



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

INSTITUTO DE POSTGRADO

**MAESTRÍA EN BIODIVERSIDAD Y RECURSOS GENÉTICOS MENCIÓN
RECURSOS FITOGÉNÉTICOS Y DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS**

**BIOPROSPECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS Y BACTERIAS PRODUCTORAS
DE ENZIMAS QUE ACELEREN LA DESCOMPOSICIÓN DE RESIDUOS
AGROPECUARIOS EN EL COMPOSTAJE**

Trabajo de Investigación previo a la Obtención del Título de Magíster en Biodiversidad y
Recursos Genéticos Mención Recursos Fitogenéticos y de Microorganismos Asociados

AUTOR: DIEGO EFRÉN ZAMBRANO PAZMIÑO

TUTOR: ING. ÁNGEL M. GUZMÁN CEDEÑO, PhD

IBARRA - ECUADOR

2021

APROBACIÓN DEL TUTOR DE TESIS

En calidad de tutor del trabajo de grado titulado “**BIOPROSPECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS Y BACTERIAS PRODUCTORAS DE ENZIMAS QUE ACELEREN LA DESCOMPOSICIÓN DE RESIDUOS AGROPECUARIOS EN EL COMPOSTAJE**” que ha sido desarrollado por el Ingeniero Diego Efrén Zambrano Pazmiño, previo a la obtención del Título de Magíster en Biodiversidad y Recursos Genéticos Mención Recursos Fitogenéticos y de Microorganismos Asociado, doy fe que dicho trabajo reúne los requisitos y meritos suficientes para ser sometidos a su presentación pública y evaluación por parte del jurado examinador.

Ibarra, a los 16 días del mes de abril de 2021

Lo certifico



Ing. Ángel M. Guzmán Cedeño, PhD
CI: 1202260038



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD	1311564247		
APELLIDOS Y NOMBRES	Zambrano Pazmiño Diego Efrén		
DIRECCIÓN	Chone		
EMAIL	diegozambrano87e@gmail.com		
TELÉFONO FIJO:	052360382	TELÉFONO MÓVIL:	0963049110

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Bioprospección de cepas de hongos y bacterias productoras de enzimas que aceleren la descomposición de residuos agropecuarios en el compostaje
AUTOR:	Diego Efrén Zambrano Pazmiño
FECHA: DD/MM/AAAA	27/04/2021
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input type="checkbox"/> PREGRADO <input checked="" type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Magíster en Biodiversidad y Recursos Genéticos Mención Recursos Fitogenéticos y de Microorganismos Asociados
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. Ángel M. Guzmán Cedeño, PhD



2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 27 días del mes de abril de 2021

EL AUTOR:

Diego Efrén Zambrano Pazmiño
C.I. 1311564247

REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

Guía: POSGRADO-UTN

Fecha: Ibarra, 16 de abril de 2021

Diego Efrén Zambrano Pazmiño: “Bioprospección de cepas de hongos y bacterias productoras de enzimas que aceleren la descomposición de residuos agropecuarios en el compostaje” /Trabajo de Grado de Magíster en Biodiversidad y Recursos Genéticos Mención Recursos Fitogenéticos y de Microorganismos Asociados.

TUTOR: Ing. Ángel M. Guzmán Cedeño, PhD

El principal objetivo de la investigación fue obtener cepas fúngicas y bacterianas del suelo de Loma de Mil Pesos, zona rural de Calceta, cantón Bolívar, como potenciales inóculos en el compostaje de los residuos agropecuarios, los objetivos específicos fueron:

- Seleccionar cepas fúngicas y bacterianas con capacidad enzimática celulolítica para su aplicación en el proceso de compostaje de los residuos agropecuarios.
- Identificar cepas fúngicas y bacterianas por técnicas moleculares por su capacidad enzimática celulolítica, potencialmente útiles para el proceso de compostaje de los residuos agropecuarios.
- Evaluar la capacidad enzimática de las cepas fúngicas y bacterianas inocuas, sobre los indicadores físico-químicos y biológicos durante el proceso de compostaje de residuos agropecuarios.

Fecha: Ibarra, 16 de abril de 2021



Diego Efrén Zambrano Pazmiño
AUTOR



Ing. Ángel M. Guzmán Cedeño, PhD
TUTOR



DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a la Señora Fe Dolores Del Valle Pazmiño por brindarme su inmenso amor, comprensión, apoyo incondicional y por estar siempre a mi lado en cada acontecimiento de mi vida. Por apostar siempre por mi superación personal, por alentarme a seguir adelante y por inculcar valores que me permitieron crecer como persona y profesional.

AGRADECIMIENTO

A Dios por cuidarme siempre y por permitirme alcanzar un logro más.

Al Sr. Víctor Zambrano Del Valle, por su valiosa colaboración y por sus excelentes consejos de motivación.

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López por permitirme utilizar las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular para el desarrollo de la metodología propuesta.

Al Ing. Ángel Guzmán Cedeño por gestionar el permiso respectivo para poder asistir a la maestría y también por dedicar el tiempo en la revisión de la tesis.

A mis amigos Doris Tixe, Danilo Guilcapi y José Vaca por compartir su amistad durante nuestra preparación. Por el compañerismo demostrado dentro y fuera del aula de clases.

Al señor Alberth Espinosa por su apoyo en la determinación de los parámetros microbiológicos.

A la Ing. Diana Mercedes Andrade Loor por permanecer a mi lado durante esta larga travesía que tuve que recorrer para alcanzar este sueño.

A la PhD Gabriela N. Tenea por sus valiosas sugerencias emitidas al documento.

A mis familiares por su apoyo y vibras positivas de motivación y superación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO I.....	1
EL PROBLEMA.....	1
1.1 . Problema de investigación.....	1
1.2 . Hipótesis de investigación.....	2
1.3 . Objetivos de la investigación.....	2
1.3.1. Objetivo general.....	2
1.3.2. Objetivos específicos.....	2
1.4. Justificación.....	3
CAPITULO II.....	5
MARCO REFERENCIAL.....	5
2.1. Marco teórico.....	5
1.1.1. Manejo de los residuos agropecuarios.....	5
2.1.2. Tipos de residuos agropecuarios.....	5
2.1.3. Producción enzimática de bacterias y hongos.....	6
2.1.4. Producción de compost.....	8
2.1.5. Parámetros monitoreados durante el proceso compostaje.....	9
2.1.6. Microorganismos en ambientes poco explorados.....	11
2.1.7. Inóculos para acelerar el proceso de compostaje.....	12
2.2. Marco legal.....	12
CAPÍTULO III.....	14
MARCO METODOLÓGICO.....	14
3.1. Descripción del área de estudio.....	14
3.2. Enfoque y tipo de investigación.....	14
3.3. Selección de cepas fúngicas y bacterianas.....	15
3.3.1. Recolección de muestras de suelo.....	15
3.3.2. Cepas fúngicas.....	15
3.3.3. Cepas bacterianas.....	17
3.4. Identificación molecular de cepas fúngicas y bacterianas.....	19

3.5.	Evaluación de inóculo fúngico en el proceso de compostaje	20
3.5.1.	Preparación del inóculo	20
3.5.2.	Preparación de las pilas de compostaje	20
3.5.3.	Parámetros evaluados durante el proceso de compostaje.....	20
3.6.	Análisis estadístico.....	22
3.7.	Consideraciones bioéticas	23
CAPÍTULO IV.		24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		24
4.1.	Selección de cepas fúngicas y bacterianas.....	24
4.1.1.	Cepas fúngicas.....	24
4.1.2.	Cepas bacterianas	27
4.2.	Identificación molecular de cepas fúngicas y bacterianas	32
4.3.	Evaluación de inóculo fúngico en el proceso de compostaje	33
4.3.1.	Aplicación del inóculo fúngico.....	33
4.3.2.	Parámetros evaluados	34
CAPÍTULO V.....		42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		42
5.1.	CONCLUSIONES	42
5.1.	RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA		44
ANEXOS		62
ÍNDICES DE TABLAS		
Tabla 1. Secuencias de cebadores para la amplificación por PCR.....		19
Tabla 2. Ensayo celulolítico de aislados fúngicos en agar CMC.....		25
Tabla 3. Características de las bacterias aisladas.....		28
Tabla 4. Ensayo celulolítico de aislados bacterianos en agar CMC.....		29
Tabla 5. Identificación de aislados bacterianos y fúngicos.....		33
Tabla 6. Índice de germinación de semillas de rábano.....		38
Tabla 7. Concentraciones totales de macro y micronutrientes en el compost.....		39

Tabla 8. Densidad de patógenos (UFC.g ⁻¹) al final del proceso de compostaje.....	41
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación del sitio de muestreo (Loma de Mil Pesos).....	14
Figura 2. Supervivencia de las cepas fúngicas seleccionadas a diferentes pH.....	26
Figura 3. Supervivencia de cepas bacterianas seleccionadas a diferentes pH.....	30
Figura 4. Supervivencia de las cepas bacterianas seleccionadas a 50°C.....	31
Figura 5. Cambios de temperatura durante el compostaje en T1 y T2.....	35
Figura 6. Variación del pH durante el proceso de compostaje en T1 y T2.....	36
Figura 7. Cambios de CE durante el proceso de compostaje en T1 y T2.....	37
Figura 8. Cambios de humedad durante el proceso de compostaje en T1 y T2.....	38

RESUMEN

BIOPROPECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS Y BACTERIAS PRODUCTORAS DE ENZIMAS QUE ACELEREN LA DESCOMPOSICIÓN DE RESIDUOS AGROPECUARIOS EN EL COMPOSTAJE

