



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ  
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

**INGENIERÍA AGRÍCOLA**

**TESIS PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO  
AGRÍCOLA**

**TEMA:**

**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS DE  
MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS DEGRADADORES DE  
MATERIA ORGÁNICA FIBROSA. ESPAM-MFL 2011.**

**AUTOR:**

**DIEGO EFRÉN ZAMBRANO PAZMIÑO**

**TUTOR:**

**ING. ÁNGEL GUZMÁN CEDEÑO, Mg.As.**

**CALCETA, MARZO 2013**

## **DERECHOS DE AUTORÍA**

Diego Efrén Zambrano Pazmiño declara bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su reglamento.

.....  
DIEGO EFRÉN ZAMBRANO PAZMIÑO

## **CERTIFICACIÓN DEL TUTOR**

Ángel Monserrate Guzmán Cedeño certifica haber tutelado la tesis **AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS DEGRADORES DE MATERIA ORGÁNICA FIBROSA. ESPAM-MFL 2011**, que ha sido desarrollada por Diego Efrén Zambrano Pazmiño, previa la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

.....  
ING. ÁNGEL M.GUZMÁN CEDEÑO, Mg.As.

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL**

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaran que han aprobado la tesis **AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS DEGRADORES DE MATERIA ORGÁNICA FIBROSA. ESPAM-MFL 2011**, que ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por Diego Efrén Zambrano Pazmiño, previa la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

.....  
ING. LUIS E. PARRAGA MUÑOZ  
**MIEMBRO**

.....  
ING. FREDDY J. MESÍAS GALLO  
**MIEMBRO**

.....  
ING. GONZALO A. CONSTANTE TUBAY  
**PRESIDENTE**

## AGRADECIMIENTO

A la escuela superior politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me da la oportunidad de una educación superior de calidad y en la cual estoy forjando mis conocimientos profesionales día a día.

A dios por estar junto a mí, cada instante de mi vida, por darme un corazón fuerte y una mente sana y por permitirme conocer a grandes personas que me han brindado desinteresadamente su amistad.

A la doctora Ana Julia Rondón por brindarme su conocimiento, amistad, comprensión y por sus valiosas sugerencias brindadas sobre el aislamiento de hongos y bacterias celulolíticos.

A la doctora Fátima Arteaga por infundir en mi persona principios y valores que me han ayudado a crecer en mi vida profesional.

Al Ing. Ángel Guzmán Cedeño de quien he aprendido que nada en la vida es fácil y que las metas se deben alcanzar con esfuerzo que nos lleven al éxito.

A mis amigos y a cada una de las personas que he conocido durante mi vida como estudiante, gracias por brindarme su amistad, respeto y comprensión los tendré en mis recuerdos por siempre.

.....  
DIEGO E. ZAMBRANO PAZMIÑO

## DEDICATORIA

A Fe Dolores Del Valle Pazmiño que con su apoyo, cariño y comprensión, me ha inculcado valores de respeto y disciplina con lo cual he podido conocer a personas maravillosas que me han enseñado que con la Convicción, voluntad y la dedicación se pueden alcanzar cada uno de nuestros sueños y metas más anhelados.

A mis hermanos Santiago y Victoria por ser mi inspiración en esta larga travesía en la búsqueda del tesoro más anhelado por mi llamado conocimiento.

.....  
DIEGO E. ZAMBRANO PAZMIÑO

## CONTENIDO GENERAL

CARATULA CON TEMA .....	i
DERECHOS DE AUTORÍA .....	ii
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR .....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
DEDICATORIA .....	vi
CONTENIDO GENERAL .....	vii
CONTENIDO DE CUADRO, Y FIGURAS .....	viii
RESUMEN .....	x
ABSTRACT .....	xi
CAPITULO I. ANTECEDENTE .....	1
1.1. Planteamiento y formulación del problema .....	1
1.2. Justificación .....	2
1.3. Objetivos .....	3
1.4. Hipótesis .....	3
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	4
2.1. Los microorganismos y sus hábitats .....	4
2.1.1. El suelo .....	4
2.1.2. Materia orgánica .....	4
2.1.3. Microorganismos .....	6
2.1.3. Ecología microbiana .....	8
2.2. Características de los microorganismos .....	9
2.3. Reconocimiento de los microorganismos por diferentes técnicas .....	10
2.3.1. Diluciones seriadas .....	10
2.3.2. Tinciones bacterianas .....	10
2.3.3. Prueba de la catalasa .....	12
2.4. Polisacáridos .....	13
2.4.1. La Celulosa .....	13
2.4.2. Almidón .....	14
2.5. Enzimas .....	14
2.5.1. Clasificación de las enzimas .....	15
2.5.3. Tipos de enzimas .....	15
2.5.4. Factores que afectan la actividad enzimática .....	15
2.5.5. Reacciones catabólica y anabólica .....	17

2.6. Compost .....	18
2.6.1. Sucesión de diferentes poblaciones microbianas en compostaje .....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
3.1. Localización y duración de la investigación .....	20
3.2. Características agroclimáticas .....	20
3.3. Fases de la investigación .....	21
3.3.1. Aislamiento de cepas .....	21
3.4. Recolección de muestras de suelo de diferentes ambientes .....	22
3.5. Aislamiento de hongos y bacterias .....	22
3.6. Selección de cepas elites .....	23
3.7. Actividad amilolítica.....	26
3.8. Análisis estadístico de los resultados .....	26
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	27
4.1. Cepas bacterianas .....	27
4.1.1 Aislamiento .....	27
4.1.2. Selección de cepas bacterianas de acuerdo a características deseables .....	28
4.2 Cepas fúngicas .....	37
4.2.1. Aislamiento .....	37
4.2.2. Selección de cepas fúngicas de acuerdo a características deseables .....	38
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	47
5.1. CONCLUSIONES .....	47
5.2. RECOMENDACIONES .....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXOS .....	54
CONTENIDO DE CUADROS	
3.1. Tratamientos .....	21
4.1. Bacterias aisladas según la forma de captura en cada ambiente.....	27

4.2. Degradación de celulosa cristalina y crecimiento por densidad óptica de aislados bacterianos.....	28
4.3. Agrupamiento de cepas por el halo de hidrólisis de la celulosa .....	30
4.4. Agrupamiento de cepas por la capacidad de crecimiento .....	31
4.5. Cepas seleccionadas en cuanto al diámetro del halo de degradación y por su capacidad de crecimiento .....	32
4.6. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a pH 3.....	33
4.7. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a pH 5 .....	33
4.8. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a pH 7 .....	34
4.9. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a pH 9.....	34
4.10. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a pH 3 .....	34
4.11. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a pH 5 .....	35
4.12. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a pH 7 .....	35
4.13. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a pH 9 .....	35
4.14. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a 50°C .....	36
4.15. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a 70°C .....	36
4.16. Agrupamiento de cepas por el halo de hidrólisis del almidón .....	37
4.17. Hongos aislados en cada ambiente .....	37
4.18. Degradación de celulosa cristalina y crecimiento radial de aislados fúngicos.....	38
4.19. Agrupamiento de cepas fúngicas por el halo de hidrólisis de la celulosa].	41
.....	41
4.20. Agrupamiento de cepas por su capacidad de crecimiento.....	42
4.21. Cepas fúngicas seleccionadas en cuanto al diámetro del halo de degradación y por su capacidad de crecimiento .....	42
4.22. Agrupamiento de cepas fúngicas por su crecimiento a pH 3 .....	43
4.23. Agrupamiento de cepas fúngicas por su crecimiento a pH 5 .....	44
4.24. Agrupamiento de cepas fúngicas por su crecimiento a pH 7 .....	44
4.25. Agrupamiento de cepas fúngicas por su crecimiento a pH 9 .....	45
4.26. Agrupamiento de cepas fúngicas por su crecimiento a 50°C .....	45

## CONTENIDO DE FIGURAS

4.1. Dendograma en función del halo de degradación de la celulosa y el crecimiento en bacterias .....	29
4.2. Dendograma en función del crecimiento de las cepas bacterianas a cuatro niveles de pH y a dos de temperatura .....	32
4.3. Dendograma en función del halo de degradación de la celulosa y el crecimiento en hongos .....	40
4.4. Dendograma en función del crecimiento de las cepas fúngicas a cuatro niveles de pH y a dos de temperatura .....	43

## RESUMEN

Con la intención de aislar y seleccionar cepas de microorganismos (bacterias y hongos) autóctonas con potencial para la degradación de residuos orgánicos fibrosos se escogieron cinco ambientes (área orgánica, A.O; área convencional, A.Q; Bosque, B.M; área cañera, R.C y Compost, C. donde se ubicaron placas-trampas que contenían agar nutriente modificado, además se tomaron muestras de suelo de esos sitios. Las placas-trampas fueron recogidas a las 24 horas en el caso de las bacterias y 72 horas para los hongos y llevadas a laboratorio para extraer de las muestras colonias visibles. Con las muestras de suelo se realizaron diluciones seriadas. En ambos casos, se sembró en placas y se purificó por agotamiento hasta obtener un cepario de 230 cepas (93 bacterias y 130 hongos), en el caso de las cepas bacterianas (82 provenientes de muestras de suelo y 22 de trampas) y en los hongos (71 provenientes de muestras de suelo y 42 de trampas). Todas se sembraron en agar Carboximetilcelulosa (CMC) para determinar la actividad celulolítica mediante revelado con rojo congo, del halo de hidrólisis. La cepa bacteriana A.O-19 aislada del área orgánica efectuó el mayor halo de degradación de celulosa con 12,33 mm, mientras que la cepa fúngica A.Q-8 aislada del área química efectuó el mayor halo de degradación de celulosa con 10,33 mm. Además se tomaron en consideración otras variables en estudio como la capacidad de crecimiento, la producción de biomasa a diferente pH y temperaturas y la actividad amilolítica.

**Palabras claves.** Bacterias, hongos, enzimas celulolíticas, CMC, degradación.

## ABSTRACT

With the intention of isolating and selecting strains of microorganisms (bacteria and fungi) native potential for degradation of fibrous organic residues were chosen five environments (organic area, AO; conventional area, AQ; Forest, BM; sugarcane area, RC and compost, C.-plates were located where traps modified nutrient agar containing, besides soil samples were taken from these sites. Plates-traps were collected at 24 hours for bacteria and 72 hours for fungi and carried to extract samples from laboratory colonies visible. With soil samples were serially diluted. In both cases, was plated by exhaustion and purified to obtain a strain collection of strains 230 (93 130 bacteria and fungi), in the case of bacterial strains (82 from soil samples and 22 traps) and in the fungi (71 from soil samples and 42 traps). All agar seeded in carboxymethylcellulose (CMC) to determine the cellulolytic activity by development with congo red, hydrolysis halo. The AO-19 bacterial strain isolated from the organic area made the largest halo cellulose degradation 12.33 mm. The AQ-8 fungal strain isolated from the area made the largest halo chemical degradation of cellulose 10.33 mm. Also taken into account other variables under study as the capacity for growth, biomass production at different pH and temperatures and amylolytic activity.

Keywords. Bacteria, fungi, cellulolytic enzymes, CMC degradation

## **CAPITULO I. ANTECEDENTES**

### **1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

El impacto ecológico producido por la agricultura convencional, está llevando a comprender sus grandes limitaciones para resolver el problema de la seguridad alimentaria, especialmente en los países en vía de desarrollo. Su aplicación no solo ha provocado la degradación de los recursos naturales (agua, suelo y vegetación), sino también es responsable de la pérdida paulatina del conocimiento o saber campesino en el manejo de los diversos sistemas de producción. Dentro de éste modelo de agricultura convencional el recurso suelo es considerado, simplemente, como un soporte en el cual se incorporan los nutrientes para el desarrollo de las plantas y se aplican agroquímicos sin ninguna consideración medio ambiental; no se logra entender que este recurso tiene vida y su dinámica está estrechamente relacionada con los ciclos de la naturaleza y es un recurso no renovable a corto plazo (Linares y Monedero 2004).

Precisamente uno de los procesos ecológicos que tiene lugar en el suelo agrícola es el reciclaje de nutrientes donde participa la microbiota del suelo descomponiendo la materia orgánica para liberar los elementos contenidos en ella. En estado natural este proceso se ve condicionado por factores ambientales y antropocéntricos en dependencia al modelo de agricultura implementado en el agrosistema, lo cual conduce al desarrollo y uso de tecnologías para potenciar la actividad microbiana en el aprovechamiento de los desechos y residuos orgánicos generados tanto en la ciudad como en el sector rural.

Actualmente en el Ecuador existen presentaciones comerciales de microorganismos, etiquetados como eficientes para la degradación y compostaje de materia orgánica, cuyo lugar de origen corresponde con características edafoclimáticas muy diferentes a la nuestra, en muchas ocasiones no se les ha comprobado su acción e inocuidad para poder aplicarlas en nuestro medio.

Por lo expuesto, se formula la siguiente interrogante.

¿Es posible encontrar microorganismos autóctonos que sean transformadores eficientes de materia orgánica fibrosa?

## **1.2. JUSTIFICACIÓN**

La ansiada seguridad y soberanía alimentaria declarada en la constitución y leyes del Ecuador, nos conduce a generar alternativas prácticas que reduzcan la dependencia tecnológica foránea. En el campo de la Microbiología Vegetal resulta de vital importancia hacer uso de la diversidad biológica, que caracteriza a nuestro país, para potenciar los procesos ecológicos de los agrosistemas como por ejemplo el reciclaje de nutrientes a través de la descomposición de la materia orgánica.

Al contar con microorganismos autóctonos, plenamente seleccionados e identificados, capaces de realizar funciones específicas en la transformación de la materia orgánica, se da la oportunidad de desarrollar biotecnologías propias para el manejo de los desechos y residuos orgánicos, a través, de compostaje y convertirlos en abonos que contribuyan en la implementación de un modelo de agricultura eficiente y sostenible.

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL**

Aislar y seleccionar microorganismos autóctonos (bacterias y hongos filamentosos) que degraden la materia orgánica fibrosa.

#### **1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Aislar cepas autóctonas de microorganismos degradadores de materia orgánica fibrosa en diferentes hábitats.

Seleccionar las cepas de microorganismos de acuerdo a características deseables.

### **1.4. HIPÓTESIS**

Con el aislamiento de bacterias y hongos degradadores de la celulosa de diferentes hábitats se acelerará el proceso de descomposición de la materia orgánica en la elaboración de compostaje.

## **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. LOS MICROORGANISMOS Y SUS HÁBITATS**

#### **2.1.1. EL SUELO**

El suelo es el componente básico de los ecosistemas, algunos edafólogos lo definen como “un teatro maravilloso de la vida” no solo por la diversidad que alberga si no porque funciona como reciclador de la materia orgánica y controlador tanto de la dinámica de la circulación de nutrientes como de los flujos de energía (Chamorro, 2001).

#### **2.1.2. MATERIA ORGÁNICA**

Según, Navarro y Navarro (2003) los residuos de las plantas constituyen el material principal originario de la materia orgánica del suelo. Bajo condiciones naturales, todos estos residuos (partes aéreas y raíces de los árboles, arbustos, malas hierbas y otras plantas) aportan anualmente al suelo una gran cantidad de residuos orgánicos. En los suelos cultivados, una gran parte de las plantas son extraídas, pero muchos de sus tallos y raíces son abandonadas en el suelo. Las materias de origen animal que pueden incorporarse al suelo están formadas por cadáveres y las deyecciones de los animales.

Los mismos autores manifiestan que junto a estos restos también hay que incluir los cadáveres de microorganismos vegetales, especialmente bacterias y hongos. Esta participación es importante ya que se estima que las sustancias nitrogenadas del humus pueden proceder, en una proporción bastante elevada, del protoplasma celular de los microorganismos. Las materias de origen animal que pueden incorporarse al suelo están formadas por los cadáveres y las deyecciones de los animales; todos estos restos, sobre todo aquellos procedentes de animales

superiores y principalmente sus cadáveres, evolucionan rápidamente por lo que no dejan compuesto duradero en el suelo.

La red alimentaria está formada por millones de microorganismos que viven en la capa fértil de la tierra y constituyen la base de la salud de las plantas. El número de especies y la cantidad de cada una depende mucho de los cultivos que se realizan, del sistema de trabajo que se emplea, del clima, y tipo de suelo. Empleando las técnicas ecológicas, el suelo es mucho más rico en microorganismos que si se emplea métodos convencionales, a base de abonos, químicos, entre otros (Flórez, 2009).

Álvarez (2001) señala que uno de los procesos más importantes en los ecosistemas es la descomposición, proceso en el cual la materia orgánica es transformada a sus compuestos elementales. Está constituida por las siguientes etapas: trituración, lixiviación, catabolismo y humificación, las cuales son reguladas por factores climáticos, las propiedades físicas del suelo, las características químicas del recurso y la actividad de la biota del suelo.

