de esporas y actinomicetos. En esta fase la generación de calor se iguala a la velocidad de pérdida de calor en la superficie de las pilas, esto marca el final de la fase termófila. Por último, se produce una nueva fase mesófila o de enfriamiento y una fase final de maduración en la que la temperatura se iguala a la del medio ambiente.

La temperatura se debe controlar, ya que las temperaturas bajas suponen una lenta transformación de los residuos, prolongándose los tiempos de retención, y las temperaturas elevadas determinan la destrucción de la mayor parte de los microorganismos (pasteurización), fenómeno que sólo debe permitirse al final del compostaje, para asegurar la eliminación de patógenos.

pH: Durante el proceso de compostaje se producen diferentes fenómenos o procesos que hacen variar este parámetro. Al principio y como consecuencia del metabolismo fundamentalmente bacteriano que transforma los complejos carbonados fácilmente descomponibles, en ácidos orgánicos, el pH desciende; seguidamente, el pH aumenta como consecuencia de la formación de amoníaco, alcanzando el valor más alto, alrededor de 8,5, coincidiendo con el máximo de actividad de la fase termófila. Finalmente, el pH disminuye en la fase final o de maduración (pH entre 7 y 8) debido a las propiedades naturales de amortiguador o tampón de la materia orgánica.

Factores nutricionales: Con respecto a los factores nutricionales, el carbono es utilizado por los microorganismos como fuente de energía y el nitrógeno para la síntesis de proteínas. Las dos terceras partes del carbono son quemadas y transformadas en CO₂ y el restante entra a formar parte del protoplasma celular de los nuevos microorganismos, si bien, para la producción de proteínas, se necesita la absorción de otros elementos entre los cuales el más importante es el nitrógeno y en menores cantidades el fósforo y el azufre.

Las formas de carbono más fácilmente atacables por los microorganismos son los azúcares y las materias grasas. El nitrógeno se encuentra en casi su totalidad en forma orgánica de donde debe ser extraído o modificado por los microorganismos para poder ser utilizado por éstos.

Relación C/N: La relación C/N de la masa a compostar es un factor importante a controlar para obtener una fermentación correcta y, por tanto, un producto final, de características adecuadas. A medida que transcurre el compostaje, esta relación se hace cada vez menor. La relación óptima C/N inicial está comprendida entre 25-35. Si es superior a 35, el proceso de fermentación se alarga considerablemente hasta que el exceso de carbono es oxidado y la relación C/N desciende a valores adecuados para el metabolismo. Si es inferior a 25 se producen pérdidas considerables de nitrógeno en forma de amoníaco. Cuando la relación C/N es elevada se podrá hacer descender artificialmente, ya sea quitando celulosa, es decir, reduciendo el carbono o aumentando el contenido de nitrógeno,

Tóxicos o inhibidores: existen una serie de sustancias orgánicas e inorgánicas que, a ciertas concentraciones, inhiben o impiden los procesos biológicos. Por ejemplo, los materiales pesados Fe, Al, Cr, Cu, Zn ejercen un efecto perjudicial, al actuar sobre las enzimas catalizadoras de las reacciones de síntesis. Los microorganismos sólo pueden tolerar concentraciones muy débiles de estos elementos, tan sólo algunos mg/l.

1.2.5 Sistemas de compostaje. Existen tres sistemas principales de compostaje: pilas aireadas, pilas volteadas y los sistemas mecánicos cerrados.

- **Pilas estáticas aireadas.** Consisten en una red de tuberías de conducción de aire sobre las que se distribuye el material a compostar. El material se composta durante un periodo de 21 a 28 días y se madura en un periodo adicional de 15-30 días. La altura de las pilas oscila entre 2- 2.5 metros. A menudo para aislar la pila, se dispone una capa de compostaje cribado encima de la misma.²⁸

- **Pilas volteadas.** En este sistema el material se mezcla y voltea periódicamente o según sea necesario durante el tiempo de compostaje. La altura de las pilas es de 0.5–2 metros y 2-4.5 metros de ancho. En condiciones de operación normal, las pilas se voltean lo suficiente mientras la temperatura se mantiene por encima o igual a 55 °C esta operación suele ir acompañada de olores desagradables. El periodo de compostaje oscila entre 21–28 días.²⁹ En este trabajo se utilizó este sistema de compostaje por su fácil manejo, operabilidad y costos.

- **Sistemas cerrados.** Este sistema de compostaje se realiza normalmente en reactores cerrados. Los sistemas mecánicos se diseñan para minimizar la producción de olores y la duración del proceso controlando las condiciones ambientales tales como el flujo de aire, La temperatura y la concentración de oxígeno. Se dividen en sistemas de flujo pistón y dinámicos³⁰

²⁸ TCHOBANOGLIOUS, G. Ingeniería de aguas residuales. México. 1997. p. 898.

²⁹ Ibid., p.899

³⁰ Ibid., p.900.

Figura 2. Sistemas de compostaje con pilas volteadas y pilas estáticas aireadas



Existen numerosos datos en la bibliografía sobre los parámetros microbiológicos, químicos y físicos para un buen compostaje. Los valores más comunes de los principales parámetros quedan reflejados en la Tabla 3.³¹

1.2.6 Evaluación de la madurez de un compost. La evaluación de la madurez de un compost es uno de los parámetros más importantes que se plantea en relación al proceso de compostaje y aplicación del producto obtenido al suelo. Entre los métodos de evaluación más destacados se encuentran test de tipo físico, estudios de la fracción húmica del compost, métodos químicos (contenido NPK), métodos biológicos o test de fitotoxicidad y el análisis estándar para el contenido microbiológico, este último es determinado por la concentración de seis grupos funcionales de microorganismos: Bacteria Oxigénicas, Bacterias Anoxigénicas, Hongos, Actinomicetos, Pseudomonas y Bacterias fijadoras de Nitrógeno.³² Como se indica en la Tabla 4.

³¹FERMORE, T. Applied aspects of composting and bioconversion of lignocellulosic materials an overview. International Biodeterioration & Biodegradation. Madrid, 1993. Vol. 31, 87.

³² NEGRO, M. Op. cit., p. 27.

Tabla 3. Resumen de las condiciones de un proceso de compostaje ideal

PARÁMETRO	VALOR
Relación C/N inicial	30-35:1
Relación C/P inicial	75-150:1
Tamaño de partícula	12,5 mm para plantas donde se utiliza agitación y aireación forzada, 50 mm para plantas sin agitación y aireación natural
Contenido en humedad	50-60%
Aireación	0,6-1,8 m ³ /día Kg-1 sólidos volátiles durante la fase termófila o manteniendo los niveles de oxígeno entre 10-18%
Temperatura	55° C
Agitación	Cortos períodos de agitación vigorosa, alternando con períodos sin agitación que varían desde minutos en la fase termófila a horas durante la maduración
Control pH	Normalmente no deseable
Tamaño	Cualquier longitud, pero no más de 1,5 m de alto o 2,5m de ancho en el caso de pilas con aireación natural. Con aireación forzada, depende de las necesidades para el precalentamiento.

Fuente: Fermore, 1993

Tabla 4. Concentración de microorganismos en un compost final

Grupo Funcional	Interpretación del Biotest
<i>Bacterias Oxigénicas</i>	10 ⁷ - 10 ⁹ UFC*/gramo peso seco
<i>Bacterias Anoxigénicas</i>	Radio mínimo de Oxigénicos: Anoxigénicos en el compost 10:1
<i>Mohos y Levaduras</i>	10 ³ - 10 ⁴ UFC/gramo peso seco
<i>Actinomicetos</i>	10 ⁶ - 10 ⁸ UFC/gramo peso seco
<i>Pseudomonas</i>	10 ³ - 10 ⁶ UFC/gramo peso seco
<i>Bacterias Fijadoras de N</i>	10 ³ - 10 ⁶ UFC/gramo peso seco

Fuente: Bess, 1999. *UFC Unidades Formadoras de Colonias.

1.2.6.1 Test de tipo físico: Son los habitualmente utilizados y, en general, dan una idea aproximada de la madurez de un compost. Entre ellos se incluyen factores tales como ausencia de olor desagradable, color oscuro y temperatura estable.

- ◆ **Olor:** El compost maduro debe tener ausencia de olor desagradable y debe tener un olor similar a la tierra húmeda.

- ◆ **Color:** Durante el proceso de compostaje, el material sufre un proceso de oscurecimiento o melanización hasta transformarse en un producto oscuro. Aunque los mecanismos del proceso citado no son bien conocidos, en ellos se incluyen reacciones de la humificación, tipo aminocarbonilo y tipo Maillard, sin descartar otras reacciones que ocurren a menor temperatura.

- ◆ **Temperatura estable:** Durante el compostaje se considera la evolución de la temperatura, como reflejo de la actividad de la población microbiana involucrada en el proceso, que decrece considerablemente al final del mismo, determinando una disminución de la temperatura del material compostado de 60–70°C hasta temperatura ambiente. En este sentido, un compost se considera maduro cuando la curva de temperatura del mismo se ha estabilizado y no varía con el volteo del material.³³

1.2.6.2 Test de tipo biológico: Últimamente se están desarrollando un gran número de test biológico, con el fin de evaluar la madurez de un compost, estos test están basados en el efecto negativo que provoca la aplicación de compost "inmaduros" sobre la germinación de las semillas debido a la presencia de compuestos fitotóxicos en estos productos. Estos test consisten fundamentalmente en la obtención de un extracto acuoso del material que es introducido en una placa Pétri de incubación donde se determina el grado de germinación. En general, un compost se considera maduro cuando el índice de germinación es superior al 50%.³⁴

³³. *Ibid.*, p.28.

³⁴ NEGRO, M y SOLANO, M. Laboratory composting assays of de solid residue resulting from flocculation of oil mill wastewater with different lignocellulosic residues. *Compost Science and Utilization*, 1996. 4 (4), 62-71.

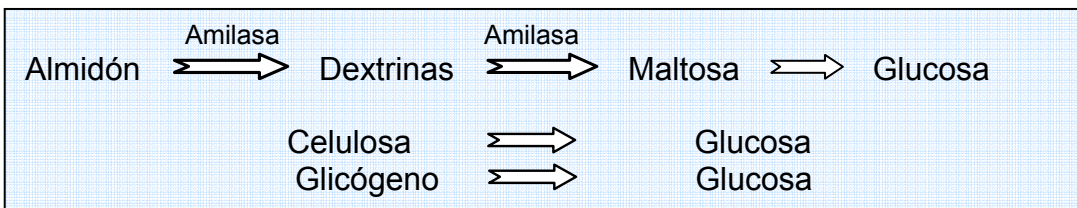
1.3 ACCION METABÓLICA DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE LOS RESIDUOS ORGÁNICOS

Los microorganismos contenidos en una pila de compostaje ejercen una acción enzimática sobre cada uno de los biocompuestos que conforman los residuos, para la selección de un grupo de microorganismos degradantes adecuados es necesario conocer como se metabolizan enzimáticamente estos compuestos.

1.3.1 Metabolismo de los Carbohidratos. Los carbohidratos presentes en los residuos orgánicos comprenden un gran grupo de compuestos químicos que incluyen monosacáridos (tetrosas, pentosas y hexosas), oligosacáridos (sacarosa y maltosa) y polisacáridos (almidón, celulosa y glicógeno). Para los organismos microscópicos los carbohidratos son la fuente predilecta para la producción de Energía, así mismo lo usan para la síntesis de grasas, proteínas y formación de tejido celular. A escala celular son degradados como monosacáridos.³⁵

♦ **Degradación de polisacáridos.** Algunos *Bacillus spp*, Mohos, *Clostridium spp* y otras especies bacterianas son capaces de degradar almidón, glicógeno, celulosa, pectina y otros polisacáridos. Los polisacáridos son llevados a mono y disacáridos con ayuda de enzimas microbianas extracelulares secretadas al ambiente, estos azucares pueden ser luego transportados y metabolizados al interior de la célula.

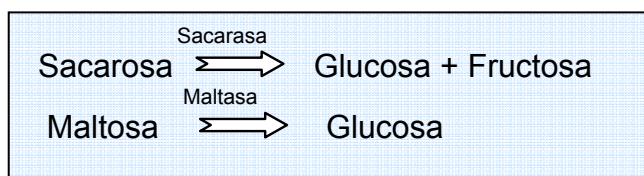
La hidrólisis enzimática de los principales polisacáridos presentes en los residuos ocurre de la siguiente manera



♦ **Degradación de disacáridos:** los disacáridos presentes en los desechos o producidos durante el crecimiento microbiano (Maltosa) son

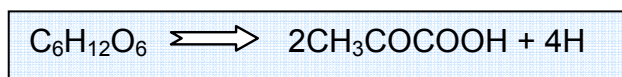
³⁵ MADIGAN, M., MARTINKO, J., y PARKER, J. Brock biología de los microorganismos España. 1998, p. 517.

hidrolizados a monosacáridos dentro de las células por enzimas específicas.³⁶



- ◆ **Degradación de Monosacáridos:** Los monosacáridos son catabolizados por microorganismos aeróbicos y anaeróbicos y anaeróbicos facultativos por medio de varias vías que generan muchos tipos de subproductos.

Las rutas metabólicas dependen del tipo y cantidad de monosacáridos, tipo de microorganismos y potencial redox del sistema. En cualquier ruta, la conversión inicial es a ácido pirúvico a partir de una hexosa simple (generalmente Glucosa) de la siguiente manera:



Este ácido pirúvico se somete después a una serie de transformaciones exergónicas que permiten la obtención de grandes cantidades de Energía para la célula³⁷.

1.3.2 Metabolismo de las proteínas. Los compuestos proteínicos presentes en los residuos orgánicos comprenden diferentes tipos de proteínas simples (Albúmina, globulina, queratina y colágeno), proteínas conjugadas (Mioglobina, Hemoglobina y Caseína) y péptidos con dos o mas aminoácidos. También aminoácidos, úrea, Creatinina, trimetilamina y otros de los grupos nitrogenados no proteínicos.

Las proteínas y los péptidos grandes dentro de los residuos son hidrolizados a aminoácidos y péptidos pequeños por medio de proteinasas y peptidasas microbianas extracelulares. Los aminoácidos y péptidos aquí formados, junto

³⁶ *Ibid.*, p.519

³⁷ *Ibid.*, p.519

con los que se encontraban inicialmente en los residuos son transportados al interior de la célula para su posterior metabolismo.

Dentro del compost las especies tales como *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* son capaces de producir enzimas que hacen posible esta serie de reacciones hidrolíticas y de oxidación³⁸.

Finalmente ocurre la desaminación de los aminoácidos a través de diversas reacciones dentro de la célula cuya naturaleza varia si las condiciones son aeróbicas o anaeróbicas. De esta reacción se obtiene Amoniaco y Ácidos carboxílicos que serán metabolizados más adelante.

1.3.3 Metabolismo de los lípidos. Los principales lípidos de los desechos orgánicos son los mono, di y triglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos, esteroides y ceras, siendo los glicéridos los de más abundancia.

Los microorganismos tienen baja preferencia por metabolizar lípidos que debido a su naturaleza hidrofóbica son difíciles de atacar cuando se encuentran en gran masa. En emulsión pueden ser atacados en la interfase grasa/agua. Los glicéridos son hidrolizados por lipasas extracelulares generadas por algunos microorganismos presentes en el compost (*Bacillus spp* y *Pseudomonas spp* y hongos como *Aspergillus* y *Penicillium*) dando como resultado la liberación de glicerol y ácidos grasos.

Estos ácidos grasos sumados a los ácidos producidos en la desaminación y los producidos por la fermentación de los carbohidratos son transformados por oxidación beta a través de una serie de pasos donde finalmente los ácidos grasos son transformados en moléculas de ácido acético³⁹.

1.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS ACELERADORES.

El objetivo principal de este proyecto fue la obtención de un grupo de microorganismos oxigénicos que actúen en conjunto en la aceleración del

³⁸GARZON, M., GUTIERREZ, E. y RIOS, J. Producción a escala de laboratorio de un pool de microorganismos aceleradores de compostaje. Tesis de Grado. Ingeniería Química UIS, p.30

³⁹MADIGAN, M., MARTINKO, J., y PARKER, J. Op. cit., p. 521.

proceso de compostaje de la pollinaza al tiempo que mejoren la calidad del producto. Para ello es necesario tener en cuenta ciertos aspectos que permitan su selección dentro del complejo sistema microbiológico existente en los residuos. Estos criterios de selección se basaron en los fundamentos teóricos anteriormente expuestos (acción metabólica de los microorganismos sobre los residuos orgánicos) y en investigaciones realizadas por otros autores⁴⁰

1.4.1 Ecología microbiana de las especies. En una pila de compostaje, por su misma naturaleza biológica existe una gran variedad microbiológica relacionada entre si mediante interacciones tanto de tipo benéficas como perjudiciales, que permiten llevar a cabo efectivamente los procesos de degradación orgánica de una forma sinérgica. Teniendo en cuenta esto, se optó por aislar los microorganismos nativos de la pollinaza, ya que al pertenecer a un proceso natural de descomposición, una vez sean adicionados a la pila en proporciones similares a las que existen naturalmente en el compost, no alteraran en forma drástica el equilibrio microbiológico.⁴¹

1.4.2 Etapas del compostaje susceptibles a aceleración. Conociendo las diferentes etapas que se desarrollan dentro del proceso de compostaje la selección se debe encaminar hacia aquellos microorganismos que actúen en las fases mesófilas, por ser estas etapas las que toman más tiempo (12 a 20 días) comparado con fase termófila que dura aproximadamente de 3 a 4 días.

En un proceso de compostaje el aumento de la temperatura se debe a la energía liberada en todos los procesos metabólicos de los microorganismos sobre los residuos. Al introducir una carga extra de estos microorganismos la actividad metabólica se incrementará de forma que se llegará más rápido a los valores de temperatura que determinan el final de ésta fase. Con respecto a la etapa mesofílica 2, cuyo final está determinado por la biodegradación mayoritaria de todos los residuos, se vera mediante interacciones tanto benéficas como perjudiciales que permite llevar a cabo efectivamente los procesos de degradación orgánica de una forma sinérgica.

Al incrementar la concentración de microorganismos descomponedores de la materia difícilmente asimilable, estas sustancias se agotaran mas

⁴⁰ GARZON, M., GUTIERREZ, E. y RIOS, J. Op. cit., p. 31

⁴¹ *Ibid.*, p.32.

rápidamente lográndose una estabilización de los residuos en menor tiempo.⁴²

1.4.3 Requerimientos enzimáticos de la biodegradación de residuos.

Basados en la información expuesta en la sección de acción metabólica de los microorganismos es claro que los diferentes biocompuestos que componen los residuos orgánicos requieren de una acción enzimática conjunta para su descomposición a moléculas más simples.

Cada uno de los microorganismos presentes en los residuos orgánicos aporta sus complejos sistemas enzimáticos, que sumados logran la transformación de estos materiales. No obstante dentro de este grupo existen cepas particularmente activas en la producción de una amplia variedad de enzimas que juegan un papel primordial en las distintas tareas de biodegradación.

Según investigaciones previas (Gray, 1973) se ha podido determinar que los géneros que tienen una mayor participación en el metabolismo de los biocompuestos son las bacterias, hongos y actinomicetos; y dentro del grupo de las bacterias están los *Bacillus* y *Pseudomonas*⁴³

Bacillus. Este tipo de microorganismos posee un rápido metabolismo capaz de producir una gran cantidad de enzimas del grupo de las carbohidrasas y proteasas, las cuales actúan sobre los almidones, azúcares y proteínas.

Pseudomonas. Además de hidrolizar polisacáridos por su producción de carbohidrasas, son útiles en los procesos de oxidación de los residuos de tipo hidrocarburos y sus derivados, y de lípidos por su producción de enzimas oxidorreductasas.

Actinomicetos. Complementan la actividad de las *Pseudomonas* en materia de degradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos y de compuestos lignocelulósicos, ya que producen enzimas del tipo desmolíticas o respiratorias y del tipo celulasas.

⁴² *Ibid.*, p.32.

⁴³ GRAY, K y BIDDLESTONE; A. The Chemical Engineering. London. 1973. p 89.

Hongos. Son unos actores biológicos de especial importancia, muy activos en los procesos de amonificación y descomposición de lignocelulosas por su producción de enzimas del tipo hemicelulosas y celulasas. Así mismo sus enzimas carbohidrasas permiten atacar fácilmente residuos con altas concentraciones de polisacáridos.

Con base en éstos criterios, los microorganismos finalmente seleccionados fueron aquellos mesófilos, que aislados del proceso del compostaje pertenecían a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, hongos, *actinomicetos*, levaduras y géneros de la familia enterobacteriaceae que fuesen higiénicamente inofensivos, y con antecedentes de su amplia utilización en los procesos de degradación orgánica; ya sea por trabajos de investigación anteriores o por que ya hagan parte de conglomerados comerciales patentes.

2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La presente investigación se llevó a cabo en La Granja Avícola “La Rosita”, propiedad de INDUPOLLO S.A. Ubicada en el municipio de Turbaco del Departamento de Bolívar a 100 m.s.n.m., jurisdicción de la Corporación Autónoma Regional del Canal del Dique-CARDIQUE, Eco-región Zona Costera y simultáneamente en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN) sede UIS-Guatiguará.

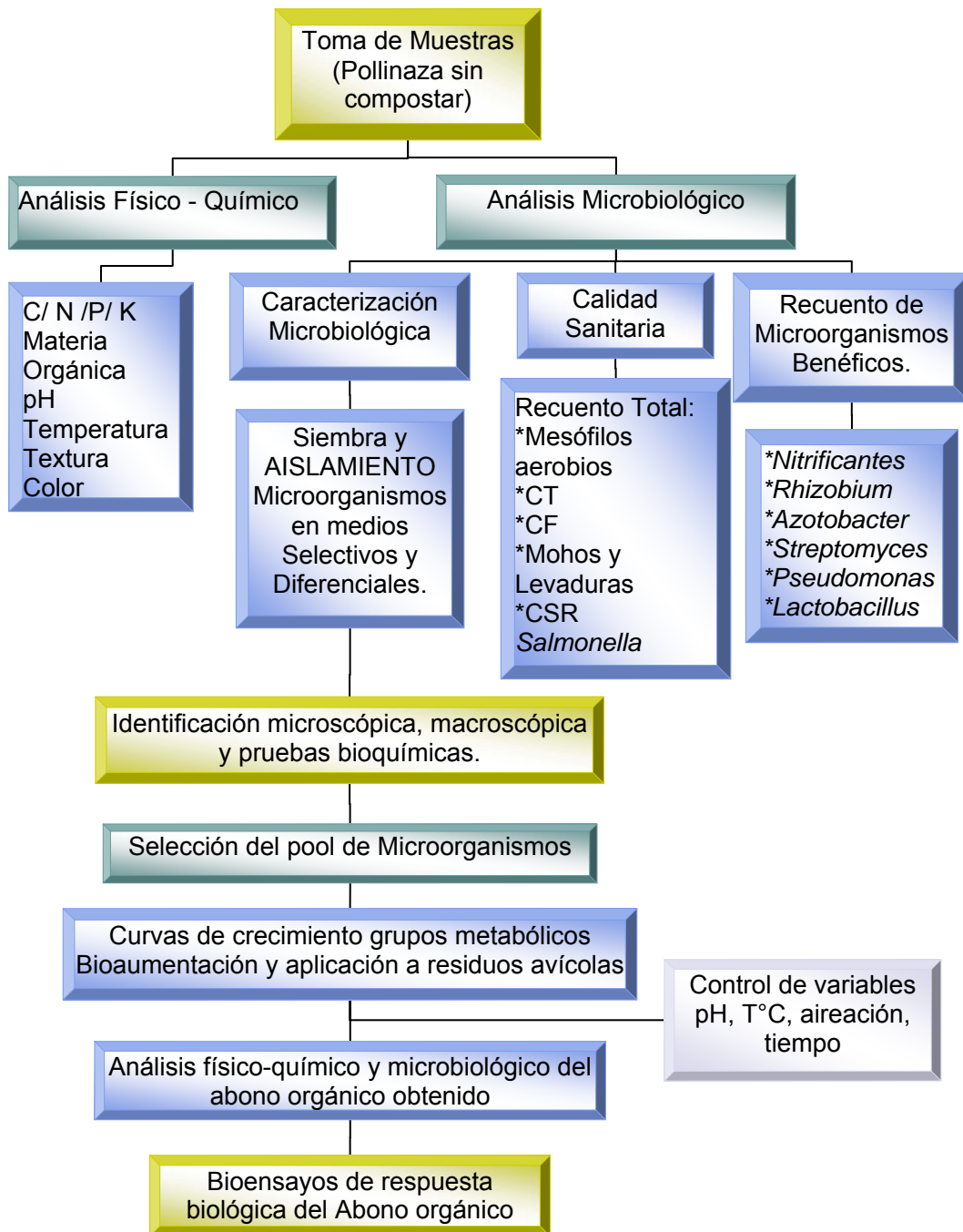
El sitio de estudio La granja La Rosita cuenta con un área total de 4.556 m². La cual está constituida por 6 galpones con dimensiones de 134 m de largo por 34 m de ancho. Cada galpón con capacidad para 25.000 pollos, para un total de 150.000 pollos, con una densidad poblacional de 12.5 animales/m² aproximadamente. La producción total de pollinaza de los galpones de acuerdo con el área de 12.012 m² es de 192.192 Kg. (192,19 Ton.)/ ciclo productivo (56 días).

El compostaje de la pollinaza para la obtención del abono orgánico se desarrolló en 7 etapas experimentales como se observa en la Figura 3. Iniciando con la toma de muestras de pollinaza, análisis físico, químico y microbiológico del sustrato, aislamiento e identificación de los microorganismos oxigénicos, selección de microorganismos oxigénicos aceleradores, curvas de Crecimiento de grupos metabólicos, bioaumentación y aplicación a residuos avícolas. Posteriormente se realizó análisis físico, químico y microbiológico del abono obtenido para finalmente realizar la etapa de bioensayos con extractos acuosos del abono orgánico, y así comprobar su eficacia en el porcentaje de germinación de semillas, crecimiento de la raíz y el tallo de la plántula de Tomate.