Autor: Diego Efrén Zambrano Pazmiño

Correo: diego.zambrano@espam.edu.ec

Año: 2021

Este estudio tuvo como objetivo identificar y caracterizar hongos y bacterias aislados del suelo de Loma de Mil Pesos, zona rural de Calceta, cantón Bolívar, como potenciales inóculos en el compostaje de los residuos agropecuarios, para la obtención de abonos orgánicos. Los aislados bacterianos y fúngicos se sembraron en punción en agar Carboximetilcelulosa y se aplicó rojo congo como agente revelador de los halos de hidrólisis. En el compostaje se emplearon dos pilas (con y sin inóculo) conformadas con 43,12 kg de cáscara de maní y 21,56 kg de gallinaza; la pila inoculada recibió 500 g de un consorcio de cuatro cepas de *Trichoderma longibrachiatum* y una de *Trichoderma reesei*. El proceso de compostaje tuvo una duración de 150 días, en el cual se monitoreó la temperatura, pH, conductividad eléctrica y contenido de humedad; al compost se evaluó parámetros microbianos que incluyen *Salmonella*, coliformes totales y fecales, concentración de nutrientes e índice de germinación en semillas de rábano. Se aislaron 48 hongos y 41 bacterias, por su capacidad enzimática 31 hongos y 18 bacterias mostraron zonas de hidrólisis en placas con carboximetilcelulosa. La identificación realizada a las siete cepas con mayor halo de hidrólisis dio como resultado tres grupos taxonómicos diferentes. Las cepas bacterianas EMB-236 y EMB-265 mostraron una similitud de 99,03 y 99,86% de identidad de secuencia de ADN con *Bacillus cereus*, cuatro aislados fúngicos tuvieron similitud entre 99,48 y 100% con *T. longibrachiatum*, la otra cepa de hongo tuvo similitud de 99,86 con *T. reesei*. Los resultados obtenidos en el tratamiento inoculado con las cepas de *Trichoderma* muestran que la temperatura del compost aumentó a 55°C, la conductividad eléctrica fue de 1,04 mS cm⁻¹, pH 7,41. Las concentraciones de N, P, K, Mg, y S, como % en el compost fueron 1,12, 0,83, 0,70, 0,47, y 0,18 respectivamente. El índice de germinación presentó un porcentaje final de 93,5. El consorcio fúngico conformado por cepas de *Trichoderma* evaluado en proceso de compostaje puede utilizarse para reducir los patógenos presentes en la mezcla de residuos.

Palabras clave: Sucesión microbiana, comunidades microbianas, hidrólisis enzimática, metabolitos fitotóxicos

ABSTRACT

BIOPROTECTION OF ENZYME-PRODUCING FUNGUS AND BACTERIA STRAINS THAT ACCELERATE THE DECOMPOSITION OF AGRICULTURAL RESIDUES IN COMPOSTING

Author: Diego Efrén Zambrano Pazmiño

Correo: diego.zambrano@espam.edu.ec

Año: 2021

The objective of this study was to identify and characterize fungi and bacteria isolated from the soil of Loma de Mil Pesos, rural area of Calceta, Bolívar canton, as potential inoculums in the composting of agricultural waste, to obtain organic fertilizers. Bacterial and fungal isolates were punctured on Carboxymethylcellulose agar and Congo red was applied as a revealing agent for hydrolysis halos. Two piles (with and without inoculum) were used for composting, consisting of 43.12 kg of peanut shell and 21.56 kg of chicken manure; the inoculated pile received 500 g from a consortium of four strains of *Trichoderma longibrachiatum* and one of *Trichoderma reesei*. The composting process lasted 150 days, in which the temperature, pH, electrical conductivity and moisture content were monitored; the compost was evaluated for microbial parameters that include Salmonella, total and fecal coliforms, nutrient concentration and germination index in radish seeds. 48 fungi and 41 bacteria were isolated, 31 fungi and 18 bacteria showed hydrolysis zones in plates with carboxymethylcellulose due to their enzymatic capacity. The identification of the seven strains with the highest hydrolysis halo resulted in three different taxonomic groups. Bacterial strains EMB-236 and EMB-265 showed a similarity of 99.03 and 99.86% of DNA sequence identity with *Bacillus cereus*, four fungal isolates had similarity between 99.48 and 100% with *T. longibrachiatum*, while another strain of fungus had 99.86 similarity to *T. reesei*. The results obtained in the treatment inoculated with the *Trichoderma* strains show that the compost temperature increased to 55°C, the electrical conductivity was 1.04 mS cm⁻¹, pH 7.41. The concentrations of N, P, K, Mg, and S, as% in the compost were 1.12, 0.83, 0.70, 0.47, and 0.18 respectively. The germination index presented a final percentage of 93.5. The fungal consortium made up of *Trichoderma* strains evaluated in the composting process can be used to reduce the pathogens present in the waste mix.

Key words: Microbial succession, microbial communities, enzymatic hydrolysis, phytotoxic metabolites

CAPÍTULO I. EL PROBLEMA

1.1. Problema de investigación

“La diversidad biológica disminuye a un ritmo sin precedentes; la pérdida, degradación y fragmentación de hábitats sigue siendo elevada en los bosques y otros biomas, especialmente en los ecosistemas con mayor diversidad biológica de las regiones tropicales” (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2020, pp. 8-52). Siendo “la destrucción de los hábitats naturales por la transformación de bosques a cultivos, pastizales o ciudades la causa principal” (Estrella et al. 2005, pp. 32, 33) y es que “la diversidad biológica forestal abarca no solo los árboles, sino la multitud de plantas, animales y microorganismos que habitan las áreas forestales y su diversidad genética asociada” (Convention on biological diversity [CBD], 2016).

En el Programa Nacional de Reforestación 2014-2021 (Ministerio del Ambiente [MAE], 2014, p. 12) se señala que en Ecuador la tasa anual de deforestación bruta para el período 2008-2014 fue de -0,77%, que corresponde a 97.918 ha, mientras que para el período 2014-2016 fue de -0,74%, que corresponde a 94.353 ha, proceso que permitió la conversión de bosques naturales a otros tipos de uso y cobertura y que para el periodo 2014-2016 se perdieron 188.706 ha de bosque nativo en el Ecuador continental, durante el mismo periodo se reporta una ganancia de bosque nativo de 66.483 ha, dando como resultado una pérdida neta de bosque nativo de 122.224 ha.

La provincia de Manabí-Ecuador ha experimentado cambios en su Zona de vida causado por la deforestación, con relación a esto durante el periodo 2014-2016, Manabí fue una de las provincias con mayor deforestación. En el cantón Bolívar la microcuenca de Membrillo que se encuentra en las parroquias de Membrillo y Calceta, presenta un alto grado de pérdida de la vegetación nativa, situación que ha propiciado altos niveles de erosión de

los suelos; sin embargo, todavía es posible observar los remanentes de bosque que aún quedan (Gobierno Autónomo Descentralizado [GAD], 2014, p. 8).

“La ausencia de cultivos puros o secuencias del genoma hace que sea difícil determinar el papel específico de los microorganismos en los ambientes del suelo” (Eichorst et al., 2007, p. 2708), lo que imposibilitaría descubrir nuevas fuentes de enzimas y otros productos que poseen un valor económico actual o potencial, y que se encuentran en los componentes de la diversidad biológica.

1.2. Hipótesis de investigación

De las cepas fúngicas y bacterianas aisladas de muestras de suelo del sitio Loma de Mil Pesos es posible obtener cepas con capacidad enzimática celulolítica, potencialmente útiles para el compostaje de residuos agropecuarios.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Obtener cepas fúngicas y bacterianas del suelo de Loma de Mil Pesos, zona rural de Calceta, cantón Bolívar, como potenciales inóculos en el compostaje de los residuos agropecuarios.

1.3.2. Objetivos específicos

Seleccionar cepas fúngicas y bacterianas con capacidad enzimática celulolítica para su aplicación en el proceso de compostaje de los residuos agropecuarios.

Identificar cepas fúngicas y bacterianas por técnicas moleculares por su capacidad enzimática celulolítica, potencialmente útiles para el proceso de compostaje de los residuos agropecuarios.

Evaluar la capacidad enzimática de las cepas fúngicas y bacterianas inocuas, sobre los indicadores físico-químicos y biológicos durante el proceso de compostaje de residuos agropecuarios.

1.4. Justificación

“Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad del continente y del mundo” (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias [INIAP], 2008, p. 9). En el informe 2015 de las Naciones Unidas sobre Objetivos de Desarrollo del Milenio se señala que “es necesario precautelar las áreas protegidas con el objetivo de conservar y nutrir la diversidad biológica, asegurando la conservación y el mantenimiento de las áreas para generaciones futuras” (Naciones Unidas, 2015, p. 56). En el objetivo 6 del Plan de Desarrollo del Ecuador señala que “se tienen que desarrollar las capacidades productivas y del entorno, para lograr la soberanía alimentaria y el Buen Vivir Rural” (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo [SENPLADES], 2017, pp. 80-84).

El desarrollo sostenible para alcanzar el Buen Vivir implica reestructurar nuestra economía mediante la disminución de la dependencia de actividades extractivas, y la orientación de su transición hacia una economía basada en el bioconocimiento, la cual posiciona a la biodiversidad como una fuente de conocimiento y saber. Una economía amigable con la naturaleza implica acoger el conjunto de saberes, conocimientos y aplicaciones tanto tradicionales como científicas, para marcar una nueva era de bioeconomía basada en el aprovechamiento sustentable de los recursos biológicos renovables para la producción de alimentos, energía y bienes industriales, obtenidos a través de transformaciones de material orgánico (SENPLADES, 2017, p. 64).