El proceso de descomposición tiene rangos considerables de variación y la velocidad con que ocurre depende de varios factores, entre los cuales se involucran los constituyentes orgánicos de los detritos (metabolitos primarios y secundarios (Álvarez y Naranjo 2003).

Los metabolitos primarios (azúcares, lípidos y proteínas) se descomponen fácilmente y los elementos que se obtienen (C, N, P) intervienen en el flujo de nutrimentos en los ecosistemas. Los compuestos fenólicos y terpenos son metabolitos secundarios de lenta degradación y su permanencia en detritos y suelo depende, principalmente, de los factores correlacionados con evapotranspiración real (ETR). Los taninos y las ligninas se consideran como retardadores de la descomposición, mientras que el resto de los compuestos fenólicos y terpenos tienen efectos diferenciales sobre la biota detritívora según sus características estructurales (Álvarez y Naranjo 2003).

El edafón descompone y desintegra la materia orgánica produciendo su mineralización y humificación; la desintegración microbiana conduce a la liberación de los elementos orgánicos y su posterior transformación en productos inorgánicos (mineralización); a través del proceso de humificación se forman sustancias húmicas. Mediante este proceso se mejora la estructura del suelo porque se provee las sustancias nutritivas a las plantas y se incrementa la capacidad de retención de agua (Kolmans y Vásquez 1999).

### **2.1.3. MICROORGANISMOS**

El componente microbiano del suelo es importante para la salud de los ecosistemas. Los procesos agrícolas, así como el manejo de los recursos vegetales inciden sobre este componente afectando tanto su biodiversidad como la densidad de las poblaciones microbianas implicadas; los resultados a mediano y largo plazo pueden ser la pérdida de la fertilidad de los suelos y su progresiva pauperización (Olalde y Aguilera 1998).

Los microorganismos son componentes importantes del suelo, constituyen su parte vital y son los responsables de la dinámica de transformación y desarrollo de los procesos bioquímicos. La diversa cantidad de microorganismos que se encuentran en una fracción de suelo cumplen funciones determinantes en la transformación de los componentes orgánicos e inorgánicos (Borrero y Silva 2005).

Los microorganismos del suelo (hongos y bacterias) son trabajadores anónimos que hacen que este sea fértil, descomponiendo la materia orgánica hasta la más mínima expresión, haciendo posible la absorción de muchos compuestos y elementos por las plantas. Un suelo fértil es aquel que tiene una gran biodiversidad de microorganismos, que mediante las actividades liberan nutrientes en forma permanente para alcanzar un balance que permita un buen desarrollo vegetal (Borrero y Silva 2005).

Los hongos celulíticos tienen la capacidad de penetrar en los residuos celulósicos y excretan celulasas en sitios internos de las partículas celulósicas, en estos sistemas las enzimas no forman complejos y son denominados sistemas no agregativos. Por el contrario las bacterias anaeróbicas carecen de la capacidad de penetrar en este material y presentan sistemas agregativos (Castillo *et al.*, 2005).

Por sus características morfológicas y fisiológicas los hongos son organismos con una alta capacidad degradadora. En la naturaleza participan activamente en el reciclaje de nutrientes degradando, junto con las bacterias y la macrofauna del suelo, los restos vegetales. En los ecosistemas tropicales las hojas se encuentran entre los elementos que aportan el mayor porcentaje de biomasa al suelo. Mucho antes de la abscisión, las hojas son colonizadas por diferentes tipos de hongos parásitos y saprobios. Entre los factores que regulan la comunidad de hongos microscópicos en las hojas están: las características químicas de la hoja, factores climatológicos y la capacidad enzimática de los hongos para aprovechar el sustrato en sus diferentes estados de descomposición (Álvarez y Naranjo 2003).

Los microorganismos capaces de degradar la celulosa en los hábitat del suelo juegan un papel fundamental, sin embargo no todas las especies pueden producir elevados niveles de enzimas extracelulares, que a su vez no sean afectados por factores físicos y químicos durante el proceso de hidrólisis (Munero *et al.*, 2005).

Las bacterias son organismos unicelulares, su clasificación se basa en los estudios morfológicos y bioquímicos, las variaciones morfológicas varían entre cocos, bacilos y espirilos; algunas bacterias son pleomórficas (cambian de forma y tamaño) (Mandolesi y Sagardoy 2004).

Los mismos autores manifiestan que desde un punto de vista bioquímico, las bacterias son complejas, pueden utilizar a nivel individual un amplio número de sustratos orgánicos, compuestos inorgánicos y también, la luz solar como

donadores de electrones (fuente de energía). Así como todo organismo vivo tiene un donador de electrones también tiene que tener un aceptor de electrones, para las bacterias aerobias, el aceptor de electrones es el oxígeno; sin embargo, otras bacterias tienen un sistema metabólico que les permite vivir en ausencia de oxígeno, en estos casos el aceptor de electrones puede ser un compuesto inorgánico (nitrato, sulfato, carbonato, hierro férrico, manganeso oxidado, compuestos orgánicos y dióxido de carbono) u orgánico.

### **2.1.3. ECOLOGÍA MICROBIANA**

El término ambiente se refiere a todo lo que rodea a un organismo: los factores físicos, químicos y biológicos. Los microorganismos desempeñan roles muy importantes de lo que podría inferirse por su pequeño tamaño, desde una perspectiva ecológica los microorganismos son parte de las comunidades de los llamados ecosistemas. Cada organismo en un ecosistema interactúa con su entorno modificando marcadamente en algunos casos las características del ecosistema, los microorganismos se encuentran en todos los ambientes naturales (Frioni, 1999).

La misma autora manifiesta que en muchos ambientes donde los organismos superiores están ausentes, debido a extremos físicos o químicos, gran variedad de microorganismos existen y se desarrollan como en los casos de acidez extrema, desecación, salinidad, entre otros. Los factores del ambiente afectan a los microorganismos en la naturaleza tanto como lo hacen en el laboratorio, en ambientes naturales, en general, es el nivel y la naturaleza de los nutrientes disponibles, quienes determinan los niveles de crecimiento microbiano; como estos niveles son en general mucho menores que en el laboratorio, la producción de células en la mayor parte de los ambientes naturales es menor que en los cultivos de laboratorio.

Hans (1997) sostiene además que en los ecosistemas puede describirse para cada especie un hábitat concreto; el hábitat ecológico es el lugar o espacio vital que vive normalmente un organismo determinado (individuo o población). A cada

organismo se le puede asignar por lo menos un hábitat en el que se encuentra normalmente, donde se desarrolla y multiplica, y del que puede aislarse con la máxima probabilidad. El hábitat puede ser el sedimento de un lago, el humus de un suelo fértil, entre otros. Dentro de un ecosistema determinado el microorganismo tiene por lo general un único hábitat; no obstante, un microorganismo puede tener también varios hábitats, cada uno de ellos en un ecosistema distinto.

## **2.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS**

Una identificación bacteriana se puede realizar tras el estudio de las características morfológicas mediante la Tinción de Gram y pruebas bioquímicas de los microorganismos; la identificación bioquímica se basa en las características metabólicas específicas de cada microorganismo, en la detección de la actividad de ciertas enzimas, entre otros. Al igual que la mayor parte de los seres vivos, las bacterias son capaces de modificar el ambiente que las rodea, captando sustancias necesarias para su multiplicación y liberando al medio producto de desechos, enzimas, exotoxinas, entre otros (Díaz *et al.*, 2005).

Frioni (1999) manifiesta que una de las formas de poder observar las características bioquímicas es evaluando la capacidad de degradación de un sustrato particular midiendo su desaparición por pérdida de peso o análisis químicos o indirectamente siguiendo la producción de metabolitos, o por respirometría. La muestra (suelo, agua, restos orgánicos, alimentos) se incuba con la sustancia cuya biodegradación se desea evaluar, proteína, ácidos, almidón, celulosa, lignina, en condiciones controladas de laboratorio (actividad potencial) o en el campo (actividad real) y se sigue la desaparición de la sustancia o la aparición de productos del metabolismo: amonio, nitratos, sulfatos, entre otros. Estas técnicas evalúan la actividad de un grupo grande de microorganismo (grupos fisiológicos) sin detenerse en la caracterización de géneros o especies responsables.

## **2.3. RECONOCIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS POR DIFERENTES TÉCNICAS**

### **2.3.1. DILUCIONES SERIADAS**

Días *et al.*, (2005) manifiestan que para realizar esta técnica se deberá agitar bien el tubo con la primera dilución, para lo cual se puede emplear un agitador eléctrico, o bien haciéndolo girar entre las palmas de las manos, con un pipeta estéril transferir 1 mL de esta primera dilución al segundo tubo con 9 mL de solución salina; agitar el tubo y marcarlo como dilución  $10^{-2}$ . Se debe Repetir la misma operación hasta conseguir las diluciones requeridas. El número de diluciones necesario dependerá de la carga microbiana que se sospeche que se encuentre en la muestra.

Los mismos autores sostiene que una vez realizado la última dilución se procede a transferir con una pipeta estéril 0.1 mL de cada solución de la muestra a placas Petri con el medio de cultivo ya solidificado, este inculó debe extenderse de forma homogénea por toda la superficie de la placa, para lo cual se emplea la espátula de Drigalsky previamente esterilizada, impregnándola de alcohol y pasándola por la llama del mechero. Luego de esto se procede a incubar las placas en posición invertida a la temperatura y tiempo requerido por los microorganismos. Las colonias aparecerán sobre la superficie del agar; cada colonia representa los descendientes de una unidad formadora de colonia.

### **2.3.2. TINCIONES BACTERIANAS**

Permiten el reconocimiento de ciertas estructuras externas, cuando se estudian las características microscópicas de las bacterias se pone especial interés en algunos rasgos de la célula individual como el tipo de forma, el tipo de agrupación, la elevación el margen o borde, color, superficie, caracteres ópticos, olor, entre otros (Díaz *et al.*, 2005).

Los mismos autores manifiestan que con el estudio de las características físicas y bioquímicas de los cultivos se busca el comportamiento grupal o colonial,

puesto que cada colonia representa una masa densa de bacterias, originada usualmente de una sola célula que quedo dispersa en el medio sólido. Las características de las colonias propias de la especie a la que pertenecen, dependen del tipo de medio de cultivo en el cual se inoculó, temperatura, tiempo y la atmosfera de incubación.

#### **2.3.2.2. TINCIÓN SIMPLE**

Rodríguez *et al.*, (2005) manifiestan que ésta es una tinción directa que utiliza un solo colorante, el cual debe ser básico para que la célula bacteriana se tiña, permite demostrar la morfología general de una célula de manera rápida; al emplearse un único colorante, todas las células se observan del color del colorante empleado, los más empleados son el cristal violeta, el azul de metileno y la fucsina fenicada, estos colorantes difieren en la velocidad y grado en que tiñen.

Los mismos autores manifiestan que el azul de metileno reacciona a menor velocidad, toma de 30 a 60 segundos para teñir una preparación microbiana. El cristal violeta es, más reactivo y usualmente requiere solo 10 segundos. La fucsina fenicada es un colorante aún más rápido, generalmente requiere solo cinco segundos, su reactividad es tan grande que con frecuencia sobre colorea, especialmente con preparaciones que contienen grandes cantidades de materia orgánica y detritos.

#### **2.3.2.2. TINCIÓN DE GRAM**

Esta tinción desarrollada por el doctor Christian Gram en 1884, es hoy la más utilizada y permite, de acuerdo con la estructura y grosor de la pared bacteriana, agrupar las bacterias en Gram positivas y en Gram negativas. Las Gram positivas poseen una capa gruesa de peptidoglicano y carecen de membrana externa, mientras que las Gram negativas tienen una capa más delgada de peptidoglicano y poseen una membrana externa (Rodríguez *et al.*, 2005).

Valencia (2004) manifiesta que para realizar el montaje se deberá colocar una pequeña gota de agua esterilizada sobre el portaobjetos, a continuación se tendrá que flamear al rojo vivo el asa y enfriarla tocando el borde del medio, posteriormente se procederá a retirar una pequeña parte de la colonia con el asa, y se dispersara en la gota formando una película delgada. Luego de esto se dejara secar al aire extendido y para finalizar fije con calor, para adherir la muestra y detener la actividad enzimática, para lo cual se deberá tomar con pinzas el portaobjetos y pasándolo con el frotis hacia arriba rápidamente por la llama, tres veces. Luego de esto se aplicara el cristal violeta, el lugol, el alcohol-acetona y por último la safranina.

### **2.3.2.3. TINCIÓN DE ENDOSPORAS**

Tortora *et al.*, (2007) manifiestan que una endospora es una estructura especial, resistente y latente que se forma dentro de una célula y que protege a una bacteria de las condiciones ambientales adversas, aunque las endosporas son relativamente inusuales en las células bacterianas, pueden ser formadas por algunos géneros de bacterias. Las endosporas no se tiñen con los métodos comunes, como la tinción simple y la tinción de Gram, porque estos colorantes no atraviesan sus paredes.

Las endosporas son extremadamente resistentes a numerosos factores físicos (altas temperaturas, radiaciones) y químicos (sequedad, valores extremos de pH) y además, pueden permanecer viables durante largos periodos de tiempo. Cuando las condiciones ambientales vuelven a ser favorables, las endosporas germinan generando una única célula vegetativa (Díaz *et al.*, 2005).

### **2.3.3. PRUEBA DE LA CATALASA**

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrogeno  $H_2O_2$  en agua y oxígeno: químicamente es una hemoproteína, el peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales de oxidación del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono, si se permite que se acumule resulta letal para las células bacterianas. Para la realización de esta prueba se necesita tener

peróxido de hidrógeno al 3% y un cultivo de 18 a 24 horas del microorganismo a probar en estudio (Allen *et al.*, 2008).

Los mismos autores manifiestan que primeramente con un asa de platino, se transfiere parte del centro de una colonia a la superficie de un portaobjeto, seguidamente a esto agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y observar la formación de burbujas. La aparición rápida y sostenida de burbujas o de efervescencia constituye una reacción positiva, como medida de precaución se deberá tener en cuenta, que como algunas bacterias tienen enzimas distintas de la catalasa que pueden descomponer el peróxido de hidrógeno, la formación de unas pocas burbujas pequeñas después de 20 a 30 segundos no se considera un resultado positivo.

## **2.4. POLISACARIDOS**

Los polisacáridos son macromoléculas, polímeros unidos por uniones glucosídicas, algunos polisacáridos sirven como material de almacenamiento, que se hidroliza cuando es necesario proporcionar azúcar para las células. Otros polisacáridos sirven como material para estructuras que protegen la célula o todo el organismo; la arquitectura y la función de un polisacárido se determinan por sus monómeros de azúcar y por las posiciones de sus enlaces glucosídicos (Campbell y Reece 2007).

### **2.4.1. LA CELULOSA**

La celulosa es la molécula orgánica más abundante en la naturaleza (Chávez *et al.*, 2004); (Lynd *et al.*, 2002). Además, se señala que es un homopolisacárido lineal de la  $\beta$ -D-glucosa y todos los residuos están unidos por enlaces  $\beta$  (1-4) glucosídico (Campbell y Farrell 2004). También se indica que es sintetizada por una variedad de organismos (Chávez *et al.*, 2004). Igualmente se manifiesta que la hidrólisis produce celobiosa y glucosa. (Yúfera, 1995).

Estas cadenas lineales de celulosa interactúan entre sí por medio de puentes de hidrógeno dando lugar a la formación de microfibrillas con regiones altamente ordenadas que le dan las características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático. En la hidrólisis y el metabolismo de la celulosa los microorganismos producen celulasas extracelulares, los componentes de estos sistemas celulósicos pueden clasificarse según su acción catalítica y se pueden encontrar tres tipos de actividades enzimáticas (Castillo *et al.*, 2005).

Los mismos autores sostienen que las Endoglucanasas o 1,4-  $\beta$ -D-glucán-4-glucanohidrolasas, actúan en las porciones amorfas de las fibras de celulosa y rompen los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos generando oligosacáridos de distintas longitudes. Las exoglucanasas que incluyen 1,4- $\beta$ -D-glucán-celobiohidrolasa, actúan en los extremos reductores y no reductores de la celulosa liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas). Los  $\beta$ -glucosidasas o  $\beta$ -glucósido glucohidrolasas, hidrolizan las unidades de celobiosa en monómeros de glucosa.

#### **2.4.2. ALMIDÓN**

El almidón, es un polisacárido de almacenamiento de las plantas, es un polímero que se compone en su totalidad en monómeros de glucosa. La mayoría de estos monómeros están unidos mediante uniones 1-4 (del carbono 1 al carbono 4 (C<sub>1</sub> al C<sub>4</sub>), la forma más simple de almidón, la amilasa, no es ramificada; la amilopectina, una forma más compleja de almidón, es un producto ramificado con uniones 1-6 en los puntos de ramificación (Campbell y Reece 2007). La amilasa hidroliza la amilosa, la amilopectina y el glucógeno (Fanju y Hiriart 2008).