2.1 TOMA DE MUESTRAS

La recolección de la materia prima se realizó en la Granja Avícola “La Rosita” perteneciente a INDUPOLLO-Cartagena entidad financiadora del presente proyecto.

Figura 3. Etapas del bioproceso experimental.



La materia orgánica seleccionada para el compostaje fue Pollinaza de Piso, con un tiempo de retención de 2 meses compuesta principalmente de material de cama (cascarilla de arroz), plumas y estiércol fresco.

2.2 CARACTERIZACIÓN DE LA POLLINAZA

Con los estudios de caracterización se determinan las características Químicas, Físicas y Microbiológicas de la pollinaza.

2.2.1 Análisis Físico-Químico del sustrato. Para la caracterización Físico-Química del sustrato se tomaron 6 muestras seriadas a diferentes intervalos de altura de la pila de compostaje antes y después del bioproceso.

La caracterización se realizó en el Laboratorio de Calidad Ambiental de CARDIQUE, los parámetros medidos fueron: Relación Carbono / Nitrógeno (C/N), Materia Orgánica (MO), Fósforo Total (P), Potasio (K), Nitrógeno (N), Mercurio Total (Hg.), Humedad, Cenizas, pH, Temperatura, Textura, y Color.

2.2.2 Análisis Microbiológico. El análisis microbiológico de la pollinaza consta de tres etapas: Determinación de la calidad sanitaria del compost, recuento de microorganismos benéficos y caracterización microbiológica.

2.2.2.1 Calidad Sanitaria. Tiene como objetivo analizar la carga microbiana total y patógena que pueda encontrarse en la muestra, este análisis requiere de recuento total de microorganismos mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales, recuento de *mohos* y *Levaduras*, *Clostridium* Sulfito Reductor (CSR) y *Salmonella spp.* (Fig. 4).

La metodología para determinar la calidad sanitaria se realizó de la siguiente manera:

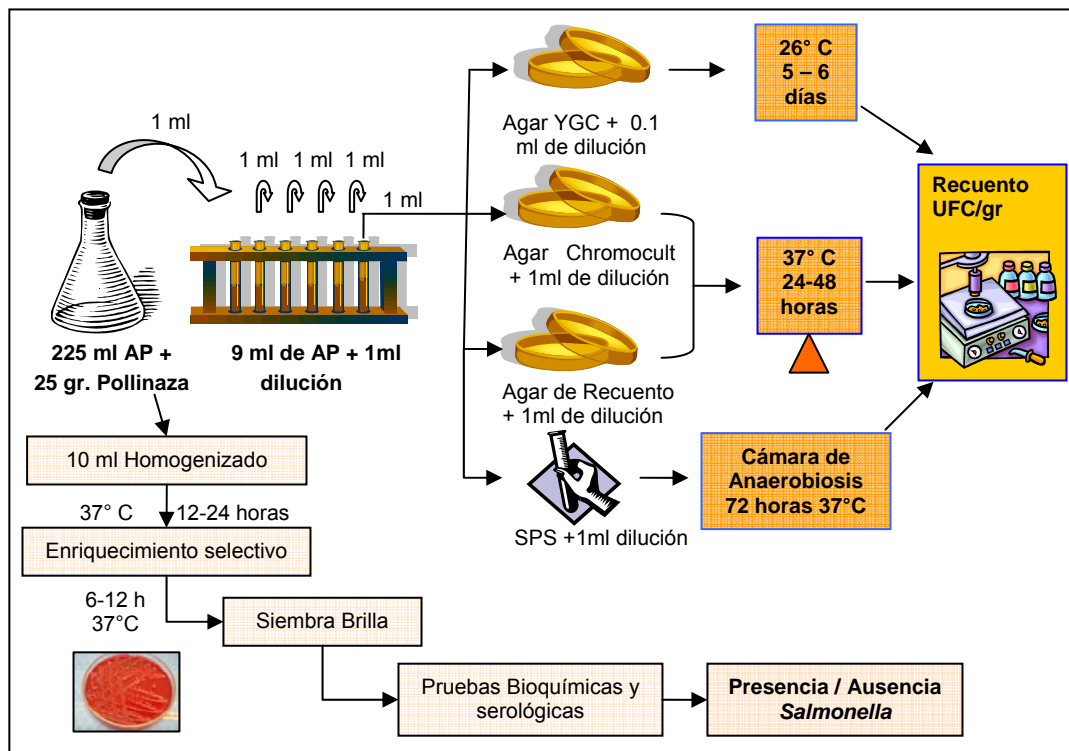
Se preparó un homogenizado tomando 225 ml de solución Peptonada estéril y 25 gramos de pollinaza (dilución 1:10), se mezcló y luego se procedió a hacer una serie de diluciones $1/10^2$, $1/10^3$, $1/10^4$ hasta $1/10^9$.

- Para el **Recuento de Mesófilos** se hizo siembra profunda en una caja de pétri estéril tomando 1 ml de la dilución $1/10^9$, se agregó Agar de Recuento fundido mezclando muy bien el inóculo con el Agar, se dejó

solidificar e incubó a 37°C por 24-48 horas. Después del crecimiento se realizó el recuento de colonias en la cámara de Québec y se multiplicó por el factor de dilución utilizado, informando el resultado como UFC/gr de compost.

- El recuento de **Coliformes Totales y Fecales** se realizó de la misma forma que el procedimiento anterior pero el medio de cultivo utilizado fue Chromocult. Se contaron tanto las colonias de color rojo o rosado y las violeta para coliformes totales y solamente las de color violeta para el recuento de coliformes fecales. Ambos recuentos se informaron como UFC/gr de pollinaza.

Figura 4. Análisis de calidad sanitaria del compost.



- Para el recuento de **Mohos y Levaduras** se hizo siembra en superficie tomando 0,1 ml de la dilución respectiva, se colocó en el centro de una caja de pétri estéril con medio YGC, se extendió con una espátula Driglaski hasta que la muestra se absorbió completamente en el medio

y se incubó a Temperatura Ambiente, entre el tercer y quinto día se realizó el recuento de colonias.

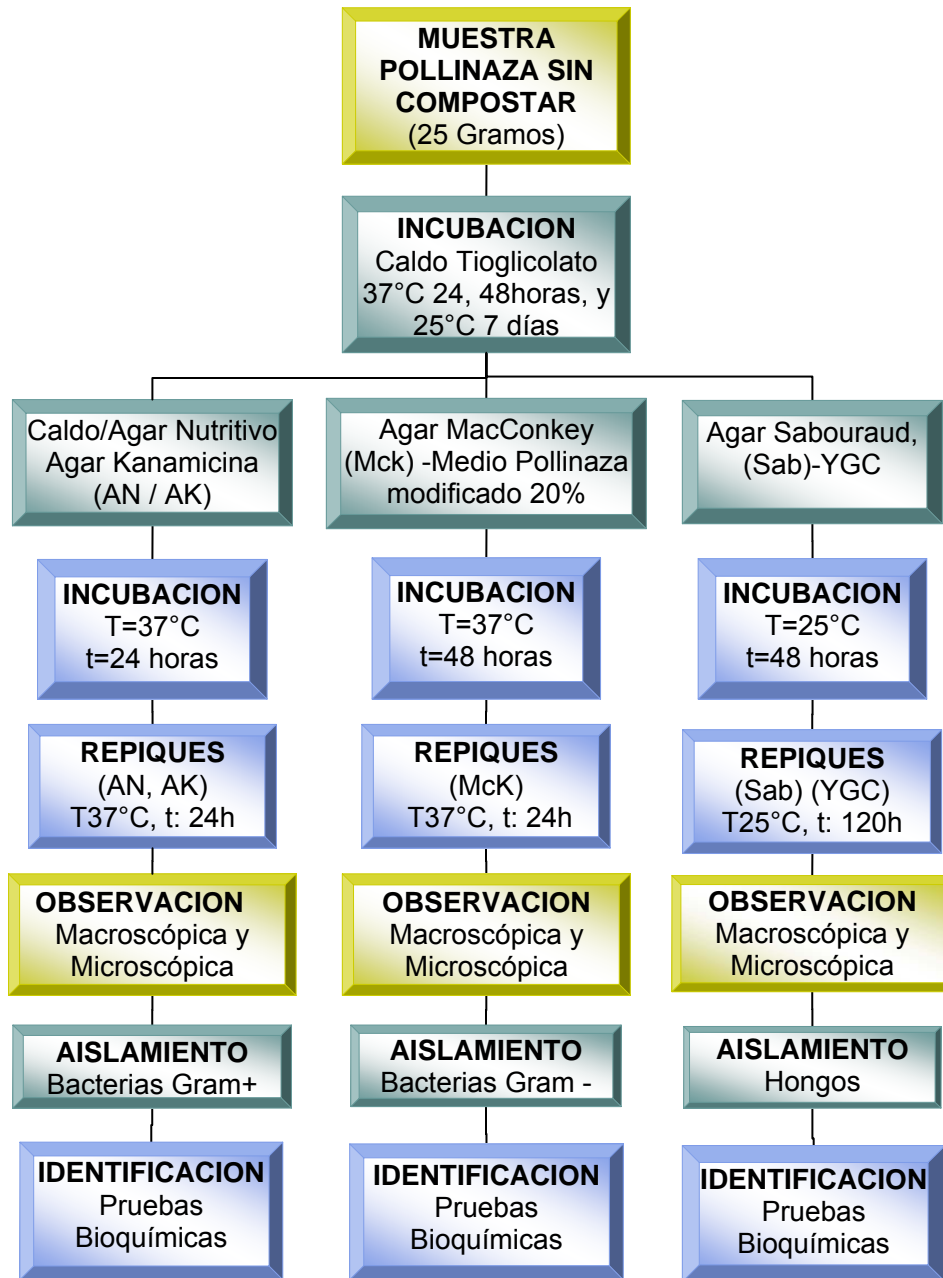
- Para determinar la **presencia o ausencia de *Salmonella spp.*** Se tomaron 10 ml del homogenizado y se incubaron de 12 a 24 horas a 37°C (enriquecimiento no selectivo), luego se agregó una pastilla de *Salmosyst* dejando en reposo por 30 minutos. Posteriormente se agitó fuertemente y se incubó por 6 a 8 horas (enriquecimiento selectivo), después se hizo repique por agotamiento en medios selectivos y diferenciales para *Salmonella* (SS. Brilla). A las colonias sospechosas se les realizó pruebas Bioquímicas, y se informó como presencia o ausencia de *Salmonella*.
- Recuento de ***Clostridium Sulfito Reductor***. Se utilizó el medio selectivo para *Clostridium* (medio SPS) en tubo fundido. Se tomó 1 ml de la respectiva dilución e inoculó en el medio SPS a una temperatura de 45 a 50°C, se agregó tres a cuatro gotas de aceite mineral y se dejó solidificar incubando en ambiente anaerobio por 72 horas. Finalmente se efectuó el recuento de las colonias informando el resultado como UFC de CSR/gr de compost.

2.2.2.2 Recuento de microorganismos benéficos. Su principal objetivo fue analizar la carga microbiana de los microorganismos benéficos en el compost, entre los que se encuentran las Bacterias Nitrificantes, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Streptomyces*, *Lactobacillus* y otros. Para poderlos determinar es necesario hacer primero un homogenizado de la muestra en una solución diluyente preparada con agua desmineralizada.

- **Homogenizado:** Se mezclaron 5 gramos de la muestra de compost en 99 ml de extracto de suelo estéril o en solución Ringer + gelatina y se agitó a 150 rpm durante 15 minutos.
- **Siembra:** Se sembró 0,1 ml del homogenizado sobre el medio de cultivo selectivo para cada uno de los microorganismos benéficos (Anexo 1) extendiéndolo con una espátula driglaski. Se incubó de 3 a 5 días a temperatura ambiente, y se procedió al respectivo recuento de bacterias.

2.2.2.3 Caracterización Microbiológica. El objetivo principal de esta etapa es identificar los microorganismos autóctonos útiles en la producción acelerada del compost. La Metodología empleada se resume en la Figura 5.

Figura 5. Metodología de la caracterización microbiológica de la Pollinaza.



➤ **Siembra y Aislamiento de microorganismos oxigénicos de la pollinaza:** El aislamiento de los microorganismos se realizó a partir de una pila de pollinaza fresca de un galpón de la granja Avícola “La Rosita”. Se tomaron tres muestras a diferente altura de la pila de

compost cuando el proceso de compostaje alcanzó una temperatura de 36°C (etapa mesofílica 1). Posteriormente cuando el proceso alcanzó la etapa mesofílica 2, 36°C se tomaron otras tres muestras, de esta manera se aseguró obtener la mayor cantidad de microorganismos mesófilos posibles.

Se vertieron 25 gramos de la muestra homogénea de la pollinaza en 225 ml de caldo Tioglicolato, incubándose a 37°C por 48 horas; sacando dos muestras, una a las primeras 24 horas y otra a las 48 horas, para permitir un adecuado desarrollo de los microorganismos.

Luego de los respectivos periodos de incubación de las muestras se sembraron por superficie en medios de cultivo selectivos (Agar Nutritivo, Agar MacConkey, Agar Sabouraud y Agar YGC) y medio pollinaza sólido modificado al 20%. Las Bacterias se incubaron durante 24-48 horas a 37°C, y los Hongos se incubaron a 25°C durante 5 días para luego continuar con sucesivos repiques con el fin de aislar especies deseadas en el estudio.

Los medios utilizados fueron preparados con ingredientes naturales y sintéticos.⁴⁴

2.3 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS SEMBRADOS EN LOS MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES.

La Identificación de los microorganismos aislados se realizó teniendo en cuenta las características morfológicas y bioquímicas en las colonias.

- ❖ **Macroscópicamente** para las Bacterias se tuvo en cuenta: color, tamaño, forma, borde, aspecto, superficie y pigmentación; para los hongos: tipo de colonia, velocidad de crecimiento, color del micelio, forma de la colonia, pigmento difusible al medio, color del haz y del envés entre otros.

- ❖ **Microscópicamente** (Tinciones Gram. y Azul de Lactofenol). Para el caso de las bacterias se utilizó la metodología del manual Bergey's de Bacteriología determinativa (1984). La confirmación final se realizó

⁴⁴ Manual OXOID limited. Medios de cultivo ingredientes para su preparación y otros elementos de laboratorio. Cuarta edición, 1981

mediante las reacciones bioquímicas típicas comparativas dependiendo de su clasificación taxonómica. Para los hongos se utilizó el manual de Micología descriptiva, las claves de Barnett y Hunter, 1972, Samsom *et al.*, 1981; Malloch, 1997, y Rojas, 1997.

Una vez aislados e identificados los microorganismos se realizaron siembras de las cepas puras en medios líquidos y sólidos para su conservación en nevera a -70°C, con su respectiva ficha de Ingreso al Cepario del Laboratorio de Microbiología del CINBIN.

2.4 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS OXIGÉNICOS ACELERADORES.

Los criterios de selección de los microorganismos se basaron en las características fisicoquímicas del proceso de compostaje, en las características de espectro degradativo individual, y en el tipo de desechos orgánicos hacia los cuales va dirigida su actividad.

2.4.1 Selección del medio de cultivo y adaptación de los microorganismos. Con los microorganismos seleccionados se realizaron pruebas preliminares utilizando diferentes concentraciones de sustrato, para determinar en forma cualitativa en cual de ellos se observaba el mejor crecimiento. Los sustratos escogidos para las pruebas preliminares fueron: medio modificado Pollinaza 20%, 40% y 80% y Medio Nutritivo sintético.

Esta selección se hizo teniendo en cuenta su bajo costo y su alto contenido de nutrientes para los microorganismos. Se prepararon medios sólidos y líquidos en diferentes concentraciones, se esterilizó, se ajustó el pH y se sembró por duplicado cada serie de microorganismos seleccionados incubando a 30°C y 37°C por 24 horas.

El mejor medio se seleccionó analizando cualitativamente en cual de ellos se presentó el mejor crecimiento de los microorganismos tanto en medios sólidos como líquidos en las diferentes concentraciones y se comparó con el medio Nutritivo Sintético Comercial.

2.5 CURVAS DE CRECIMIENTO DE GRUPOS METABÓLICOS Y BIOAUMENTACIÓN

El cultivo por lotes o cultivo Batch se puede definir como aquel en donde no hay entrada ni salida de materia, salvo gases (O_2 , CO_2) que se suministran y retiran continuamente. En esta modalidad de cultivo se esteriliza el medio con determinada composición de nutrientes y se inocula con cierta cantidad de microorganismos, el cultivo se lleva a cabo a condiciones constantes de temperatura, aireación, etc. hasta que la multiplicación de los microorganismos cese por agotamiento de nutrientes o acumulación de productos metabólicos tóxicos.

En ésta etapa se plantea un bioproceso en Batch con biorreactores tipo Airlift a escala de Laboratorio (frascos de vidrio 500 ml) como el observado en la Figura 6. En ellos se determinan las características cinéticas de cada grupo metabólico, encontrando las mejores condiciones de temperatura, flujo de aire y agitación en el sustrato seleccionado para una mayor producción celular.

Figura 6. Bio-reactor aireado



2.5.1 Montajes y Equipos

- **Equipos de esterilización.** Se utilizaron equipos para el método de esterilización con calor húmedo y seco.

Calor Húmedo. Los medios de cultivo y las diferentes partes del montaje se esterilizaron en un autoclave eléctrico de 15 litros de capacidad y presión máxima de trabajo de 15 libras de presión (psi).

Calor seco. Para la esterilización del material de vidrio se emplearon estufas eléctricas de 200 Watts con temperatura máxima de calentamiento de 220°C.

- **Equipos de Calentamiento.** Para el calentamiento de los medios de cultivo se emplea una estufa eléctrica con controlador de temperatura.

En las curvas de crecimiento se empleó un baño termostataado (Memmert) con controlador automático de temperatura y agitación como el que se muestra en la figura 7.

- **Sistema de aireación.** Se emplearon bombas de acuario con 0.6 volúmenes de aire con mangueras de catéter estéril.
- **Agitación.** La agitación se realizó en placas magnéticas con nivel de agitación variable como el sistema mostrado en la figura 8.
- **Cuantificación de la Biomasa.** *Cámara de Neubauer.* Para efectuar conteo directo al microscopio. (Fig.9).

Espectrofotómetro de Absorción Atómica DR/200. Permite cuantificar la turbidez (%T) de los medios líquidos, la cual se relaciona con la concentración de células mediante la escala de McFarland. (Fig.10)

- **Equipo de Filtración:** empleado para filtración al vacío de la biomasa de hongos, consta de un elenmeyer de 500 ml con salida lateral conectado a una bomba de Vacío. (Fig.11).
- **Centrífuga HERMLE Z 230 A:** equipo utilizado para la centrifugación de hongos y levaduras con el fin de concentrar la mayor cantidad de biomasa de los hongos identificados para su posterior conservación y preservación. (Fig.12)

Figura 7. Baño Termostato



Figura 8. Agitación con placa



Figura 9. Cámara de Neubauer (40X)

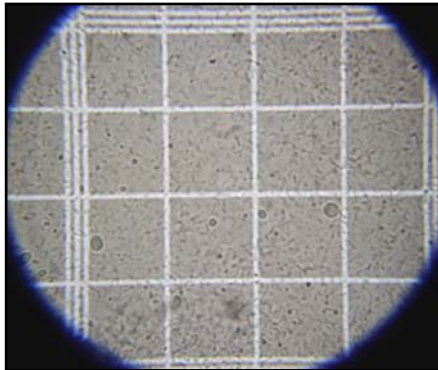


Figura 10. Espectrofotómetro



Figura 11. Filtración al vacío



Figura 12. Centrifuga



2.5.2 Ensayos preliminares. Se pretendió establecer la compatibilidad y competitividad de algunas especies entre sí, para esto, se realizaron pruebas

en medio sólido (Agar Nutritivo) para todas las combinaciones posibles de los microorganismos.

La prueba consistió en una siembra inicial abundante de la especie X a analizar en la mitad del área superficial de una caja de petri, dejándose incubar durante 24 horas, posteriormente se siembra la otra especie Y en la misma caja mediante una estría perpendicular y muy cerca de la siembra inicial, incubándose durante 48 horas a 37°C. El periodo inicial de 24 horas permite que el microorganismo X produzca una cantidad suficiente de sustancias que inhiban o favorezcan el crecimiento de la otra especie.

Las pruebas eran de compatibilidad positiva si ambas especies presentaban un buen crecimiento sin distinción entre los dos tipos de colonias, por el contrario las pruebas eran negativas si se observaba un retroceso en el crecimiento de alguna de las especies, ésta inhibición en el crecimiento podía verse de dos formas, la primera es el crecimiento de la estría ocasionando un repliegue de la siembra abundante aquí se dice que la especie Y inhibe el crecimiento de X, la segunda es el crecimiento normal de la especie X (siembra abundante), inhibiéndose totalmente la extensión de la estría, en este caso la especie X es la inhibidora del crecimiento en la otra especie.

De acuerdo a estos primeros resultados, a las especies que no presentaban indicios de inhibición entre sí se les realizó un estudio mas a fondo de crecimiento en medio líquido con el fin de determinar la factibilidad de la producción conjunta de las especies, la cual representaría ventajas en términos económicos de producción en un posible proceso a mayor escala.

En este ensayo se cultivaron juntas las especies que no representaron inhibición empleando como medio de cultivo caldo Tioglicolato modificado con pollinaza al 20%.

2.5.3 Determinación de la cinética de crecimiento. Para el caso de las Bacterias, y la Levadura las pruebas se realizaron por duplicado en frascos de 500 ml con un volumen de 350 ml de medio de cultivo, partiendo de un inóculo de $2.8 \cdot 10^8$ células para cada uno de ellos (Fig.13 y 14).

Para los hongos se realizaron pruebas por duplicado en una serie de 11 frascos de vidrio de 300 ml con un volumen de medio de cultivo de 150 ml

(Fig.15 y 16). La inoculación de estos medios se realizó simultáneamente para todos los recipientes de la serie partiendo de un inóculo de $1.0 \cdot 10^6$ esporas.

Figuras 13 y 14. Montaje para la realización de las curvas de crecimiento del pool de Bacterias.



Figuras 15 y 16. Serie de 11 frascos de 300 ml con 150 ml de medio de cultivo para las Curvas de Crecimiento del pool de hongos.

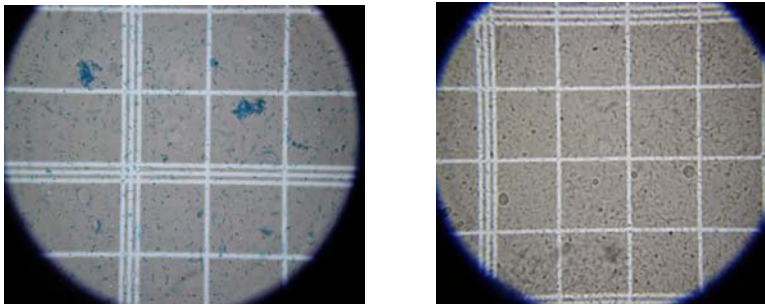


2.5.3.1 Adecuación del Medio de Cultivo. El medio de cultivo se obtuvo mediante la preparación de una solución acuosa de la pollinaza en una concentración del 20 % de pollinaza y 80% de caldo tioglicolato, se ajustó el pH con una solución de Acido Sulfúrico al 1% o Hidróxido de sodio, dependiendo si el pH es ácido o básico, obteniéndose un pH final de 7.2 para las bacterias y 6.0 para Levadura y Hongos. Seguidamente esta solución se sometió a dos esterilizaciones en la autoclave durante media hora a 15 psi cada una, con el fin de eliminar los microorganismos endosporados resistentes al calor, de esta forma garantizar la esterilidad total del medio de cultivo.

2.5.3.2 Inoculación. Se preparó un pre-inóculo de cada especie, tomando una muestra del microorganismo cultivado en medio sólido añadiéndolo al medio de cultivo líquido e incubando por 24 horas a 37°C.

En el caso de los hongos la Temperatura de incubación fué de 30°C, del preinóculo se realizaron recuentos de esporas en cámara de Neubauer (Fig.17 y 18) un ml de este preinóculo fué adicionado a un frasco de vidrio con medio de cultivo estéril para dar inicio a cada tratamiento a una aireación y temperatura determinada.

Figuras 17 y 18. Recuentos en cámara de Neubauer (40 X)



2.5.3.3 Parámetros evaluados en las curvas de crecimiento de cada grupo de microorganismos. Los parámetros que se evaluaron en las curvas de crecimiento del pool de Bacterias fueron temperatura (montajes por duplicado a 26°C y 37°C), Aireación (dos montajes con y sin aireación), y Agitación (dos montajes con y sin agitación) como se observó en las figuras 13 y 14.

Para la curva de crecimiento de los hongos se tuvo en cuenta dos temperaturas de crecimiento a 26 °C y 37°C y la Levadura solo a 26°C. Se realizaron montajes con agitación y sin agitación. (Fig. 19, 20, 21 y 22)

2.5.3.4 Cuantificación de la biomasa producida.

- ❖ **Bacterias y Levaduras:** para la cuantificación del crecimiento se empleo el método de turbidimetría, el cual permite establecer directamente el total de células en suspensión. El patrón empleado para relacionar las unidades de absorbancia con el crecimiento celular fue la escala de Mc Farland con soluciones de H₂SO₄ al 1% y BaCl₂

1% (Anexo 2). La longitud de onda empleada (λ) fue 600 nm; el blanco de comparación de turbidez se preparó con medio de cultivo modificado de pollinaza estéril.

Figura 19. Serie para curvas de Crecimiento de hongos a 26°C sin Agitación.

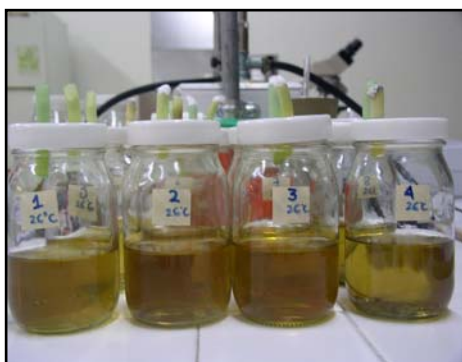


Figura 20. Serie para curvas de Crecimiento de hongos a 26°C con Agitación.