La microbiota juega un papel importante en el crecimiento, desarrollo, productividad y resistencia de las plantas al estrés ambiental (Tian et al., 2020, p. 9). Al contar con microorganismos autóctonos, seleccionados e identificados por su capacidad de realizar funciones específicas en la transformación de los residuos agropecuarios, se podrán desarrollar métodos biotecnológicos para el manejo adecuado de los residuos agropecuarios,



que permitan la descomposición de los residuos orgánicos, a través de compostaje y la obtención de abonos orgánicos, contribuyendo en la implementación de un modelo de agricultura ambientalmente responsable. La información generada en esta investigación contribuirá con la línea de investigación de la Universidad Técnica del Norte: Biotecnología, energía y recursos naturales renovables.

CAPITULO II. MARCO REFERENCIAL

2.1. Marco teórico

1.1.1. Manejo de los residuos agropecuarios

“Los aumentos en la productividad agropecuaria parecen ser la única respuesta para garantizar la seguridad alimentaria” (Vimal et al., 2017, p. 177), lo que ha provocado que “la cantidad de desechos se incremente” (Singh et al., 2011, p. 719); sobre todo, “en la producción agrícola donde se generan abundantes residuos vegetales que son quemados en las propias unidades de producción; por otro lado en la explotación de animales de interés zootécnico se producen abundantes excretas” (Bernal et al., 2009, p. 5444; Anyanwu et al., 2015, p. 778). “Los organismos patógenos presentes en varios residuos como en el estiércol” (Avery et al., 2005, p. 358), “pertenecen a cuatro grupos principales: bacterias, virus, parásitos y hongos, siendo una amenaza potencial para la salud de los operadores en las unidades de producción y los usuarios de compost” (Bazrafshan et al., 2016c, p. 5).

2.1.2. Tipos de residuos agropecuarios

Singh-Nee et al. (2009), mencionan que los residuos secos pueden provenir de cultivos y son aquellos materiales que quedan por encima del suelo después de la cosecha, incluida la paja o rastrojo de cebada, arroz, centeno y trigo, tallos o rastrojos de maíz, algodón, sorgo, soja y alfalfa. Otro tipo de residuos lo conforman los residuos de cultivos de frutas y estos incluyen las podas de huertos, los tipos de cultivos de frutas incluyen manzanas, albaricoques, aguacates, cerezas, higos, pomelos, uvas, limones, limas, aceitunas, naranjas, melocotones, peras, ciruelas, ciruelas pasas y nueces. Además, están los residuos correspondientes a cultivos de hortalizas y consisten principalmente en hojas que permanecen en el suelo después de la cosecha, entre los tipos de cultivos de hortalizas se incluyen plantas como alcachofas, espárragos, pepinos, lechugas, melones, patatas, calabazas y tomates.

También están los residuos de cultivos de vivero que incluyen las podas y recortes extraídos de las plantas durante su crecimiento y en la preparación para el mercado (por ejemplo, flores y plantas de interior, etc.) que se cultivan (pp. 14-15).

Wen, (2004), menciona que “los residuos húmedos están conformados por el estiércol de los animales y que la mayor parte del estiércol proviene de ganado lechero y de corrales de engorde, y el resto proviene de operaciones de cerdos y aves de corral” (p. 31).

2.1.3. Producción enzimática de bacterias y hongos

“Las enzimas microbianas actúan como biocatalizadores para acelerar reacciones en bioprocesos de una manera económica y respetuosa con el ambiente en comparación con el empleo de catalizadores químicos (Nigam, 2013, p. 597)”. “Las celulasas participan en la hidrólisis de materiales poliméricos lignocelulósicos, son producidas por hongos, bacterias o actinomicetos, pero el productor más común es el de los hongos” (Ariffin et al., 2006, p. 47 y Jayasekara y Ratnayake, 2019, p. 2).

“Los microorganismos liberan enzimas que tienen un papel importante en la degradación de los residuos agropecuarios” (Tampoebolon et al., 2014, p. 225). “Las bacterias son importantes fuentes de celulasas con diversas aplicaciones industriales y biotecnológicas” (Thomas et al., 2018, p. 429). “Por su parte los hongos producen tanto ligninasas como celulasas capaces de degradar los residuos agropecuarios” (Martínez-Anaya et al., 2008, p. 119). “La celulosa es un polisacárido lineal de residuos de glucosa con enlaces β -1,4-glicosídicos” (Gupta et al., 2012, p. 1).

Es un complejo de tres enzimas importantes que trabajan sinérgicamente debido a la estructura compleja cristalina y amorfa de la celulosa, hidrolizan la celulosa en celobiosa, glucosa y oligosacáridos. La enzima endoglucanasa es la primera que actúa sobre las fibras de celulosa amorfa, atacando aleatoriamente la cadena glucosa-polímero, que libera pequeñas fibras constituidas por extremos libres reductores y no reductores. Los extremos libres de la cadena se exponen luego a la actividad de la

enzima exoglucanasa, que produce celobiosa. El tercer componente de la celulasa es la β -glucosidasa, que hidroliza la celobiosa, produciendo la glucosa como producto final de la sacarificación de la celulosa (Nigam, 2013, p. 603).

La detección de microorganismos productores de celulasa se realiza de forma rutinaria en placas de carboximetilcelulosa (CMC). En mucho de los experimentos las placas de cultivo se inundan con bromuro de hexadeciltrimetil amonio al 1% o con rojo de Congo al 0,1 % seguido de NaCl 1M. En ambos casos, toma un mínimo de 30 a 40 minutos para obtener la zona de hidrólisis después de la inundación, y el área hidrolizada no es claramente perceptible; otro método empleado para la detección de la producción de celulasa extracelular por microorganismos es la utilización de yodo. El yodo forma un complejo de color negro azulado con celulosa, pero no con celulosa hidrolizada, dando una zona clara alrededor de las colonias microbianas productoras de celulasa en 3 a 5 minutos (Kasana et al., 2008, p. 503).

Tanto los hongos como las bacterias han sido muy explotados por su capacidad para producir una amplia variedad de celulasas y hemicelulasas. Se ha puesto mayor énfasis en el uso de hongos debido a su capacidad para producir grandes cantidades de celulasas y hemicelulasas que se secretan al medio para una fácil extracción y purificación. Además, las enzimas son a menudo menos complejas que las hidrolasas de glucósidos bacterianos. Sin embargo, el aislamiento y caracterización de nuevas glucósido hidrolasas de Eubacteria se están explotando ahora ampliamente. Hay varias razones para estos cambios, por una parte, las bacterias a menudo tienen una tasa de crecimiento más alta que los hongos, lo que permite una mayor producción recombinante de enzimas (Maki et al., 2009, p. 502).

En segundo lugar, las glucosidasas bacterianas son a menudo más complejas y a menudo se expresan en complejos multienzimáticos que proporcionan una mayor función y sinergia. Lo más importante es que las bacterias habitan una amplia variedad de nichos ambientales e industriales, que producen cepas celulolíticas que son extremadamente resistentes a las tensiones ambientales. Estos incluyen cepas que

son termófilas o psicrófilas, alcalifílicas o acidófilas y cepas que son halófilas. Estas cepas no solo pueden sobrevivir a las duras condiciones que se encuentran en el proceso de bioconversión, pero a menudo producen enzimas que son estables en condiciones extremas que pueden estar presentes en el proceso de bioconversión y esto puede aumentar las tasas de hidrólisis enzimática, fermentación y recuperación del producto.

2.1.4. Producción de compost

“El compostaje es el proceso mediante el cual se produce el compost” (Semple et al., 2001, p. 272). “El compostaje es un proceso biológico aeróbico, donde se transforman los residuos orgánicos en sustancias estables” (Boulter et al., 2002, p. 661; Guardabassi et al., 2003, p. 15; Ryckeboer et al., 2003b; Hubbe et al., 2010, p. 2808), en el cual “intervienen diversas comunidades microbianas, principalmente bacterias y hongos” (Ryckeboer et al., 2003a, p. 132; Partanen et al., 2010, p. 5; Neher et al., 2013, p. 8; Bello et al., 2020, p. 5), “cuya acción metabólica conduce a la mineralización y humificación parcial de los residuos orgánicos” (Hoffmeister et al., 2005, p. 283). “El proceso comprende tres fases diferentes: la fase mesofílica, la fase termófila y la fase de maduración (curado)” (Guardabassi et al., 2003, p. 15), “donde las comunidades microbianas degradan sustratos orgánicos en formas humificadas, más estables, generando calor como producto de la actividad metabólica microbiana” (Ryckeboer et al., 2003, p. 349b).

“Debido a la complejidad de los sustratos y productos intermedios, la diversidad microbiana y la sucesión de las diferentes comunidades de microorganismos es un requisito previo, para asegurar la biodegradación completa y obtener un producto final estable” (Ryckeboer et al., 2003, p. 349b). Además, “el compostaje permite la inactivación de patógenos” (Erickson et al., 2014, p. 1917; Rastogi et al., 2020, p. 2), “la eliminación malezas, de olores no deseados” (Guo et al., 2012, p. 171) “y la eliminación de compuestos fitotóxicos para su aplicación (Singh y Nain, 2014a, p. 474)”.

“El producto final del compostaje puede suministrar todos los macro y micro nutrientes necesarios para el crecimiento vegetal, tales como: N, P, K, Ca, Mg, Na, Cu, Zn, Mn, Fe” (Borken et al., 2002, p. 49; Ahmed et al., 2007, p. 87; Anyanwu et al., 2015, p. 781); “por lo que puede ser utilizado como enmiendas ricas en nutrientes” (Cooperband 2002, p. 1; Brewer et al., 2013, p.1; Neher et al., 2013, p. 1), “como acondicionador del suelo” (Anwar et al., 2015, 73) “y en la reducción de la erosión y la desertificación” (Gigliotti et al., 2005, p. 1).