#### **2.5. ENZIMAS**

Las enzimas son biocatalizadores (es decir compuestos de origen biológico) que aceleran las reacciones químicas (Koolman y Rohm 2004). Cada enzima actúa sobre una sustancia específica denominada sustrato y cataliza exclusivamente una reacción (Tortora *et al.*, 2007).

Las enzimas presentan tres propiedades, que son: sitio activo o catalítico la cual es una región que se pone en contacto con el sustrato; la especificidad que es la capacidad de la enzima para poder reconocer el reactante (llamado sustrato) de la reacción que acelera, además, determina que sustrato es el que se usa para la reacción enzimática y por último la afinidad que es la capacidad de la enzima para determinar cuánto sustrato utiliza para iniciar su función de acelerar la reacción bioquímica. (Grajales, 2005).

### **2.5.1. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS**

Las enzimas se clasifican y denominan de acuerdo con la naturaleza de la reacción química que catalizan (Voet y Voet 2006). Se clasifican en óxido-reductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. La mayoría de las enzimas digestivas actúan como hidrolasas, formando parte de este amplio grupo se encuentran las amilasas, celulasas, lipasas y proteasas, las reacciones catalizadas por hidrolasas implican la rotura hidrolítica de enlaces (Garrido *et al.*, 2006).

### **2.5.2. TIPOS DE ENZIMAS**

Montoya (2008) manifiesta que las enzimas extracelulares, exocelulares o exoenzimas, funcionan o tienen su acción catalítica fuera de la célula y que las enzimas intracelulares, endocelulares o endoenzimas, cuya acción catalítica se limita al interior de la célula. La función principal de las enzimas extracelulares consiste en efectuar cambios precisos, para que los nutrientes puedan ser transportados al interior de la célula.

### **2.5.3. FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

Grajales (2005) expresa, que la actividad enzimática depende de los siguientes factores: concentración de sustrato, concentración de la enzima, temperatura, pH, fuerza iónica y presencia de inhibidores.

### **2.5.3.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA**

Rodríguez *et al.*, (2005) manifiestan que la temperatura de incubación afecta drásticamente la tasa de crecimiento de las bacterias, debido a que influye en la actividad enzimática. Cada microorganismo tiene una temperatura óptima para su crecimiento, casi siempre relacionada con la temperatura de su hábitat.

Los mismos autores sostienen que para cada microorganismo se ha definido una temperatura mínima, por debajo de la cual no crece; más aún, a bajas temperaturas (0°C o inferiores) el metabolismo cesa por disminución de la actividad enzimática y porque el agua al estar cristalizada, no permite llevar a cabo las reacciones metabólicas, el ingreso de nutrientes ni la eliminación de desechos. También se ha definido una temperatura máxima, sobre la cual las bacterias tampoco crecen e incluso puede ocurrir desnaturalización de proteínas que provocan muerte celular.

Las bacterias cultivables crecen en intervalos de temperaturas mucho más amplio que el de la mayoría de los organismos eucarióticos. Con base en la temperatura óptima de crecimiento y el intervalo de temperatura en el cual pueden desarrollar, las bacterias se dividen en cuatro categorías principales: los psicrófilos, los mesófilos, los termófilos y los hipertermófilos los cuales pueden desarrollarse a temperaturas mayores de 80°C. La temperatura de incubación puede usarse como un procedimiento de selección para microorganismos que poseen diferentes ámbitos de temperatura para su crecimiento, cuyos valores extremos no se traslapen (Rodríguez *et al.*, 2005).

### **2.5.3.2. EFECTO DEL pH**

El pH es el logaritmo negativo de la concentración del ión hidrónico (H<sup>+</sup>); aunque algunas bacterias crecen a pH 1,0 y otras a 11,0, la mayoría crece mejor cerca de la neutralidad (pH 7,0); se conoce como valores máximos y mínimos de pH a los límites superiores e inferiores de su ambiente. Fuera del cual esa bacteria no se multiplica, con frecuencia el metabolismo del propio microorganismo influye en el pH de su hábitat (Rodríguez *et al.*, 2005).

Tortora *et al.*, (2007) declaran, que para la mayoría de las enzimas existe un pH óptimo que se asocia con una actividad enzimática máxima. Por arriba o por debajo de este pH, la actividad enzimática disminuye y por lo tanto también disminuye la velocidad de reacción.

En relación al pH se sabe que no afecta la actividad enzimática directamente sino que modifica la concentración de protones. Los protones además de alterar la estructura de la enzima y el sustrato, pueden participar en la reacción como sustrato o producto. En esos casos, la concentración de protones afecta directamente la velocidad de reacción, cualquier cambio brusco de pH, sabiendo que las enzimas son proteínas, pueden alterar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo en la superficie proteica, afectando así a las propiedades catalíticas de una enzima; a pH alto o bajo se puede producir la desnaturalización de la enzima y en consecuencia su inactivación (Grajales, 2005).

#### **2.5.4. REACCIONES CATABÓLICA Y ANABÓLICA**

El término metabolismo designa la totalidad de las reacciones químicas que se producen en un organismo vivo.- en las células vivas las reacciones químicas reguladas por enzimas que liberan energía por lo general son reacciones implicadas en el catabolismo, es decir la degradación de compuestos orgánicos complejos para su conversión a compuestos más simples.- las reacciones catabólicas son reacciones hidrolíticas (reacciones que utilizan agua y en las que se rompen los enlaces químicos) y exergónicas (producen más energía de la que consumen). Un ejemplo de reacción catabólica es la degradación celular de los azúcares para formar dióxido de carbono y agua (Tortora *et al.*, 2007).

Las reacciones reguladas por enzimas que requieren energía se relacionan principalmente con el anabolismo, es decir, la formación de moléculas orgánicas complejas a partir de moléculas más simples. Estas reacciones se denominan anabólicas o biosintéticas.- los procesos anabólicos se relacionan con reacciones sintéticas de deshidratación (reacciones en las que se libera agua) y son endergónicas (consumen más energía de la que producen) así por ejemplo

se encuentra a formación de proteínas a partir de aminoácidos (Tortora *et al.*, 2007).

## **2.6. COMPOST**

El compostaje es la degradación microbiana de material orgánico sólido (no acuoso), que involucra respiración aeróbica pasando por una etapa termófila, del que se obtiene un producto estabilizado, no contaminante y útil, que reduce la masa, el volumen, las posibilidades de contaminación, los olores desagradables, el desarrollo de insectos, gusanos, produciendo inactivación de patógenos (De Carlo, 2001).

### **2.6.1. SUCESIÓN DE DIFERENTES POBLACIONES MICROBIANAS EN COMPOSTAJE**

El compostaje comienza con una fase inicial o mesófila, donde los residuos orgánicos están a temperatura ambiente y los microorganismos mesófilos se multiplican rápidamente. Tiene una duración de pocos días, en los cuales, se degradan los compuestos orgánicos de cadena corta o más fácilmente biodegradables (Tortarolo *et al.*, 2008).

Los mismos autores sostienen que la fase termófila, comienza cuando el material alcanza una temperatura de 40°C, caracterizada por una mayor actividad microbiológica. A partir de los 60°C los hongos termófilos desaparecen y aparecen bacterias esporígenas y actinomicetos. Estos microorganismos son los encargados de descomponer ceras, proteínas y hemicelulosas. En ésta etapa se eliminan posibles gérmenes patógenos para plantas y animales, así como el poder germinativo de las semillas de malezas.

Igualmente concluyen manifestando que la fase de madurez o estabilización, está caracterizada por una disminución de la temperatura, del grado de descomposición y de la recolonización del material por microorganismos mesófilos. Es un período que requiere meses a temperatura ambiente, durante

los cuales se producen reacciones secundarias de condensación y polimerización de las sustancias húmicas.

## CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El presente trabajo se desarrolló, en el Laboratorio de Biología Molecular en la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, ubicados en el sitio el Limón, cantón Bolívar de la provincia de Manabí, situada geográficamente entre las coordenadas 0°49'23'' Latitud Sur; 80°11'01'' Longitud Oeste y una altitud de 15 msnm. <sup>1/</sup>

### 3.2. CARACTERÍSTICAS AGROCLIMÁTICAS

Clima <sup>2/</sup>

Precipitación anual	838.7 mm
Humedad relativa media	78%
Temperatura media anual	25.6 ° C
Heliofania año	1158 horas sol al año
Evaporación	1365.2 mm

Edáficos <sup>3/</sup>

Topografía	Plana
Drenaje	Bueno
Textura	Franco limoso
pH	6 - 7

<sup>1/</sup> Estación Agrometeorológica Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

<sup>2/</sup> Corporación Reguladora de Recursos Hídricos de Manabí (C.R.M), proyecto Carrizal Chone, actualización y complementación del estudio de impacto ambiental y plan de manejo ambiental 2003.

<sup>3/</sup> Vera, J. (2003). Determinación de las curvas de infiltración de agua de los suelos agrícolas en el campus politécnico de la ESPAM- MFL.

### 3.3. FASES DE LA INVESTIGACIÓN

#### 3.3.1. AISLAMIENTO DE CEPAS

##### a) FACTORES EN ESTUDIO

Forma de captura (C).

Hábitats (H)

##### b) NIVELES

C1= muestra de suelo.

C2= trampa.

H1= bosque.

H2= área convencional.

H3= área orgánica.

H4= depósito de residuos fibrosos.

H5=compost.

##### c) COMBINACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

Cuadro 3.1. Tratamientos

N°	Código	Descripción	
		Forma de captura	Hábitats
1	C1H1	Suelo	Bosque
2	C1H2	Suelo	Área convencional
3	C1H3	Suelo	Área orgánica
4	C1H4	Suelo	Deposito residuos fibrosos.
5	C1H5	Suelo	Compost
6	C2H1	Trampa	Bosque
7	C2H2	Trampa	Área convencional
8	C2H3	Trampa	Área orgánica
9	C2H4	Trampa	Deposito residuos fibrosos.
10	C2H4	Trampa	Bosque

### **3.4. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE DIFERENTES AMBIENTES**

La investigación se realizó en áreas de agricultura orgánica, convencional y de bosque de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López” (ESPAM-MFL), en un área de producción de caña de azúcar ubicada en el cantón Chone y en una unidad de producción de compost perteneciente a una bananera orgánica del cantón Tosagua, Manabí, Ecuador. En todos los ambientes se colocaron placas-trampas a una profundidad de 10 cm también se tomaron muestras directas de suelo, en los mismos puntos de localización de las trampas.

### **3.5. AISLAMIENTOS DE HONGOS Y BACTERIAS**

#### **3.5.1. MUESTRAS DE SUELO**

Los microorganismos (bacterias y hongos) celulolíticos fueron aislados por el método de las diluciones seriadas (Stanier, 1996). Se preparó una suspensión al 10% (p/v) con un gramo de suelo, la siembra se realizó en placas Petri en un medio cuya única fuente energética era la celulosa. Se realizaron diluciones hasta  $10^{-6}$  y se sembraron por triplicado a concentraciones entre  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  en el caso de las cepas fúngicas y entre  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$ , para las cepas bacterianas.

Posteriormente las bacterias se incubaron por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y la resiembra y purificación de las mismas se evaluó considerando, fundamentalmente, la formación de endosporas, y la tinción de Gram con lo cual se obtuvo el cepario. En el caso de los hongos se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  de tres a cinco días y se seleccionaron por su descripción macroscópica, se observaron las características de las colonias (color, aspecto, superficie, textura y tamaño).

**3.5.2. CAPTURADORES (TRAMPAS).** Se prepararon placas con medios de cultivo enriquecido con celulosa, que se ubicaron a una profundidad de 10 cm en los mismos puntos de localización de donde se extrajo la muestra de suelo: Las placas fueron recogidas a las 24 horas para las cepas bacterianas y 72 horas en el caso de las cepas fúngicas y llevadas a laboratorio para extraer muestras de

las colonias visibles. Se seleccionaron según lo mencionado para aislamiento en muestras de suelo.

### **3.6. SELECCIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS**

#### **3.6.1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BIODEGRADATIVA DE LA CELULOSA**

Se realizó una prueba cualitativa para determinar la actividad celulolítica de los microorganismos aislados. Esta prueba se realizó mediante la siembra en Agar Carboximetilcelulosa; las cajas Petri fueron incubadas a 37°C, por 72 horas, después de esto se realizó una tinción adicionando rojo congo al 1% como revelador, el colorante se dejó actuar por 15 min, se retiró el exceso y se adiciono una solución de cloruro de sodio (NaCl) 2 mol/L, dejando reposar por quince minutos más, transcurrido este tiempo se determinó la actividad celulolítica por la presencia de zonas claras (halos) manifestado por la hidrólisis de la celulosa. Los diámetros fueron medidos a través de una regla milimétrica (Teather y Wood. 1982) citado por (Gaitán y Pérez 2007).

#### **3.6.2. CAPACIDAD DE CRECIMIENTO EN HONGOS**

Para la medición del crecimiento radial se partió de un cultivo puro, que se sembró en punción en el centro de la superficie (colonia gigante) en Agar Sabouraud. Las cajas se incubaron a 30°C por 72 horas (Samuels *et al.*, 2002) citado por (Sánchez, 2012).

#### **3.6.3. CAPACIDAD DE CRECIMIENTO EN BACTERIAS**

Cultivos de 24 horas en caldo nutriente, se inocularon (1:10) en erlenmeyers de 100 mL de capacidad, que contenían 50 mL del mismo medio de cultivo, los que se ubicaron en zaranda termostataada a 37°C y 130 rpm (Milián, 2009). Se retiraron los erlenmeyers para la toma de muestras a las 24 horas. Una vez finalizado este tiempo se midió la masa celular por espectrofotometría (Jenway-

6305). La lectura de la absorbancia se efectuó con una longitud de onda de 660 nm.

### **3.6.4. PLASTICIDAD ECOLÓGICA**

#### **a) EFECTO DEL PH (3-5-7-9) DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO EN BACTERIAS CELULOLÍTICAS**

Un asa de siembra de células se suspendió en 25 mL de caldo nutriente (pH 7,3) y se incubó a 37°C con agitación 130 rpm. 5 mL de cultivo de 24 horas de incubación se inoculó en 50 mL de caldo nutriente y a pH (3-5-7 y 9) en un matraz de agitación de 125 mL y se incubó a 37°C con agitación a 130 rpm por 24 horas. (Nakamura, *et al.*, 2004). Para poder ver cuál de las cepas fue la que mejor se adaptó a las condiciones de pH mencionada anteriormente se empleó la técnica de recuento en placas de células viables. Para lo cual transcurrido el tiempo de incubación se realizó la técnica de las diluciones seriadas al 0.85% y la siembra de 0.1 mL en agar nutriente (HIMEDIA) con espátula de Drigalsky; la incubación de las bacterias se realizó a 37°C durante 24 horas en incubadora Thermo scientific en condiciones aerobias.

La medición de los valores de pH se realizó en un pHmetro digital (OAKLON pH 700). El conteo de microorganismos se realizó a través del número de unidades formadoras de colonias (UFC). Se determinó por conteo visual de colonias en placas con agar nutriente (Pelczar y Reid 1966).

#### **b) EFECTO DEL PH (3-5-7-9) DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO EN HONGOS CELULOLÍTICOS**

La capacidad de crecer a temperaturas de pH en las cepas fúngicas se determinó por la producción de biomasa, para lo cual un asa de siembra de células se suspendió en 25 mL de caldo arroz a pH 5,6 (Otalora *et al.*, 2001) citado por (Chávez, 2006) y se incubó a 30°C con agitación 120 rpm. 5 mL de micelio producido de 72 horas de incubación se inoculó en 50 mL de caldo arroz y a pH (3-5-7 y 9) en matraces de agitación de 125 mL y se incubó a 30°C con agitación

a 130 rpm por 72 horas (Nakamura *et al.*, 2004). Posteriormente se filtró el material y se pesó el micelio, luego se llevó a estufa a 70°C por 24 horas. Trascurrido este tiempo se pesó el micelio seco y se obtuvo el resultado por diferencia de pesos. (Izarra *et al.*, 2010).

**c) EFECTO DE LA TEMPERATURA (50 y 70°C) DE INCUBACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO EN BACTERIAS CELULOLÍTICAS**

Un asa de siembra de células se suspendió en 25 mL de caldo nutriente con pH 7,3 y se incubó a 37°C con agitación de 130 rpm. 5 mL de cultivo de 24 horas de incubación se inoculó en 50 mL de caldo nutriente en un matraz de agitación de 125 mL y se incubó a 50°C y a 70°C con agitación a 130 rpm por 24 horas. Para poder ver cuál de las cepas fue la que mejor se adaptó a las condiciones de temperatura indicadas anteriormente se empleó la técnica de recuento en placas de células viables; para lo cual transcurrido el tiempo de incubación se realizó la técnica de las diluciones seriadas al 0.85% y la siembra de 0.1 mL en agar nutriente (HIMEDIA) con espátula de Drigalski, la incubación se realizó a 37°C durante 24 horas en incubadora (Thermo scientific) en condiciones aerobias.