Figura 21. Serie para curvas de Crecimiento de hongos a 37°C sin Agitación.



Figura 22. Serie para curvas de Crecimiento de hongos a 37°C con Agitación.

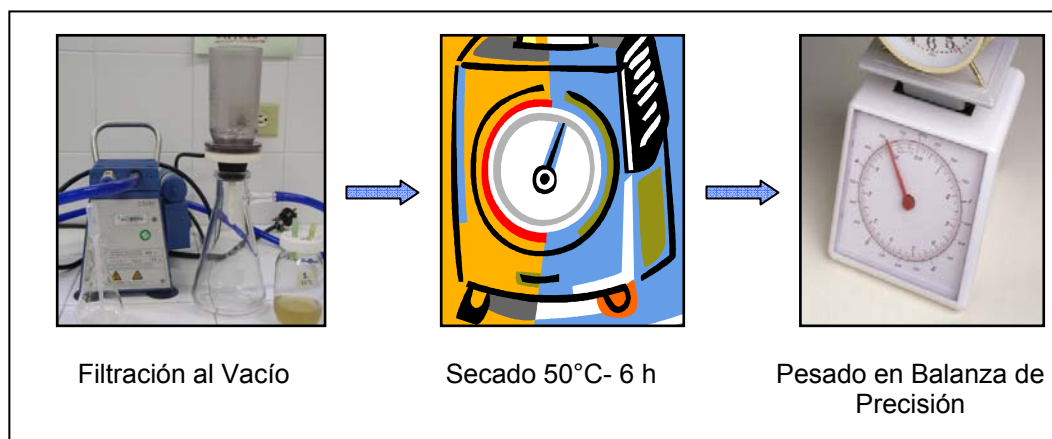


Los resultados de las curvas de crecimiento se calcularon por medio de Regresión Lineal teniendo como curva patrón la escala de McFarland y se graficaron.

- ❖ **Hongos.** La cuantificación del crecimiento se realizó por el método gravimétrico pasando el contenido de el frasco por filtros de 0.8 μ de tamaño de poro, los sólidos aquí retenidos se secaron a 50°C durante

6 horas y posteriormente se pesaron. Este procedimiento se realizó cada 12 horas, hasta obtener un peso constante de la biomasa. (Fig. 23)

Figura 23. Esquema para la cuantificación de la biomasa fúngica.



2.5.4 Aplicación sobre residuos Avícolas. Esta etapa tiene como fin evaluar el desempeño de los microorganismos y la dosificación adecuada del pool, aplicando el conglomerado microbiano en procesos de compostaje de residuos orgánicos

2.5.4.1 Determinación de la dosificación adecuada del inóculo. Al realizar una bioaumentación es necesario tener en cuenta en que proporción y cantidad se encuentran distribuidas las diferentes especies dentro del ecosistema de una pila de compostaje y hacer una adición de carga microbiana que conserve estas proporciones. De esta manera se asegura que no habrá una alteración marcada de las relaciones simbióticas de los microorganismos; que de presentarse podrían traer beneficios o perjuicios para el desarrollo del proceso del compostaje.

Para determinar la dosificación adecuada del producto se evaluó el desarrollo de dos sistemas de compostaje uno sin bioaumentación y otro con la adición de inóculo en cantidades específicas (cada uno por duplicado), en éstas pruebas no se varió la proporción de las distintas especies microbianas en el inóculo: *Bacillus* y *Bacterias Gram negativas (enterobacterias)* Oxigénicas 81%, *Pseudomonas* 1.6%, Actinomiceto 16% y Hongos 1.4%.

El criterio de dosificación del producto en cuanto a proporción de las distintas especies y cantidad de microorganismos adicionados por Kilogramo de residuo a compostar se basó en información reportada en la literatura de la composición microbiana de un compost maduro (Tabla 4) y además teniendo en cuenta el recuento de microorganismos benéficos realizado en la etapa de análisis microbiológico.

Los ensayos se realizaron a las mismas condiciones de proceso de compostaje. Una comparación de los resultados obtenidos entre los diferentes procesos permitirá determinar si la dosificación del producto es la adecuada en el proceso de aceleración del compostaje.

El sistema de compostaje empleado para las pruebas fue de pilas estáticas (Figuras 24, 25 y 26) con aireación natural, donde la ventilación se hace a través de los espacios de la masa a compostar y por un volteo mecánico cada 2 días; dichas pruebas se realizaron en cajas de madera prensada sin tapa, las cuales tenían las siguientes dimensiones ancho 60 cm, largo 30 cm. y alto 50 cm. Para un volumen aproximado de 0.9 m³ de pollinaza por cada caja de madera.

2.5.4.2 Medición de variables durante el bioproceso.

- **Temperatura:** se realizaron mediciones en los diferentes ensayos con el fin de diferenciar las etapas mesofílicas y termofílicas en el bioproceso. Estas mediciones se realizaron diariamente siendo esta una de las variables de comparación entre los procesos de compostaje.
- **pH:** se tomaron muestras de los ensayos mezclando con agua destilada y agitando hasta homogenizarlas, y se midieron en el peachímetro el registro llevado fué el promedio de dos mediciones.
- **Humedad:** éste parámetro se evaluó cualitativamente durante el proceso manteniendo constante con la adición de agua o extendiendo al sol, se estabilizó un porcentaje de humedad aproximado de 50%-60%, mediante la medición manual de su capacidad de campo.

- **Aireación:** La aireación de las pilas se realizó por medio de volteos periódicos. Estos volteos se realizaron cuando la temperatura se acercó a los 40°C o cuando la humedad excedía el 60%, normalmente se realizó dos o tres volteos por semana para asegurar un bioproceso oxigénico adecuado.
- **Grado de Madurez del compost:** el estado de madurez del compost se estimó mediante la caída final de la temperatura y la evaluación de los parámetros físicos como color, textura y olor.

Figuras 24, 25 y 26. Pilas estáticas para el compostaje de pollinaza



2.6 ANÁLISIS FÍSICO, QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL ABONO ORGÁNICO

El análisis Físico-Químico y Microbiológico del Abono Orgánico obtenido, fue realizado por el Laboratorio de Calidad Ambiental CARDIQUE y los análisis de Calidad sanitaria y Microorganismos benéficos fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología del CINBIN.

2.7 ENSAYOS DE RESPUESTA BIOLÓGICA

La evaluación de la respuesta biológica de acuerdo al grado de maduración de la materia orgánica se estableció mediante 3 bioensayos (Fig. 27) a los 60 días.

Estos consistieron en hacer germinar semillas de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en extractos acuosos de la pollinaza compostada (Abono Orgánico) como se muestra en la figura 28, la mezcla Compost-agua (40 gr/l) se dejó reposar por 30 minutos se centrifugó a 3500 rpm, se filtró en papel Whatman N° 42.

Para comparar efectos se hizo un extracto con pollinaza sin compostar (Fig. 29), se colocaron en cajas de Pétri con algodón 10 semillas, se agregó 0,5 ml del filtrado al 40%, replicando 6 veces los tratamientos y midiendo a las 48 horas el porcentaje de germinación referidos al control con agua destilada (Fig. 30), este producto se dividió entre 100 obteniéndose el índice de germinación creado por Zucconi (Ayuso *et al.*, 1992). Si el índice es ≥ 50 la maduración es adecuada⁴⁵.

Además del porcentaje de germinación se evaluó la respuesta biológica del abono en cuanto a la longitud radicular y del tallo de la plántula de tomate haciendo mediciones durante 10 días.

⁴⁵ NEGRO, M y SOLANO, M. Laboratory composting assays of de solid residue resulting from flocculation of oil mill wastewater with different lignocellulosic residues. *Compost Science and Utilization*, 1996. 4 (4), 62-71.

Figura 27. Bioensayos de Respuesta Biológica

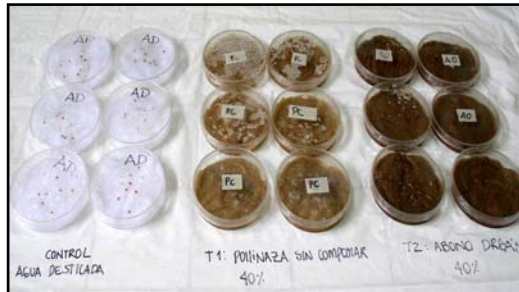


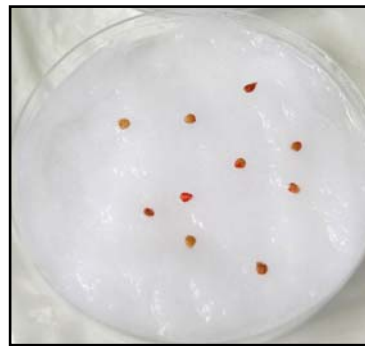
Figura 29. Semillas de tomate con Pollinaza sin compostar.



Figura 28. Semillas de Tomate con Abono Orgánico



Figura 30. Semillas de tomate con Agua destilada (control)



De acuerdo a la metodología propuesta se compararon los tratamientos utilizando ANOVAS (analysis of variance) de una vía con el programa STATISTIC 6.0. (StatSoft, 2001) tomando como variable dependiente % de Germinación y como factor los tratamientos agua destilada AD, pollinaza PC cruda y abono orgánico AO, de igual forma se realizaron ANOVAS de una vía con las variables longitud del tallo LT y longitud de la raíz LR ($\alpha: 0,05$).

Los Análisis de Varianza demuestran si existen diferencias significativas entre los tratamientos. Las hipótesis planteadas fueron: H_0 = No existen diferencias significativas entre los tres tratamientos y H_A = Existen diferencias significativas entre los tres tratamientos.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL SUSTRATO

El Análisis Físico-Químico de la Pollinaza y del Abono Orgánico realizado por el Laboratorio de Calidad Ambiental de CARDIQUE se muestra en la tabla 5. Se observa que hubo una reducción significativa de la materia orgánica de 28% lo que nos da idea de la oxidación efectuada por los microorganismos en materia orgánica.

Se observa la transformación de la pollinaza en un producto más alcalino (pH: 6,9) con una reducción en la concentración del carbono orgánico de más del 50% y con niveles de Mercurio Total por debajo de los límites establecidos en guías y normas de referencia.⁴⁶

Tabla 5. Análisis físico- químico de la pollinaza y el abono orgánico.

Parámetro	Unidades	Métodos	Pollinaza	Abono Orgánico
Cenizas	%	Calcinación	33,49	35,50
Nitrógeno	%	*S.M 4500	3,27	3,18
Potasio	g K/Kg Base Seca	Ion Selectivo	60,96	33,50
Fósforo Total	mg/Kg Base Seca	S.M 4500-P-E	2,18	2,38
Mercurio Total	mg/Kg Base Seca	S.M 3112-B	0,35	0,20
Materia orgánica	%	Gravimetría	80,40	52,57
Humedad	%	Gravimetría	45,14	46,22
Densidad Máxima	g/cc		1,110	1,11
Temperatura	°C	Temperatura	28	26,5
pH		Potenciómetro	5,8	6,9

Fuente: Laboratorio de Calidad Ambiental de la Corporación Autónoma Regional del canal de Dique. *S.M Estándar Methods Edición 20.

⁴⁶ Reglamento sobre el Manejo y Control de Gallinaza y Pollinaza N° 29145-MAG-S-MINAE , 1996.

Los porcentajes de Nitrógeno, cenizas y materia orgánica se encuentran dentro de los límites permitidos para Abonos orgánicos contenidos en la Norma Técnica Colombiana N° 1927 por la cual se adopta el reglamento técnico de fertilizantes y acondicionadores de suelos y por la norma ICONTEC 2 235 para abonos orgánicos, gallinaza y productos a base de gallinaza cuyo objetivo es establecer los requisitos que deben cumplir y los ensayos a los cuales debe someterse la gallinaza, la pollinaza y los abonos orgánicos obtenidos a partir las mismas.

3.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

3.2.1 Calidad Sanitaria. Los análisis de calidad sanitaria realizados al abono orgánico antes y después del proceso de compostaje se representan en la tabla 6, donde se puede observar que la pollinaza sin compostar tiene recuentos muy altos de coliformes totales (CT) 9×10^6 UFC/gr y coliformes fecales (CF) 3×10^6 UFC/gr por lo tanto se puede deducir que ésta pollinaza requiere un tratamiento térmico prolongado para eliminar o reducir significativamente la carga de los microorganismos patógenos y así pueda ser empleado como abono para cultivos o mejorador de suelos.

Tabla 6. Análisis de calidad sanitaria de la Pollinaza y el Abono Orgánico

Recuento	Pollinaza (UFC/gr)	Abono Orgánico (UFC/gr)
Coliformes Totales	9×10^6	23
Coliformes Fecales	3×10^6	<3
Mesófilos	3×10^4	4×10^2
Mohos y Levaduras	2×10^7	2×10^7
Salmonella	Ausencia	Ausencia
*CSR	1×10^6	Ausencia

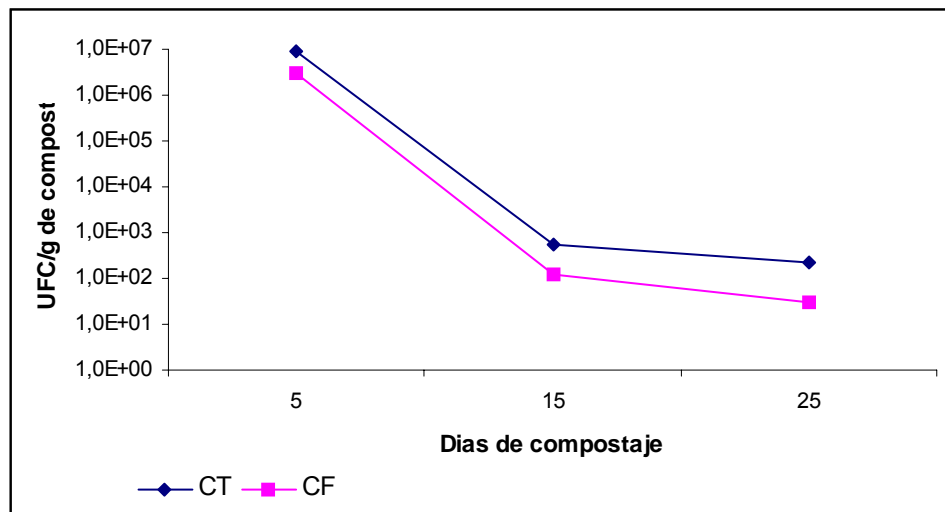
UFC/gr Unidades Formadoras de Colonias por gramo de compost.

***CSR** *Clostridio* Sulfito Reductor.

Al inicio del compostaje, la concentración de CF de la mezcla era 3×10^6 UFC/gr y de CT 9×10^6 UFC/gr y al cabo de 15 días de tratamiento disminuyeron aproximadamente 4 órdenes de magnitud (Fig.31), la disminución en el valor de este indicador, coincidió con la etapa termofílica dando como resultado para CF 1×10^2 y CT 5×10^2 .

Al final del compostaje (día 25), la concentración de CT fué de 23 UFC/gr y de CF <3 UFC/gr, lo que correspondió a una reducción superior a 2 órdenes de magnitud. Al término del proceso (compostaje + maduración), el producto presentaba una humedad de 46% y una remoción de CF de 6 órdenes. De esto se puede deducir que el abono orgánico obtenido cumple con los estándares de calidad sanitaria. La figura 31 indica el comportamiento entre los microorganismos patógenos (CT y CF) a través del tiempo de compostaje.

Figura 31. Variación de microorganismos patógenos a través del tiempo de compostaje.



La ausencia de *Salmonella* y *Clostridium* Sulfito Reductor en el abono orgánico también indica que el tratamiento térmico fué el adecuado para la reducción y eliminación de los microorganismos patógenos. Con ello se pudo comprobar que el cumplimiento de la etapa termofílica aseguró una fuerte reducción de patógenos al final del proceso, por lo cual se puede concluir que el abono orgánico es apto para ser utilizado como mejorador de suelos o biofertilizante, sin ningún riesgo de tipo sanitario.

3.2.2. Recuento de Microorganismos Benéficos. El recuento de Microorganismos Benéficos de la pollinaza sin compostar y después de compostada se representa en la Tabla 7 donde se observa que al final del proceso aumentaron los Microorganismos Benéficos. Este aumento asegura la obtención de un abono de óptima calidad que facilitará a las plantas la disponibilidad, fijación, asimilación de nitrógeno y elementos esenciales para su desarrollo, y a la vez mejora la fertilidad del suelo haciéndolo mas productivo.

Tabla 7. Recuento de Microorganismos Benéficos.

Microorganismos	Pollinaza UFC/gr*	Abono Orgánico UFC/gr
Bacterias Nitrificantes	2×10^2	3×10^4
<i>Rhizobium</i>	1×10^2	3×10^5
<i>Azotobacter</i>	-	4×10^6
<i>Streptomyces</i>	3×10^2	3×10^4
<i>Lactobacillus</i>	9×10^2	4×10^4
<i>Pseudomonas</i>	14	3×10^3

*UFC/gr Unidades Formadoras de Colonias por gramo.

En las figuras 32 a la 37 se observa el crecimiento de microorganismos benéficos en medios selectivos con su respectiva descripción macroscópica.

Figura 32. Descripción macroscópica del cultivo de Bacterias Nitrificantes.



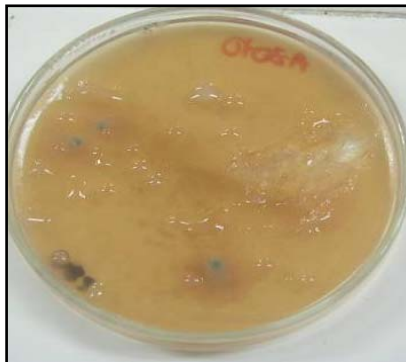
Color	Rosado
Tamaño	Mediano
Forma	Elevada convexa
Bordes	Irregulares
Aspecto	Brillante
Superficie	Lisa de consistencia Mucoide

Figura 33. Crecimiento macroscópico de *Rhizobium*. Medio LMA para *Rhizobium*



Color	Rojo oscuro en el centro
Tamaño	Pequeña
Forma	Plana
Bordes	Irregulares filamentosos
Aspecto	Opaco y mate
Superficie	Lisa de consistencia blanda

Figura 34. Crecimiento macroscópico de *Azotobacter*. Medio LMA modificado.



Color	Crema
Tamaño	Mediana
Forma	Elevada Convexa
Bordes	Irregulares lobulados
Aspecto	Brillante
Superficie	Mamelonada Mucoide

Figura 35. Crecimiento macroscópico de *Streptomyces* en Agar Caseína.



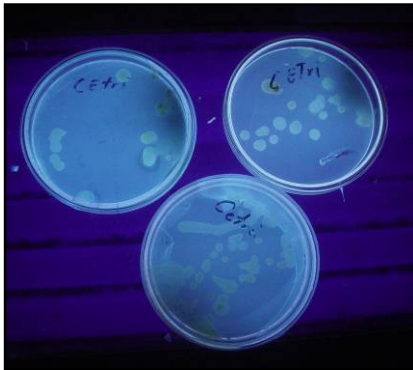
Color	Blanco lechoso
Tamaño	Pequeña
Forma	Plana
Bordes	Redondo
Aspecto	Opaco
Superficie	Lisa de consistencia blanda

Figura 36. Crecimiento macroscópico de *Lactobacillus* en Medio APT.



Color	Crema
Tamaño	Pequeña
Forma	Plana
Bordes	Irregular lobulado
Aspecto	Opaco
Superficie	Lisa de consistencia blanda

Figura 37. Crecimiento macroscópico de *Pseudomonas* en Agar Cetrimide. Luz UV.



Color	Blanco lechoso
Tamaño	Mediana
Forma	Elevada Convexa
Bordes	Irregular lobulado
Aspecto	Brillante
Superficie	Mamelonada Mucoide

3.2.3 Aislamiento e Identificación En esta fase se obtuvo una gran variedad de microorganismos entre ellos:

- ❖ **Bacterias:** Bacilos Gram positivos, Bacilos Gram negativos, Cocos Gram positivos, y Cocobacilos Gram negativos. (Tabla 8)
- ❖ **Hongos:** se encontraron especies pertenecientes a *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, *Trichoderma spp*, *Cunninghamella spp*. y Levaduras como *Saccharomyces spp*.

Las características morfológicas a nivel macro y microscópico de las bacterias Oxigénicas aisladas de la pollinaza se presentan en la tabla 9. En esta tabla se puede observar que 12 cepas pertenecen a microorganismos Gram negativos y 7 a Bacilos gram positivos.

Tabla 8. Descripción macroscópica y microscópica de las cepas aisladas de la pollinaza.

cepas	Características Microscópicas	Características Macroscópicas			
		Color	Superficie	Forma	Aspecto
cepa 1	Cocobacilos Gram negativos rectos no esporulados	Rosada	Mucoide	Plana	Brillante
cepa 2	Bacilos Gram negativos rectos no esporulados	Translúcida	Blanda	Convexa	Opaca
cepa 3	Bacilos Gram negativos rectos no esporulados	Rosada	Blanda	Plana	Brillante
cepa 4	Bacilos Gram negativos rectos no esporulados	Blanca	Blanda	Convexa	Brillante
cepa 5	cocobacilos Gram negativos curvos no esporulados	Rosada	Mucoide	Plana	Brillante
cepa 6	Bacilos Gram negativos rectos capsulados	Crema	Blanda	Convexa	Brillante
cepa 7	Bacilos Gram negativos rectos no esporulados	Rosada	Blanda	Plana	Opaca
cepa 8	coco-Bacilos Gram negativos no esporulados	Translúcida	Blanda	Convexa	Brillante
cepa 9	Cocobacilos Gram negativos no esporulados	Blanca	Blanda	Plana	Opaca
cepa 10	Bacilos Gram negativos rectos y curvos no esporulados	Rosada	Blanda	Convexa	Brillante
cepa 11	Bacilos Gram negativos levemente curvos no esporulados	Translúcida pigmento verde	Blanda	Convexa	Brillante
cepa 12	Bacilos Gram negativos rectos y curvos no esporulados	Beige	Mucoide	Convexa	Brillante
cepa 13	Bacilos Gram positivos endospora central	Blanca	Blanda mucoide	Plana	Brillante
cepa 14	Bacilos Gram positivos Endospora Terminal	Translúcida	Blanda	Convexa	Brillante
cepa 15	Bacilos Gram positivos endospora central	Amarilla	Blanda	Plana	Opaca
cepa 16	Bacilos Gram positivos endospora central	Amarilla	dura	Plana	Opaca
cepa 17	Bacilos Gram positivos filamentosos	Blanca	Dura	Plana	Opaca
cepa 18	Bacilos Gram positivos filamentosos	Crema	Mucoide	Convexa	Brillante
cepa 19	Bacilos Gram positivos filamentosos	Rosada	Mucoide	Convexa	Opaca

La evaluación del comportamiento metabólico de los primeros 9 microorganismos entéricos (cepa 1-9) mediante la valoración por pruebas bioquímicas se presentan en la tabla 9. En la tabla 10 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas de las cepas 10, 11 y 12. En la tabla 11 las pruebas bioquímicas para las cepas 13 a 16.

La identificación de los microorganismos se realizó de acuerdo con el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*^{47 48} teniendo en cuenta las pruebas bioquímicas y las características macroscópicas y microscópicas de los microorganismos.

Tabla 9. Pruebas bioquímicas de microorganismos entéricos. (Cepas 1-9).

Pruebas Bioquímicas	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9
Triple azúcar hierro (TSI)	K/K	K/A	A/A	A/A	K/A	A/A	A/A	K/K	K/K
Lisina Hierro Agar (LIA)	K/K	K/A	K/K	K/A	K/K	K/K	R/A	K/K	K/K
H ₂ S/gas en TSI	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	+++	-/+	-/-
Indol	-	-	-	(-)	-	-	+	-	-
Motilidad 37°C	+	+	+	(+)	+	-	+	+	-
Citrato	+	+	-	+	+	+	(-)	+	+
Rojo de Metilo	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Voges Proskauer 37°C	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Ureasa	d	-	-	-	-	+	+	-	-
DNAsa	+	-	-	-	-	-	d		
Reducción de Nitratos	+	-	+	(+)	+	+	+	+	-
Fenilalanina Deaminasa	-	-	-	(-)	-	-	+	-	-
Malonato	-	+	-	d	+	+	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+

K= reacción alcalina. **A**= Reacción acida. **R**= Rojo: reacción que ocurre en la superficie del medio de Lisina por la deaminación del aminoácido por el género *Proteus*. **d**= débil 1 a 3 días

⁴⁷ MADIGAN, Michael; MARTINKO, John y PARKER, Jack. Brock Biology of Microorganisms. 1997 USA.

⁴⁸ KRIEG, Noel and HOLT, John. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1y 2 William & Wilkins. Baltimore USA.

Tabla 10. Pruebas Bioquímicas de las Cepas 10, 11 y 12.

Prueba Bioquímica		Cepa 10	Cepa 11	Cepa 12
Producción de Ácido en medio Basal OF (1% de Carbohidrato)	Glucosa	+	+	+
	Fructosa	+	+	+
	Galactosa	+	-	+
	Manosa	-	+	+
	Rhamnosa	+	+	-
	Xilosa	-	+	+
	Lactosa	-	+	+
	Sacarosa	-	-	-
	Maltosa	-	-	+
	Manitol	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	
Reducción de NO ₃	+	+	-	
Gas	-	-	-	
Fenilalanina deaminasa	-	-	-	
	Úrea	+	+	+
	Almidón	-	-	-
Hidrólisis	DNA	+	+	-
Oxidasa		+	+	+
Motilidad		+	+	+

Tabla 11. Pruebas Bioquímicas de las Cepas 13, 14, 15 y 16.

Características	Cepa 13	Cepa 14	Cepa 15	Cepa 16
Motilidad	+	+	+	-
Acido	+	+	+	+
Gelatina	+	+	+	+
Gas	-	+	-	-
Acetoína	+	-	+	-
Catalasa	+	+	+	+
Hidrólisis de Almidón	+	+	+	+
Crecimiento en NaCl 7%	+	-	+	+
Hidrólisis de Caseína	+	-	+	+
Ubicación de la espora	C*	T*	C	C

C: central / T: terminal

En el anexo 3 se presenta la clasificación Taxonómica de los microorganismos oxigénicos aislados de la pollinaza.