“Con el abono elaborado se pueden obtener beneficios directos, tales como el aumento de la productividad agrícola, la mejora de la biodiversidad del suelo” (Singh y Nain, 2014a, p. 473) y “la reducción de los problemas ambientales y económicos asociados con la eliminación de residuos” (Guardabassi et al., 2003, p. 7). “La calidad del compost obtenido dependerá de si su aplicación se realizará en la agricultura, horticultura o para el paisajismo urbano” (Bernal et al., 2017, p. 144).

2.1.5. Parámetros monitoreados durante el proceso compostaje

Durante el proceso de compostaje normalmente se evalúan la temperatura, el pH, la humedad y la conductividad eléctrica. Chin et al. (2019), mencionan que “estas mediciones pueden proporcionar una comprensión básica de la degradación de los materiales lignocelulósicos durante el proceso de compostaje” (p. 4874).

a) Evolución de la temperatura durante el proceso del compostaje

“La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan el crecimiento microbiano y las reacciones biológicas” (Lopez et al., 2004, p. 2406), además es “un buen indicador de las distintas etapas del proceso de compostaje” (Chin et al. 2019, p. 4875). “durante la fase termofílica, las altas temperaturas aceleran la descomposición de las proteínas, grasas e hidratos de carbono complejos, tales como la celulosa y la hemicelulosa” (Fourti et al., 2008, p. 103). Las altas temperaturas en las pilas también reducen el número de patógenos. En el estudio realizado por Nicholson et al., (2005), encontraron que “cuando

las temperaturas son superiores a 55°C en los montones de estiércol sólido los patógenos se inactivan en menos de un mes” (p. 141). “Varios factores pueden incidir para no alcanzar temperaturas elevadas en entre ellas se encuentra la naturaleza del sustrato” (Saidi et al., 2008, p. 335).

También “el reducido tamaño de las pilas es otro factor que considerar cuando no se alcanzan altas temperaturas” (Pérez et al., 2011, p. 48), lo que podría deberse a “la disipación de calor debido al pequeño volumen de la pila” (Kala et al., 2009, p. 81). Tchegueni et al. (2013), mencionan que “los cambios de temperatura dependen de la proporción en la mezcla de materia orgánica fácilmente biodegradable en condiciones aeróbicas” (p. 3468). “A medida que la actividad microbiana disminuye, también lo hace la temperatura de la pila, esta es la fase de curado del compostaje” (Chen et al., 2020, p. 2).

La temperatura debe controlarse “con frecuencia con un termómetro punzón y ajustarse si es necesario durante todo el proceso de compostaje. Los métodos comunes que se utilizan para ajustar las temperaturas son la aireación, el volteo y el cambio del contenido de humedad” (Chen et al., 2020, p. 4).

b) Evolución del pH durante el proceso del compostaje

Fourti et al. (2011), mencionan que “el rango ideal del pH debe estar entre 6-8 para garantizar la descomposición. Si el pH está fuera de este rango, afectará la actividad microbiana, prolongando los tiempos de descomposición” (p. 126). Gómez-Brandón et al. (2008), mencionan que “el valor del pH debe estar dentro de un rango tolerable para el crecimiento de los microorganismos, es decir entre 6-7,5 para las bacterias; entre 5,5-8,0 para los hongos y de 5,0-9,0 para los actinomicetos” (p. 439). “Cuando se presentan rangos de pH muy variados, puede atribuírselo a la naturaleza de los materiales empleados en la mezcla inicial” (Escobar et al., 2012, p. 399).

c) Evolución de la humedad durante el proceso del compostaje

En concordancia con Liang et al. (2003) “el contenido de humedad afecta la actividad microbiana aeróbica de la mezcla de compostaje, siendo el contenido de humedad del 50% un requisito mínimo para incrementar la actividad microbiana, y que entre el 60-70% proporciona actividades máximas” (p. 136). Por su parte Richard et al. (2002), manifiestan “que el contenido óptimo de humedad para la biodegradación puede variar ampliamente para diferentes mezclas y tiempos en el proceso de compostaje, pudiendo oscilar cerca del 50 a más del 70% en base húmeda” (p. 286).

d) Evolución de la fitotoxicidad durante el proceso del compostaje

“La madurez de un compost se puede verificar utilizando especies de plantas que sean muy sensible a la presencia de metabolitos fitotóxicos, como el rábano” (Varnero et al., 2007, p. 29). “El índice de germinación tiende a aumentar durante el proceso de compostaje” (Jouraiphy et al., 2005, p. 105; Miaomiao, et al., 2009, p. 594; Bazrafshan et al. 2016c, p. 1).

2.1.6. Microorganismos en ambientes poco explorados

“El aislamiento y detección de nuevas cepas de bacterias y hongos en ambientes poco explorados, como montañas, lomas, cerros con remanentes de bosques nativos, es un enfoque prometedor para encontrar productores de enzimas de mayor rendimiento” (De Paula et al., 2019, p. 1). “La inoculación de microorganismos como cultivo inicial lo han recomendado, ya sea para la desactivación de agentes inhibidores, o para acelerar el proceso de compostaje, o ambos” (Hubbe et al., 2010, p. 2826). Ribeiro et al. (2017), indican que “la adición del inóculo mostró una influencia positiva en los valores de temperatura y en la degradación tanto de la celulosa como de la hemicelulosa durante el período termofílico del proceso de compostaje” (p. 167).

2.1.7. Inóculos para acelerar el proceso de compostaje

“La investigación futura también debe incluir el aislamiento metódico de la microbiota potencialmente importante, no solo para las pruebas *in situ* para su uso como inoculantes microbianos, sino también para verificar su papel como taxones potencialmente importantes” (Castellano-Hinojosa y Strauss 2020, p. 11). “La inoculación podría ser una herramienta útil para acelerar la humificación y mejorar la madurez del compost en los residuos agrícolas” (Zeng et al., 2009, p. 399). Con la inoculación de las pilas de compostaje con un consorcio de microorganismos Jurado et al. (2015), lograron “obtener tasas más rápidas de humificación y mayor estabilidad en el compost final” (p. 24). Yaman, (2020) menciona que la inoculación microbiana, combinada con una temperatura, pH y contenido de humedad óptimos, es un método eficaz para acelerar el proceso de compostaje (p. 11).

2.2. Marco legal

La presente investigación se encuentra inmersa en los siguientes instrumentos políticos y normativos vigentes:

La Constitución de la República del Ecuador (2008) especifica que el Estado promoverá la eficiencia energética, el desarrollo y uso de prácticas y tecnologías ambientalmente limpias y sanas, así como de energías renovables, diversificadas, de bajo impacto y que no pongan en riesgo la soberanía alimentaria, el equilibrio ecológico de los ecosistemas ni el derecho al agua.

En el Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación [COES], (2016), se menciona que “la soberanía sobre los conocimientos es objetivo estratégico del Estado para garantizar a las personas la generación, transmisión, gestión, uso y aprovechamiento de los conocimientos, tecnología y la innovación y así materializar el buen vivir” (p. 5). En la Agenda Nacional de Investigación sobre la Biodiversidad se sugiere la “Bioprospección y biocribado de organismos de diferente

procedencia con potencial bioactividad para su aplicación en los ámbitos agropecuario, industrial y ambiental” (Instituto Nacional de Biodiversidad [INABIO], 2017, p. 18).

En el Reglamento al Régimen Común Sobre Acceso a los Recursos Genéticos (2011), se señala que “se tiene que promover la conservación y uso sostenible de la diversidad biológica y de los recursos biológicos, garantizando la estabilidad de los ecosistemas y los derechos de la naturaleza para el buen vivir” (p. 3). El Plan Estratégico para la Diversidad Biológica 2011-2020 (PEDB, 2011), tiene como visión que “Para el 2050 la diversidad biológica se valora, conserva, restaura y utiliza en forma racional, manteniendo los servicios de los ecosistemas, sosteniendo un planeta sano y brindando beneficios esenciales para todos” (p. 1). En la Estrategia Nacional de Biodiversidad 2015-2030 se hace conocer sobre “los Contratos Marco de Acceso a Recursos Genéticos, con el cual se faculta la recolección de especímenes de especies (flora, fauna, hongos, microorganismos y otros organismos vivos de los cuales el Estado ecuatoriano es país de origen” (MAE, 2016).

El Reglamento al Código Orgánico de Economía Social de los Conocimientos y Creatividad [RCOES], (2017), establece que la autorización de acceso a recursos genéticos y sus derivados para fines de investigación o comerciales, así como los permisos de importación de organismos vivos, especímenes de colecciones científicas que tengan como fin el desarrollo de procesos investigativos se tramitarán a través de una ventanilla única para la investigación para la biodiversidad en la que interoperarán la SENESCYT, el Instituto Público de Investigación Científica sobre la Biodiversidad, la Autoridad Nacional Ambiental, la autoridad aduanera, así como las demás pertinentes (p. 7).

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Descripción del área de estudio

Con el objetivo de aislar cepas bacterianas y fúngicas se extrajeron muestras de suelo en la Loma de Mil Pesos ($0^{\circ}51'39''$ S, $80^{\circ}3'10''$ W), ubicada en la zona rural de Calceta correspondiente al cantón Bolívar. El aislamiento, selección y evaluación se ejecutó en el laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí (ESPAM).



Figura 1. Ubicación del sitio de muestreo (Loma de Mil Pesos)

3.2. Enfoque y tipo de investigación

La presente investigación presentó un enfoque exploratorio porque se tomaron muestras de un hábitat no intervenido, además fue cuantitativo ya que se manejaron la estadística descriptiva y cualitativo porque se describen las características morfológicas de las bacterias y los indicadores físico-químicos y biológico del compost.

3.3. Selección de cepas fúngicas y bacterianas

3.3.1. Recolección de muestras de suelo

Las muestras se tomaron de la capa superior del suelo (una profundidad entre 0-10 cm), realizando un recorrido en zig-zag. Cada muestra se colocó en fundas de polietileno estériles (Ziploc) (Chaudhary et al., 2019, p. 2) y se trasladaron al Laboratorio de Biología Molecular de la (ESPAM) para realizar el aislamiento de las cepas fúngicas y bacterianas.