**d) EFECTO DE LA TEMPERATURA (50 y 70°C) DE INCUBACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO DE HONGOS CELULOLÍTICOS.**

La capacidad de crecer a temperaturas de incubación de 50°C y 70°C en las cepas fúngicas se determinó por la producción de biomasa, para lo cual un asa de siembra de células se suspendió en 25 mL de caldo arroz (pH 5,6) y se incubó a 30°C con agitación 130 rpm. 5 mL de micelio producido de 72 horas de incubación se inoculó en 50 mL de caldo arroz en un matraz de agitación de 125 mL y se incubó a 50°C y a 70°C con agitación a 130 rpm por 72 horas posteriormente se filtró el material y se pesó el micelio, luego se llevó a estufa a 70°C por 24 horas. Trascurrido este tiempo se pesó el micelio seco y se obtuvo el resultado por diferencia de peso.

### **3.7. ACTIVIDAD AMIOLÍTICA**

Se empleó una modificación del método en placas antes citado para la actividad celulolítica reemplazando la (CMC) por almidón.

### **3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Mediante el uso del paquete INFOSTAT versión 1 se realizó análisis de varianza, prueba de significación Tukey y análisis de conglomerados (Belzarini *et al.*, 2001).

## CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. CEPAS BACTERIANAS

#### 4.1.1. AISLAMIENTO

Los resultados del aislamiento de las cepas bacterianas se presentan en el cuadro 4.1 donde se aprecia que el 44 % de cepas aisladas proviene del área cañera; probablemente el depósito de residuos fibrosos favorece la mayor presencia de microorganismos celulolíticos. Lo que coincide con Vilches (2002), quien menciona que es indispensable considerar el tipo de muestra y zona de muestreo como una condición importante para lograr aislar cepas con altas posibilidades degradativas de residuos celulósicos.

En orden de importancia por el número de cepas aisladas le corresponde al área orgánica donde se obtuvieron el 28% del total de cepas. En el resto de ambientes el número de cepas aisladas esta en concordancia con los estudios realizados por Gutiérrez *et al.*, (2008) donde obtuvieron 16 cepas de bacterias celulolítica a partir de muestras de sedimentos provenientes de cultivos de *Stevia rebaudiana*. Por su parte Gaitán y Pérez (2007) evaluaron la actividad celulolítica a partir de residuos vegetales de crisantemo en compostaje, empleando Agar CMC logrando aislar 8 cepas bacterianas celulolítica. En cuanto a la forma de captura, se encontró que a partir de muestras de suelo se asegura un mayor número de aislamiento.

Cuadro 4.1. Bacterias aisladas según la forma de captura en cada ambiente

Ambientes	Forma de captura		Total	%
	Trampa	Muestra		
Área orgánica		26	26	28.0
Área convencional		7	7	7.50
Bosque		12	12	13.0
Área cañera	22	19	41	44.0
Compost		7	7	7.50
Total	22	71	93	100.0

#### 4.1.2. SELECCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS DE ACUERDO A CARACTERÍSTICA DESEABLE

##### a) SELECCIÓN POR SU CAPACIDAD BIODEGRADATIVA Y POR SU CRECIMIENTO

En el cuadro 4.2 se presentan los resultados de la actividad enzimática de las cepas para degradar la celulosa, también se aprecia la capacidad de crecimiento evaluado a las 24 horas haciendo uso del espectrofotómetro. De las 70 cepas seleccionadas, 30 mostraron capacidad celulolítica; las mismas se ubican de acuerdo a las áreas de selección de la siguiente manera: 25 corresponden a muestras de suelo y 5 de trampas.

Cuadro 4.2. Degradación de celulosa cristalina y crecimiento por densidad óptica de aislados bacterianos

Ambiente	Bacterias	Halo mm	D.O
Área orgánica	A.O-19	12.33	1.927
	A.O-28	3.42	1.885
	A.O-29	3.42	1.847
	A.O-30	2.83	1.826
Área convencional	A.Q-2	3.23	1.943
	A.Q-3	1.33	1.980
	A.Q-4	1.67	1.833
	A.Q-8	2.37	1.917
Bosque	B.M-1	1.17	1.983
	B.M-5	2.50	1.995
	B.M-7	3.50	1.758
	B.M-10	2.33	1.904
	B.M-11	1.50	1.885
Área Cañera	R.C- 1	2.33	1.795
	R.C- 2	4.73	1.981
	R.C- 3	2.33	1.914
	R.C- 4	1.83	1.988
	R.C- 5	1.33	1.737
	R.C- 6	7.50	1.997
	R.C- 7	2.83	1.831
	R.C- 8	2.17	1.630
	R.C- 9	2.33	1.635
	R.C- 10	2.17	1.683
	R.C- 11	2.00	1.962

R.C- 12	2.17	1.649
R.C- 13	2.33	1.980
R.C- 15	2.33	1.670
R.C- 16	2.67	1.696
R.C- 18	3.50	1.921
R.C- 23	1.17	1.923

Según, Theather y Wood (1982) citado por Arroyo (2010), las ventajas de éste sistema Rojo Congo, derivan del intenso color rojo del complejo colorante glúcano, el cual permite la diferenciación visual entre organismos que emplean la celulosa y los que no.

#### b) ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS EN FUNCIÓN DEL HALO DE DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA, Y EL CRECIMIENTO

Los datos de estos dos criterios de selección al ser sometidos al análisis de conglomerados, con la intención de agrupar las cepas de mayor similitud., (figura 4.1) permitió definir cuatro grupos al interior de cada criterio.

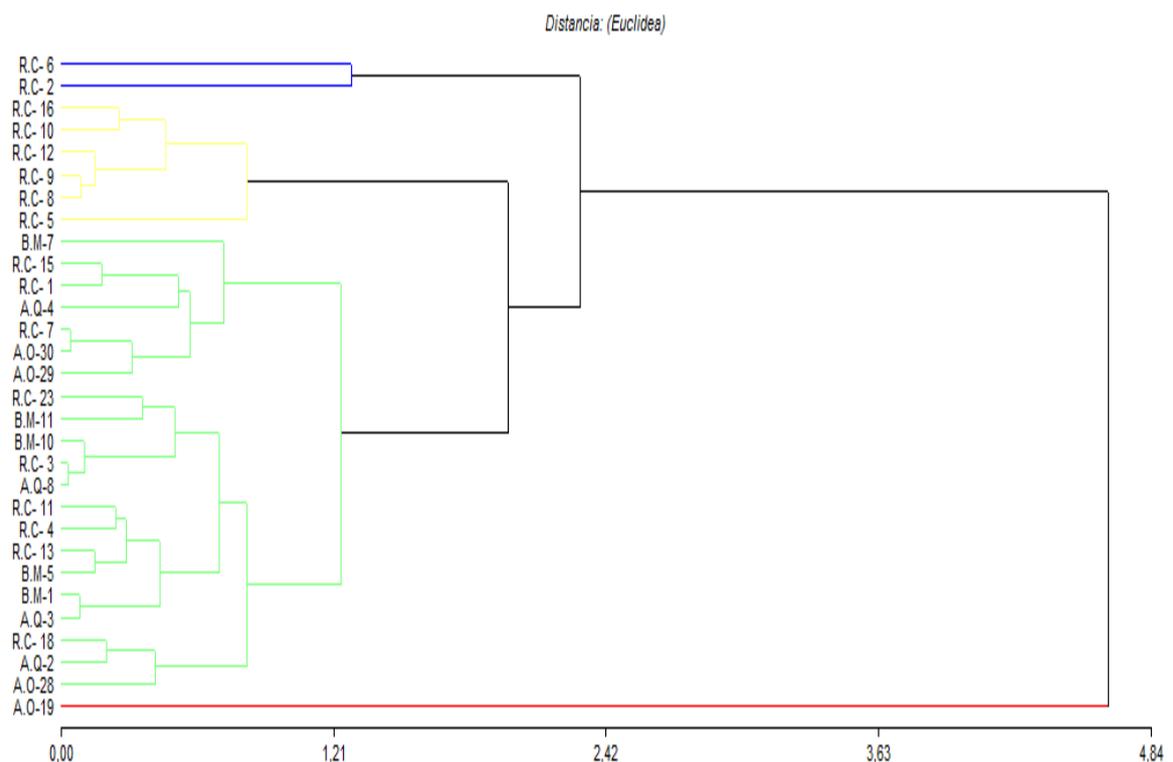


Figura 4.1. Dendrograma en función del halo de degradación de la celulosa y el crecimiento

### c) ANÁLISIS DE DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA

En el cuadro 4.3 aparecen las cepas que integran cada grupo y su respectivo promedio del halo de hidrólisis, que al ser categorizados las diferencias muestran tres rangos estadísticos. Ubicándose en la primera categoría la única cepa del primer grupo la (A.O-19) con un promedio de halo de hidrólisis de la celulosa de 12.33 mm. El segundo rango estadístico le correspondió al grupo 2 conformado por las cepas R.C-2 y R.C-6, que alcanzaron un promedio de halo de hidrólisis de 6.12 mm. Finalmente, las restantes 27 cepas repartidos en el tercer y cuarto grupo con 5 y 22 cepas respectivamente, comparten la tercera categoría con promedios de halo de hidrólisis de 2.38 y 2.14 mm, en su orden, los valores de esta tercera categoría coinciden con los de Gaitán y Pérez (2007); Mykán y Castellanos (2004) quienes obtuvieron resultados de degradación de la celulosa por bacterias que no superaron los 3 y 4 mm de diámetro en cada caso.

Cuadro 4.3. Agrupamiento de cepas por el halo de hidrólisis de la celulosa

Grupo	Cepas	Halo (UI/mm)	E.E
1	A.O-19	12.33a	0.79
2	R.C-2; R.C-6	6.12b	0.56
4	R.C-8; R.C-9; R.C-10; R.C-12 y R.C-16	2.38c	0.17
3	A.O-28; A.O-29; A.O-30; A.Q-2; A.Q-3; A.Q-4; A.Q-8; B.M-1; B.M- 5; B.M-7; B.M-10; B.M-11; R.C-1; R.C-3; R.C-4; R.C-5; R.C-7; R.C- 11; R.C-13; R.C-15; R.C-18 y R.C-23.	2.14c	0.32

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

### d) ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO

Los promedios de crecimiento del análisis de conglomerados (cuadro 4.4), se distribuyen en tres categorías estadísticas diferentes. Las cepas del grupo dos (R.C-2 y R.C-6) alcanzaron el mayor promedio de crecimiento con 1.99 D.O liderando la primera categoría que la comparten, con la cepa A.O-19 del primer grupo, con una densidad óptica de 1.93. Sin embargo estas cepas tienen también la probabilidad estadística de crecimiento del cuarto grupo, que se ubicaron en

la segunda categoría con un promedio de 1,90 D.O. Las 22 cepas del tercer grupo se ubican en la tercera categoría con un promedio de 1,67 D.O de crecimiento.

Cuadro 4.4. Agrupamiento de cepas por la capacidad de crecimiento (D.O).

Grupo	Cepas	Crecimiento D.O	E.E
2	A.O-19	1.93 ab	0.04
1	R.C-2; R.C-6	1.99 a	0.03
4	R.C-8; R.C-9; R.C-10; R.C-12 y R.C-16	1.90 b	0.01
3	A.O-28; A.O-29; A.O-30; A.Q-2; A.Q-3; A.Q-4; A.Q-8; B.M-1; B.M- 5; B.M-7; B.M-10; B.M-11; R.C-1; R.C-3; R.C-4; R.C-5; R.C-7; R.C- 11; R.C-13; R.C-15; R.C-18 y R.C-23.	1.67 c	0.02

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

El resultado del análisis de estos dos criterios de selección permite inferir estadísticamente que la cepa A.O-19 cumple con los objetivos primarios de la investigación. Sin embargo, hay cepas con promedios de halo de hidrólisis de celulosa con mayor amplitud, que merecen un seguimiento para encontrar otras cualidades.

En tal sentido se escogieron 10 cepas (cuadro 4.5) a quienes se les evaluó su capacidad de crecer a diferentes niveles de pH (3-5-7-9), a dos niveles de temperatura y la actividad amilolítica. Se midió el halo de hidrólisis de degradación empleando lugol como revelador dada su incapacidad de pigmentar las zonas en las que el almidón ha sido hidrolizado por su actividad enzimática por parte de los microorganismos (Sánchez *et al.*, 2005).

De las cepas seleccionadas solo tres produjeron el halo de hidrólisis B.M-1; A.O-19 y B.M-7 con promedios 9,33; 8,08 y 3,78 mm, respectivamente; en estudios realizados por Rodríguez *et al.*, (2006), sobre la variabilidad del halo de hidrólisis producido por las bacterias, productoras de enzimas amilolíticas, obtuvieron

halos de hidrólisis que superaron los 15 mm y otras están por debajo de los resultados obtenidos en esta investigación.

Cuadro 4.5. Cepas seleccionadas por el diámetro del halo de degradación y por su capacidad de crecimiento

Cepa	Halo de hidrólisis Celulosa UI/mm	Densidad óptica	Halo de hidrólisis Almidón UI/mm
		Hora 24	
A.O-19	12.3	1.927	8.08
A.Q-3	1.33	1.980	0.00
B.M-1	1.20	1.983	9.33
B.M -5	2.50	1.995	0.00
B.M -7	3.50	1.758	3.78
R.C-2	4.73	1.981	0.00
R.C-4	1.83	1.988	0.00
R.C-6	7.50	1.997	0.00
R.C-13	2.33	1.980	0.00
R.C-18	3.50	1.925	0.00

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

#### e) CRECIMIENTO DE BACTERIAS A DISTINTOS VALORES DE pH

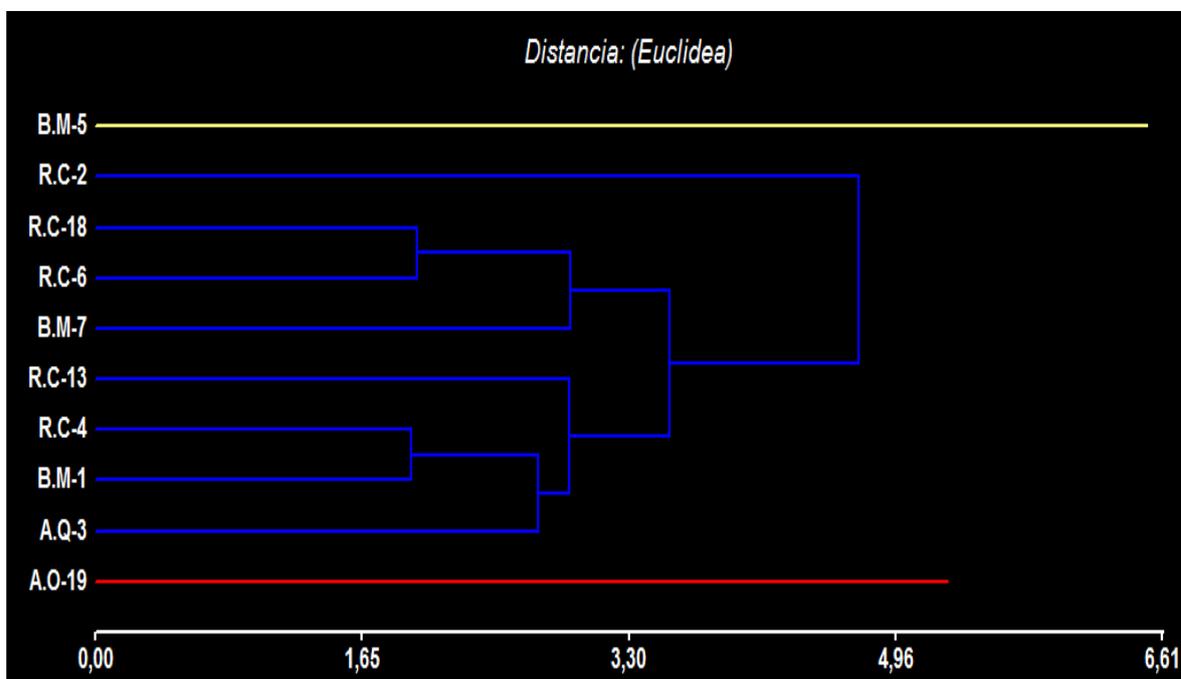


Figura 4.2. Dendrograma en función del crecimiento de las cepas bacterianas a cuatro niveles de pH y a dos de temperatura

En el cuadro 4.6 se muestran las cepas que integran el análisis de conglomerados correspondiente a la evaluación del pH-3, con su respectivo

promedio de las unidades formadoras de colonias, producidas por parte de las bacterias que al ser categorizados, se encontró que las cepas bacterianas evaluadas, no presentaron diferencias significativas por lo cual se formó un solo rango estadístico. En esta categoría se encuentran 10 cepas correspondientes a los grupos 2, 3 y 1 con un promedio de producción de 10,75; 3.67 y  $1.00 \cdot 10^{-8}$  UFC/mL<sup>-1</sup>.