En la tabla 12 se observa los microorganismos oxigénicos tanto Bacterias como hongos que fueron aislados e identificados de la pollinaza.

Tabla 12. Especies de microorganismos oxigénicos que fueron aislados de la pollinaza.

TIPO DE MICROORGANISMO		ESPECIE
BACTERIAS	GRAM NEGATIVAS	<i>Serratia marcescens</i> <i>Cedecea davisae</i> <i>Kluyvera cryocrescens</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Enterobacter aerógenes</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Alcaligenes denitrificans</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomona fluorescens</i> <i>Pseudomona cepacia</i>
	GRAM POSITIVAS	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus macerans</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Streptomyces griseus</i> <i>Actinomices pyogenes</i> <i>Nocardia corallina</i>
HONGOS		<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus penicilloides</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Cunninghamella achinulata</i> <i>Curvularia spp</i> <i>Trichoderma víride</i> <i>Saccharomyces cerevisae</i>

- **Características morfológicas de las cepas 17, 18 y 19:** Filogenéticamente los Actinomicetos forman una subdivisión de los organismos del dominio bacteria, diferente de los formadores de endosporas, y de los cocos gram positivos y de los bacilos esporógenos. A pesar de su gran variabilidad morfológica, los actinomicetes constituyen una unidad filogenética y la mayor parte de sus representantes tienen un porcentaje de Guanina-Citosina entre el 60 y el 70%.⁴⁹

⁴⁹ MADIGAN, *op. cit.*, p. 296

Actynomices pyogenes: Gram positivo, forma microcolonias filamentosas transitorias y se fragmentan en células corineformes, no formador de esporas, sin resistencia acido-alcohol, aerobio, fermenta glucosa, y los productos de la fermentación son principalmente acido acético y acido propiónico, no productor de gas, Indol negativo y ureasa negativa.

Nocardia corallina: Gram positivo, forma microcolonias filamentosas, los filamentos del micelio se fragmentan para formar elementos cocoidales o alargados, resistencia acido alcohol. *Nocardia corallina* generalmente se encuentra en el suelo, es aerobio obligado.

Streptomyces griseus: Gram positivo, forma colonias pequeñas, aerobio. Micelio intacto aéreo abundante y cadena larga de esporas. Son organismos principalmente del suelo.

3.3 SELECCIÓN DE GRUPOS DE MICROORGANISMOS ACELERADORES

De los microorganismos previamente aislados e identificados se seleccionaron 13 especies de bacterias y 7 especies de hongos para conformar el conglomerado de microorganismos considerando su diversidad metabólica y su acción enzimática sobre los residuos. Estas fueron:

➤ **Microorganismos aerobios facultativos Gram negativos.** Dentro de este grupo están las bacterias entéricas que comprenden un grupo filogenético relativamente homogéneo⁵⁰. Se caracteriza fenotípicamente por lo siguiente: Bacilos Gram negativos no esporulados, inmóviles o móviles por flagelación períttrica, aerobios facultativos, oxidasa negativo, con requerimientos nutritivos muy sencillos, fermentadores de azucares con diferentes productos finales.

Dos especies de enterobacterias seleccionadas para formar parte del conglomerado fueron ***Klebsiella oxytoca*** y ***Serratia marcescens*** las cuales tiene la propiedad de fijar N₂ además de producir butanodiol por el género *Serratia* y se encuentran corrientemente en el suelo y agua. En la figura 38 se observa el crecimiento macroscópico de la cepa *Klebsiella oxytoca* con una fotografía a nivel microscópico, y en la Figura 39, el crecimiento de *Serratia marcescens*.

⁵⁰ *Ibid.*, p. 298

Figura 38. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica (100X) de *Klebsiella oxytoca*.

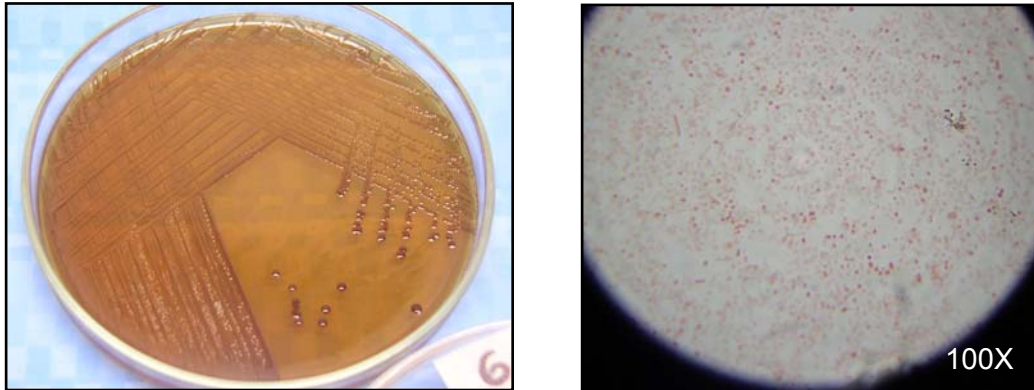
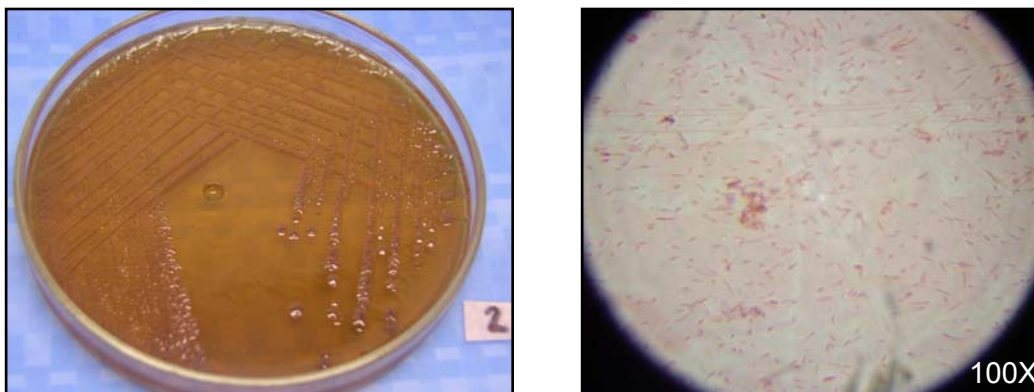


Figura 39. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica (100X) de *Serratia marcescens*



En las figuras 40, 41 y 42 se presentan fotos del crecimiento macroscópico (McK) y microscópico (100 X) de las bacterias *Enterobacter agglomerans*, *Alcaligenes denitrificans* y *Acinetobacter calcoaceticus*.

***Alcaligenes denitrificans*:** Crece quimiorganotróficamente a partir de sustratos orgánicos y de CO₂. Los microorganismos del género *Acinetobacter* se encuentran en el suelo y agua, y ocasionalmente se encuentra como parásito de algunos animales.

Figura 40. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica de *Enterobacter agglomerans*.

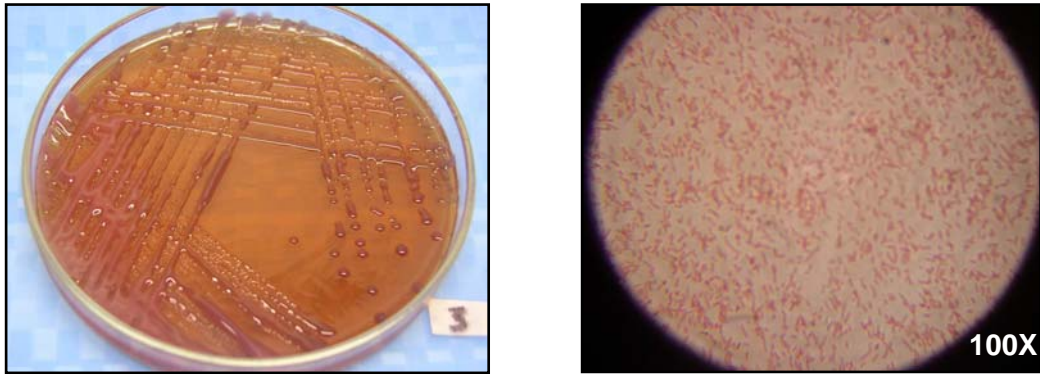


Figura 41. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica de *Alcaligenes denitrificans*.

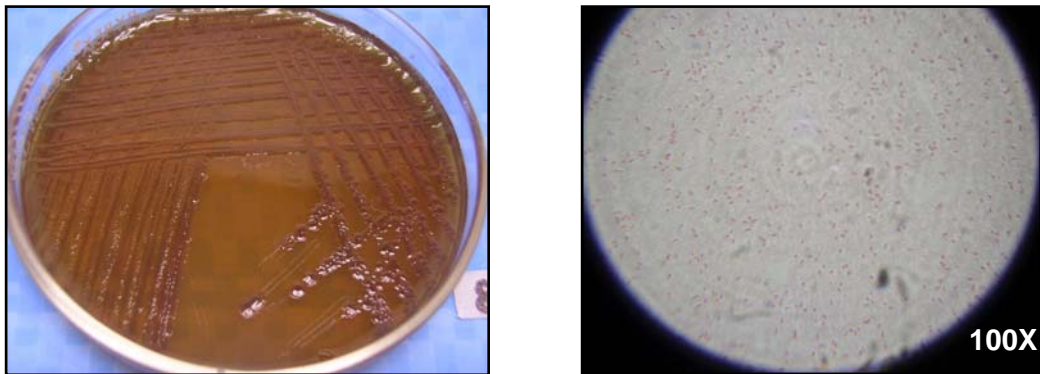
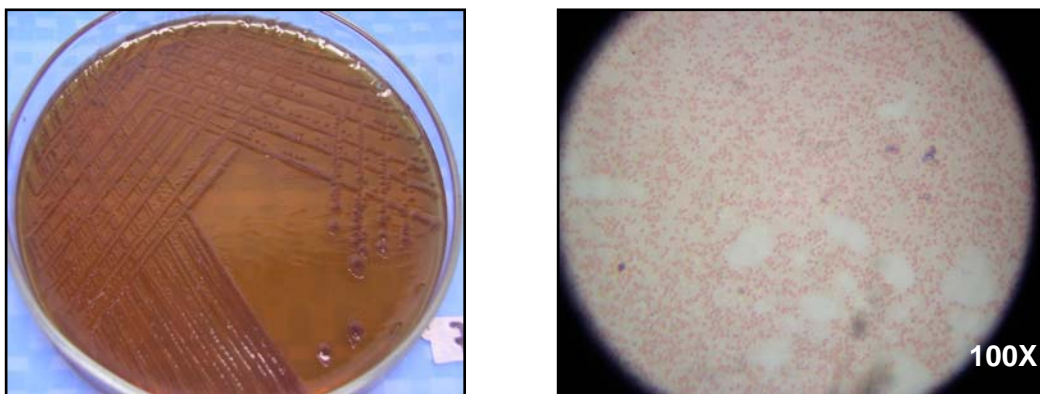


Figura 42. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica de *Acinetobacter calcoaceticus*.



Pseudomonas spp: las *Pseudomonas* son un grupo importante de bacilos gram negativos quimio-organotróficos a pH neutro, aeróbicos, mesófilos, con requerimientos nutricionales sencillos, nunca muestran metabolismo fermentativo. La ausencia de formación de gas a partir de glucosa y la oxidasa positivo son dos características distintivas con las bacterias entéricas.

Una propiedad especial de este grupo es la gran variedad de compuestos orgánicos que usa como fuente de carbono y como donadores de electrones para la producción de energía.

Pseudomonas putida: posee un metabolismo enzimático que genera oxidasa, monooxigenasa y dioxigenasa para la degradación de hidrocarburos, incluso aromáticos. (Fig. 43)

Pseudomonas fluorescens: posee enzimas como la oxidasa para degradar hidrocarburos alifáticos, y produce pigmentos fluorescentes amarillo-verde solubles en agua, sin producción de poli β hidroxibutirato (Fig. 44).

Pseudomonas cepacia: Gran versatilidad nutricional; algunas cepas son patógenas para las plantas. (Fig. 45)

Figura 43. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica de *Pseudomonas putida*.

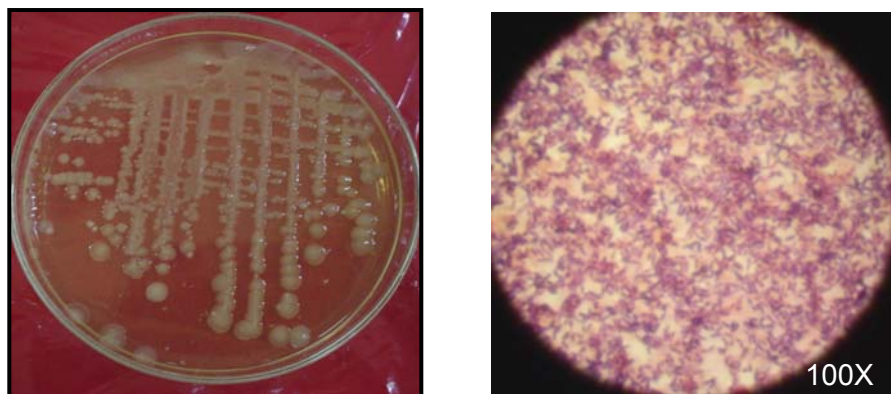
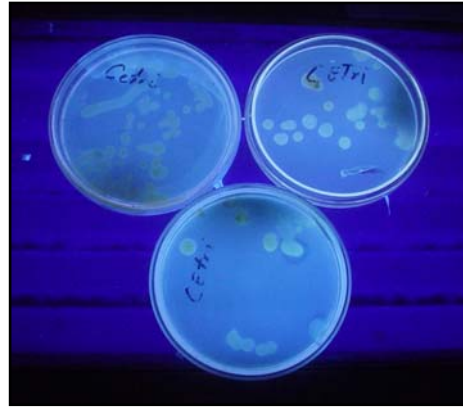


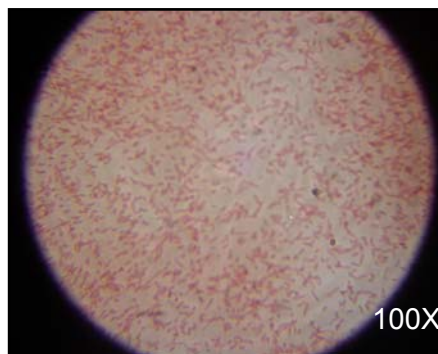
Figura 44. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica de *Pseudomonas fluorescens*.



Agar Cetrimide (Pigmento amarillo-Verdoso).



Luz Ultravioleta

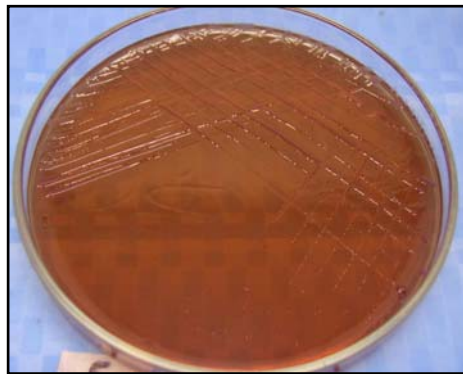


➤ **Bacillus Gram positivos formadores de endosporas:** Algunos miembros de este género producen enzimas catalasa y superóxido dismutasa, constituido por bacilos Gram positivos o gram variables, que normalmente son móviles con flagelación peritrica.

Los miembros del género *Bacillus* pueden aislarse fácilmente del suelo o de partículas de polvo en suspensión, crecen bien en medios sintéticos que contengan azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes como única fuente de carbono y amoniaco como única fuente de nitrógeno.

Muchos bacilos producen enzimas hidrolíticas extracelulares que degradan polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, los cuales son usados como fuente de carbono y donadores de electrones.

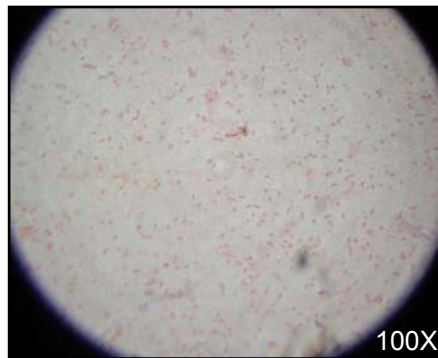
Figura 45. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica de *Pseudomonas cepacia*.



Crecimiento en Agar McK



Agar Cetrimide



Por su rápida duplicación, acción enzimática variada y mayor sinergia metabólica se seleccionaron cuatro cepas:

Bacillus subtilis: reconocido por su producción de enzimas como α -amilasa, lipasas, celulasas, lipopéptidos y enzimas proteolíticas extracelulares como ciertas proteasas neutras y alcalinas (Rehberger, 2001). (Fig. 46)

Bacillus macerans: tiene la particularidad de producir altos niveles de celulasas y peptinasas (Shigemitsu, 2000), así como la capacidad de fijar nitrógeno. (Fig. 47)

Bacillus licheniformis: similar a *B. subtilis* secreta gran cantidad de proteasas que permiten desdoblar complejos grupos proteínicos, además

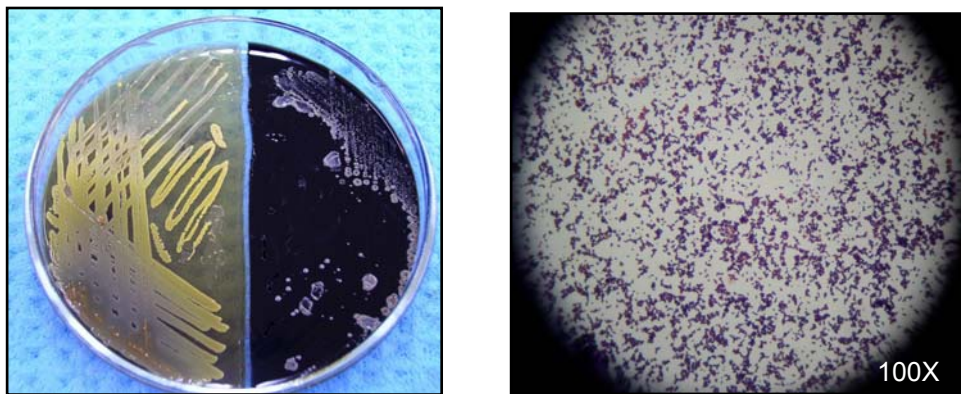
tiene amplio espectro degradativo sobre carbohidratos y pectinas. (Rehberger, 2001) (Fig. 48).

Bacillus megaterium: por su gran producción de α -amilasa, es el degradador de almidones por excelencia (Wiseman, 1989). (Fig. 47).

Figura 46. Crecimiento macroscópico de *Bacillus subtilis* en Agar Kanamicina.



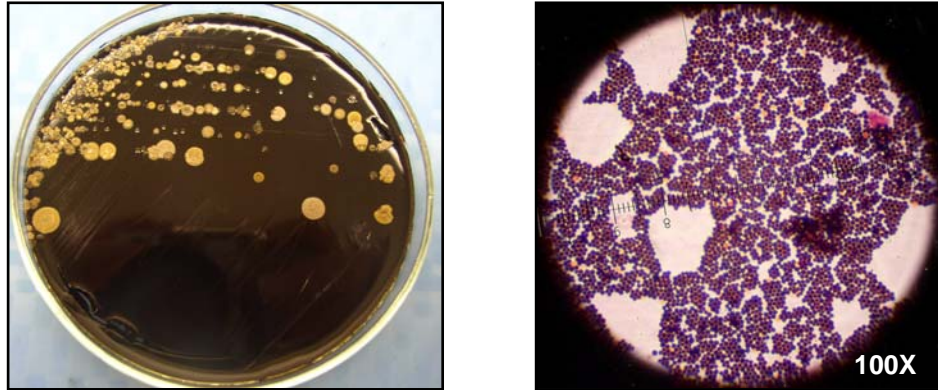
Figura 47. Crecimiento macroscópico de *Bacillus macerans* y *Bacillus megaterium* en Agar Kanamicina, Gram de *B. megaterium*.



B. megaterium *B. macerans*

Coloración Gram + *B. magaterium*

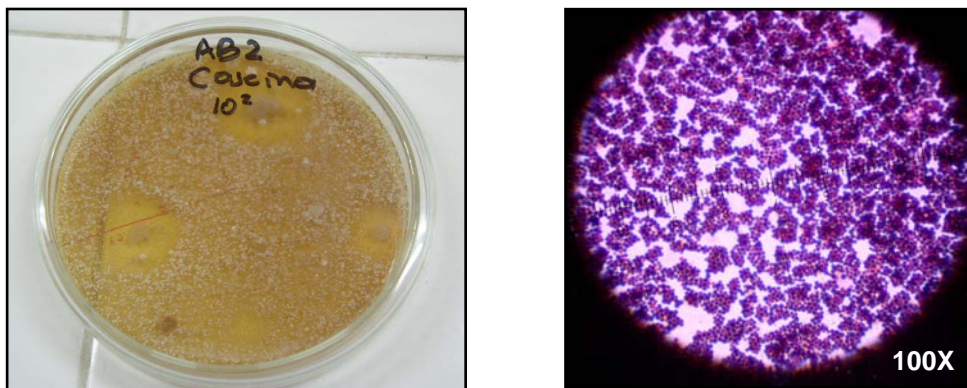
Figura 48. Crecimiento macroscópico (AK) y microscópico de *Bacillus Licheniformis*.



➤ **Actinomicetos:**

***Nocardia corallina*:** Bacilos irregulares, en pares o aislados o filamentosos ramificados. Son gram positivos o gram variables y a veces se tiñen de manera no uniforme, poseen gránulos metacromáticos. No móviles, no endosporados. Oxigénicos son eficaces en el tratamiento de residuos de degradación difícil como los lignocelulósicos, además es útil frente a compuestos aromáticos como rastros de plaguicidas y herbicidas. (Fig. 49)

Figura 49. Crecimiento macroscópico (AK) y microscópico de *Nocardia corallina*.



➤ **Hongos y Levaduras:**

***Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*:** en la tabla 13 se enumeran las características macroscópicas y microscópicas de estas dos especies de hongos Deuteromycetes.

Tabla 13. Características macroscópicas y microscópicas de *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*.

Características	<i>Aspergillus fumigatus</i> (Fresenius)	<i>Aspergillus flavus</i>
macroscópicas	<p>Colonias planas de crecimiento rápido, inicialmente de color blanco que cambia a verde claro y luego a verde oscuro, cuando están maduras toman un color verde oscuro.</p> <p>Aspecto aterciopelado o pulverulento fino. Reverso de la colonia incolora a roja.</p>	<p>Colonias de crecimiento rápido y consistencia densa, granulosa, amarillo verdosas a verde oscuras, café oliva o café.</p> <p>Reverso incoloro o de color variable.</p>
microscópicas	<p>*Cabeza conidiana: Va de verde claro a verde oscuro, su forma típica de columna a veces muy compacta.</p> <p>*Vesícula: en forma de mazo, fértil a partir de la mitad o 3/4 partes superiores.</p> <p>*Fialides o Esterigmas: una sola serie llevada directamente por la vesícula.</p> <p>*Conidióforo: corto, liso, coloreado de verde en la zona terminal.</p> <p>*Conidias: redondas o elípticas, equinuladas ligeramente rugosas.</p> <p>*Cleistotecios: no presente.</p>	<p>*Cabeza conidiana: Amarilla-verdosa claro a verde oscura.</p> <p>*Vesícula. En las especies de cabeza grande Globosa o subglobosa y en forma de mazo o de pera en las especies de cabeza pequeña.</p> <p>*Fialides: uni o biseriadas o con las dos características presentes en la misma variedad incluso en la misma vesícula.</p> <p>*Conidióforo: Hialino en general rugoso, pero puede variar de muy rugoso a liso.</p> <p>*Conidias: Elípticas inicialmente y luego globosas o subglobosas y de tamaño variable. Esclerotes: varían de color café a negro, su forma es globosa, subglobosa o alargada.</p>

Figura 50. Crecimiento macroscópico y microscópico de *Aspergillus fumigatus*.