3.3.2. Cepas fúngicas

a. Aislamiento de cepas fúngicas

Para el aislamiento de las cepas fúngicas “se pesaron 0,1 g de las muestras de suelo colectadas y se espolvorearon directamente en dos tipos de medios de cultivo sólidos” (Warcup, 1955, p. 298) que eran “el medio agar Sabouraud y agar papa dextrosa (PDA)” (López y Vázquez 2003, p. 138). “Posteriormente se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 72 horas (h)” (Al-Taweil et al., 2009, p. 1285); transcurrido este tiempo se seleccionaron las colonias por sus características macroscópicas distintivas (color, borde, superficie y elevación) y se subcultivaron en el mismo medio para obtener cultivos puros.

b. Actividad enzimática de cepas fúngicas en agar carboximetilcelulosa (CMC)

Los aislados fúngicos puros se sembraron en “punción en agar CMC que contenía (g/L): carboximetilcelulosa, 10; extracto de levadura, 2,5; peptona, 2,5; sulfato de amonio, 0,5; cloruro de calcio, 0,5; Fosfato monobásico de potasio, 0,1; Fosfato dibásico de potasio, 0,1; agar noble, 15 y pH 5,8” (Gaitán y Pérez, 2007, p. 64), “colocándose en incubación a 37°C . 72 h después de la incubación se aplicó rojo Congo (10 g/L) como agente revelador de los halos de hidrólisis” (Teather y Wood, 1982, p. 778) dejándose actuar durante 15 minutos; se retiró el exceso y se adicionó solución de NaCl (5%) dejando reposar por quince minutos, transcurrido este tiempo se eliminó el NaCl y se determinó “la actividad celulolítica

manifestado por la presencia de zonas claras (halos)” (Apun et al., 2000, p. 264). Los halos de hidrólisis se midieron con una regla en cm.

c. Supervivencia de aislados fúngicos a condiciones controladas de pH y temperatura

➤ pH

“La influencia del pH en caldo de infusión de papa” (Jiménez-Delgadillo et al., 2018, p. 260) sobre el crecimiento de las cepas fúngicas “se investigó con cuatro valores de pH (3,0; 7,0; 9,0 y 5,8 como testigo); las cepas fúngicas se inocularon en el caldo infusión de papa, posteriormente se incubaron a $28^{\circ}\text{C}\pm 2$, agitando a 180 rpm durante 72 h” (Shahid et al., 2011, p. 147; Singh et al., 2014b, p. 2; Petrisor et al., 2016, p. 12). La evaluación se realizó a las 72 h, para cada evaluación se hicieron diluciones seriadas y la siembra de 100 μL en medio de cultivo PDA; a continuación, se incubaron a 30°C durante 72 h. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC).

➤ Temperatura

El caldo de infusión de papa, se ajustó a pH 5,8 con 1M de HCl. Las cepas fúngicas se inocularon al 1% v/v; posteriormente se incubaron a 50°C , agitando constantemente a 180 rpm durante 72 h. Después del periodo de incubación se realizaron diluciones seriadas y la siembra de 100 μL en placas Petri con medio de cultivo PDA. A continuación, se incubó a 30°C durante 72 h. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el conteo de las UFC.

3.3.3. Cepas bacterianas

a. Aislamiento de cepas bacterianas

Para el aislamiento de las cepas bacterianas, se tomaron 10 g de muestra de suelo se suspendieron en 90 mL de agua peptonada (1%), dejándose en incubación a 37°C, agitado a 200 rpm durante 30 minutos (min). A continuación, se diluyó en serie hasta 10^{-6} con solución salina estéril (NaCl al 0,85%). Posteriormente, se esparcieron 100 μ l de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} en placas con medio agar nutritivo y se incubaron a $37^{\circ}\text{C}\pm 2$ durante 18 h; transcurrido este tiempo se seleccionaron las colonias por sus características morfológicas distintivas (color, borde, superficie y elevación) y se subcultivaron hasta que se obtuvieron cultivos puros, las colonias puras con características morfológicas distintivas se sometieron a tinción de Gram (Roslan et al., 2015, p. 78; Chaudhary et al., 2019, p. 2; Sha et al., 2020, p. 232).

b. Actividad enzimática de cepas bacterianas en agar CMC

Para verificar la actividad enzimática las cepas bacterianas se inocularon en punción en el medio de cultivo agar CMC, descrito anteriormente para las cepas fúngicas, con la diferencia que se le modificó el pH a 7.

c. Supervivencia de cepas bacterianas a condiciones controladas de pH y temperatura

Para realizar la caracterización a nivel de pH y temperatura se seleccionaron las mejores cepas bacterianas y fúngicas que presentaron diferencias estadísticas en el diámetro del halo de hidrólisis en relación con los demás aislados.

➤ pH

El pH del caldo nutriente se ajustó a 3, 5, 9 y 7 como testigo (Saha y Santra 2014, p. 13), “con soluciones de hidróxido de sodio (NaOH) 1N y de ácido clorhídrico (HCl) 1N” (López y López 2004, p. 8). Las cepas bacterianas se inocularon y posteriormente se incubaron a 37°C, agitando constantemente a 180 rpm durante 18 h. La evaluación se realizó a las 18 h, para cada evaluación se realizaron diluciones seriadas y la siembra de 0,1 mL en medio de cultivo agar nutriente. A continuación, se incubaron a 37°C durante 18 h. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el conteo de las UFC.

➤ Temperatura

Las cepas bacterianas se sembraron en agar nutriente y se incubaron a 37°C durante 18 horas, a continuación, se introdujo 1 asa de cada uno de los cultivos bacterianos en 50 mL de caldo nutriente, seguido de agitación a 180 rpm a 37°C durante 18 h (precultivo). Posteriormente las cepas bacterianas se inocularon al 1% v/v, a continuación, se incubó a 50°C, agitando constantemente a 180 rpm durante 18 h. Para la evaluación se realizaron diluciones seriadas, la siembra y diseminación de 100 µL en placas Petri con medio de cultivo agar nutriente. A continuación, se incubó a 37°C durante 18 horas; Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el conteo de las UFC.

d. Prueba de hemólisis a los aislados bacteriano

La sangre se extrajo mediante una técnica aséptica en ovejas sanas que no estaban recibiendo antibióticos en el momento de la extracción de sangre (Russell et al., 2006, p. 3347). La evaluación se realizó a los mejores aislamientos bacterianos por su capacidad de producir halos de hidrólisis en agar CMC. Cada aislado se sembró en punción en agar base suplementado con 5% de sangre de oveja; dejándose en incubación durante 24 horas

3.4. Identificación molecular de cepas fúngicas y bacterianas

La Identificación taxonómica de los aislados bacterianos y de las cepas fúngicas se realizó de acuerdo con la técnica empleada por el laboratorio de IDGEN-Quito, como se muestra a continuación. La extracción de ADN se realizó por métodos convencionales utilizando aproximadamente 100 mg de micelio o pellet celular bacteriano. Se realizó electroforesis en gel de agarosa para evaluar la integridad y calidad del ADN. El ADN obtenido se diluyó hasta una concentración de aproximadamente 20 ng/uL para la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La región ITS del ADN ribosómico de hongos y para la región 16S, rpoB o gyrB de bacterias se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores universales descritos en la Tabla 1 (White et al., 1990, p. 317; Reysenbach et al., 2000, p. 3799; Jiang et al., 2006, p. 3834; Mohkam et al., 2016, p. 10). Los productos de PCR fueron purificados previo a la secuenciación por el método SANGER (Madigan et al., 2015, pp. 184, 185 y 186). Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando programas bioinformáticos. Los resultados de las secuencias se analizaron y compararon en el sitio web, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Tabla 1
Secuencias de cebadores para la amplificación por PCR

Cebador	Secuencia de cebador (5'-3')
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
1492R	5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'
rpoB-F	5'-ATCGAAACGCCTGAAGGTCCAAACAT-3'
rpoB-R	5'-ACACCCTTGTTACCGTGACGACC-3'

3.5. Evaluación de inóculo fúngico en el proceso de compostaje

Una vez seleccionadas e identificadas las cepas fúngicas y bacterianas por su capacidad de producir enzimas celulolíticas, se procedió a preparar el inóculo para su aplicación en la mezcla de residuos (compostaje) proveniente del sector agropecuario.

3.5.1. Preparación del inóculo

Para la multiplicación de las cepas fúngicas (EM-12, EM-49, EM-72, EM-149 y EM-150) se utilizó “granos de arrocillo. Los granos se ablandaron en agua hervida, posteriormente se esterilizó en autoclave (15 libras de presión). A continuación, se inocularon 3 mL por separado de cada cepa fúngica y se incubaron a 28°C durante 21 días” (Khandelwal et al., 2012, p. 3951 y Chand et al., 2014, p. 318). El consorcio se preparó en cantidades iguales a partir de cada inóculo de las cepas después de ser aislados, caracterizados e identificados molecularmente por su capacidad de producir enzimas potencialmente útiles para la degradación de los residuos agropecuarios.

3.5.2. Preparación de las pilas de compostaje

Para la mezcla a compostar se emplearon dos residuos orgánicos de diferente naturaleza: estiércol de gallinas ponedoras (gallinaza) y cáscara de maní. Se prepararon dos pilas de compost, cada una contenía 21,56 kg estiércol de gallinas ponedoras y 43,12 kg de cáscara de maní. En ambas pilas el volteo se realizó de forma manual cada 8 días (Jiangming, 2016, p. 315).