Cuadro 4.6. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a pH 3

Grupo	Cepas pH-3 (H 0)	(UFC/mL <sup>-1</sup> )	E.E
2	B.M-1; B.M-7; R.C-2; R.C-4; R.C-6; R.C-18; R.C-13; A.Q-3	10.75a	1.92
3	B.M-5	3.67a	5.44
1	A.O-19	1.00a	5.44

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

En el cuadro 4.7 se observa claramente que las bacterias evaluadas a pH 5 presentaron diferencias significativas por lo que se forman dos rangos estadísticos. En esta categoría se encuentran 10 cepas correspondientes a los grupos 3, 2 y 1 con un promedio de 41.67; 9.83 y  $2.33 \cdot 10^{-8}$  UFC/mL<sup>-1</sup>. En estudios realizados por Calvo y Zúñiga (2010) manifiestan que el 100% de las cepas de *Bacillus* aisladas crecieron bien a pH 4 y 5.5, lo que indica una buena adaptación del crecimiento a pH ácidos.

Cuadro 4.7 Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a pH 5

Grupo	Cepas pH-5 (H 0)	(UFC/mL <sup>-1</sup> )	E.E
3	B.M-5	41.67a	8.90
2	B.M-1; B.M-7; R.C-2; R.C-4; R.C-6; R.C-18; R.C-13; A.Q-3	9.83b	3.15
1	A.O-19	2.33b	8.90

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Como puede observarse en el cuadro 4.8 con respecto al análisis estadístico del pH-7 se encontró que las cepas bacterianas evaluadas presentaron diferencias significativas por lo tanto se formaron dos rangos estadísticos. En esta categoría se encuentran 10 cepas correspondientes a los grupos 3, 2 y 1 con un promedio de 18.33; 5.79 y  $3.33 \cdot 10^{-8}$  UFC/mL<sup>-1</sup>.

Cuadro 4.8. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a pH 7

Grupo	Cepas pH-7 (H 0)	(UFC/mL <sup>-1</sup> )	E.E
3	B.M-5	18.33a	3.85
2	B.M-1; B.M-7; R.C-2; R.C-4; R.C-6; R.C-18; R.C-13; A.Q-3	5.79b	1.36
1	A.O-19	3.33b	3.85

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

En el cuadro 4.9 se observa claramente que las bacterias evaluadas a pH 9 presentaron diferencias significativas formándose dos rangos estadísticos. En esta categoría se encuentran 10 cepas correspondientes a los grupos 3, 2 y 1 con un promedios de 14.67; 5.08 y  $2.00 \cdot 10^{-8}$  UFC/mL<sup>-1</sup> respectivamente.

Cuadro 4.9 Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a pH 9

Grupo	Cepas pH-9 (H 0)	(UFC/mL <sup>-1</sup> )	E.E
3	B.M-5	14.67a	3.21
2	B.M-1; B.M-7; R.C-2; R.C-4; R.C-6; R.C-18; R.C-13; A.Q-3	5.08b	1.14
1	A.O-19	2.00b	3.21

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Como puede observarse en el cuadro 4.10 con respecto al análisis estadístico del pH-3 a la hora 24 se encontró que las cepas bacterianas evaluadas presentaron diferencias significativas por lo tanto se formaron dos rangos estadísticos. En esta categoría se encuentran 10 cepas correspondientes a los grupos 3, 2 y 1 con promedios de 0.67; 0.13 y  $0.00 \cdot 10^{-8}$  UFC/mL<sup>-1</sup> respectivamente.

Cuadro 4.10. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a pH 3

Grupo	Cepas pH-3 (H 24)	(UFC/mL <sup>-1</sup> )	E.E
1	A.O-19	0.67a	0.20
2	B.M-1; B.M-7; R.C-2; R.C-4; R.C-6; R.C-18; R.C-13; A.Q-3	0.13b	0.07
3	B.M-5	0.00b	0.20

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

En el cuadro 4.11 se observa claramente que las bacterias evaluadas a pH 5 a la hora 24 presentaron diferencias significativas por esta razón se formaron dos rangos estadísticos. En esta categoría se encuentran 10 cepas

correspondientes a los grupos 3, 2 y 1 con promedios de 1.67; 0.83 y  $0.00 \cdot 10^{-8}$  UFC/mL<sup>-1</sup> respectivamente.

Cuadro 4.11. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a pH 5

Grupo	Cepas pH-5 (H 24)	(UFC/mL <sup>-1</sup> )	E.E
1	A.O-19	1.67a	0.72
2	B.M-1; B.M-7; R.C-2; R.C-4; R.C-6; R.C-18; R.C-13; A.Q-3	0.83a	0.25
3	B.M-5	0.00a	0.72

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Como puede observarse en el cuadro 4.12 con respecto al análisis estadístico del pH-7 a la hora 24 se encontró que las cepas bacterianas evaluadas presentaron diferencias significativas por lo tanto se formaron dos rangos estadísticos. En esta categoría se encuentran 10 cepas correspondientes a los grupos 2, 3 y 1 con un promedio de producción de 5.83; 5.00 y  $2.33 \cdot 10^{-8}$  UFC/mL<sup>-1</sup>.

Cuadro 4.12 Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a pH 7

Grupo	Cepas pH-7 (H 24)	(UFC/mL <sup>-1</sup> )	E.E
2	B.M-1; B.M-7; R.C-2; R.C-4; R.C-6; R.C-18; R.C-13; A.Q-3	5.83a	1.21
3	B.M-5	5.00a	3.43
1	A.O-19	2.33a	3.43

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

En el cuadro 4.13 se observa claramente que las bacterias evaluadas a pH-9 a la hora 24 presentaron diferencias significativas por esta razón se formaron dos rangos estadísticos. En esta categoría se encuentran 10 cepas correspondientes a los grupos 3, 2, y 1 con promedios de 5.67; 2.29 y  $0.33 \cdot 10^{-8}$  UFC/mL<sup>-1</sup> respectivamente.

Cuadro 4.13. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a pH 9

Grupo	Cepas pH-9 (H 24)	(UFC/mL <sup>-1</sup> )	E.E
3	B.M-5	5.67a	1.49
2	B.M-1; B.M-7; R.C-2; R.C-4; R.C-6; R.C-18; R.C-13; A.Q-3	2.29ab	0.53
1	A.O-19	0.33b	1.49

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

### f) CRECIMIENTO A TEMPERATURAS DE 50 Y 70°C

En el cuadro 4.14 correspondiente a la evaluación de la temperatura a los 50°C se revelan tres grupos correspondientes al análisis de conglomerados, los cuales se forman debido al grado de similitud existente entre las medias de los diámetros del halo. Los promedios se distribuyen en dos categorías estadísticas diferentes. La cepa del grupo tres B.M-5 alcanzó el mayor promedio crecimiento con  $66,33 \cdot 10^{-7} \text{UFC/mL}^{-1}$  y por tanto lidera la primera categoría. El segundo rango estadístico le correspondió a los grupos 1 y 2 conformado por las cepas A.O-19; B.M-1; B.M-7; R.C-2; R.C-4; R.C-6; R.C-18; R.C-13; A.Q-3 con promedios de 16.67 y  $3,58 \cdot 10^{-7} \text{UFC/mL}^{-1}$  respectivamente.

Cuadro 4.14. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a 50°C

Grupo	Crecimiento 50°C	(UFC/mL <sup>-1</sup> )	E.E
3	B.M-5	66.33a	8.19
1	A.O-19	16.67b	8.19
2	B.M-1; B.M-7; R.C-2; R.C-4; R.C-6; R.C-18; R.C-13; A.Q-3	3.58b	2.90

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

En el cuadro 4.15 se observa claramente que las bacterias evaluadas a 70°C presentaron diferencias significativas por esta razón se formaron dos rangos estadísticos. La cepa del primer grupo la A.O-19 alcanzó el mayor promedio crecimiento con  $2,67 \cdot 10^{-7} \text{UFC/mL}^{-1}$  y por tanto lidera la primera categoría. El segundo rango estadístico le correspondió a los grupos 2 y 3 conformado por las cepas B.M-1; B.M-7; R.C-2; R.C-4; R.C-6; R.C-18; R.C-13; A.Q-3 y B.M-5 con promedios de 0.17 y  $0,00 \cdot 10^{-7} \text{UFC/mL}$  respectivamente.

Cuadro 4.15. Agrupamiento de cepas bacterianas por su crecimiento a 70°C

Grupo	Crecimiento 70°C	(UFC/mL <sup>-1</sup> )	E.E
1	A.O-19	2.67a	0.35
2	B.M-1; B.M-7; R.C-2; R.C-4; R.C-6; R.C-18; R.C-13; A.Q-3	0.17b	0.12
3	B.M-5	0.00b	0.35

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

En el cuadro 4.16 aparecen las cepas que integran cada grupo y su respectivo promedio del halo de hidrólisis correspondiente a la actividad amilolítica, que al

ser categorizados las diferencias resultaron en dos rangos estadísticos. Ubicándose en la primera categoría la cepa del tercer grupo la (B.M-5) con un promedio de halo de hidrólisis del almidón de 9,33 mm, liderando la primera categoría que la comparte, con la cepa A.O-19 del primer grupo, con un promedio de 8,08 mm respectivamente; por su parte el segundo rango estadístico está conformado por las cepas restantes del segundo grupo que alcanzaron un promedio de halo de hidrólisis de 0,47 mm respectivamente.

Cuadro 4.16. Agrupamiento de cepas por el halo de hidrólisis del almidón

Grupo	Hidrólisis del almidón	(UFC/mL <sup>-1</sup> )	E.E
3	B.M-5	9.33a	0.84
1	A.O-19	8.08a	0.84
2	B.M-1; B.M-7; R.C-2; R.C-4; R.C-6; R.C-18; R.C-13; A.Q-3	0.47b	0.30

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

## 4.2. CEPAS FÚNGICAS

### 4.2.2. AISLAMIENTO

Los resultados del aislamiento de las cepas fúngicas se presentan en el cuadro 4.17, se aprecia que el 38,5% de las cepas aisladas proviene del área convencional; que a pesar que es un área donde se aplican grandes cantidades de agroquímicos, los hongos probablemente se han adaptado a estas condiciones. En orden de importancia por el número de hongos aislados le corresponde a las muestras tomadas en el compost con 19,2%.

Cuadro 4.17. Hongos aislados en cada ambiente

Ambientes	Forma de captura		Total	%
	Trampa	Muestra		
Área orgánica	12	8	20	15,4
Área convencional	34	16	50	38,5
Bosque	2	14	16	12,3
Área cañera		19	19	14,6
Compost		25	25	19,2
Total	48	82	130	100

### 4.2.3 SELECCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS DE ACUERDO A CARACTERÍSTICA DESEABLE

#### a) SELECCIÓN POR SU CAPACIDAD BIODEGRADATIVA Y POR SU CRECIMIENTO

Cuadro 4.18. Degradación de celulosa cristalina y crecimiento radial de aislados fúngicos

Ambientes	Hongos	Halo de hidrolisis		Crecimiento radial	
		mm.....DS	mm.....DS	mm.....DS	mm.....DS
Área orgánica	A.O-1	7.67	0.47	20.75	4.43
	A.O-2	6.67	0.47	9.33	0.31
	A.O-3	5.00	0.82	21.17	3.38
	A.O-4	7.00	0.82	19.77	1.33
	A.O-5	6.00	1.41	19.17	1.24
	A.O-6	6.00	0.82	15.29	0.56
	A.O-7	2.83	1.04	16.50	0.41
	A.O-8	10.67	0.31	42.25	1.24
Área de compost	A.C-1	1.47	0.39	15.67	0.24
Área de bosque	B.M-1	3.00	0.82	20.58	0.31
	B.M-2	5.33	0.94	21.42	0.46
Área cañera	R.C- 1	4.67	1.70	18.57	0.31
	R.C- 2	4.33	0.47	11.38	1.46
	R.C- 3	7.67	0.47	26.96	0.12
	R.C- 4	3.67	1.89	12.58	1.61
	A.Q-1	1.33	0.94	14.20	0.42
	A.Q-2	4.33	1.25	16.00	0.61
	A.Q-3	7.67	0.47	6.25	0.74
	A.Q-4	4.00	0.82	14.63	0.47
A.Q-5	3.17	0.62	5.17	0.62	
A.Q-6	5.33	3.30	15.67	0.74	
A.Q-7	2.17	0.78	29.75	1.61	
A.Q-8	10.33	1.25	29.88	4.61	
A.Q-9	2.67	0.47	15.46	0.16	

Área de agricultura convencional	A.Q-10	2.67	0.47	16.50	0.71
	A.Q-11	2.67	1.70	23.21	0.88
	A.Q-12	4.33	0.94	14.75	0.74
	A.Q-13	4.33	0.47	14.75	0.35
	A.Q-14	5.00	1.78	15.75	0.41
	A.Q-15	3.67	0.47	18.33	0.31
	A.Q-16	3.33	1.25	12.93	0.31
	A.Q-17	2.00	0.82	11.29	0.87
	A.Q-18	3.17	0.24	14.88	0.67
	A.Q-19	3.67	0.94	20.54	0.56
	A.Q-20	3.77	0.87	13.42	0.42
	A.Q-21	3.17	0.24	16.00	2.07
	A.Q-22	3.33	1.25	16.09	0.48
	A.Q-23	5.00	0.82	17.58	1.56
	A.Q-24	2.67	1.25	15.58	0.85
	A.Q-25	1.67	0.47	14.21	0.31
	A.Q-26	5.67	0.47	20.04	1.55
	A.Q-27	5.00	0.82	22.25	0.61
	A.Q-28	3.67	0.47	18.21	0.86
	A.Q-29	3.67	0.47	19.08	0.96
	A.Q-30	5.00	1.41	21.08	0.92
	A.Q-31	2.23	0.05	19.42	0.92
	A.Q-32	4.33	0.47	18.88	0.62
	A.Q-33	3.33	0.47	18.58	2.04

**b) ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS EN FUNCIÓN DEL HALO DE DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA Y EL CRECIMIENTO**

Los datos de estos dos criterios de selección al ser sometidos al análisis de conglomerados, con la intención de agrupar las cepas de mayor similitud, (figura 3) permitió definir seis grupos al interior de cada criterio.

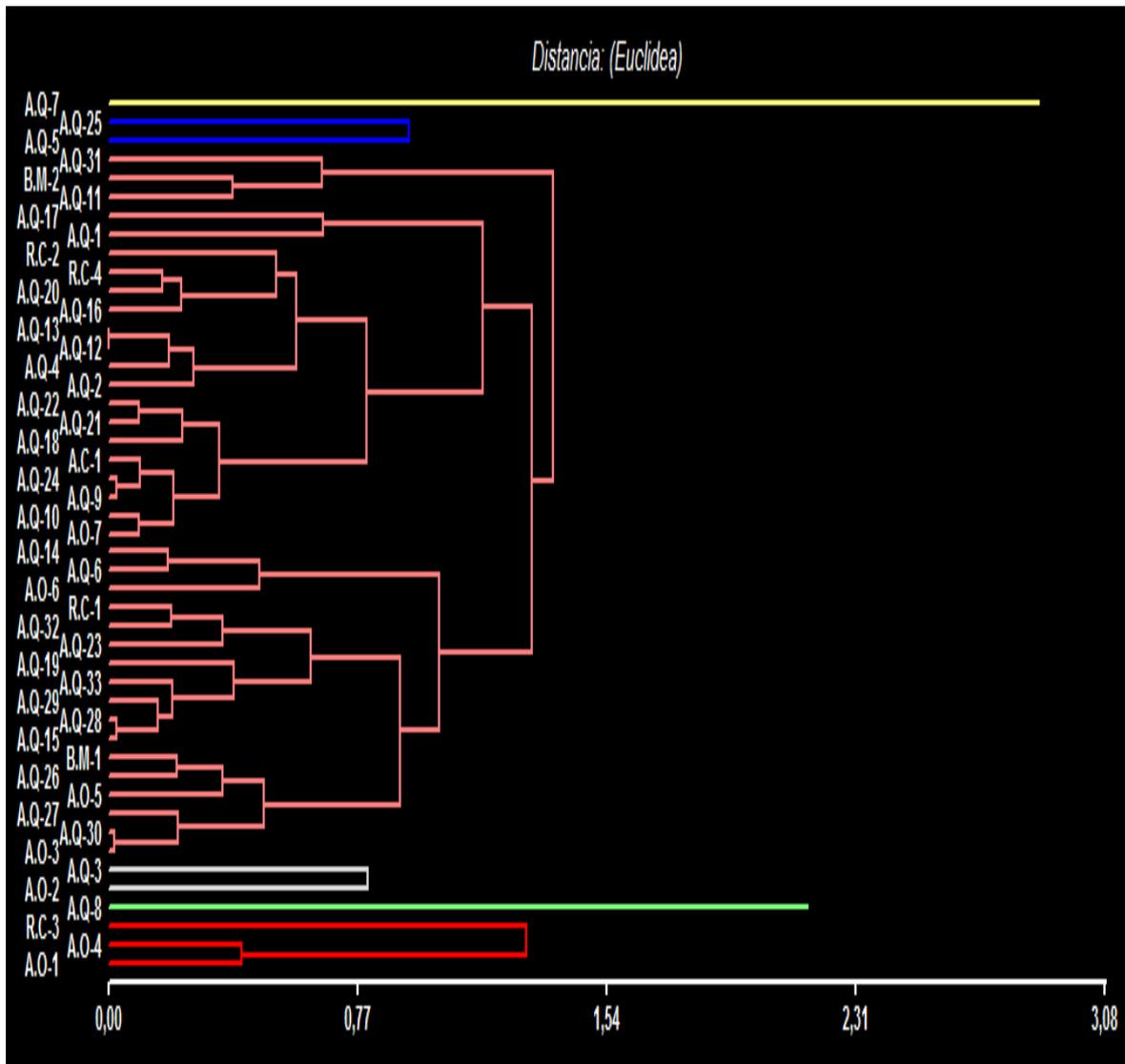


Figura 3. Dendrograma en función del halo de degradación de la celulosa y el crecimiento en las cepas fúngicas

### c) ANÁLISIS DE DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA

En el cuadro 4.19 aparecen las cepas que integran cada grupo y la media del halo de hidrólisis, que al ser categorizados las diferencias, resultaron tres rangos estadísticos. Ubicándose en la primera categoría la cepa del cuarto grupo la A.Q-8 con un promedio de halo de hidrólisis de la celulosa de 10.33 mm. En su orden, los valores de esta primera categoría superan los encontrados por Villalba *et al.*, (2004), quienes obtuvieron resultados de degradación de la celulosa por hongos del genero *Penicillium, sp*; que no superaron los 0.7 y 0.9 cm de diámetro en cada caso.