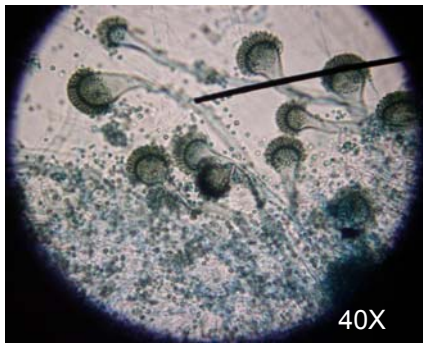
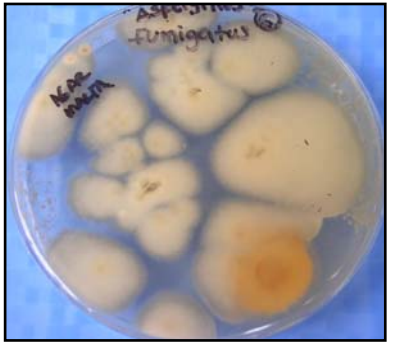
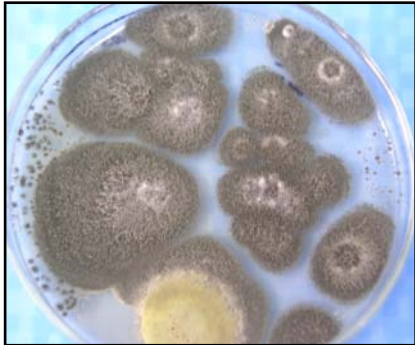
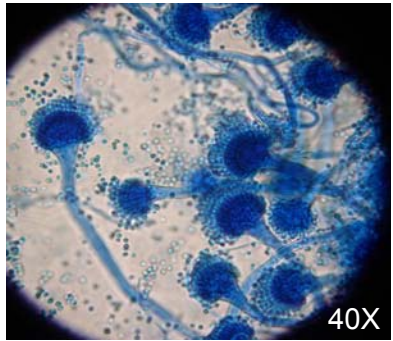
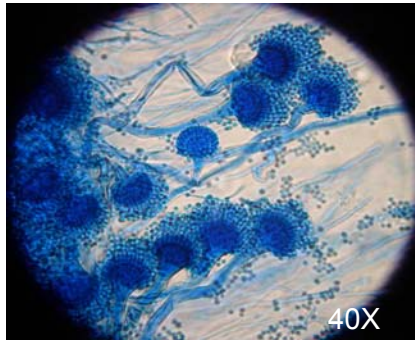
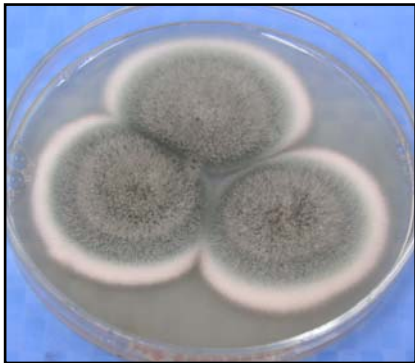
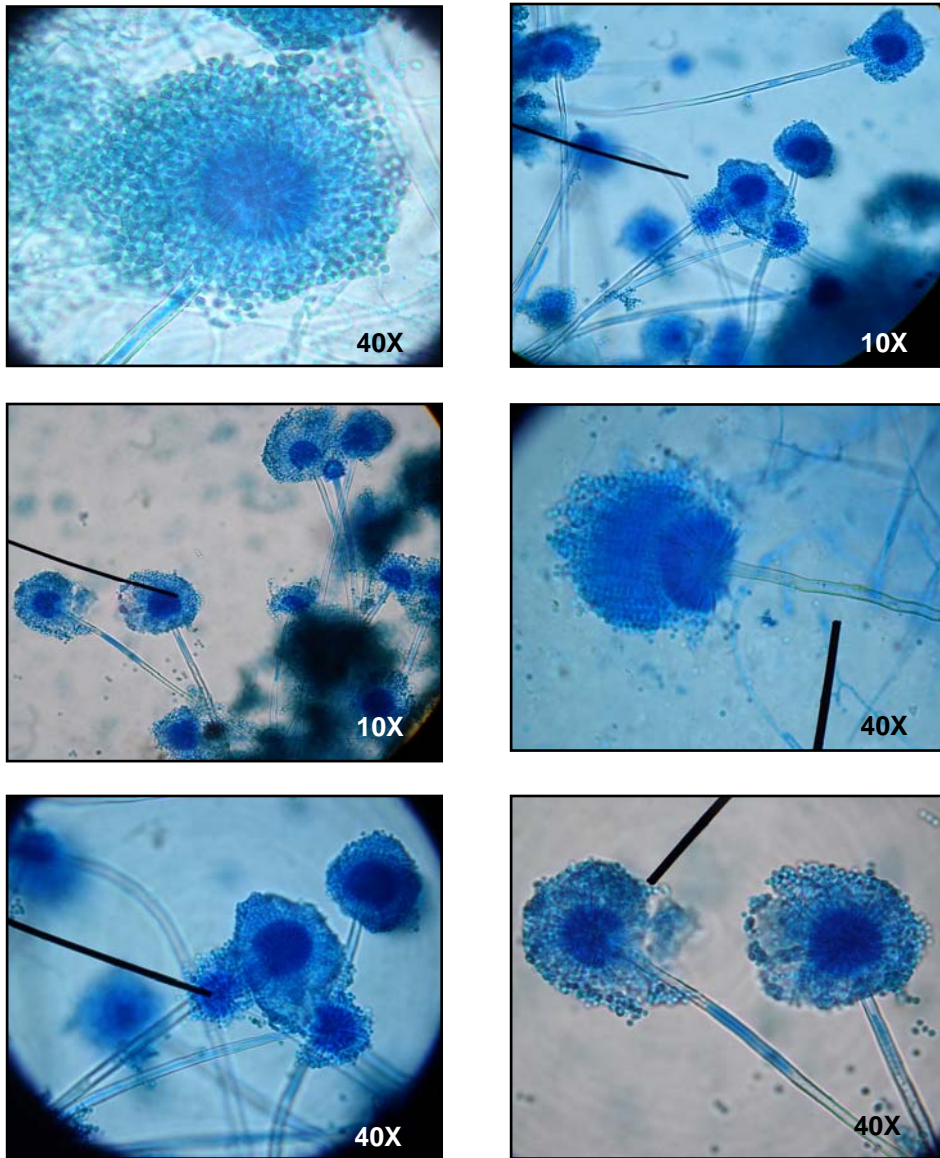
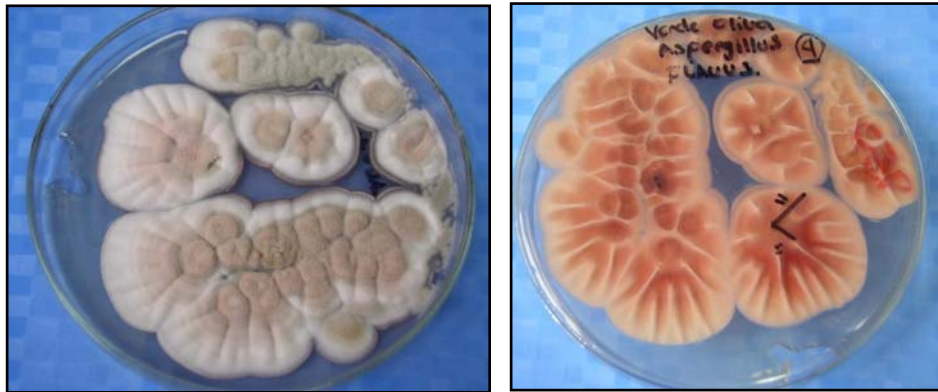


Figura 51. Características microscópicas de *Aspergillus flavus*.



Las fotos correspondientes a características macroscópicas y microscópicas de *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus* se observan en la figura 50, 51 y 52.

Figura 52. Características macroscópicas de *Aspergillus flavus*.



Agar Czapec



Agar extracto
de Malta



Agar Sabouraud



Agar YGC

***Penicillium chrysogenum* y *Cunninghamella achinulata*.** Las características macroscópicas y microscópicas⁵¹ tenidas en cuenta para la identificación de estos hongos se indican en la tabla 14 y las fotos correspondientes se observan en las figuras 53,54 y 55.

⁵¹ VELEZ, Herta. Curso avanzado de hongos oportunistas. Diagnostico de los agentes más comunes. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín.1989

Tabla 14. Características macroscópicas y microscópicas de *Penicillium chrysogenum* y *Cunninghamella achinulata*.

Características	<i>Penicillium chrysogenum</i> (Thom)	<i>Cunninghamella achinulata</i> (Thaxter)
macroscópicas	Crecimiento rápido, es inhibido por la actidiona, da colonias inicialmente vellosas por la presencia de numerosos conidióforos que salen en forma paralela, el borde de la colonia es blanco y corresponden a la parte mas joven del micelio.	Micelio blanco algodonoso de más o menos 1,5 cms de espesor. Crece rápidamente en medios sin actidiona o muy inhibida en medios con ella.
	El micelio vegetativo es incoloro, a medida que empieza a esporular toma color verde- azul muy característico, la mayoría de las veces con reverso amarillo intenso.	Las colonias inician blancas y con el tiempo cambian a grises, el reverso es incoloro.
	Difunde el pigmento en agar, exuda pequeñas gotas de agua color amarillo.	Temperatura optima 26°C y máxima de 37-40 °C.
microscópicas	Los conidióforos son hialinos de pared lisa, salen directamente de las hifas vegetativas, puede llevar solo métulas o ramificarse a partir del mismo conidióforo en forma divergente.	El micelio vegetativo es hialino con algunos rizoides y clamidoconidias intercalares. Los esporangióforos son largos simples o ramificados y lisos.
	Cada métula lleva de 4 a 7 fialides en forma de ánforas cortas. Las conidias forman cadenas largas y son subglobosas o elipsoidales de pared lisa.	El esporangio esférico u ovoide mide 20 y 60 µm de diámetro. Las esporangiolas están implantadas en pequeños esterigmas dando la apariencia de macetas, son esféricas u ovoides y miden entre 11 y 14 µm de largo las esporangiolas son ornamentadas por espinas muy finas (Fig. 55) que se pierden cuando el hongo envejece.
Hábitat	Cosmopolita frecuente en el suelo. Productor de Penicilina en pequeña cantidad.	Se ha aislado en diferentes países aunque no esta extremadamente diseminado, se aísla del suelo, del aire y de diferentes plantas.

Figura 53. Características macroscópicas y microscópicas de *Penicillium chrysogenum*.

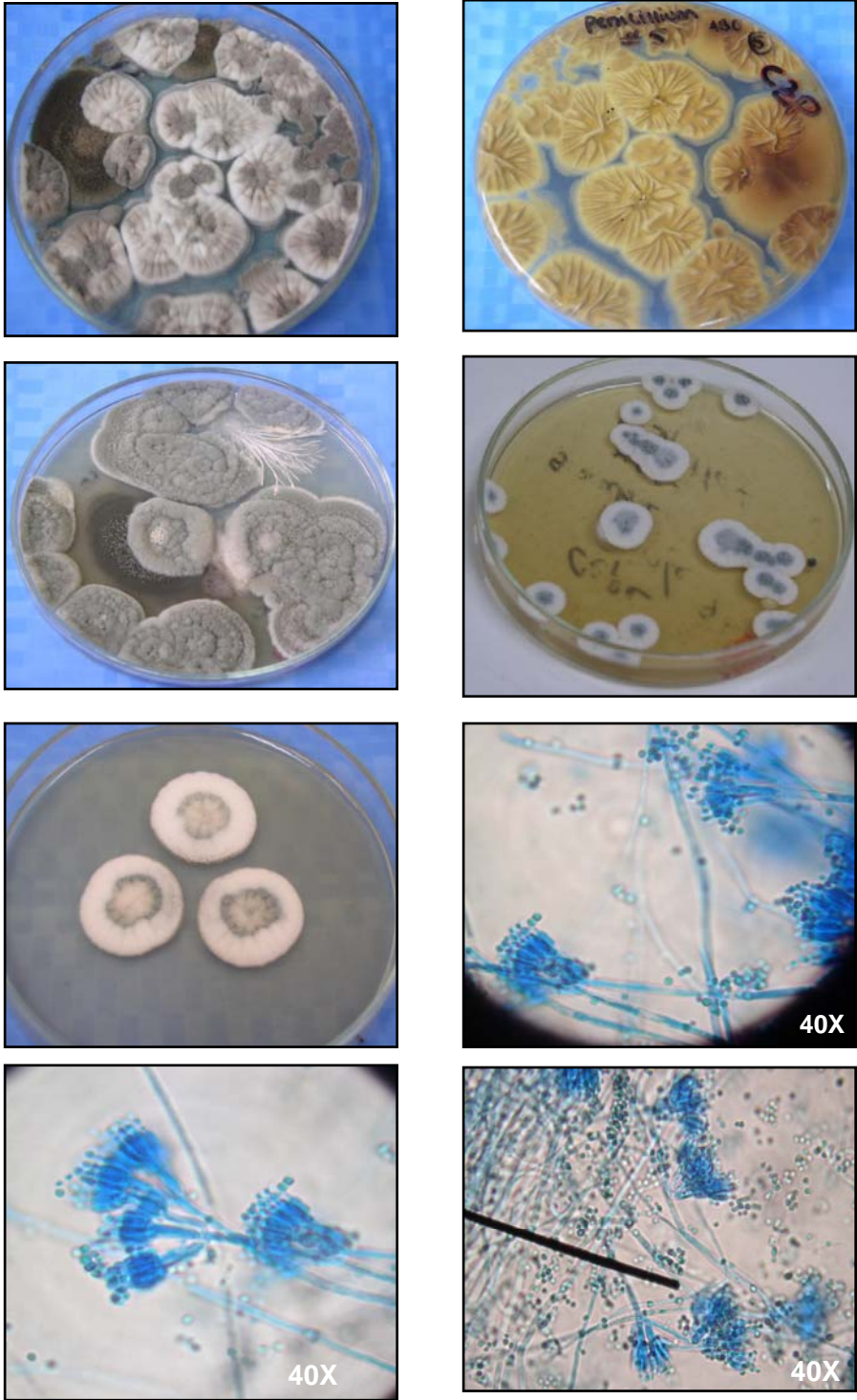
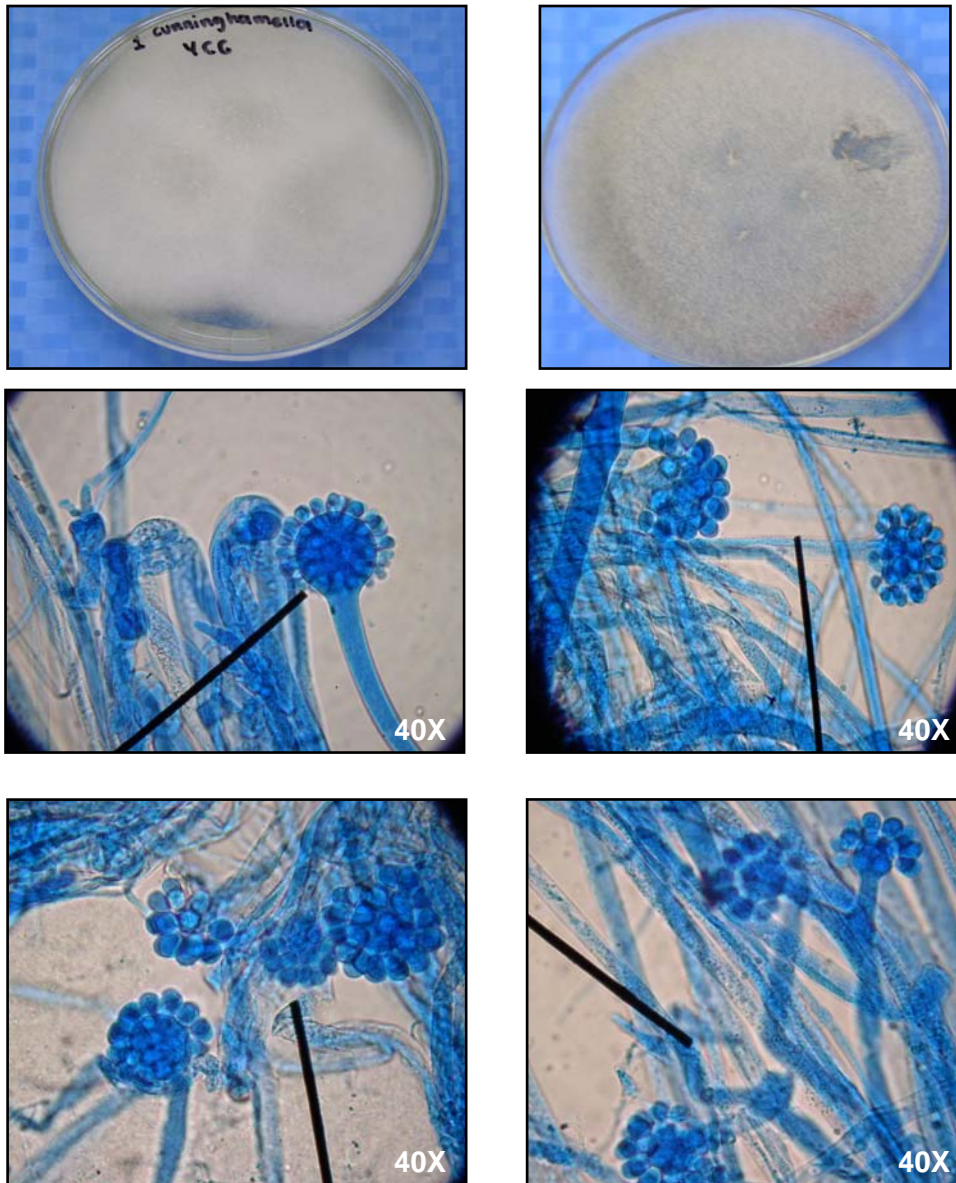
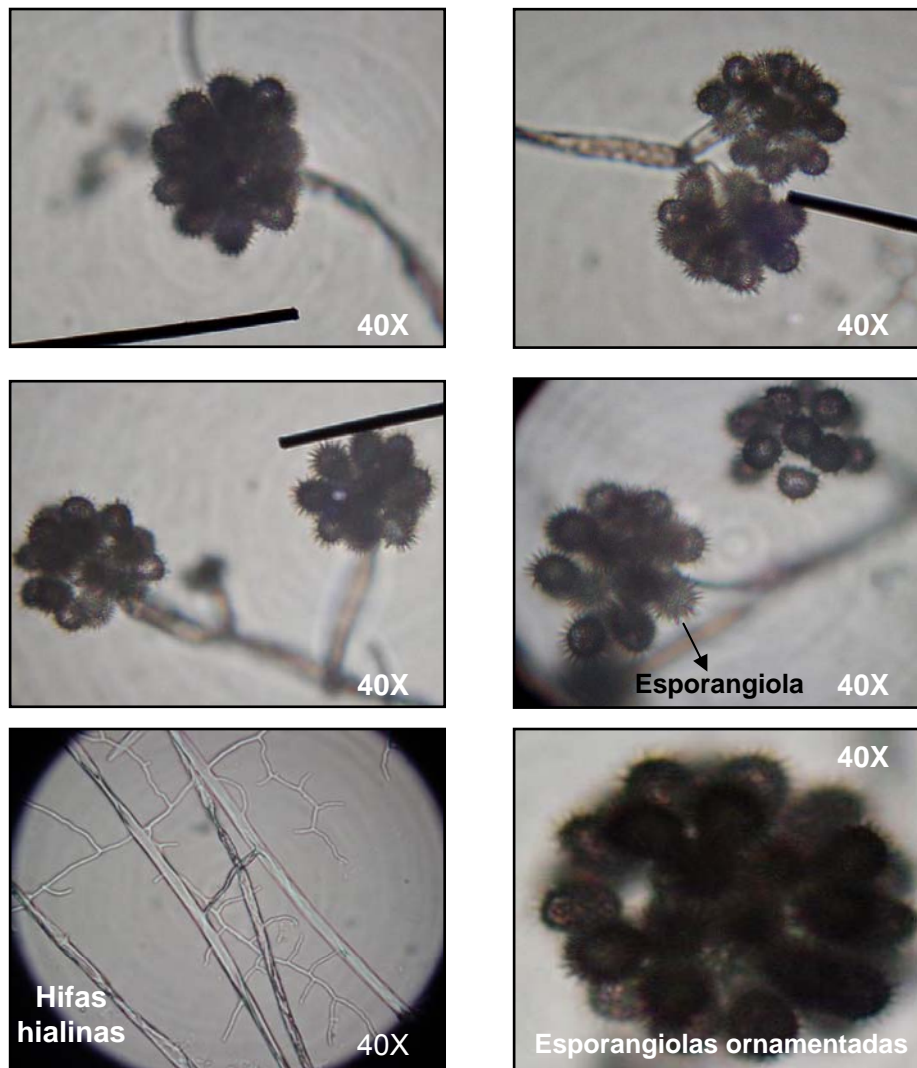


Figura 54. Características macroscópicas y microscópicas de *Cunninghamella achinulata*



En la figura 55 se muestran las características microscópicas de *Cunninghamella achinulata*, fotos tomadas de microcultivo sin colorante (Azul de lactofenol) donde se observan las esporangias ornamentadas con espinas y una foto de las hifas hialinas.

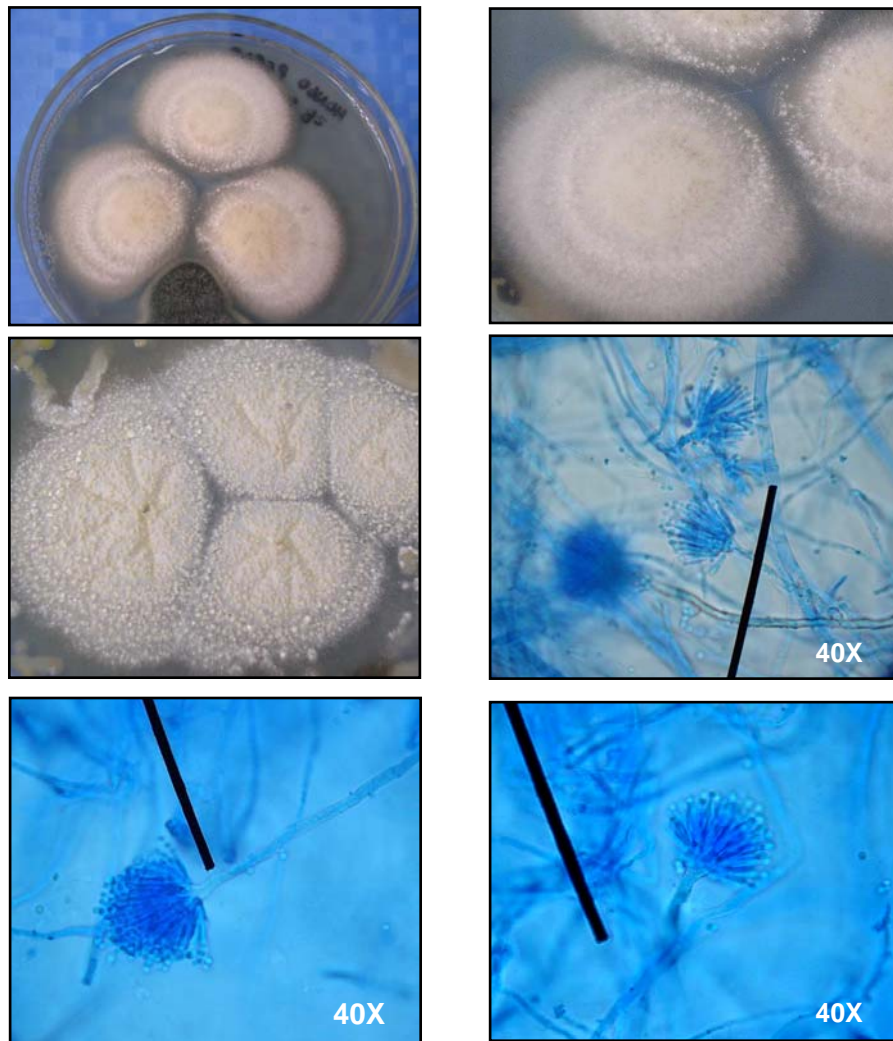
Figura 55. Características microscópicas de *Cunninghamella achinulata*



***Aspergillus penicillioides*:** presenta hifas septadas, micelio coriáceo duro, color crema con pequeñas excrescencias redondeadas duras, posee cuerpo fructífero representado por una vesícula globosa y una serie de esterigmatas. En la figura 56 se observa características del crecimiento macroscópico en Agar Extracto de Malta (MEA) y microfotografías.

Es de gran importancia económica por que producen sustancias químicas, tipo ácidos orgánicos como el cítrico, degradaciones de desechos lignocelulósicos, producen enzimas, lipasas, proteasas y antibióticos.

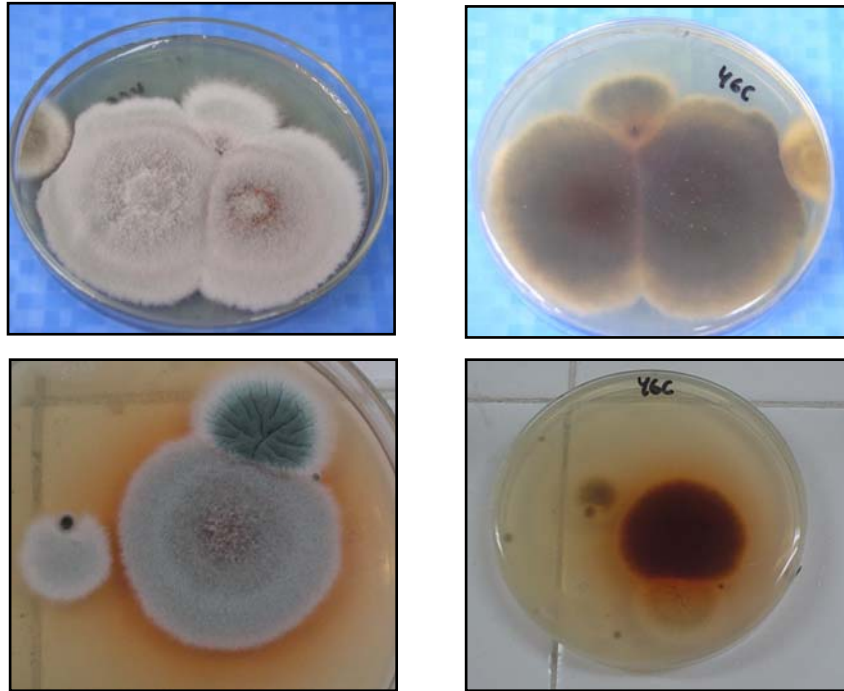
Figura 56. Características del crecimiento macroscópico y microscópico de *Aspergillus penicillioides*



Curvularia spp: pertenece a la familia Dematiaceae presenta colonias de micelio algodonoso al principio blanco y luego negro. El envés de la colonia es negro, algunas veces presentan pigmentos de colores, las hifas son septadas y oscuras, producen macroconidias curvas con célula central mas ancha, sueltas y de color café. Presentan amplia distribución ambiental.

En la figura 57 se observa el crecimiento macroscópico de la colonia por el haz y el envés, puede notarse la producción de un pigmento rojo que se difunde en el medio.

Figura 57. Características del crecimiento macroscópico de *Curvularia spp.*



***Trichoderma viride*:** Es un Deuteromiceto perteneciente al grupo de los Hifomicetos, y se caracteriza porque se desarrolla rápidamente y emite gran cantidad de esporas verdes. Se encuentra comúnmente en el suelo cuando se cultivan produce colonias planas aterciopeladas blancas, amarillas, y grises. Es usado en producción comercial de la enzima celulasa. Efectivo en residuos con altos niveles de material celulosa, además es poderoso agente contra hongos patógenos de importancia agrícola. Por ser un hongo del suelo es muy activo en procesos de amonificación. En la figura 58 se muestra el crecimiento típico del hongo en Agar extracto de Malta.

***Saccharomyces cerevisiae*:** Levadura que presenta predominantemente talo unicelular, se reproduce por gemación o brotes, produce colonias blancas-beige de consistencia mucoide. Posee la capacidad de actuar en sustratos con concentraciones elevadas de polisacáridos y buena acción sobre compuestos lignocelulósicos (Banguart, 1981). Además apoya la actividad metabólica de aquellos microorganismos que requieren vitaminas adicionales para el crecimiento y otras funciones metabólicas. En la figura 59 se observa el crecimiento macroscópico de la colonia de levaduras en Agar Extracto de malta.