3.5.3. Parámetros evaluados durante el proceso de compostaje

Las muestras de compost (1 kg) “se recogieron en diferentes puntos, desde la parte superior a la parte inferior de las pilas de compostaje” (Droussi et al., 2009, p. 1282). La temperatura, el pH, la conductividad eléctrica y la humedad de las pilas se monitorearon diariamente durante el proceso de compostaje.

a) Control de temperatura, contenido de humedad, pH y conductividad

La temperatura se monitoreó en “cinco puntos equidistantes de la pila usando un termómetro digital” (Kalamdhad y Kazmi, 2009, p. 1328). El pH y la conductividad “se determinaron mediante la suspensión de la muestra en agua destilada (1:10 p/v), y se midieron utilizando un potenciómetro” (Oakton modelo 700) (Chin et al., 2019, p. 4874; Bello et al., 2020, p. 3; Jiang et al., 2020, p. 2). Mientras que para el contenido de humedad “las muestras se secaron en la estufa (Memmert) a 105°C durante 24 h” (AOAC, 1990; Chin et al., 2019, p. 4874).

b) Análisis de materia orgánica y del contenido de macro y micronutrientes

El contenido de materia orgánica y la concentración de N, P, K Ca, Mg, S, B, Zn, Cu y Fe se realizaron al final del proceso de compostaje (150 días), en La Estación Experimental Santa Catalina del INIAP.

c) Evaluación de la toxicidad del compost

La fitotoxicidad de las muestras de compost se realizó a los 150 días. Se determinó en extractos de agua destilada (1:10, peso/volumen). Los extractos se agitaron durante 30 min y luego se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min; el sobrenadante se recogió y se filtró a través de un filtro de membrana de 045 micrómetros (μm). Posteriormente se pipetearon 5 mililitros del extracto acuoso en placas de Petri esterilizadas (10 cm de diámetro) revestidas con papel de filtro Whatman # 2. A continuación se dispersaron uniformemente sobre el papel de filtro siete semillas de rábano (*Raphanus sativus*), y se incubaron durante 5 días a temperatura ambiente en la oscuridad, para el testigo se utilizaron semillas colocadas en papel filtro humedecido sólo con agua destilada (Gao et al., 2010, p. 615 y Guo et al., 2012, p. 173).

Después de 8 días de incubación en la oscuridad, se determinaron el porcentaje de germinación de semillas y la longitud de la raíz del rábano en los extractos y se expresaron como índice de germinación (IG). El porcentaje de germinación relativo de semillas (PGR), crecimiento relativo de radícula (CRR) y el IG se calcularon de acuerdo con la fórmula presentada por Tiquia y Tam (1998) (p. 44).

$$\text{PGR} = \frac{\text{Número de semillas germinadas en el extracto}}{\text{Número de semillas germinadas en el testigo}} \times 100$$

$$\text{CRR} = \frac{\text{Elongación de radículas en el extracto}}{\text{Elongación de radículas en el testigo}} \times 100$$

$$\text{IG} = \frac{\text{PGR} \times \text{CRR}}{100}$$

d) Recuento de microorganismos

A partir de las diluciones realizadas se sembró 1 mL en placas Petri en los siguientes medios de cultivo: PDA para el conteo de hongos, agar nutriente para el conteo de mesófilos aeróbicos, agar rojo de fenol con sal de manitol para el conteo de estafilococo (Chapman 1945, p. 201), agar *Salmonella Shigella* (agar SS) para el conteo de Salmonela y agar MacConkey para el conteo de Coliformes fecales y totales. Para el recuento de hongos y de mesófilos aeróbicos las placas Petri se incubaron a 28°C. Para determinar los recuentos totales de Salmonela, estafilococo, coliformes fecales y totales, las placas Petri se incubaron a 37°C. Después de la incubación, se contaron las colonias y los resultados se calcularon teniendo en cuenta el factor de dilución, el peso de la muestra utilizada y se expresaron como UFC/gramo de compost (Ghinea y Leahu, 2020, p. 5).

3.6. Análisis estadístico

En el programa Infostat se comprobó por medio del test de Shapiro-Wilk, que los datos de halos de hidrólisis se distribuían normalmente; posteriormente se realizó el ANOVA para determinar diferencias significativas entre los halos de hidrólisis producidos por las

cepas bacterianas y fúngicas, y de esta manera poder seleccionar los mejores aislados. En lo relacionado con los datos obtenidos en el compost se verificó que estuvieran dentro de los límites establecidos por la Norma Chilena 2880 [NCh2880], (2003), la Norma Ambiental para el Distrito Federal [NADF-020-AMBT], (2012) y la norma Canadian Council of the Ministers of the Environment [CCME], (2005).

3.7. Consideraciones bioéticas

En nuestros días, hay cada vez más enfermedades y riesgos para la salud que se relacionan con el ambiente y los estilos de vida. Por tal motivo hay que considerar, desde el punto de vista ético y moral, el derecho de cada ciudadano a una buena salud, así como su deber y responsabilidad de velar por ella. Esto conlleva al deber de cuidar y proteger el medio ambiente, lo cual exige apoderarse de una formación ambientalista, tener conciencia de los factores ambientales que constituyen un riesgo para la salud y promover medidas y acciones que preserven la supervivencia de las generaciones presentes y futuras (Cuéllar et al., 2010, p. 322). En tal sentido en esta investigación se realizaron pruebas de hemólisis a todas las bacterias aisladas antes de proceder a aplicarlas a campo.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Selección de cepas fúngicas y bacterianas

4.1.1. Cepas fúngicas

a. Aislamiento cepas fúngicas

Se aislaron cuarenta y ocho cepas fúngicas de suelo de la Loma de Mil Pesos; teniendo los siguientes géneros representativos: *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium*, similar a lo reportado por Ávila y Quito (2019) (p. 89) y Paco-Pérez *et al.* (2017) (pp. 33, 34, 35).

b. Actividad enzimática de las cepas fúngicas en agar CMC

De las 48 cepas fúngicas aisladas, 32 produjeron halo de hidrólisis. La actividad producida por las cepas de fúngicas difirió significativamente ($p < 0,05$) y la cepa EM-72 produjo la mayor actividad celulasa (Tabla 2). Para posteriores estudios se eligió el aislado EM-72 que fue el que presentó el mayor promedio del halo de hidrólisis; sin embargo, para hacer la caracterización a nivel de pH y temperatura y de esta manera formar el consorcio microbiano fúngico se escogieron los aislados EM-12, EM-49, EM-149 y EM-150 que produjeron un diámetro de halo de hidrólisis superior a los 2 cm. El criterio empleado es similar al usado por Zhou *et al.* (2019), quienes señalan que “el proceso a menudo es inestable cuando se inocula un solo agente microbiano al compost” (p. 1). De igual manera Guzmán *et al.* (2015), “seleccionaron el aislado bacteriano que mostró el mayor promedio del halo de hidrólisis con 10,67 mm” (p. 184).

Tabla 2
Ensayo celulolítico de aislados fúngicos en agar CMC

Código de aislamiento Cepas fúngicas	Halo de hidrólisis cm
EM-72	3,46±0,29 ^a
EM-12	2,98±0,07 ^b
EM-149	2,70±0,10 ^{bc}
EM-150	2,32±0,10 ^{cd}
EM-49	2,28±0,25 ^{de}
EM-33	2,0±0,10 ^{def}
EM-134	1,94±0,08 ^{def}
EM-63	1,89±0,06 ^{ef}
EM-1	1,79±0,17 ^f
EM-145	1,78±0,13 ^f
EM-64	1,33±0,23 ^g
EM-135	1,24±0,18 ^g
EM-147	1,04±0,06 ^{gh}
EM-137	0,99±0,14 ^{ghi}
EM-62	0,77±0,09 ^{hij}
EM-131	0,74±0,01 ^{hij}
EM-148	0,74±0,01 ^{hij}
EM-100	0,67±0,03 ^{hijk}
EM-139	0,64±0,14 ^{hijkl}
EM-132	0,60±0,09 ^{ijkl}
EM-42	0,49±0,03 ^{ijkl}
EM-138	0,44±0,12 ^{ijkl}
EM-103	0,43±0,09 ^{ijkl}
EM-146	0,42±0,14 ^{ijkl}
EM-10	0,41±0,07 ^{ijkl}
EM-48	0,39±0,14 ^{ijkl}
EM-133	0,39±0,04 ^{ijkl}
EM-71	0,39±0,09 ^{ijkl}
EM-101	0,38±0,03 ^{ijkl}
EM-39	0,31±0,10 ^{kl}
EM-70	0,29±0,08 ^{kl}
EM-38	0,20±0,07 ^l
p-valor	<0,0001
EE	0,07
CV (%)	11,09

Letras iguales en columnas no difieren según Tukey ($p > 0,05$)

c. Supervivencia de aislados fúngicos a diferentes condiciones de pH y temperatura

➤ pH

Las cepas fúngicas EM-12, EM-49, EM-72, EM-149 y EM-150 se desarrollaron en todos los valores de pH durante las 72 horas de incubación, pero se registraron variaciones entre cepas (Figura 2). A pH 5,8 se obtuvo el mayor crecimiento en todas las cepas, similares resultados fueron obtenidos por Petrisor et al. (2016), quienes “obtuvieron alta producción de biomasa de *Trichoderma pseudokoningii* a pH 5,5 (1,60 g), seguido de pH 4,5 (1,52 g), y mínima a pH 7,5 y 8,5 (1,35 y 1,36 g)” (p. 12). Las cepas EM-49, EM-72 y EM-150 obtuvieron buen crecimiento a pH 7. De manera similar Singh et al. (2014b), “obtuvieron alta producción de biomasa de *Trichoderma* sp., a pH 6,5, seguido de 7,5 y 5,5”, sin embargo, Zehra et al. (2017) encontró en su estudio que “el crecimiento y la esporulación de todos los aislados de *Trichoderma* disminuyeron con valores de pH por debajo 4,6 o con un aumento por encima de 7,6” (p. 201). En conclusión “las actividades enzimáticas se ven afectadas por los cambios en el pH y dependerá de la cepa en estudio como en el estudio de las quitosanasas” (Da Silva et al., 2012, p. 65).