Por su parte el segundo rango estadístico le correspondió al primero y al quinto grupo, conformado por las cepas A.O-1; A.O-4; R.C-3, A.O-2; A.Q-3 que alcanzaron un promedio de halo de hidrólisis de 7.44 y 7.17 mm. Finalmente, las restantes 40 cepas se encuentran en los grupos 6, 2 y 3, comparten la tercera categoría con promedios de halo de hidrólisis de 3.86; 2.42 y 2.17 mm respectivamente.

Cuadro 4.19. Agrupamiento de cepas fúngicas por el halo de hidrólisis de la celulosa

Grupo	Hidrólisis de la celulosa	Halo (mm)	E.E
4	A.Q-8	10.33a	0.87
1	A.O-1; A.O-4; R.C-3.	7.44b	0.50
5	A.O-2; A.Q-3	7.17b	0.62
6	A.O-3; A.O-5; A.O-6; A.Q-1; A.Q-2; A.Q-4; A.Q-6; A.Q-9; A.Q-10; A.Q-11; A.Q-12; A.Q-13; A.Q-14; A.Q-15; A.Q-16; A.Q-17; A.Q-18; A.Q-19; A.Q-20; A.Q-21; A.Q-22; A.Q-24; A.Q-32; A.Q-23; A.Q-26; A.Q-27; A.Q-28; A.Q-29; A.Q-30; A.Q-31; A.Q-32; A.Q-33; B.M-1; B.M-2 R.C-1; R.C-2; R.C-4; A.C-1.	3.86c	0.14
2	A.Q-5; A.Q-25	2.42c	0.62
3	A.Q-7	2.17c	0.87

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

#### d) ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO

Los promedios de crecimiento de los seis grupos de cepas resultantes del análisis de conglomerados, se muestran en el cuadro 4.20 y se distribuyen en cuatro categorías estadísticas diferentes. La cepa del cuarto grupo la A.Q-8 alcanzó el mayor promedio de crecimiento 29.88 mm y por tanto lidera la primera categoría que la comparten, con la cepa A.Q-7 del tercer grupo, con un crecimiento radial de 29.75 mm.

Por su parte el segundo rango estadístico está formado por el primer grupo conformado por las cepas A.O-1; A.O-4; R.C-3 que alcanzaron un promedio de

halo de hidrólisis de 22.49 mm. Seguidamente en la tercera categoría se encuentran 37 cepas correspondientes al sexto grupo con un promedio de crecimiento de 17.04 mm. Por último las 4 cepas restantes del quinto y segundo grupo le corresponden la cuarta categoría con un promedio de 7.79 y 4.28 mm, de crecimiento respectivamente.

Cuadro 4.20. Agrupamiento de cepas por su capacidad de crecimiento

Grupo	Capacidad de crecimiento	Halo (mm)	E.E
4	A.Q-8	29.88a	1.85
3	A.Q-7	29.75a	1.85
1	A.O-1; A.O-4; R.C-3. A.O-3; A.O-5; A.O-6; A.Q-1; A.Q-2; A.Q-4; A.Q-6; A.Q-9; A.Q-10; A.Q-11; A.Q-12; A.Q-13; A.Q-14; A.Q-15; A.Q-16; A.Q-17; A.Q-18;	22.49b	1.07
6	A.Q-19; A.Q-20; A.Q-21; A.Q-22; A.Q-24; A.Q-32; A.Q-23; A.Q-26; A.Q-27; A.Q-28; A.Q-29; A.Q-30; A.Q-31; A.Q-32; A.Q-33; B.M-1; B.M-2 R.C-1; R.C-2; R.C-4; A.C-1.	17.04c	0.30
5	A.O-2; A.Q-3	7.79d	1.31
2	A.Q-5; A.Q-25	4.28d	1.31

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Cuadro 4.21. Cepas seleccionadas por el diámetro del halo de degradación y por su capacidad de crecimiento

Cepas	Halo de hidrólisis	Crecimiento radial	Halo de hidrólisis
	Celulosa (mm)	Hora 24 (mm)	Almidón (mm)
A.O-1	7.67	20.75	10.33
A.O-2	6.67	9.33	11.33
A.O-3	5.00	21.17	9.00
A.O-4	7.00	19.77	8.67
A.O-5	6.00	19.17	9.00
A.O-6	6.00	15.29	11.00
A.Q-2	4.33	16.00	11.00
A.Q-3	7.67	6.25	10.00
A.Q-7	2.17	29.75	12.00
A.Q-8	10.33	29.88	11.33
R.C-3	4,67	18.57	8.67

### e) CRECIMIENTO A DISTINTOS VALORES DE pH

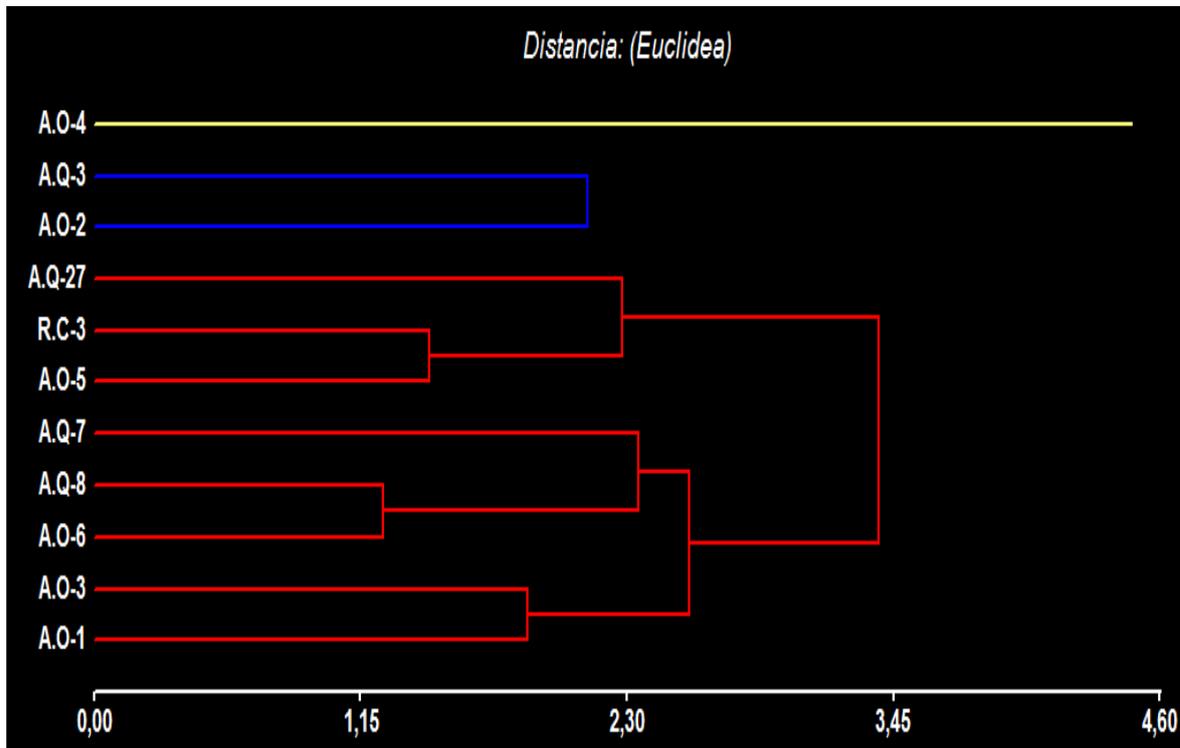


Figura 4. Dendrograma en función del crecimiento a diferentes pH y temperaturas

En el cuadro 4.22 se observa claramente que en la producción de biomasa por parte de los hongos celulolíticos evaluados a pH-3, que al ser categorizados se encontró que no presentaron diferencias significativas por esta razón se formó un solo rango estadístico. En esta categoría se encuentran 11 cepas correspondientes a los grupos 1, 2 y 3 con un promedio de crecimiento de 2.70; 2.53 y 1.93  $\text{g/mL}^{-1}$  de crecimiento respectivamente.

Cuadro 4.22. Agrupamiento de cepas fúngicas por su crecimiento a pH 3

Grupo	Cepas pH-3	( $\text{g/mL}^{-1}$ )	E.E
1	A.O-1; A.O-3; A.Q-7; A.Q-8; A.O-5; A.O-27; R.C-3.	2.70a	0.42
2	A.O-2; A.Q-3.	2.53a	0.84
3	A.O-4.	1.93a	1.19

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

En el cuadro 4.23 aparecen las cepas que integran cada grupo en el análisis de conglomerados correspondiente a la evaluación del pH-5, con su respectivo

promedio de la producción de biomasa por parte de los hongos, que al ser categorizados, se encontró que las cepas fúngicas evaluadas, presentaron diferencias significativas por lo cual se formó dos rangos estadísticos. En la primera categoría se encuentran 2 cepas correspondientes al grupo 2 con un promedio de crecimiento de 5.08 g/mL<sup>-1</sup>; el segundo rango está por el grupo 1 y 2 con un promedio 1.93 y 1.80 g/mL<sup>-1</sup> de producción de biomasa.

Cuadro 4.23. Agrupamiento de cepas fúngicas por su crecimiento a pH 5

Grupo	pH-5	(g/mL <sup>-1</sup> )	E.E
2	A.O-2; A.Q-3.	5.08a	0.64
1	A.O-1; A.O-3; A.Q-7; A.Q-8; A.O-5; A.O-27; R.C-3.	1.93b	0.32
3	A.O-4.	1.80b	1.91

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey (P≤ 0.05).

En el cuadro 4.24 aparecen las cepas que integran cada grupo en el análisis de conglomerados correspondiente a la evaluación del pH-7, con su respectivo promedio de la producción de biomasa por parte de los hongos, que al ser categorizados, se encontró que las cepas fúngicas evaluadas, no presentaron diferencias significativas por lo cual se formó un solo rango estadístico. En esta categoría se encuentran 11 cepas correspondientes a los grupos 1, 2 y 3 con un promedio de crecimiento de 2.14; 2.10 y 0.97 g/mL<sup>-1</sup> de producción de biomasa.

Cuadro 4.24. Agrupamiento de cepas fúngicas por su crecimiento a pH 7

Grupo	Crecimiento a pH-7	(g/mL <sup>-1</sup> )	E.E
1	A.O-1; A.O-3; A.Q-7; A.Q-8; A.O-5; A.O-27; R.C-3.	2.14a	0.46
2	A.O-2; A.Q-3.	2.10a	0.91
3	A.O-4.	0.97a	1.29

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey (P≤ 0.05).

En el cuadro 4.25 aparecen las cepas que integran cada grupo en el análisis de conglomerados correspondiente a la evaluación del pH-9, con su respectivo promedio de la producción de biomasa por parte de los hongos, que al ser categorizados, se encontró que las cepas fúngicas evaluadas, no presentaron diferencias significativas por lo cual se formó un solo rango estadístico. En esta

categoría se encuentran 11 cepas correspondientes a los grupos 2, 1 y 3 con un promedio de crecimiento de 2.18; 1.14 y 0.10 g/mL<sup>-1</sup> de crecimiento respectivamente.

Cuadro 4.25. Agrupamiento de cepas fúngicas por su crecimiento a pH 9

Grupo	Crecimiento a pH-9	(g/mL <sup>-1</sup> )	E.E
2	A.O-2; A.Q-3.	2.18a	0.68
1	A.O-1; A.O-3; A.Q-7; A.Q-8; A.O-5; A.O-27; R.C-3.	1.14a	0.34
3	A.O-4.	0.10a	0.96

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey (P≤ 0.05).

#### f) CRECIMIENTO A DISTINTAS TEMPERATURAS

En el cuadro 4.26 correspondiente a la evaluación de la temperatura a los 50°C se revelan cinco grupos correspondientes al análisis de conglomerados, los cuales se forman debido al grado de similitud existente entre las medias de los diámetros del halo. Los promedios de producción de biomasa a 50°C se distribuyen en dos categorías estadísticas diferentes. La cepa del grupo tres A.O-4 alcanzó el mayor promedio crecimiento con 1.60 g/mL<sup>-1</sup> y por tanto lidera la primera categoría. El segundo rango estadístico le correspondió a los grupos 1 y 2 conformado por las cepas A.O-1; A.O-3; A.Q-7; A.Q-8; A.O-5; A.O-27; R.C-3; A.O-2 y A.O-6; A.Q-3 las cuales no presentaron producción de biomasa.

Cuadro 4.26. Agrupamiento de cepas fúngicas por su crecimiento a 50°C

Grupo	Crecimiento a 50°C	(g/mL <sup>-1</sup> )	E.E
3	A.O-4.	1.60a	0.41
2	A.O-2; A.Q-3.	0.00b	0.29
1	A.O-1; A.O-3; A.Q-7; A.Q-8; A.O-5; A.O-27; R.C-3.	0.00b	0.15

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey (P≤ 0.05).

En cuanto a la evaluación de la producción de biomasa fúngica a 70°C se encontró que ninguna de las 11 cepas evaluadas presentó crecimiento, lo que coincide por Tortarolo *et al.* (2008), quienes manifiestan que a partir de los 60 °C los hongos termófilos desaparecen.

En el cuadro 4.27 aparecen las cepas que integran cada grupo y su respectivo promedio del halo de hidrólisis correspondiente a la actividad amilolítica, que al ser categorizados las diferencias resultaron dos rangos estadísticos. Ubicándose en la primera categoría las cepas del grupo 2 (A.O-2; A.Q-3) con un promedio de halo de hidrólisis del almidón de 11.17 mm, las cuales lideran la primera categoría que la comparten, con las cepas A.O-1; A.O-3; A.Q-7; A.Q-8; A.O-5; A.O-27; R.C-3 del grupo 1, con una promedio de halo de hidrólisis de 10.17 mm respectivamente.

El segundo rango estadístico lo comparten el grupo 1 y 3 que alcanzaron un promedio de halo de hidrólisis de 8.67 mm.

Cuadro 4.27. Agrupamiento de cepas por el halo de hidrólisis del almidón

<b>Grupo</b>	<b>Hidrólisis del almidón pH-9</b>	<b>Halo (mm)</b>	<b>E.E</b>
<b>2</b>	A.O-2; A.Q-3.	11.17a	0.58
<b>1</b>	A.O-1; A.O-3; A.Q-7; A.Q-8; A.O-5; A.O-27; R.C-3.	10.17ab	0.29
<b>3</b>	A.O-4.	8.67b	0.82

Medias con la misma letra son iguales estadísticamente Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

### **4.3. CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA A.O-19.**

A la cepa A.O-19 se le realizaron tinciones en la cuales resulto que produce endosporas, es tinción Gram positiva. Además es catalasa positiva.

# CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 5.1. CONCLUSIONES

- ✚ Se aislaron un total de 223 cepas de microorganismos autóctonos (93 bacterias y 130 hongos) de diferentes hábitats, siendo el método de las diluciones seriadas el más eficiente.
- ✚ Por la capacidad de degradación de la celulosa se seleccionaron 77 microorganismos (47 hongos y 30 bacterias).
- ✚ La cepa bacteriana A.O-19 proveniente del área orgánica del campus politécnico de la ESPAM-MFL produjo el mayor de hidrólisis de la celulosa (12,33 mm) y comparte el mejor rango estadístico con las cepas R.C-2 y R.C-6 en cuanto a su capacidad de crecimiento.
- ✚ La cepa de bacteria B.M-7, aislada del bosque perteneciente al campus politécnico, es la más eficiente en actividad amilolítica con un promedio de halo de hidrólisis de almidón de 9.33 mm, seguida de la A.O-19 que alcanzo 8.08 mm.
- ✚ La cepa fúngica A.Q-8 proveniente del área convencional del campus politécnico de la ESPAM-MFL produjo el mayor de hidrólisis de la celulosa (10,33 mm) y comparte el mejor rango estadístico con la cepa A.Q-7 en cuanto a su capacidad de crecimiento.
- ✚ La cepa de fúngica A.Q-7 aislada del área convencional perteneciente al campus politécnico, es la más eficiente en actividad amilolítica con un promedio de halo de hidrólisis de almidón de 12.00 mm, seguida de las cepas A.Q-8 y A.O-2 que alcanzaron un promedio de 11.33 mm.

## 5.2. RECOMENDACIONES

- ✚ La cepa A.O-19 y la A.Q-8 deben ser evaluadas en un medio que contenga lignina.
- ✚ Determinar que enzimas liberan las cepas A.O-19 y la A.Q-8 y evaluar su actividad en diferentes sustratos.
- ✚ Realizar la identificación molecular y comparar los resultados mediante el banco de genes para su utilización en el compostaje.
- ✚ Evaluar distintas mezclas y materias primas controlando la relación Carbono/Nitrógeno adecuada, valorar si dichas mezclas logran aumentar y mantener la temperatura, por más tiempo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, J. 2001. Descomposición y ciclo de nutrientes, en ecosistemas terrestres de México. Mex. Acta Zool. Mex. # 1. P 11-27.
- Álvarez, J. Naranjo, E. 2003. Ecología del suelo en la selva tropical húmeda de México. Xalapa. Mex. P 123- 263.
- Allen, S. Janda, W. Koneman, E. Procop, G. Schrenckenberger, P. Winn, W. Woods, G. 2008. Koneman diagnóstico Microbiológico. Argentina. Panamericana. P 1383.
- Arroyo, J. 2010. Selección de microorganismos fúngicos productores de enzimas celulolíticas para hidrolizar bagazo de agave (Agave tequilana). Tesis. Biólogo. Universidad Michoacana san Nicolás Hidalgo. Morelia, Michoacán México. P.
- Belzarini, M, G., Casanoves, F., ADi Rienzo, J., Laura A González. & Robledo, C. W. 2001. Infostat Software estadístico Versión 1. Córdoba Argentina
- Benavides, G. Hermida, A. 2008. Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los páramos Cruz Verde Y Guasca (Cundinamarca). Tesis Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. P.
- Borrero, C. Silva, M. 2005. Efectos de Trichoderma (in vitro) en los microorganismos no patógenos descomponedores de materia orgánica de un suelo oxisol clase IV del Piedemonte Llanero. Villavicencio. Colomb. Orinoquia. 9 (002): 6-14.
- Calvo, p. Zúñiga, D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de bacillus spp., aisladas de la rizósfera de papa (Solanum tuberosum). Lima-Perú. Ecología Aplicada. Vol. 9. (1). P 31-39.
- Campbell, N. Reece, J. 2007. Biología. 7 ed. Panamericana. Madrid-España. P 71-72.
- Campbell, M. Farrell, S. 2004. Bioquímica. 4 ed. Thomson. P 135- 450.
- Castillo, F. Roldán, M. Blasco, R. Huertas, M. Caballero, F. Moreno, V. Luque, M. 2005. Biotecnología ambiental. Tébar. Madrid-España.

- Chamorro, C. 2001. El suelo maravilloso teatro de la vida. Acad. Colomb. Cienc. 25 (97): 484-486.
- Chávez, J. Martínez, S. Contreras, M. Escamilla, E. 2004. Celulosa bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. México. Revista especializada de ciencias químico-biológicas. 7 (001): 18-25.
- Chávez, M. 2006. Producción de *Trichoderma* sp. Y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis Microbiología Industria-Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C.
- Díaz, R. Gamazo, C. López, I. 2005. Manual práctico de microbiología. 3 ed. Barcelona-España. Masson. P 12-13.
- De Carlo, E; Benintende, S. Rosa, A.; Cariello, M; Castañeda, L.; Figoni, E; Grasso, N.; Ruiz, A.; Mascheroni, F. 2001. Estudio de la población microbiana en las etapas iniciales de compostaje. Rev. Ceres; Vol. 48 (280). P 699-715.
- Fanju, M. Hiriart, M. 2008. Biología funcional de los animales. 2 ed. México. P 116.
- Flórez, J. 2009. Agricultura Ecológica. Madrid-España. Mundi-Prensa. P 58-60.
- Frioni, L. 1999. Procesos microbianos. Argentina. UNRC. P 44-49.
- Gaitán, D. y Pérez, L 2007 "Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*)". Tesis. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. P 64.
- Garrido, A. Teijón, J. Blanco, D. Villaverde, C. Mendoza, C. Ramírez, J. 2006. Fundamentos de Bioquímica estructural. Tébar. 2 ed. Madrid España. P 194-196.
- Gutiérrez, V. Pinzón, A. Casas, J. Martínez, M. 2008. Determinación de la actividad celulolítica del suelo proveniente de cultivos de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Colomb. Agronomía colombiana. Vol. 26(3): 497-504.
- Grajales, O. 2005. Apuntes de bioquímica vegetal. Bases para su aplicación fisiológica. P 43-44. UNAM. México D.F.

- Hans, G. 1997. Microbiología general. Barcelona. Omega. P 581-606.
- Izarra, M. Santayana, M. Villena, G. Gutiérrez, M. 2010. Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanas por *Aspergillus niger*. Bogotá Col. Revista Colombiana de biotecnología. Vol. 12 (2). P 139-150.
- Koolman, J. Rohm, K. 2004. Bioquímica: texto y atlas. 3 ed. Madrid-España. Medica panamericana. P 88.
- Kolmans, E. Vásquez, D. 1999. Manual de Agricultura Ecológica. Una introducción a los principios básicos y su aplicación. 2 ed. Grupo de Agricultura Orgánica Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales. La Habana. P 4-8.
- Linares, C. Monedero, M. 2004. Uso, manejo y conservación de los suelos. 1 ed. La Habana. Cuba. P 6.
- Lynd, L. Weimer, P. van Zyl, W. Pretorius, I. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Micro. & Mol.Bio.Rev. Vol. 66. P 506-577.
- Mandolesi, M. Sagardoy, M. (2004). Biología del suelo. Guía de estudio. U.N.S. P 42,52, 23.
- Mikán, J. castellano, D. 2004. Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. Bogotá. Colomb. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol. 6 (1). P 58-71.
- Milián, G. 2009. Obtención de cultivos de *Bacillus* spp. Y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*). Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos" Tesis Dr. Ciencias Veterinarias. Matanzas.
- Nakamura, K. Haruta, S. Nguyen, H. Ishii, M. Igarashi, Y. 2004. Enzyme production-based approach for determining the functions of microorganisms within a community. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 70 (6). P. 3329-3336.
- Navarro. J. Navarro. S. 2003. Química Agrícola. 2 ed. Madrid. España. Mundi. Prensa. P 15, 21, 30.

- Munero, P. Gonzales, J. Pérez, C. Manso, M. Díaz, F. 2005. Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica de *Hyphomycetes* nativos de la provincia de villa clara.
- Montoya, H. 2008. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2 ed. universidad de Antioquia. Medellín Col.
- Olalde, V. Aguilera, I. 1998. Microorganismos y biodiversidad. Terra Latinoamericana. Chapingo México. Vol. 16. (003). P 289-292.
- Pelczar, M. J. & Reid, R. D. 1966. Microbiología. Ed. Castilla. España
- Rodríguez, Z. Boucourt, R. Rodríguez, J. Albelo, N. Nuñez, O. Herrera, F. 2006. Aislamiento y selección de microorganismos con capacidad de degradar el almidón. La Habana, Cuba. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. Vol. 40. (3). pp. 349-354.
- Rodríguez, E. Gamboa, M. Hernández, F. García, J. 2005. Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio. P 149-153. C.R.
- Sánchez, C. Mejía, C. Figueroa, C. Esquivia, M. Agudelo, L. Zapata, N. Gómez, M. 2005. Estudio de cepas nativas amilolíticas. Medellín Colomb. Vitae, Revista de la facultad de química farmacéutica. 12 (2): 21-28.
- Sánchez, V. Martínez, L. Zavala, E. Ramírez, M. (2012). Nuevos registros de *Trichoderma crassum* para México y su variación morfológica en diferentes ecosistemas. Revista mexicana de micología. P 17-26.
- Stanier, R. S. 1996. Microbiología. Barcelona. Editorial Revert. 2 ed, 750.
- Tortarolo, M. Pereda, M. Palma, M. Arrigo, M. 2008. Influencia de la inoculación de microorganismos sobre la temperatura en el proceso de compostaje. Ciencia del suelo. Vol. 26. (1). P 41-50.
- Tortora, G. Funke, B., Case, C. 2007. Introducción a la microbiología. 9 ed. Buenos Aires-Argentina. Panamericana. P 3, 160-170, 292-293.
- Valencia, H. 2004. Manual de prácticas de microbiología básica. 1 ed. Bogotá Colombia. Unibiblos. P 37.
- Vilches, L. 2002. Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis Biólogo. Lima-Perú.

Villalba, L. Mikán, J. Sánchez, J. (2004). Actividades hidrolíticas y caracterización isoenzimática de poblaciones microbianas aisladas del patrimonio documental del Archivo General de Colombia. Vol.2 (2). P 50-58.

Voet. D. Voet. J. 2006. Bioquímica. 3 ed. Buenos Aires-Argentina. Panamericana. P 6.

Yúfera, E. 1999. Química orgánica básica y aplicada de la molécula a la industria. Reverté. Barcelona España. P 899.

# **ANEXOS**

**ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVOS Y REACTIVOS**

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Composición</b>	<b>(g/L)</b>
AGAR SABORAUD MODIFICADO (hongos)	Dextrosa Celulosa Agar pH	10 15 15 5.6+/-2
AGAR NUTRITIVO MODIFICADO. (bacterias)	PEPTONA Extracto de levadura Cloruro de sodio Celulosa Agar pH	6 2 5 15 15 7.3+/-2
Agar CMC 1%(p/v)	Carboximetilcelulosa Extracto de levadura Peptona universal Sulfato de amonio Cloruro de calcio Fosfato monobásico de potasio Fosfato dibásico de potasio Agar pH	10 2.5 2.5 0.5 0.5 0.1 0.1 15 7.0+/-2
Caldo de cultivo para bacterias.	Peptona Extracto de levadura Cloruro de sodio pH	10 10 5 7.3+/-2
Caldo arroz	Arroz molido pH	30 5.6+/-2
Agar almidón	Almidón soluble Sulfato de amonio Cloruro de calcio Fosfato monobásico de potasio Fosfato dibásico de potasio Agar pH	10 0.5 0.5 0.1 0.1 15 7.0+/-2
Reactivos	Composición	(g/L)
Rojo Congo 1%(p/v)	Rojo Congo	10
NaCl 0.1 M	NaCl	200

## ANEXO 2. RECOLECCIÓN DE SUELO Y COLOCACIÓN DE CAPTURADORES



Foto 1. Unidad de producción de compost.



Foto 2. Bosque secundario.

### **ANEXO 3. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA**



Foto 3. Tinción de Gram

### **ANEXO 4. PURIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS Y FÚNGICAS**



Foto 4. Siembra en medio de cultivo en plano inclinado

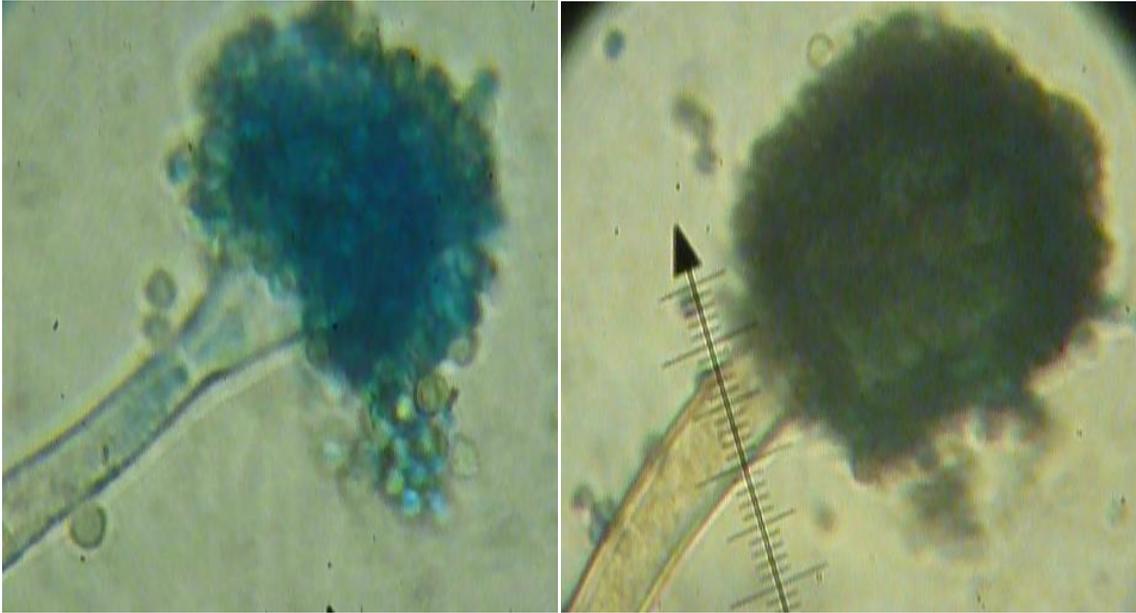
**ANEXO 5. MICROSCOPIA DE CEPAS FÚNGICAS**

Foto 5. Hongos aislados.