Figura 58. Características del crecimiento macroscópico y microscópico de *Trichoderma viride*.

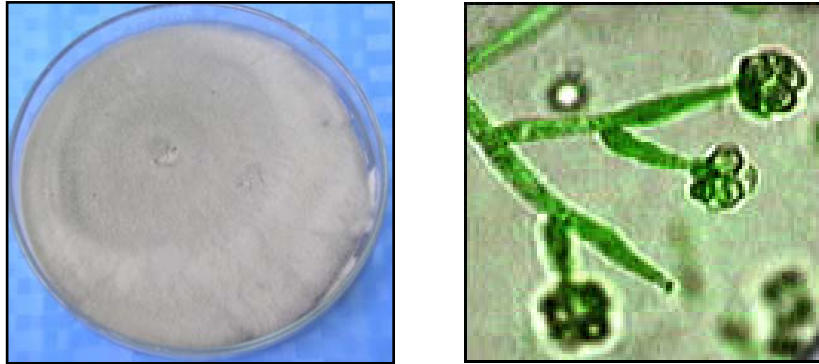
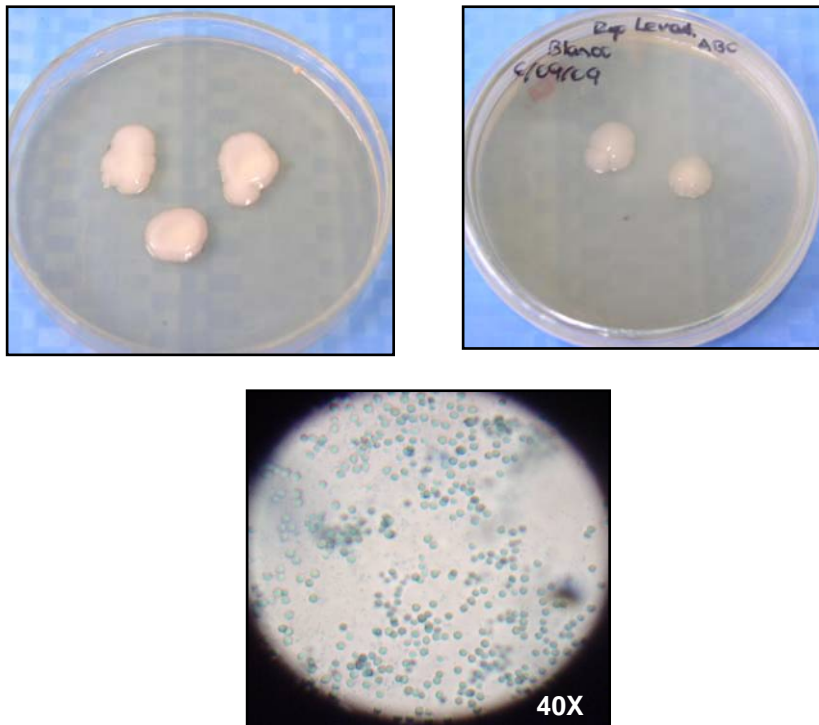


Figura 59. Características del crecimiento macroscópico y microscópico de *Saccharomyces cerevisiae*.



3.3.1 Selección del medio de cultivo y adaptación de los microorganismos. Como se puede observar en los resultados reportados en la tabla 15, el mejor crecimiento microbiano se presentó en el medio pollinaza modificado 80%. Este fue seleccionado como medio de cultivo para la producción de los microorganismos debido a que contiene mayor porcentaje del sustrato del cual fueron aislados, hecho que se refleja en su mayor crecimiento y adaptación (debido a memoria metabólica).

Luego de realizado el análisis cualitativo de crecimiento de cada una de las especies, se logró su adaptación en el medio modificado seleccionado con una concentración de pollinaza del 80%.

Tabla 15. Crecimiento cualitativo de las especies en diferentes sustratos.

Especie	Pollinaza 20%	Pollinaza 40%	Pollinaza 80%	Agar Nutritivo
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	++	+
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	+	+	+	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	+	++	++
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	++	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	+	+
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	-	-	-	+
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	-	++	+
<i>Pseudomonas putida</i>	-	+	-	+
<i>Pseudomona fluorescens</i>	+	++	++	++
<i>Pseudomona cepacia</i>	+	-	++	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	+	+
<i>Bacillus macerans</i>	+	-	+	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	+	-	+	++
<i>Bacillus megaterium</i>	+	+	+	+
<i>Streptomyces griseus</i>	-	-	+	+
<i>Actynomices pyogenes</i>	-	-	++	+
<i>Nocardia corallina</i>	+	+	++	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	+	+
<i>Aspergillus penicilloides</i>	-	-	++	+
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	+	+	-
<i>Cunninghamella achinulata</i>	+	++	+	+
<i>Curvularia spp</i>	-	+	++	+
<i>Trichoderma víride</i>	+	++	++	-
<i>Saccharomyces cerevisae</i>	+	++	++	+

(-): crecimiento escaso/no crecimiento. (+): crecimiento. (++): crecimiento abundante

3.4 CURVAS DE CRECIMIENTO DE GRUPOS METABÓLICOS Y BIOAUMENTACIÓN.

3.4.1 Pruebas preliminares. Según la tabla de análisis cualitativos de compatibilidad y competitividad entre especies que se observa en el Anexo 4; de las 27 cepas aisladas, presentaron antibiosis la cepa 2 y la cepa 7 las cuales corresponden según la tabla de clasificación taxonómica de los microorganismos (anexo 3) a *Cedecea davisae* y *Proteus vulgaris* razón por la cual estos dos microorganismos no fueron incluidos en el conglomerado donde se bioaumentaron. Las otras especies coexistieron sin presentar antibiosis.

Estos resultados permitieron proseguir con el estudio de cinética de crecimiento de grupos metabólicos permitiendo establecer la cuantificación del crecimiento celular.

3.4.2. Determinación de la cinética de crecimiento.

Cinética de crecimiento para el grupo de bacterias aceleradoras: Según los datos del crecimiento de bacterias con diferentes parámetros de temperatura, aireación y agitación (anexo 5) se puede observar que el mayor crecimiento del grupo de bacterias se presentó en el ensayo realizado a 26°C con aireación constante (Fig. 60) obteniéndose una concentración celular de $1,32 \times 10^8$ cél/ml en un tiempo de 24 horas, comparado con el ensayo a 37°C el cual alcanzó el máximo crecimiento en 22 horas pero obteniendo un menor crecimiento de microorganismos ($0,74 \times 10^8$ cél/ml).

En los ensayos con agitación y sin agitación a 26°C (Fig. 61) se observa que este fue un parámetro importante para el mayor crecimiento de los microorganismos, obteniéndose una concentración celular de $1,24 \times 10^8$ cél/ml, en el ensayo con agitación, igualmente se obtuvo mayor densidad celular en el ensayo a 26°C que con el ensayo agitado a 37°C. ($0,63 \times 10^8$ cél/ml).

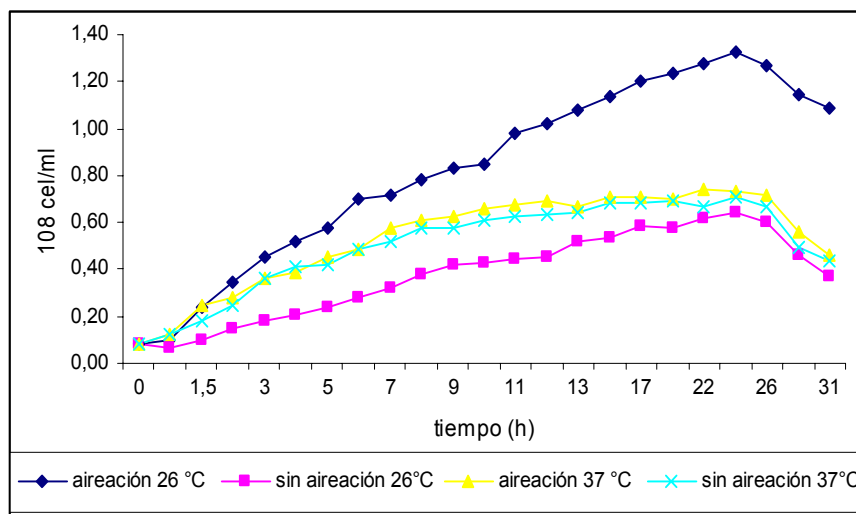
Con respecto al ensayo sin agitación el crecimiento fue mayor a 37°C con una densidad celular de $0,65 \times 10^8$ cél/ml alcanzando la fase estacionaria de crecimiento a las 19 horas comparado con $0,57 \times 10^8$ cél/ml obtenido en el ensayo a 26°C en 24 horas. (Fig. 61).

En la figura 62, se representan los datos y las curvas de crecimiento del grupo bacteriano con los parámetros evaluados de temperatura, aireación y agitación, de aquí podemos concluir que las mejores condiciones fueron logradas a 26°C con aireación y agitación constante.

En la curva de crecimiento con aireación se alcanzó la fase de adaptación en menor tiempo comparada con los otros ensayos, esto representa una ventaja, pues los microorganismos se adaptan mas rápido al sustrato ahorrando tiempo y dinero en pruebas a gran escala.

Contrario a lo que se reporta en la literatura en este ensayo la mayor temperatura no fue el parámetro determinante para obtener mayor producción de bacterias. Probablemente la temperatura aceleró el metabolismo de los microorganismos provocando el agotamiento de los nutrientes mas rápidamente en el ensayo sin agitación, haciendo que este parámetro junto con la aireación no fueran relevantes para el crecimiento a 37°C.

Figura 60. Curva de crecimiento del grupo bacteriano con aireación y sin aireación a 26 y 37°C.



A pesar de que el ensayo con aireación a 26°C empleó dos horas mas (24 h) para alcanzar la fase estacionaria que el ensayo sin agitación a 37°C, se obtuvo un mayor numero de células en éste, hecho que es muy importante ya que el objetivo es lograr es una bioaumentación mayor de

microorganismos, para ser adicionados al sustrato a compostar en el menor tiempo y la diferencia de tiempo entre estos tratamientos no es muy grande.

Figura 61. Curva de crecimiento del grupo bacteriano con agitación y sin agitación a 26 y 37°C.

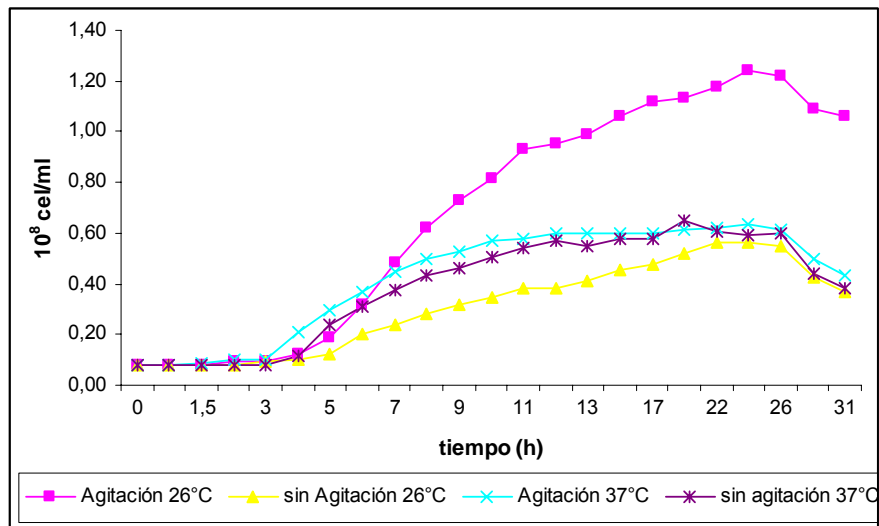
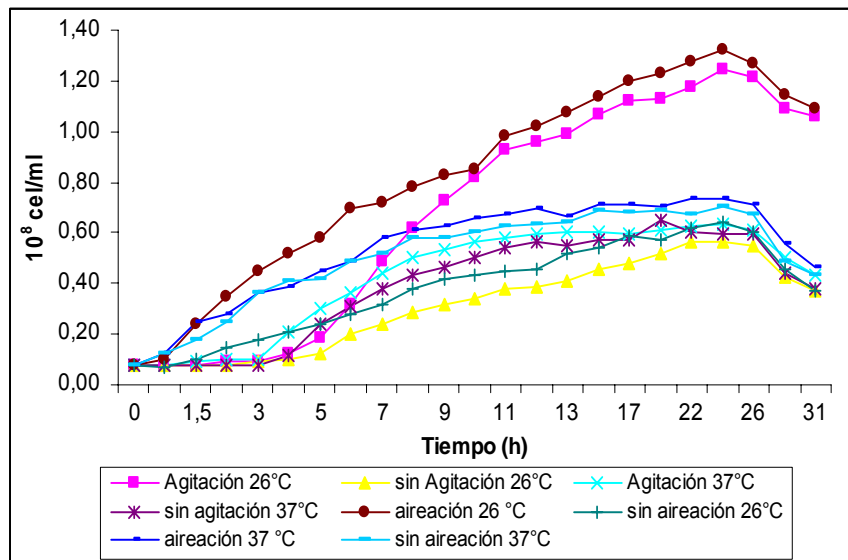


Figura 62. Curva de crecimiento del grupo bacteriano con diferentes parámetros de temperatura aireación y agitación.



Parámetro	Número de generaciones	Tiempo (h) de generación
agitación 26°C	4	6,07
sin Agitación 26°C	3	8,50
agitación 37°C	3	8,05
sin agitación 37°C	3	6,29
aireación 26 °C	4	5,43
sin aireación 26°C	3	8,00
aireación 37 °C	3	6,86
sin aireación 37°C	3	7,64

Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*: la curva de crecimiento de la levadura *saccharomyces cerevisiae* con agitación y sin agitación se observa en la figura 63 y los datos del crecimiento se indican en la tabla 16, en ellas podemos observar que el máximo crecimiento de la levadura (2.22×10^2 cél/ml) se presentó a las 12 horas con agitación a temperatura ambiente.

Figura 63. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* con y sin agitación.

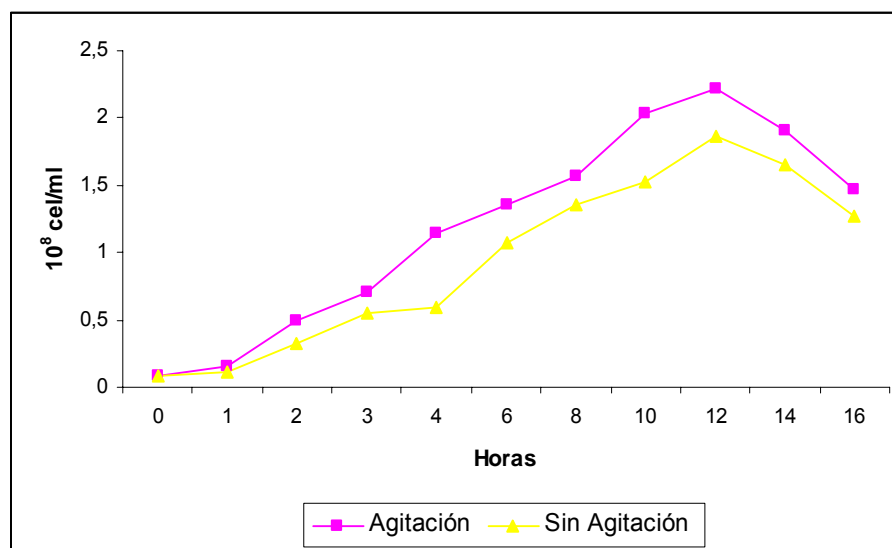


Tabla 16. Datos del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* con y sin agitación.

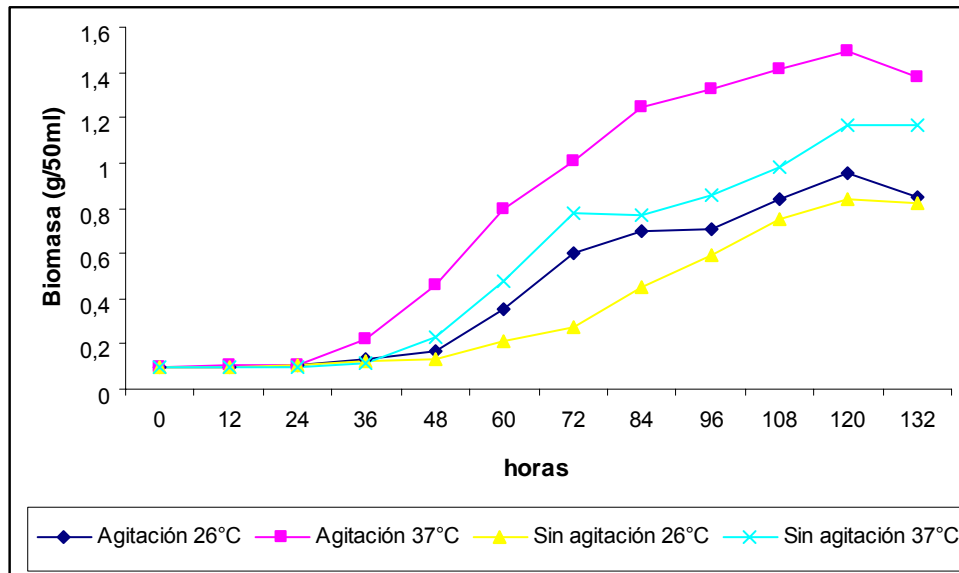
Tiempo	Agitación	Sin Agitación
0	0,08	0,08
1	0,15	0,11
2	0,50	0,33
3	0,70	0,55
4	1,14	0,60
6	1,35	1,08
8	1,57	1,35
10	2,03	1,52
12	2,22	1,86
14	1,90	1,65
16	1,47	1,27

Cinética de crecimiento para el grupo de Hongos aceleradores: en la Tabla 17, podemos observar el crecimiento del grupo de hongos aceleradores aislados de la pollinaza y bioaumentados a diferentes temperaturas y niveles de agitación mecánica. La curva de crecimiento que presentó la mayor cantidad de biomasa fue la realizada con agitación a 37°C, en la que se alcanzó un crecimiento máximo (fase estacionaria) de 1,494 g/50ml, en un tiempo de 120 horas. Como se observa en la figura 64, se puede deducir que trabajando con una temperatura de 37°C hay un incremento notable del crecimiento cuando se realiza con agitación.

Tabla 17. Datos del crecimiento de Hongos a 26 y 37°C, con y sin agitación mecánica.

Tiempo (h)	Agitación 26°C (g/50ml)	Agitación 37°C (g/50ml)	Sin agitación 26°C(g/50ml)	Sin agitación 37°C(g/50ml)
0	0,093	0,093	0,093	0,093
12	0,097	0,102	0,096	0,098
24	0,104	0,105	0,102	0,101
36	0,135	0,221	0,123	0,118
48	0,168	0,459	0,135	0,232
60	0,358	0,798	0,216	0,479
72	0,6	1,008	0,278	0,778
84	0,698	1,246	0,451	0,772
96	0,705	1,325	0,592	0,854
108	0,841	1,414	0,752	0,982
120	0,954	1,494	0,84	1,169
132	0,851	1,379	0,823	1,163

Figura 64. Efecto de la agitación en el crecimiento de Hongos oxigénicos.



3.5 APLICACIÓN SOBRE RESIDUOS AVÍCOLAS

3.5.1 Desempeño de los microorganismos: Uno de los principales objetivos de la bioaumentación es incrementar la actividad metabólica sobre los residuos para obtener un producto más higiénico en menor tiempo. La eficiencia del inóculo se puede observar al comparar los valores de temperaturas obtenidas entre la pollinaza compostada de forma natural y la pollinaza con microorganismos aceleradores durante la etapa termofílica de cada ensayo. (Tabla 18).

Al comparar la curva de temperatura de compostaje bioaumentado con la del compostaje natural (Fig. 65) se puede observar que este alcanza su temperatura máxima de 72°C en el día 8^{vo} del tratamiento, mientras que en el compostaje natural la etapa termofílica llegó a su máximo el día 20^{vo} con una temperatura de 64°C.

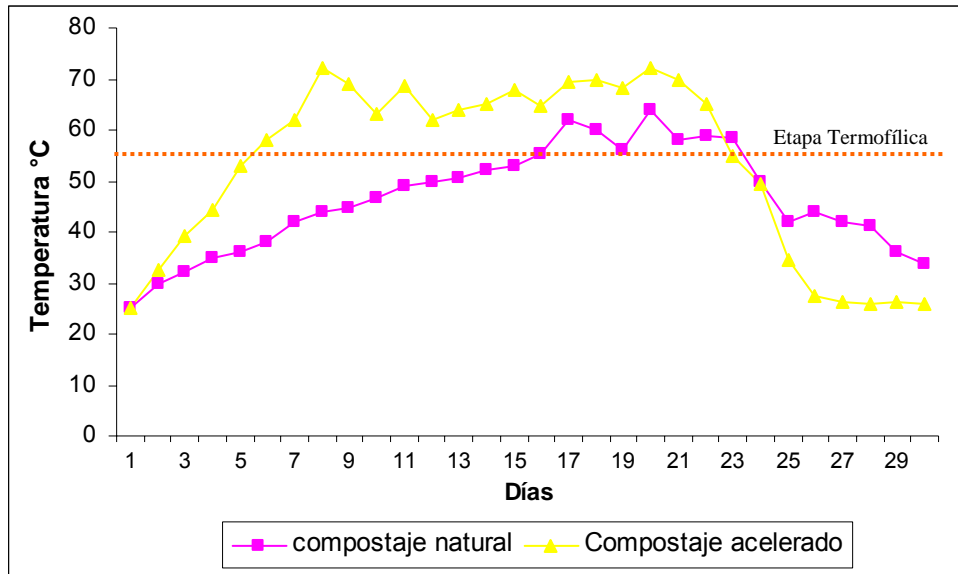
Como se observa en la figura 65, el ensayo de compostaje natural alcanza la etapa termofílica el día 16 y se estabiliza por 7 días, hasta llegar a la etapa mesofílica el día 23. La duración de la etapa termofílica en el compostaje bioaumentado fue 10 días más prolongada que en el compostaje natural (desde el día 6 al 23).

Al final del proceso se obtuvo un abono libre de microorganismos patógenos debido al prolongado periodo de exposición de la pollinaza a altas temperaturas el cual asegura la eliminación total de los microorganismos patógenos, según lo recomendado por Tchobanoglous G, 1997, el cual hace referencia que para sanear los residuos orgánicos es necesario exponerlos a altas temperaturas un tiempo superior a 5 días.

Tabla 18. Datos promedios de temperatura y pH del compostaje natural y acelerado de la pollinaza.

Días	Temperatura °C		pH	
	compostaje natural	Compostaje acelerado	compostaje natural	Compostaje acelerado
1	25,0	25,0	5,8	5,4
2	30,0	32,5	5,4	5,2
3	32,0	39,2	5,3	6,2
4	35,0	44,3	6,0	7,2
5	36,0	53,0	6,0	7,5
6	38,0	58,0	6,1	8,1
7	42,0	62,0	6,2	8,1
8	44,0	72,0	6,1	8,2
9	44,7	69,0	6,1	8,0
10	46,7	63,0	6,2	7,9
11	49,0	68,6	6,4	7,9
12	49,8	62,0	6,5	7,8
13	50,6	64,0	6,5	7,9
14	52,0	65,0	6,4	7,7
15	52,9	68,0	6,8	7,5
16	55,3	64,8	6,9	7,3
17	62,0	69,4	7,1	7,1
18	60,0	70,0	7,3	7,0
19	56,0	68,2	7,5	7,0
20	64,0	72,0	7,6	7,3
21	58,0	70,0	7,4	7,4
22	59,0	65,0	7,3	7,2
23	58,4	54,9	7,1	7,2
24	50,0	49,4	7,1	7,1
25	42,0	34,5	6,9	7,0
26	44,0	27,5	6,6	6,8
27	42,0	26,3	6,8	6,9
28	41,0	26,0	6,8	6,8
29	36,0	26,3	6,5	6,9
30	33,7	26,0	6,3	6,9

Figura 65. Efecto de la temperatura en los ensayos de compostaje natural y acelerado



El aumento de la temperatura se debe a la energía liberada en los procesos metabólicos de los microorganismos sobre los residuos. Al introducir una carga extra de microorganismos la actividad metabólica del tratamiento bioaumentado se incrementó de forma que llegó más rápido a la fase termofílica del proceso.

Con respecto a la fase mesofílica 2, cuyo final está determinado por la biodegradación de los residuos, al incrementar la concentración de microorganismos descomponedores de materia orgánica difícilmente asimilable, estas sustancias se asimilaron más rápidamente lográndose una estabilización de los residuos como ocurre en el tratamiento con bioaumentación, en el cual se alcanza la fase de estabilización en menor tiempo (26 días). Comparado con el tratamiento natural el cual alcanzó la estabilización 10 días después. Esto se debe principalmente a que la tasa de consumo de nutrientes aumentó en la fase termófila obteniéndose una biodegradación de la paja más rápida.

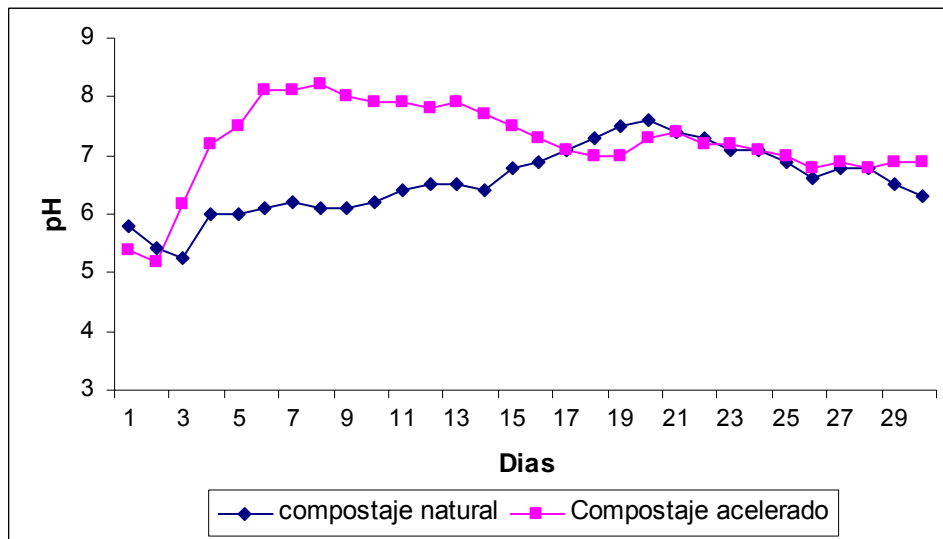
En conclusión el compostaje con microorganismos aceleradores hizo que el proceso fuera más corto y eficiente (26 días) comparado con el proceso realizado de forma natural el cual alcanzó su estabilización a los 36 días.