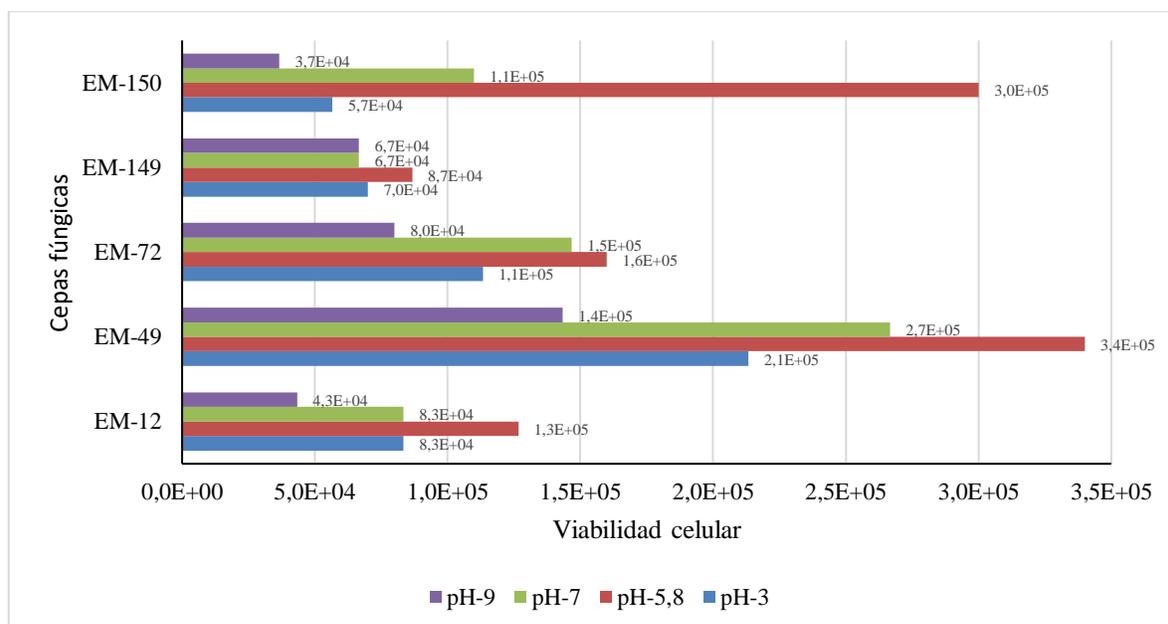


Figura 2. Supervivencia UFC de las cepas fúngicas seleccionadas a diferentes pH

➤ Temperatura

En la evaluación realizada a las cepas fúngicas EM-12, EM-49, EM-72, EM-149 y EM-150, se obtuvo que solamente las cepas EM-49 y EM-72 con $6,0 \times 10^{-1}$ y $1,5 \times 10^{-1}$ UFC respectivamente, lograron sobrevivir al ser expuestas a la temperatura controlada de 50°C durante 72 horas. En el estudio realizado por Zehra et al. (2017) reportaron que “el crecimiento de *Trichoderma* es lento por encima de los 40°C y cesa a los 45°C porque no hay esporulación” (p. 201). Singh et al. (2014b) reportaron que cuando “incubaron a 25°C la biomasa máxima producida por *Trichoderma harzianum* fue de 1,42 g; en comparación con la incubación a 20 y 35°C que resultó con la producción de 0,97 y 0,82 g de biomasa respectivamente” (p. 3). Silas et al. (2017) mencionan que “la producción de enzimas también disminuye por las elevadas temperaturas, ya que la enzima se desnaturaliza” (p. 257). En el estudio realizado por Legodi et al. (2019) encontraron que “la temperatura de incubación de 40°C redujo la producción de celulasa por *T. longibrachiatum*; mencionan que un aumento de temperatura a 35°C y 40°C provocó una disminución de la actividad endoglucanasa en todas las especies de hongos evaluadas” (p. 5).

4.1.2. Cepas bacterianas

a) Aislamiento de bacterias

A partir de las muestras de suelo se obtuvieron 41 aislamientos. La tinción de Gram de los aislados bacterianos mostró tres grupos principales: con excepción de las cepas EMB-217, EMB-230, EMB-235, EMB-261 que presentaron forma esférica y la cepa EMB-260 cuya forma es cocobacilos, el resto de las cepas aisladas fueron bacilos (Tabla 3); en el estudio realizado por Gagelidze et al. (2018), reportaron que “las bacterias del género *Bacillus* prevalecieron en la mayoría de los suelos estudiados, incluido la pradera del bosque de montaña” (p. 19).

Tabla 3
Características de las cepas bacterianas aisladas

Cepa bacteria	Endosporas	Tinción de Gram	Forma
EMB-100	Central	+	Bacilo mediano
EMB-200	Central	+	Bacilo corto
EMB-201	Central	+	Bacilo mediano
EMB-202	Central	+	Bacilo mediano
EMB-203	Central	+	Bacilo mediano
EMB-205	Central	+	Bacilo mediano
EMB-204	Central	+	Bacilo mediano
EMB-206	Terminal	+	Bacilo mediano
EMB-207	Central	+	Bacilo mediano en cadena
EMB-209	Central	+	Bacilo corto
EMB-210	Central	+	Bacilo mediano
EMB-211	Central	+	Bacilo mediano
EMB-212	Terminal	+	Bacilo mediano
EMB-213	No formador	+	Bacilo pequeño
EMB-214	No formador	+	Bacilo pequeño
EMB-215	No formador	+	Bacilo pequeño
EMB-216	Central	+	Bacilo mediano
EMB-217	No formador	+	Coco
EMB-218	Central	+	Bacilo mediano
EMB-230	No formador	+	Coco
EMB-231	Central	+	Bacilo mediano
EMB-232	Central	+	Bacilo pequeño
EMB-234	Central	+	Bacilo mediano
EMB-235	No formador	+	Coco
EMB-236	Central	+	Bacilo mediano
EMB-260	No formador	+	Cocobacilo
EMB-261	No formador	+	Coco
EMB-262	Central	+	Bacilo mediano
EMB-263	Central	+	Bacilo mediano
EMB-264	Central	+	Bacilo mediano en cadena
EMB-265	Central	+	Bacilo mediano
EMB-266	Central	+	Bacilo mediano
EMB-267	Central	+	Bacilo mediano
EMB-268	Central	+	Bacilo mediano
EMB-290	No formador	+	Bacilo pequeño
EMB-320	Central	+	Bacilo pequeño
EMB-321	Central	+	Bacilo pequeño
EMB-322	Central	+	Bacilo pequeño
EMB-323	Central	+	Bacilo pequeño
EMB-324	Central	+	Bacilo pequeño
EMB-325	Central	+	Bacilo pequeño

b. Actividad enzimática en agar CMC de cepas bacterianas

Dieciocho de las 41 cepas bacterianas aisladas produjeron halos de hidrólisis en agar Carboximetilcelulosa. Saini et al. (2017) manifiestan que “el halo alrededor de las colonias bacterianas indica la producción de celulasas extracelulares, este halo puede ser de diámetro variable evidenciando el potencial celulolítico de los aislamientos” (p. 8). La cepa bacteriana EMB-265 produjo el mayor diámetro de halo de hidrólisis con 1,68 cm (Tabla 4). De manera similar Singh y Kaur (2012) obtuvieron “30 aislamientos bacterianos, que mostraron resultados positivos cuando se aplicó el rojo Congo con una zona clara de 1 a 7 mm” (p. 507). Por su parte Guzmán et al. (2015) obtuvieron “30 aislados bacterianos con capacidad celulolítica y seleccionaron el aislado que presentó el mayor promedio del halo de hidrólisis con 12,33 mm” (p. 12).

Tabla 4

Ensayo celulolítico de aislados bacterianos en agar CMC

Cepas bacterianas	Halo Hidrólisis (cm)
EMB-265	1,68±0,14 ^a
EMB-205	1,44±0,09 ^b
EMB-236	1,34±0,06 ^{bc}
EMB-323	1,30±0,08 ^{bc}
EMB-325	1,30±0,11 ^{bc}
EMB-234	1,29±0,04 ^{bc}
EMB-324	1,29±0,11 ^{bc}
EMB-268	1,30±0,03 ^{bc}
EMB-321	1,29±0,04 ^{bc}
EMB-264	1,22±0,07 ^{cd}
EMB-320	1,19±0,06 ^{cd}
EMB-202	1,19±0,10 ^{cd}
EMB-203	1,08±0,04 ^d
EMB-322	1,02±0,03 ^d
EMB-200	0,69±0,01 ^e
EMB-204	0,67±0,02 ^e
EMB-216	0,62±0,03 ^e
EMB-261	0,48±0,03 ^e
P-valor	<0,0001
Error Estándar	0,04
CV (%)	5,93

Letras iguales en columnas no difieren según Tukey (p>0,05)

c. Supervivencia de cepas bacterianas a diferentes pH y temperatura

Para estudios posteriores se eligió el aislado bacteriano EMB-265 que fue el que presentó el mayor promedio del halo de hidrólisis (Tabla 4); sin embargo, para formar el consorcio microbiano bacteriano se escogieron los aislados EMB-205 y EMB-236 que fueron las cepas que produjeron un diámetro de halo de hidrólisis mayor a los 1,3 cm.