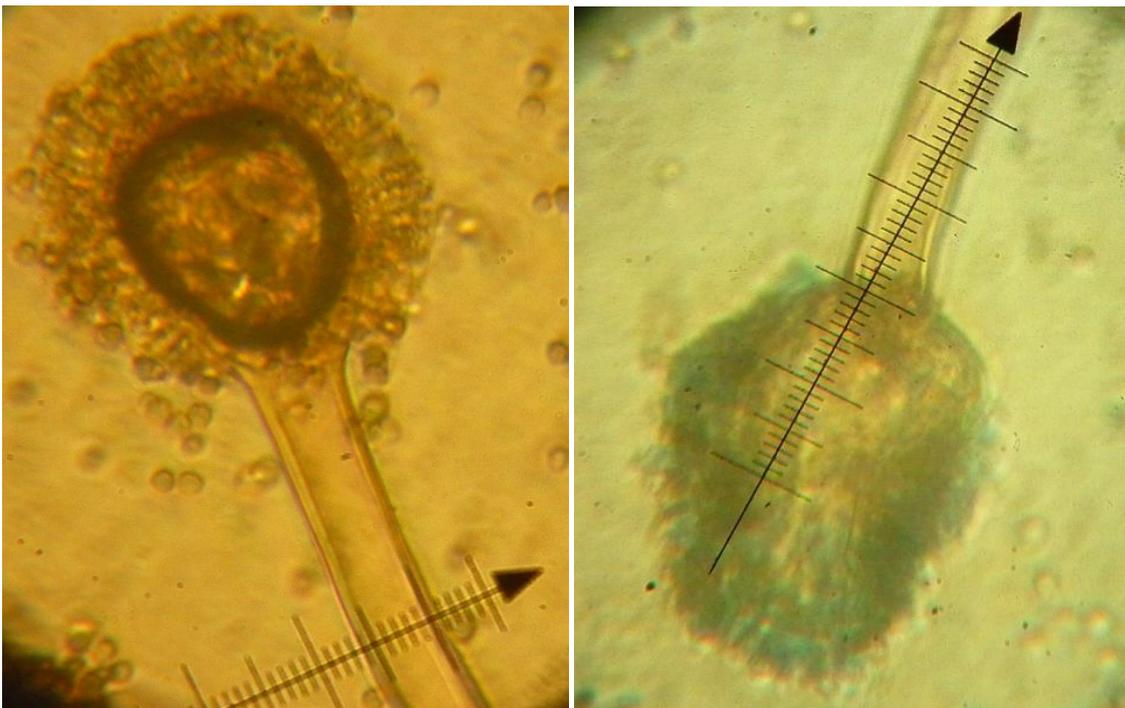


Foto 6. Microscopia de las cepas A.O-3 y A.Q-8

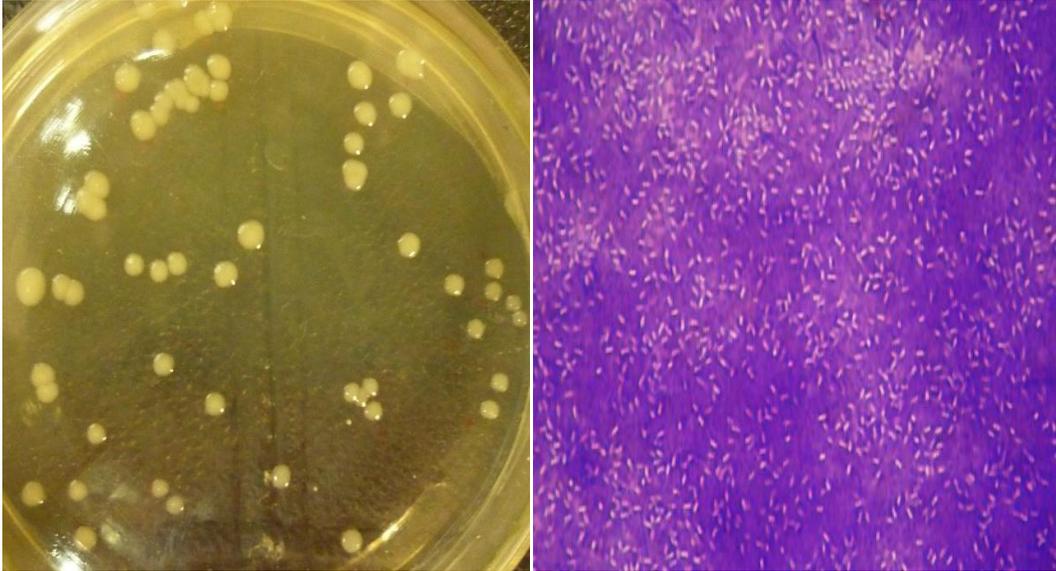
**ANEXO 6. CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA A.O-19**

Foto 7. Morfología y producción de endosporas de la cepa A.O-19

**ANEXO 7. PRESENCIA DEL HALO DE HIDRÓLISIS**

Foto 8. Zonas de aclaramiento, cepa A.Q-8 en Agar CMC 1%(p/v).

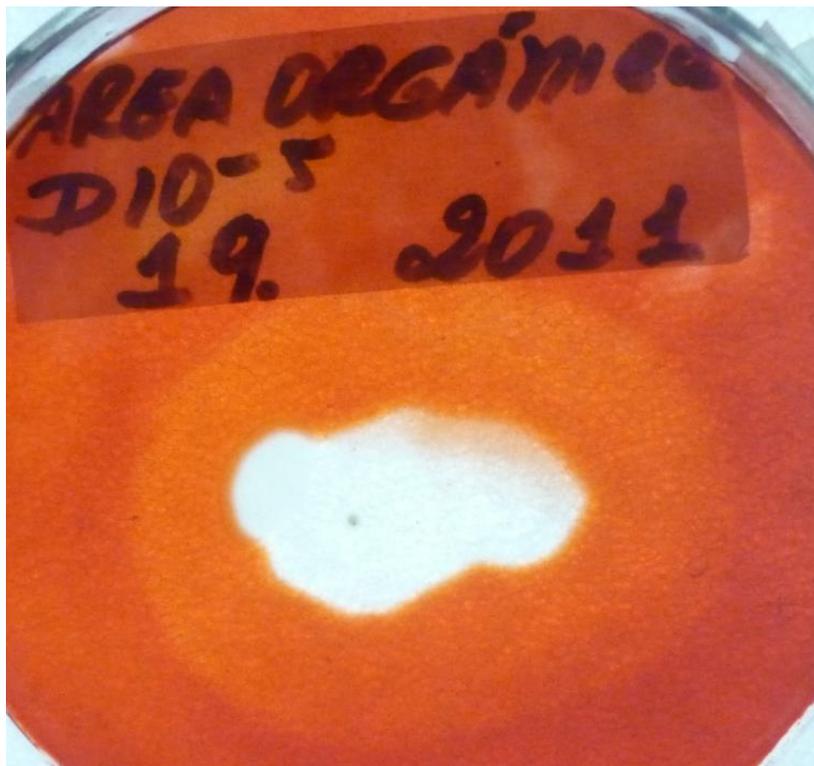


Foto 9. Zonas de aclaramiento, cepa A.O-19 en Agar CMC 1%(p/v)



Foto 10. Zonas de aclaramiento, cepa A.O- 2 en Agar Almidón 1%(p/v).

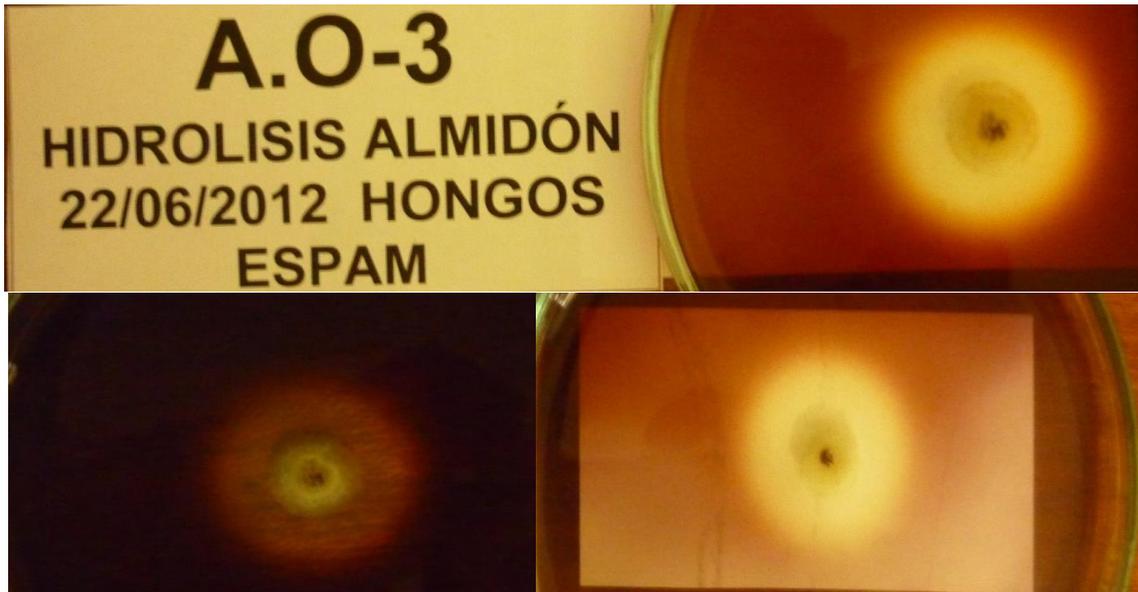


Foto 11. Zonas de aclaramiento, cepa A.O-3 en Agar Almidón 1%(p/v)



Foto 12. Zonas de aclaramiento, cepa A.O- 5 en Agar Almidón 1%(p/v).

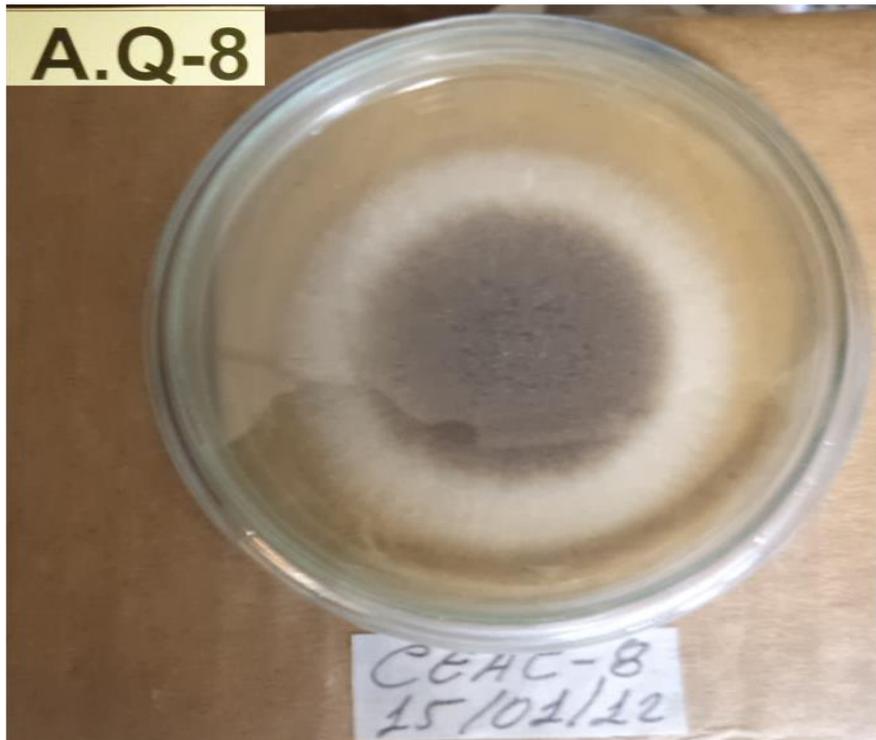
**ANEXO 8. CAPACIDAD DE CRECIMIENTO HONGOS CELULOLÍTICO**

Foto 13. Crecimiento radial hongo celulolítico A.Q-8.

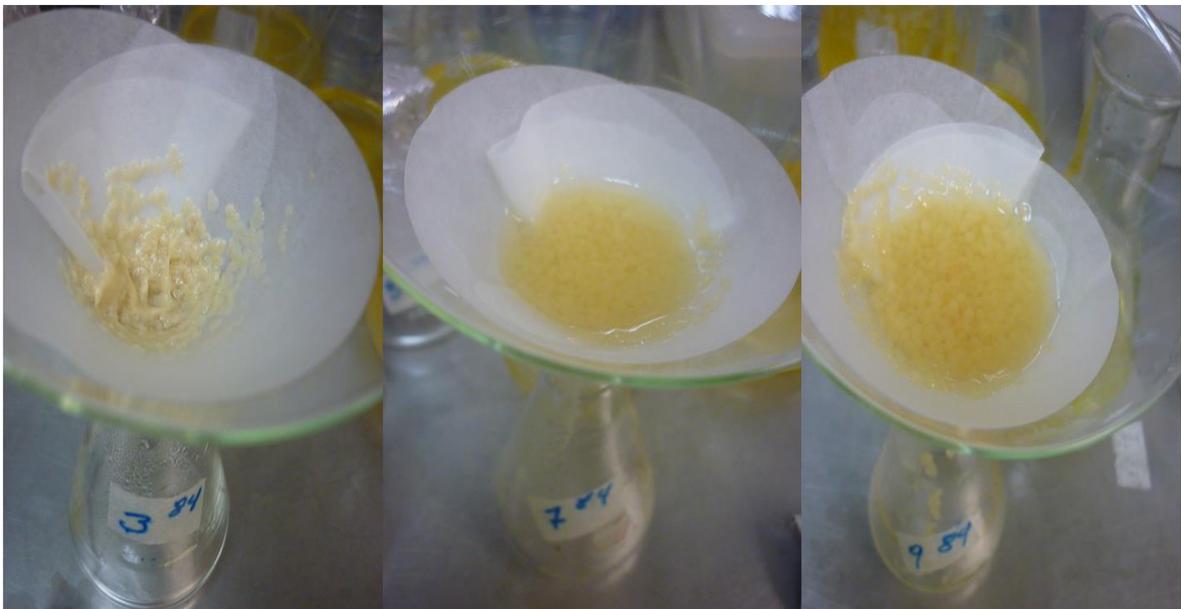
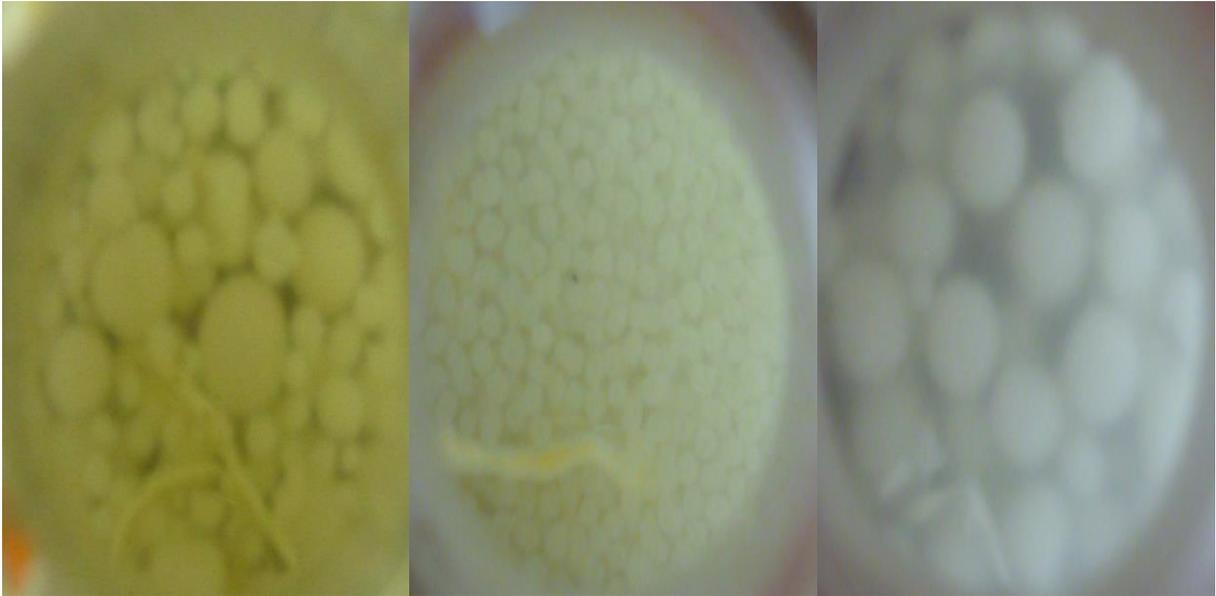
**ANEXO 9. PRODUCCIÓN DE BIOMASA FÚNGICA**

Foto 14. Capacidad de crecimiento a diferentes pH.

A.Q-8

A.O-5

R.C-3



A.Q-27

A.O-3

A.O-1

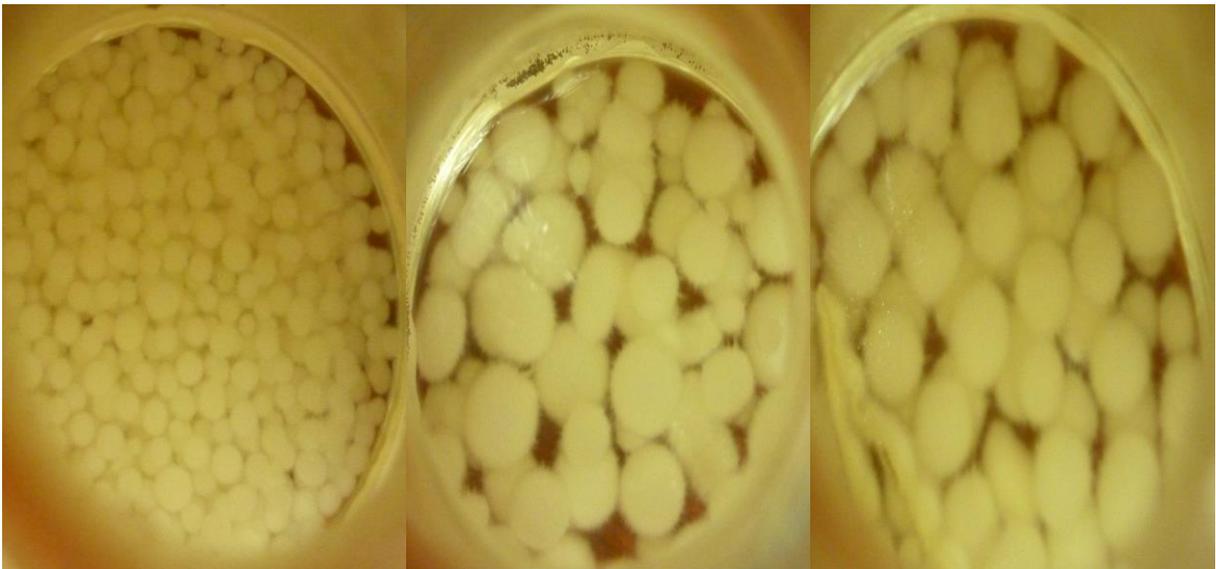


Foto 15. Forma de pellet de hongos celulolíticos en medio caldo arroz