En la tabla 18 se resume los resultados de los promedios diarios de pH en los tratamientos natural y bioaumentado.

En la figura 66 se observa el comportamiento del pH a través del proceso de compostaje de la pollinaza con y sin bioaumentación. En esta gráfica se puede observar que este parámetro tiene un comportamiento similar al de la temperatura el cual aumenta progresivamente desde la fase mesófila 1 a la termófila (de ácido a base), obteniéndose un pH máximo de 8.2 en la curva de compostaje bioaumentado el cual coincide con el pico máximo de temperatura y un mínimo de 5.2 al inicio de la compostación, mientras que en la curva de pH del compostaje natural, se observa un máximo de 7.6 en la fase termófila y un mínimo de 5.3 al inicio de la fase mesófila.

Al final del compostaje bioaumentado se obtuvo un valor de pH igual a 6.9 y 6,3 para el compostaje natural.

Figura 66. Variación de pH en el compostaje natural y acelerado.



Durante el proceso de compostaje se producen diferentes fenómenos o procesos que hacen variar este parámetro. En el compostaje bioaumentado al principio y como consecuencia del metabolismo fundamentalmente bacteriano que transforma los complejos carbonados fácilmente descomponibles, en ácidos orgánicos, el pH desciende; seguidamente, el pH

aumenta como consecuencia de la formación de amoníaco, alcanzando el valor más alto, alrededor de 8,2, coincidiendo con el máximo de actividad de la fase termófila. Finalmente, el pH disminuye en la fase final o de maduración (pH entre 7 y 8) debido a las propiedades naturales de amortiguador o tampón de la materia orgánica.

Observando los datos de las propiedades físico-químicas y microbiológicas de la pollinaza antes y después del compostaje contenidos en las tablas 5 y 6 se puede determinar que todos los procesos se llevaron a cabo de forma correcta obteniéndose un producto viable para su aprovechamiento en agricultura.

3.6 BIOENSAYOS DE RESPUESTA BIOLÓGICA.

Los resultados de los ensayos de respuesta Biológica del Abono medidos como porcentaje de germinación (%germ) de las semillas de Tomate (*Lycopersicon esculentum*) y medidas de longitud del tallo (LT) y la raíz (LR) de la plántula se muestran en la tabla 19.

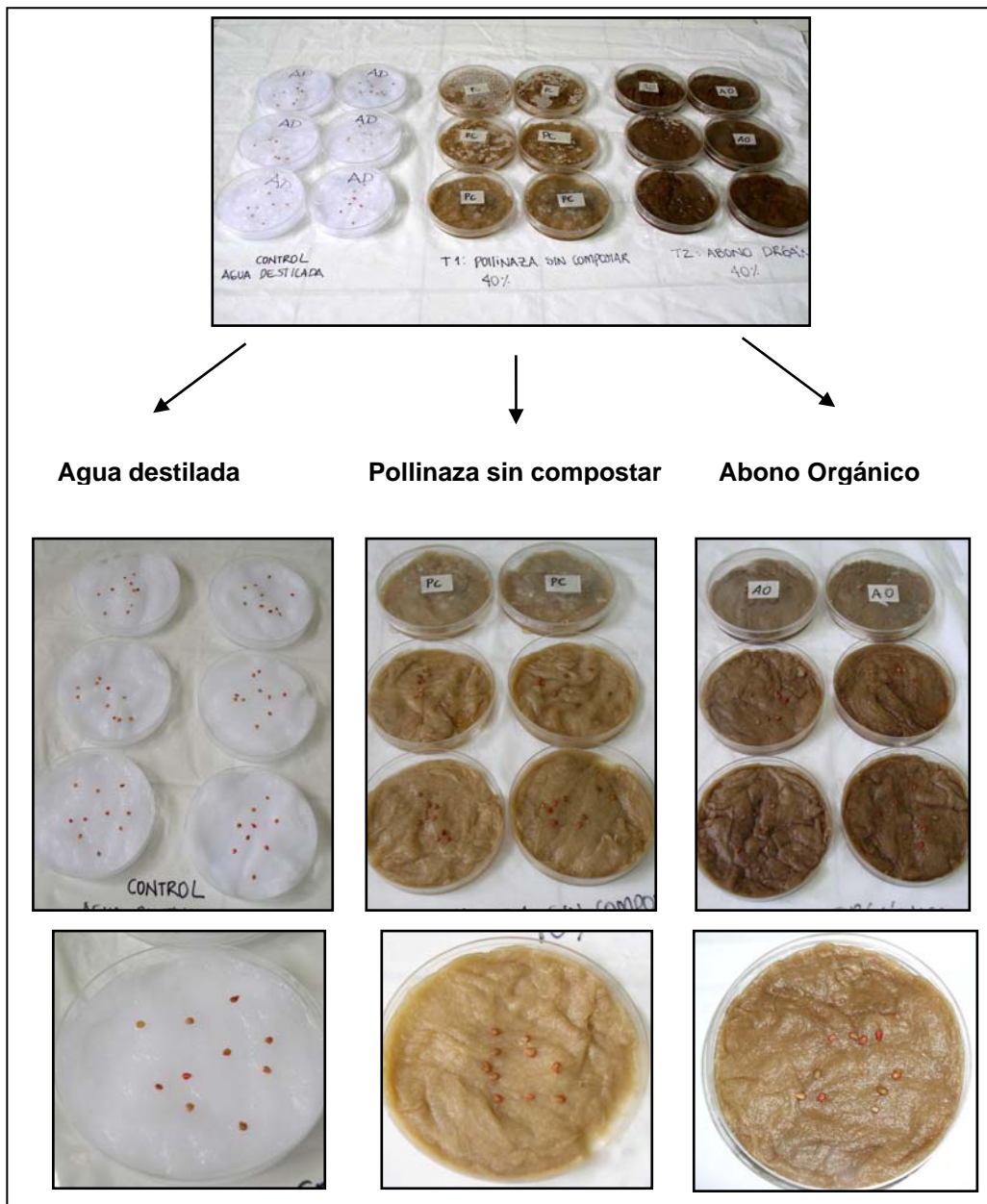
Los ensayos de tipo biológico tienen como fin evaluar la madurez del compost. Estas pruebas se basan en el efecto negativo en el crecimiento que provoca la aplicación de compost “inmaduros” sobre la germinación de las semillas debido a la presencia de compuestos fitotóxicos en estos productos.

Tabla 19. Resultados ensayos de Respuesta Biológica.

Día	Control Agua Destilada			Pollinaza sin compostar			Abono Orgánico		
	% Germ	Long Raíz (mm)	Long Tallo (mm)	% Germ	Long Raíz (mm)	Long Tallo (mm)	% Germ	Long Raíz (mm)	Long Tallo (mm)
2	0,54	3,53	0,00	0,07	0,10	0,00	0,27	1,07	0,00
3	0,58	8,73	0,00	0,08	0,50	0,00	0,67	5,55	0,00
4	0,62	14,57	0,00	0,10	0,95	0,00	0,75	12,37	0,00
5	0,73	19,28	7,22	0,10	1,45	1,38	0,75	18,93	16,87
6	0,75	24,10	13,2	0,10	2,03	1,77	0,75	23,98	29,25
7	0,75	28,73	18,62	0,10	2,67	2,63	0,77	29,75	40,65
8	0,75	33,68	28,66	0,10	3,30	3,45	0,77	38,30	51,82

La etapa inicial del bioensayo donde se observan los tres tratamientos: agua destilada (AD), pollinaza sin compostar (PC) y pollinaza compostada abono orgánico (AO) cada uno con 10 semillas de tomate y 6 réplicas se muestran en la figura 67.

Figura 67. Etapa inicial del bioensayo de respuesta biológica.



En la figura 68 se observa fotografías de los tratamientos al tercer día de germinación de las semillas, ya se empiezan a notar pequeñas diferencias tanto en el porcentaje de germinación de las semillas, como en la longitud del tallo y la raíz. El tratamiento con agua destilada y abono orgánico tienen similares porcentajes de germinación 0,75% y 0,77% y estos a su vez se diferencian del tratamiento pollinaza cruda el cual sólo presentó un 0,10% de germinación.

A los 8 días de tratamiento se observa una marcada diferencia tanto en el crecimiento del tallo como de la raíz siendo mayor la longitud del tallo en el tratamiento con AO (51,82 mm) y menor en la PC (3,45 mm) (Fig. 69). La longitud de la raíz en el tratamiento con Abono orgánico fue de 38,30 mm, seguido por el agua destilada con una longitud de 33,68 mm y la menor longitud se presentó en la PC la cual fue de 3,30 mm.

En las figuras 70, 71 y 72 se observan los análisis de Porcentaje de germinación de las semillas, longitud del tallo y la raíz en los tres bioensayos: Agua destilada, Pollinaza sin Compostar y Abono Orgánico, evaluados a través del tiempo del bioensayo de respuesta biológica.

El abono orgánico al final del bioensayo presentó los mayores valores de porcentaje de germinación (0,77%), LT (51.82mm) y LR (38,30mm), seguido por AD, (% germinación 0,75, LT 28,66 mm y LR 33,68 mm) y por último los valores más bajos de las variables evaluadas lo presentó la pollinaza sin compostar (germinación 0,10%, LT 3,45 mm y LR 3,30 mm).

Según los resultados de porcentaje de germinación se considera que el abono orgánico es maduro puesto que el porcentaje de germinación es mayor al 70%.

Figura 68. Bioensayo evaluación de respuesta biológica al tercer día de germinación.

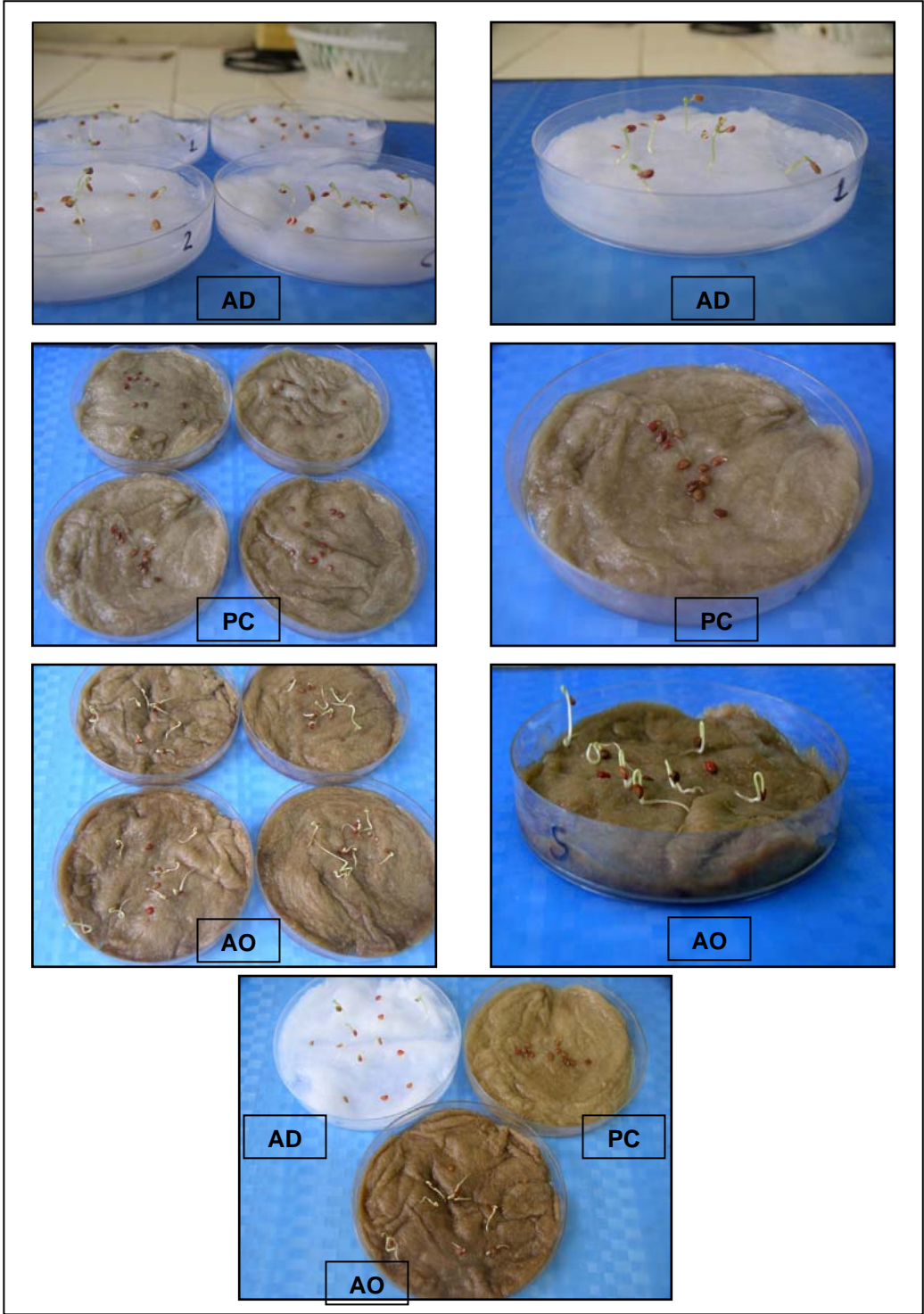


Figura 69 Bioensayo evaluación de respuesta biológica 8 días de Germinación.

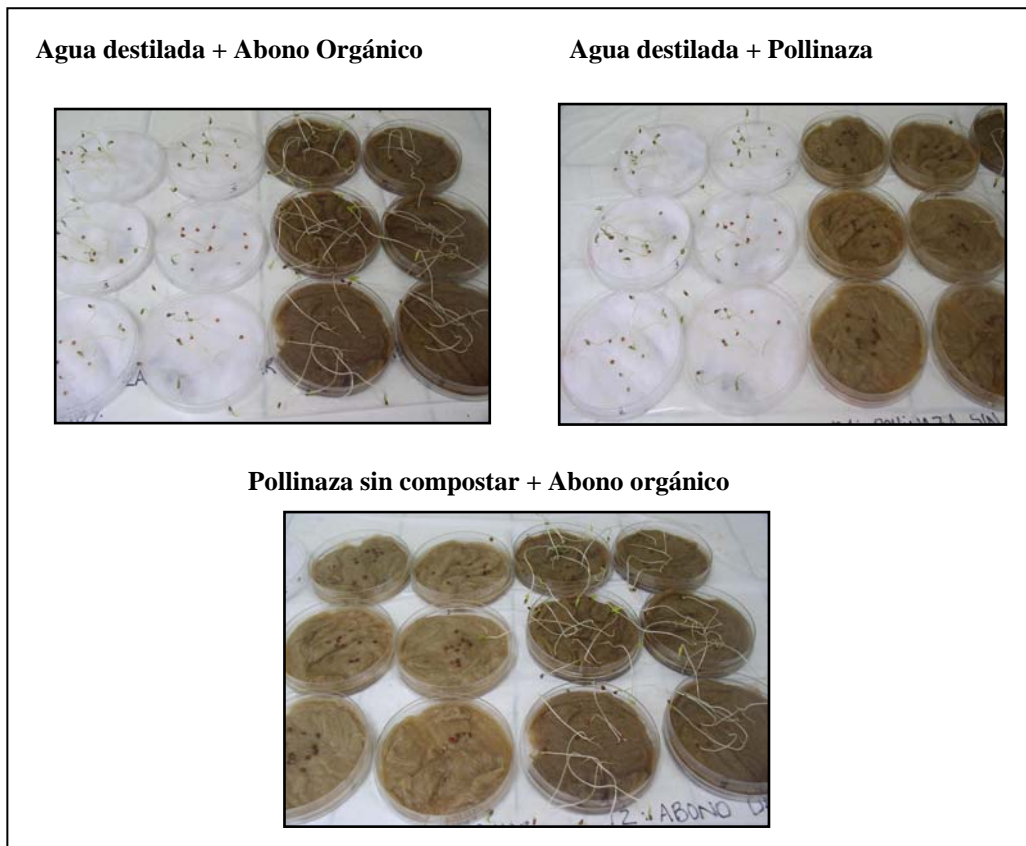


Figura 70. Porcentaje de germinación de las semillas de tomate en Agua destilada, pollinaza sin compostar y abono orgánico.

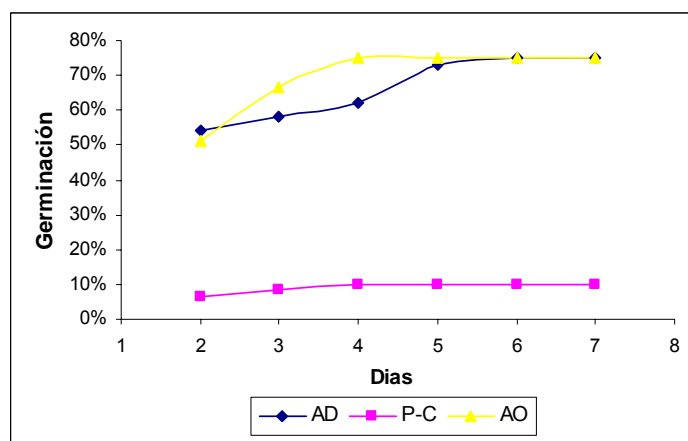


Figura 71. Longitud del tallo de la plántula de tomate en AD, PC y AO.

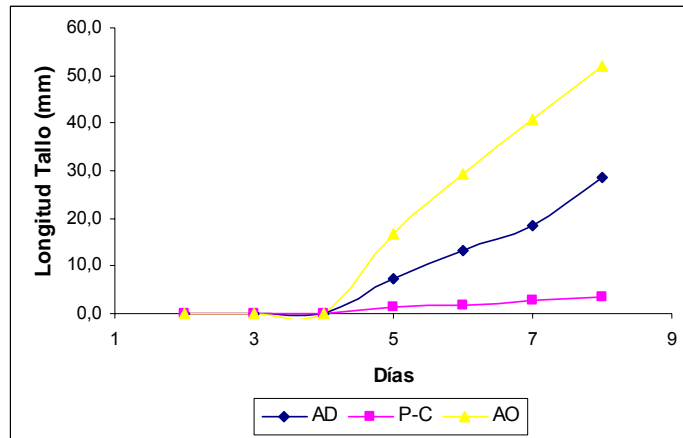
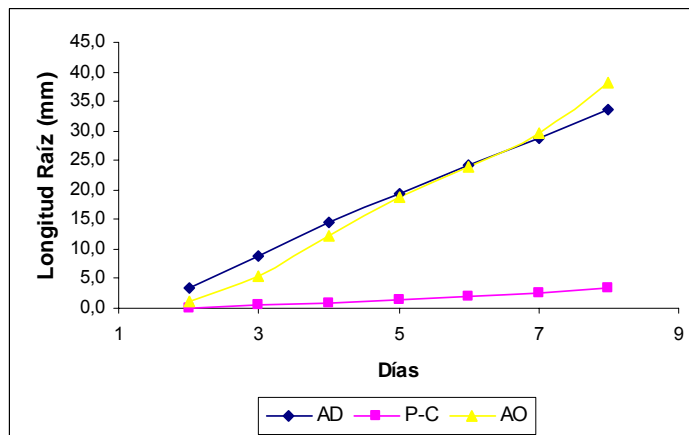


Figura 72. Longitud de la raíz de la plántula de tomate en AD, P-C y AO

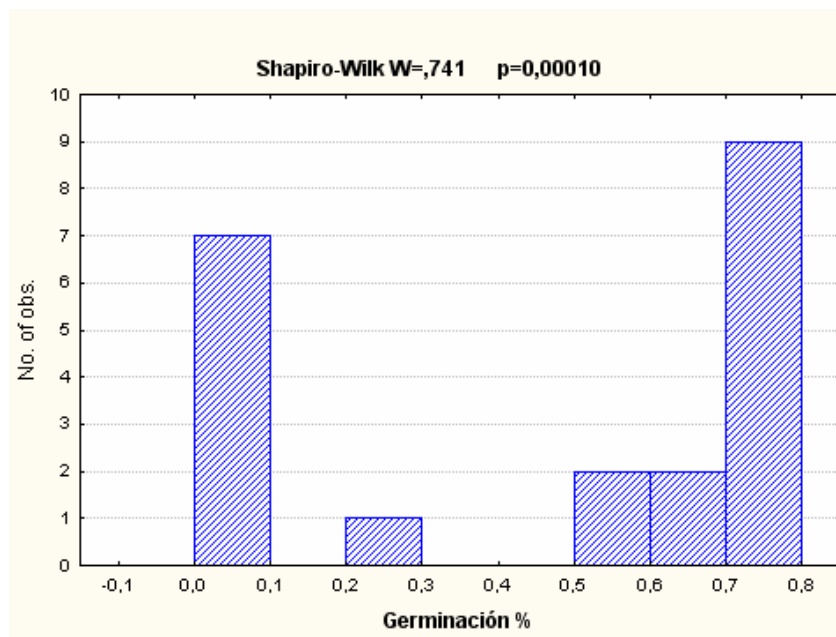


Para sustentar estadísticamente los resultados obtenidos se optó primero que todo por determinar si los datos presentaban distribución normal para ello se utilizó el programa Statistica 6.0 en el que se construyeron las matrices de datos de cada variable dependiente (% Germ, LT, LR) y los factores (tratamientos AD, PC, AO).

Se establecieron 2 hipótesis para cada una de las variables: H_0 = los datos de los tratamientos presentan distribución normal y H_A = los datos de los tratamientos no presentan distribución normal.

Para comprobar la hipótesis de distribución homogénea de los datos se procedió a aplicar el test para normalidad Shapiro-Wilk's ($\alpha=0,05$) dando como resultado para % de germinación: Shapiro-Wilk $W=0,74$, $p=0,00010$ (Fig. 73), longitud del tallo, Shapiro-Wilk $W=0,72$, $p=0,00007$ (Fig. 74) y longitud de la raíz, Shapiro-Wilk $W=0,87$, $p=0,01045$ (Figura 75). Todos los tratamientos presentaron probabilidades inferiores a 0,05 por lo cual se rechazó la Hipótesis nula y se aceptó H_A .

Figura 73. Histograma de Normalidad de porcentaje de germinación del tomate.



A pesar de que los datos no fueron normales se aplicaron pruebas paramétricas, pues según Lindman, 1974 afirma que las pruebas no paramétricas son generalmente menos robustas y menos flexibles en términos de tipo de conclusiones que pueden dar.

En las figuras 76, 77 y 78 observa que los tres tratamientos presentaron probabilidades inferiores a $P=0,05$ por lo cual se rechazó la Hipótesis nula indicando que sí existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Figura 74. Histograma de Normalidad longitud del tallo del tomate.

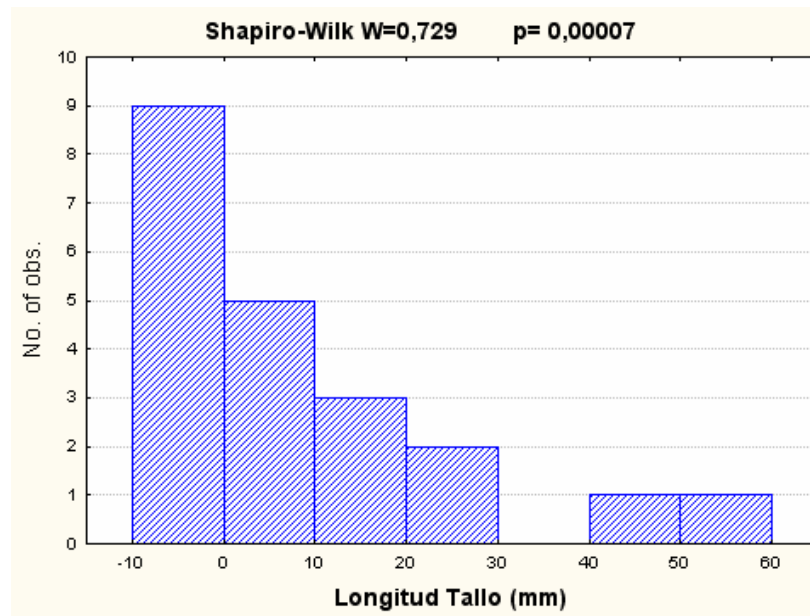


Figura 75. Histograma de Normalidad de longitud de la raíz del tomate.

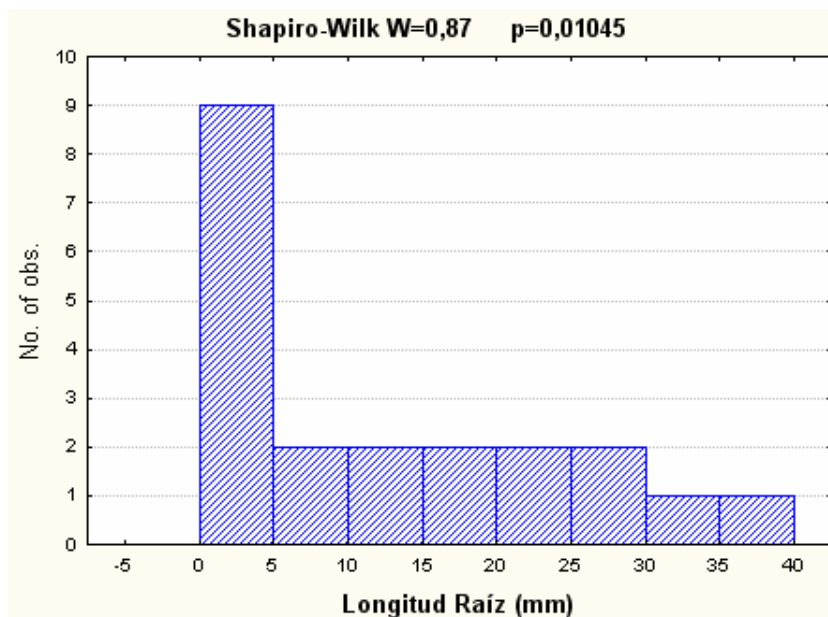


Figura 76. Diferencias entre el porcentaje de germinación y los tratamientos AD, PC y AO.

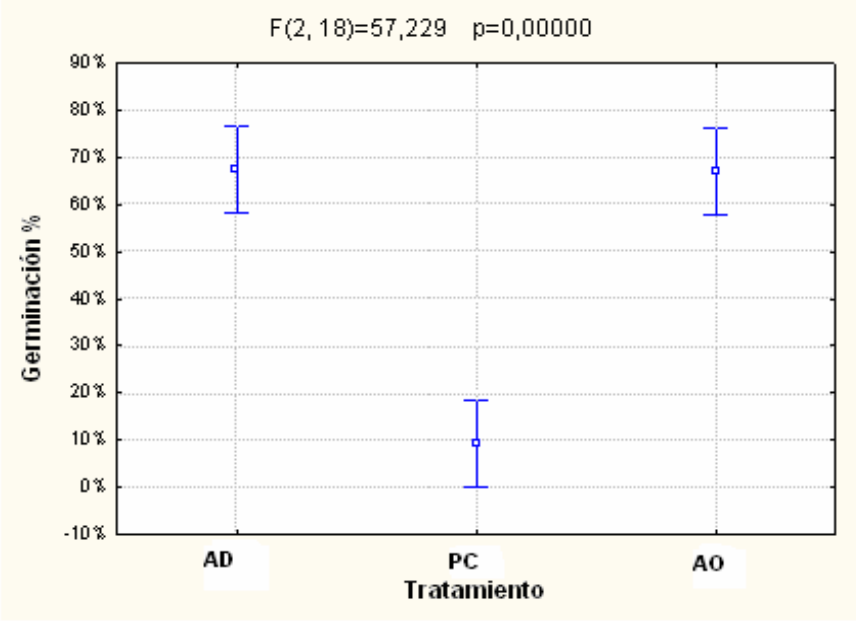


Figura 77. Diferencias entre la LT y los tratamientos AD, P-C y AO.

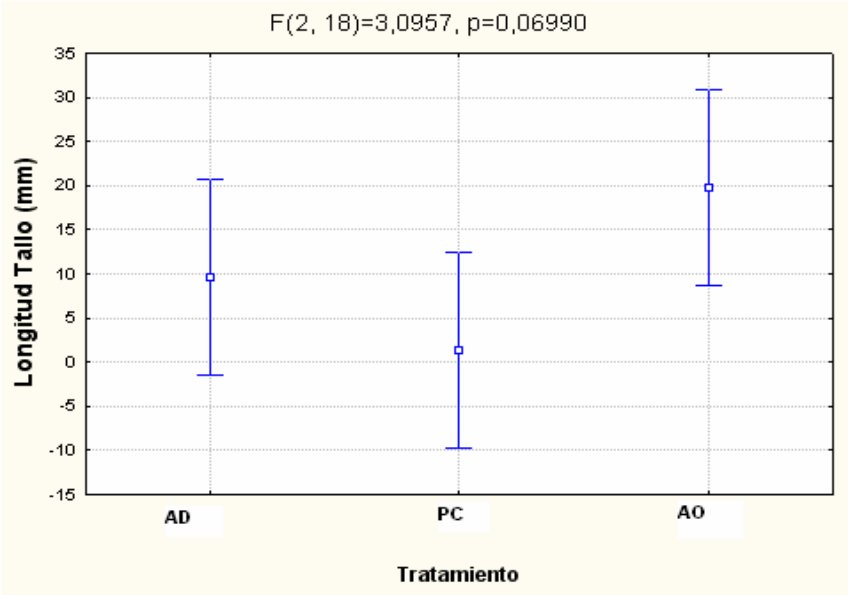
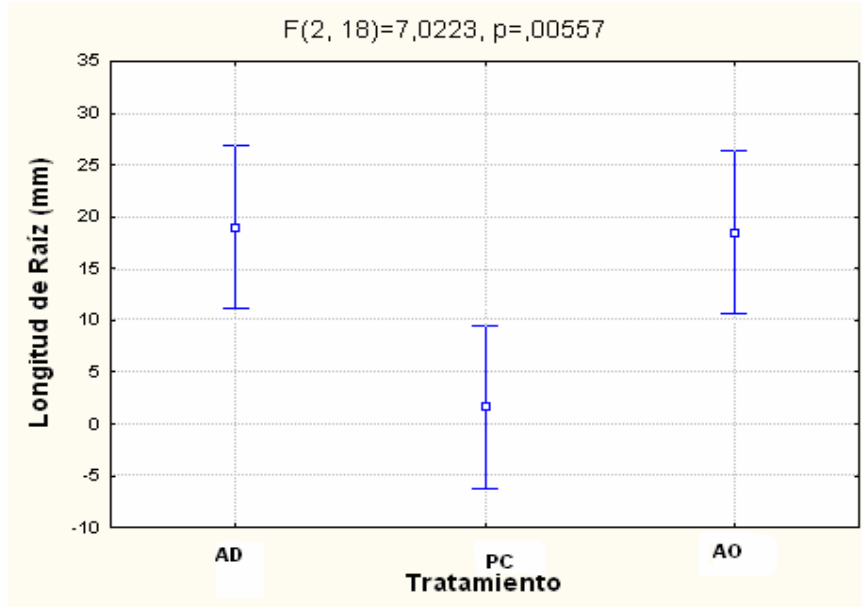


Figura 78. Diferencias entre longitud de la raíz y los tratamientos AD, PC y AO.



El test de Tukey (Honestly Significant difference test) realizado al porcentaje de germinación, la longitud del tallo y la raíz mostró que la diferencia está marcada por el tratamiento numero dos correspondiente a la pollinaza sin compostar hecho que esta soportado por los siguientes resultados:

Porcentaje de germinación:

Tratamiento	Agua destilada	Pollinaza cruda	Abono orgánico
Agua destilada		0,000149	0,996223
Pollinaza cruda	0,000149		0,000149
Abono orgánico	0,996223	0,000149	

Longitud del tallo

Tratamiento	Agua destilada	Pollinaza cruda	Abono orgánico
Agua destilada		0,512919	0,381241
Pollinaza cruda	0,512919		0,057262
Abono orgánico	0,381241	0,057262	

Longitud de la raíz

Tratamiento	Agua destilada	Pollinaza cruda	Abono orgánico
Agua destilada		0,011118	0,997184
Pollinaza cruda	0,011118		0,012958
Abono orgánico	0,997184	0,012958	

Como se observa en los resultados del test de Tukey y en las graficas de las Anovas se puede deducir que el tratamiento que marca la diferencia es el de la pollinaza sin compostar.

Una razón para justificar estos resultados es que posiblemente la aplicación de la pollinaza sin compostar pudo provocar como efecto más destacado un bloqueo biológico del Nitrógeno asimilable, lo que ocasionó un descenso del contenido del nutriente en la planta y en definitiva un menor porcentaje de germinación y un menor crecimiento.

La inmovilización del N mineral se debe a que la pollinaza sin compostar posee una relación C/N elevada debido principalmente a que va a tener un alto contenido de sustancias hidrocarbonadas. Además la incorporación de pollinaza insuficientemente madura origina la descomposición posterior de sustancias que pueden producir serios daños tanto a las semillas como a la plántula de tomate.

Se ha descrito también que la aplicación de pollinaza sin previo tratamiento produce un descenso en el contenido de oxígeno y del potencial de Oxidoreducción favoreciendo la creación de zonas de anaerobiosis y fuertemente reductoras (Negro y Solano, 1996), esto unido a un fuerte aumento de la temperatura puede llegar a inhibir la germinación y producir una disminución en el desarrollo de las plantas especialmente cuando se encuentran en estadios más jóvenes.

Otra razón para explicar el bajo crecimiento de la raíz y el tallo de la plántula de tomate en el tratamiento con pollinaza cruda es que ésta puede además reducir la respiración de las raíces, hacer más lenta la absorción de elementos minerales y disminuir la síntesis de giberelinas y citoquininas y su transporte a las partes aéreas.

El efecto fitotóxico puede ser debido a la formación de amoníaco, producido como consecuencia de la degradación de la materia orgánica residual y cuya presencia incluso en cantidades pequeñas es tóxica para las raíces y para el desarrollo de las plantas, así como para la germinación de las semillas (intoxicación amoniaca).

Con respecto al Abono orgánico que fué el tratamiento que obtuvo mejor resultados se puede decir que éste aumentó la disponibilidad de nutrientes necesarios para la germinación y el crecimiento de la plántula esta condición se evidencia en la mejor apariencia de la plántula y en la mayor longitud del tallo y la raíz comparado con el agua destilada, además se puede decir que el abono orgánico mejoró las condiciones físico-químicas y biológicas para el óptimo desarrollo de las semillas de tomate, por lo cual se puede catalogar como un abono maduro.

4. CONCLUSIONES

El compostaje de la pollinaza es fundamental para obtener un producto de excelente calidad libre de microorganismos patógenos, para que ello ocurra se hace necesario que la temperatura aumente rápidamente y se estabilice en la etapa termófila. Con esta investigación se demostró que el comportamiento de la microbiota durante el proceso de compostaje es variable y dependiente de la temperatura.

El abono orgánico obtenido presentó altos estándares de calidad físico-química y microbiológica, ya que fueron eliminados un 98 % de los microorganismos patógenos (coliformes fecales y Coliformes totales) y presentó altos recuentos de microorganismos benéficos (Bacteria Nitrificantes, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Streptomyces*, *Lactobacillus* y *Pseudomonas*) con lo cual se puede concluir que es apto para ser utilizado como mejorador de suelos o biofertilizante sin ningún riesgo de tipo sanitario.

Se aislaron 27 microorganismos de la pollinaza de los cuales 19 de ellos fueron bacterias (12 Gram negativas pertenecientes a los géneros *Serratia*, *Cedecea*, *Kluyvera*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* y 7 Gram positivas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Streptomyces* y *Nocardia*) y 8 hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Trichoderma* y la Levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta microbiota hizo parte del conglomerado de microorganismos aerobios aceleradores del proceso de compostaje los cuales al ser adicionados a la pollinaza alcanzaron en corto tiempo (6 días) la fase termofílica y se mantuvo en esta etapa por más tiempo que el compostaje natural, asegurando de esta forma un saneamiento total de la pollinaza.

El compostaje bioaumentado fue más eficiente en cuanto a niveles de temperatura, pH y tiempo de estabilización comparado con el compostaje natural, lo cual indica que los microorganismos oxigénicos adicionados a la pollinaza poseen un metabolismo enzimático degradativo que consume más rápidamente la materia orgánica, dando como resultado un abono orgánico de excelente calidad. Por ello es muy importante estudiar las características

químicas y biológicas de estos microorganismos que son los pioneros de la biodegradación de residuos orgánicos.

El tiempo de compostaje con microorganismos aceleradores se redujo un 30% comparado con el compostaje natural. El abono bioaumentado presentó una reducción en el tiempo de compostaje de la etapa mesofílica de 15 días.

Los principales parámetros evaluados en la cinética de crecimiento del grupo de las bacterias y de los hongos que influyeron en su rápido crecimiento fueron la temperatura y la agitación. En el caso de las bacterias las condiciones ideales fueron logradas a 26°C, con aireación y agitación constantes, para *Saccharomyces cerevisiae* el crecimiento fue mayor a 26°C con agitación y para los hongos las mejores condiciones para un rápido crecimiento fueron las realizadas a 37°C con agitación.

Esto concuerda con lo que realmente sucede en el proceso de compostaje donde existe una sucesión de poblaciones microbianas, en las que al principio del compostaje predominan principalmente bacterias mesófilas a medida que va ocurriendo la degradación y va subiendo la temperatura comienzan a proliferar los hongos termófilos que empiezan a degradar la lignina y la celulosa haciendo que la temperatura aumente hasta los 70°C.

Para que los efectos de la aplicación del compost sean positivos este debe ser lo suficientemente maduro, es decir, estable, de lo contrario, la materia orgánica poco estabilizada seguirá el proceso de descomposición en el suelo provocando problemas sanitarios. Para evitar estos posibles efectos negativos se hace necesaria la evaluación de la madurez del compost.

Los test de respuesta biológica tienen como objetivo evaluar la madurez del compost, y están basados en el efecto negativo que provoca la aplicación de estos compost inmaduros sobre la germinación de las semillas debido a la presencia de compuestos fitotóxicos en estos productos. Los ensayos de respuesta biológica realizados al abono obtenido dieron porcentajes de germinación de semillas de tomate superiores al 80%, además que las plántulas presentaron mayor longitud del tallo y la raíz, comparados con la pollinaza sin compostar el cual inhibió la germinación de las semillas, provocando bajas tasas de germinación. Ello indica que el abono orgánico presenta condiciones óptimas de madurez.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un estudio de factibilidad en cuanto costo, operatividad y tiempo para llevar a cabo la producción de abonos orgánicos a partir de residuos sólidos orgánicos y especialmente de pollinaza, para de esta manera aprovecharla y evitar contaminación ambiental.

- Sería recomendable hacer ensayos con el proceso a gran escala para comparar los resultados obtenidos.

- Puesto que el proceso de compostaje implica una mineralización del carbono que es llevada a cabo por microorganismos, y son éstos los que realizan una parte importante del proceso, es fundamental saber que tipo de microorganismos actúan en cada momento, porque en función de que actúen unos u otros se producirán o no la desaparición de ciertos compuestos, por eso es tan importante estudiar a fondo las características de todo el proceso.

- Es importante evaluar el efecto que la adición de compost tiene sobre suelos de distinta textura, es decir, como varían parámetros como el ph, la conductividad eléctrica, la materia orgánica y la capacidad de intercambio catiónico.

- Exigir análisis de calidad física-química y microbiológica para evitar posibles efectos negativos en los cultivos por aplicación de abonos insuficientemente maduros.

BIBLIOGRAFÍA

ALEXOPOULOS, C. and MINS, C. Introductory Mycology. New York, 1979.

BONGCAM, Elkin. Guía para compostaje y manejo de suelos. Ciencia y Tecnología Convenio Andrés Bello. Bogotá, 2003. p.12, 14

CAICEDO, Y. La importancia de los Abonos Orgánicos en la nueva agricultura. Tierra Palmera, FEDEPALMA. 2000. Vol. 9, p.8.

CAICEDO, Yiseth. Efectos del proceso de fermentación sobre la microbiota fúngica de la gallinaza. Tesis de Grado, UIS, Bucaramanga, 2002. p. 35.

FERMORE, T. Applied aspects of composting and bioconversion of lignocellulosic materials and overview. International Biodeterioration & Biodegradation. Madrid, 1993. Vol. 31, 87-106.

GARZON, M., GUTIERREZ, E. y RIOS, J. Producción a escala de laboratorio de un pool de microorganismos aceleradores de compostaje. Tesis de Grado. Ingeniería Química, UIS, p.28-34.

GRAY, K.R and BIDDLESTONE, A.J. The chemical Engineering. London N° 270. 1973

HAUG, Roger. Composting Engineering, principles and Practice. USA: Ann Arbor science 1980.

ICA Instituto Colombiano Agropecuario Resolución N° 00150 Por la cual se adopta el reglamento técnico de fertilizantes y acondicionadores de suelo. 21 Enero 2003.

KRIEG, Noel and Holt, John, Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol, 1 William & Wilkins Baltimore (USA). 1984, Pág. 296-298

M. J. Negro. Producción y Gestión del compost. Tanagosa. Centro de técnicas agrarias.1998

MADIGAN, M., MARTINKO, J., y PARKER, J. Brock Biología de los microorganismos. España: Editorial Prentice Hall, 8a ed. 1998, p. 517-521.

MAYEA, S. y PADRON, J. Producción de composta a partir de la inoculación con microorganismos. Cuba: Ministerio de Agricultura CIDA, 1992. 233p.

MEDRANO, José. Subproductos agrícolas y su utilización en sistemas integrados de producción. Compendio de alternativas no tradicionales para la alimentación de rumiantes. CORPOICA, 1994.p.168-192

MUNEVAR, German. Estiércol que se convierte en plata, Cartagena, 1998. p. 22-25

NEGRO, M y SOLANO, M. Laboratory composting assays of de solid residue resulting from flocculation of oil mill wastewater with different lignocellulosic residues. Compost Science and Utilization, 1996. 4 (4), 62-71.

NEGRO, M. Producción y Gestión del Compost. Zaragoza: Centro de Técnicas Agrarias, 2000. N° 88, p.2-28.

Norma Técnica Colombiana N° 1927 por la cual se adopta el reglamento técnico de fertilizantes y acondicionadores de suelos.

Norma ICONTEC 2 235 Abonos orgánicos, Gallinaza y productos a base de Gallinaza

Reglamento sobre el Manejo y Control de Gallinaza y Pollinaza N° 29145-MAG-S-MINAE , Agosto, 1996

REHBERGER, Thumasg. Waster treatment with a combination of denitrifying propionobacterium acidi propiocini and protease-prodicing bacillus. US. patent N° 6,221,650 2001

RESTREPO, R. Elaboración de Abono orgánicos fermentados y biofertilizantes foliares, 2001 p.13.

RIVERO & CARRACEDO. Efecto del uso de la gallinaza sobre algunos parámetros de fertilidad química de dos suelos de pH contrastante. Revista Facultad Agronómica, 1999. Vol. 25 p.83-90

SAMSON, Robert, HOEKSTRA, LL and OLE, S. Introduction to food-borne fungi. The Netherlands: central albureau boors chimelcultures. 1995. 315 p.

SAWYER, Cair. Bioquímica para Ingeniería Ambiental. Cuarta edición. Colombia: Mc Graw Hill. 2000

SHIGETMITSU, Haruhiro. *Bacillus* descomposting turf pseudos thatchi and thatch, and a microbial material containing the *Bacillus*. Us. Patent N° 6,165,775. 200

TCHOBANOGLIOUS, G. Gestión integral de Residuos Sólidos. 1994, España. Ed. Mc Graw-Hill, Madrid. p.10, 47-50, 67.

TCHOBANOGLIOUS, G. Ingeniería de aguas residuales. México. 1997. Tomo II, p. 898-900.

TUCKER, Robert. Guía para el control y la prevención de la contaminación industrial, Sector Criadero de Aves, Subsector Productores Avícolas. Santiago de Chile. 1998 p.11

VELEZ, Herta. Curso avanzado de hongos oportunistas. Diagnostico de los agentes más comunes. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín.1989.

VOGEL, Henry. Fermentation and Biochemical Engineering handbook. New Jersey. Noyes publications.1983.

ANEXOS

ANEXO 1

MEDIOS DE CULTIVO PARA MICROORGANISMOS BENÉFICOS

▪ MEDIO DE CULTIVO PARA BACTERIAS NITRIFICANTES (según Lewis and Pramer 1958)

Fosfato de Na.	(Na ₂ HPO ₄)	6.75 gr
Fosfato de K	(KH ₂ PO ₄)	0.35 gr
Sulfato de Mg	(MgSO ₄ *7H ₂ O)	0.05 gr
Carbonato de Na	(NaHCO ₃)	0.25 gr
Sulfato de Amonio	((NH ₄) ₂ SO ₄)	1.25 gr
Cloruro férrico	(FeCl ₃ *H ₂ O)	7.2 mg
Cloruro de Ca	(CaCl ₂ *7H ₂ O)	9.2 mg
Agar agar		7.5 gr
Agua destilada		500 ml
Ajustar el pH a 8.0		

Esterilizar a 15 libras de presión y 121 °C durante 15 minutos.

▪ MEDIO PARA LMA PARA *RHIZOBIUM* (según Allen 1957)

Manitol		10.0 gr
Fosfato de K (KH ₂ PO ₄)		0.5 gr
Sulfato de Mg (MgSO ₄ *7H ₂ O)		0.2 gr
Cloruro de Na (NaCl)		0.1 gr
Carbonato de calcio (CaCO ₃)		3.0 gr
Extracto de levadura (10%)		100 ml
Agua destilada		900 ml

Esterilizar a 15 libras de presión y 121 °C durante 15 minutos

▪ SOLUCION RINGER + GELATINA PARA LA PREINCUBACION

Cloruro de Na (NaCl)		8.6 gr
Cloruro de K (KCl)		0.3 gr
Cloruro de Ca (CaCl ₂)		0.33 gr
Gelatina		0.01% p/v
Agua desionizada		1000 ml

Esterilizar a 15 libras de presión y 121 °C durante 15 minutos

▪ **MEDIOS PARA *AZOTOBACTER***

1. Al medio LMA se le agrega Benzoato en una proporción de 3%.
2. Al medio LMA + NaCl (3%) + Zn (80 mg) + Al (10 mg) +Mn (5mg) + Cu (80 mg). Todo esto es para 1 litro de medio LMA.

▪ **MEDIOS PARA *STREPTOMYCES***

AGAR CASEINA

Leche desnatada	50 gr
Agar agar	10 gr
Agua destilada	1000 ml

Disolver la leche en 500 ml de agua calentando pero sin hervir.

Disolver el agar en 500 ml de agua, llevar a ebullición hasta la digestión del medio.

Autoclavar las dos soluciones por separado a 15 psi. por 15 minutos y dejar enfriar hasta una temperatura de 45 o 50 °C para mezclar las dos soluciones y luego servir en cajas de Pétri estériles.

ANEXO 2

CURVA PATRON DE McFARLAND

Esta curva es un método para cuantificar la concentración celular en una suspensión. Se basa en el grado de turbidez que resulta de la precipitación del BaSO_4 por adición de una solución de BaCl_2 a H_2SO_4 en solución del 1% (Rico, 1998). Cada punto se genera por la variación en el volumen de BaCl_2 añadido al ácido completando siempre un volumen de suspensión de 10 ml. La turbidez de cada suspensión se mide en términos de transmitancia a una longitud de onda determinada.

Datos experimentales para curva McFarland obtenidos a partir de solución H_2SO_4 al 1% con BaCl_2

% T	[]* 10^8 m.o/ml
100	0,1
87,6	0,75
67,1	1,5
55,2	3
32,2	6
22	9
15,2	12
9	15
6,8	18
5,1	21
4,6	24
3,9	27
2,8	30
1,3	33

ANEXO 3

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS MICROORGANISMOS OXIGÉNICOS AISLADOS DE LA POLLINAZA.

Cepa	Dominio	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
1	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>
2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Cedecea</i>	<i>davisae</i>
3	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Kluyvera</i>	<i>cryocrescens</i>
4	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	<i>aglomerans</i>
5	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	<i>aerógenes</i>
6	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca</i>
7	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Proteus</i>	<i>vulgaris</i>
8	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>	<i>denitrificans</i>
9	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>calcoaceticus</i>
10	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>utida</i>
11	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>
12	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>cepacia</i>
13	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>
14	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>macerans</i>
15	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>licheniformis</i>
16	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>
17	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Actinomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	<i>griseus</i>
18	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Actinomycetales	Actinomycetaceae	<i>Actynomices</i>	<i>pyogenes</i>
19	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Actinomycetales	Nocardiaceae	<i>Nocardia</i>	<i>corallina</i>

ANEXO 4

ANÁLISIS DE COMPETITIVIDAD DE LOS MICROORGANISMOS OXIGÉNICOS AISLADOS DE LA POLLINAZA

Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Compatibilidad Positiva. (-) antibiosis.

Anexo 5

CRECIMIENTO DE BACTERIAS CON DIFERENTES PARÁMETROS DE TEMPERATURA, AIREACIÓN Y AGITACIÓN

Tiempo (horas)	26 ° C				37 ° C			
	Agitación cél/ml (10 ⁸)	Sin Agitación cél/ml (10 ⁸)	aireación cél/ml (10 ⁸)	sin aireación cél/ml (10 ⁸)	Agitación cél/ml (10 ⁸)	sin agitación cél/ml (10 ⁸)	aireación cél/ml (10 ⁸)	sin aireación cél/ml (10 ⁸)
0	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
0,75	0,08	0,08	0,10	0,07	0,08	0,08	0,12	0,12
1,5	0,08	0,08	0,24	0,10	0,09	0,08	0,25	0,18
2,25	0,09	0,08	0,35	0,15	0,10	0,08	0,28	0,25
3	0,10	0,09	0,45	0,18	0,10	0,08	0,36	0,36
4	0,12	0,10	0,52	0,21	0,21	0,12	0,39	0,41
5	0,19	0,12	0,58	0,24	0,30	0,24	0,45	0,42
6	0,32	0,20	0,70	0,28	0,37	0,31	0,49	0,49
7	0,48	0,24	0,72	0,32	0,44	0,38	0,58	0,52
8	0,62	0,29	0,78	0,38	0,50	0,43	0,61	0,58
9	0,73	0,32	0,83	0,42	0,53	0,46	0,63	0,58
10	0,82	0,34	0,85	0,43	0,57	0,51	0,66	0,61
11	0,93	0,38	0,98	0,45	0,58	0,54	0,67	0,63
12	0,96	0,38	1,02	0,45	0,60	0,57	0,70	0,64
13	0,99	0,41	1,08	0,52	0,60	0,55	0,66	0,65
15	1,06	0,46	1,14	0,54	0,60	0,57	0,71	0,69
17	1,08	0,48	1,20	0,59	0,60	0,57	0,71	0,68
19	1,13	0,52	1,23	0,57	0,61	0,65	0,70	0,69
22	1,18	0,56	1,28	0,62	0,62	0,61	0,74	0,67
24	1,24	0,57	1,32	0,64	0,63	0,60	0,74	0,71
26	1,22	0,55	1,27	0,60	0,61	0,60	0,72	0,67
29	1,09	0,43	1,15	0,46	0,50	0,44	0,56	0,49
31	1,06	0,37	1,09	0,37	0,43	0,38	0,46	0,44