➤ pH

“El crecimiento bacteriano depende de las condiciones fisicoquímicas como pH y temperatura” (Zaved et al., 2008, p 47). Durante la evaluación realizada a 18 horas en diferentes condiciones de pH desfavorables (3-5 y 9), los aislados bacterianos EMB-236, EMB-265 y EMB-205 mantuvieron la supervivencia, posiblemente porque poseen endosporas, que son estructuras de resistencia que le ayudan a mantenerse cuando las condiciones no son favorables (Madigan et al., 2015, p 52). En el pH-7 que normalmente está presente en los medios de cultivos para el aislamiento y multiplicación de las bacterias, presentaron un mayor crecimiento de UFC/mL con respecto a los demás pH evaluados (Figura 3). De manera similar Saha y Santra, (2014) “encontrando que los pH de 7,2 y 7,6 favorecían el crecimiento máximo de las cepas bacterianas” (p. 14).

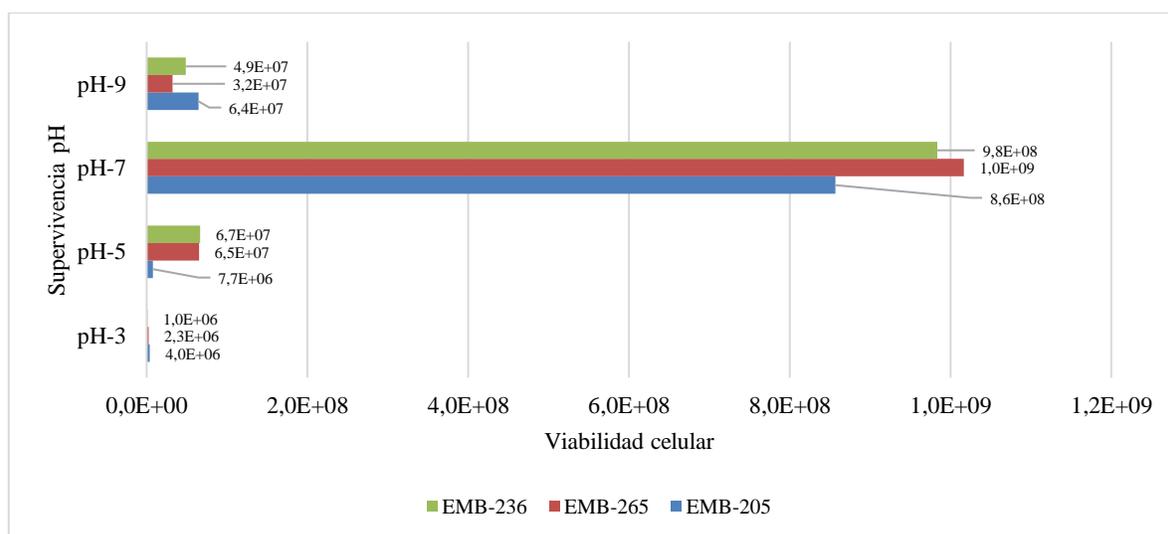


Figura 3. Supervivencia UFC de cepas bacterianas seleccionadas a diferentes pH

➤ Temperatura

Durante la evaluación de 18 horas a 50°C los aislados bacterianos lograron sobrevivir y desarrollarse (Figura 4), posiblemente se deba porque “poseen endosporas que son estructuras de resistencia que le ayudan a mantenerse cuando las condiciones no son favorables (Madigan et al., 2015, p 52). De manera similar De Souza, y Martins (2001) encontraron que “la temperatura influye en la secreción de enzimas extracelulares” (p. 272).

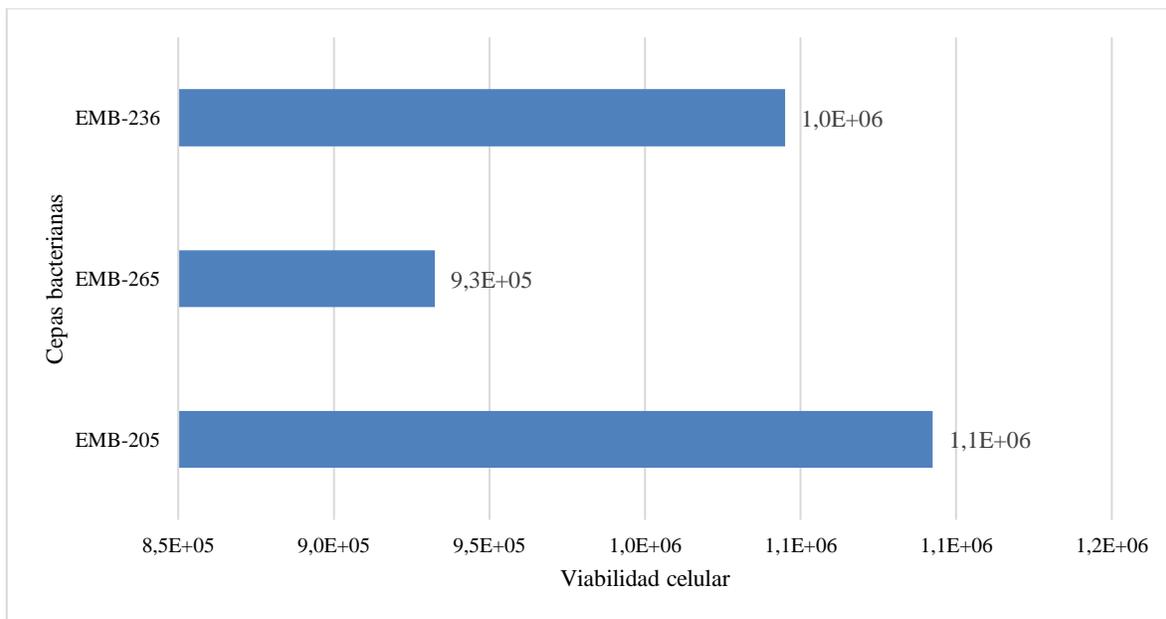


Figura 4. Supervivencia UFC de las cepas bacterianas seleccionadas a 50°C

d. Prueba de hemólisis cepas bacterianas

La evaluación realizada a las cepas EM-205, EM-236 y EM-265, mostró que las cepas EM-236 y EM-265 mostraron hemólisis Gamma ya que no existía halo alrededor de la colonia y la cepa EM-205 tenía hemólisis beta ya que presentó un halo transparente.

4.2. Identificación molecular de cepas fúngicas y bacterianas

La identificación hasta especie se realizó a las cepas bacterianas EM-236, EM-265 y a las cepas fúngicas EM-12, EM-49, EM-72, EM-149 y EM-150. La cepa EM-205 no se identificó por presentar hemólisis beta.

Basado en la secuencia de ADN_r 16s y ADN_r rpoB, las bacterias aisladas EMB-236 y EMB-265 se identificaron como perteneciente al género *Bacillus*; El amplicón del aislado EMB-236 tenía una identidad de secuencia del 99,03% con *Bacillus cereus*, con las secuencias de referencia depositada en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX713167.1?report=fasta>). Mientras que el amplicón del aislado EMB-265 tenía una identidad de secuencia del 99,86% con *Bacillus cereus* con las secuencias de referencia de las cepas en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF157016.1?report=fasta>).

Las cepas fúngicas aisladas EM-12, EM-49, EM-72, EM-149 y EM-150 por sus secuencias de ADN_r ITS se identificaron como perteneciente al género *Trichoderma*. El amplicon del aislado EM-12 tenía una identidad de secuencia del 99,48, con la secuencia de referencia de *T. longibrachiatum* depositada en Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MK910065.1?report=fasta>). El amplicón del aislado EM-49 reveló una identidad del 99,30% con la secuencia de referencia de *T. reesei* (Tabla 5) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT229303.1?report=fasta>). Mientras que el aislado EM-72 presento una identidad de secuencia del 100%, con la secuencia de referencia de *T. longibrachiatum* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT131278.1?report=fasta>). En cambio el aislado EM-149 presento una identidad de secuencia del 99,50%, con la secuencia de referencia de *T. longibrachiatum* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT052707.1?report=fasta>) y el aislado EM-150 presento una identidad de secuencia del 99,86%, con la secuencia de referencia de *T. longibrachiatum* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU317858.1?report=fasta>).

En trabajos similares, Legodi et al. (2019) realizaron “la identificación de los mejores 6 aislamientos seleccionados por el tamaño del halo de hidrólisis y reportaron la identificación de las especies como *T. longibrachiatum*, *T. harzianum* y *Aspergillus fumigatus*” (p. 3).

Tabla 5
Identificación de aislados bacterianos y fúngicos

Aislamientos	Identificación	% de identidad
EM-49	<i>T. reesei</i>	99.30
EM-12	<i>T. longibrachiatum</i>	99.48
EM-72	<i>T. longibrachiatum</i>	99.48
EM-149	<i>T. longibrachiatum</i>	100
EM-150	<i>T. longibrachiatum</i>	99.50
EM-236	<i>Bacillus cereus</i>	99.03
EM-265	<i>Bacillus cereus</i>	99.86

4.3. Evaluación de inóculo fúngico en el proceso de compostaje

Para este ensayo se evaluaron solamente las cepas fúngicas que fueron identificadas como *T. longibrachiatum* y *T. reesei*. Las cepas bacterianas identificadas como *Bacillus cereus* no se consideraron como inóculo ya que se considera que faltan más estudios para poder liberarlas al ambiente, ya que ciertos autores como Pérez, (2012) “le reconocen su carácter de patógeno oportunista” (p. 105); este tipo de bacterias poseen un complejo de enterotoxina que induce la pérdida de líquido de las células intestinales en humanos (Madigan et al., 2015, p 719).

4.3.1. Aplicación del inóculo fúngico

Los cuatro cultivos de *T. longibrachiatum* y de la cepa de *T. reesei* se mezclaron en la misma cantidad para obtener un inóculo mixto; inoculándose 500 g en la mezcla de

residuos (T2) a los 38 días de proceso de compostaje, cuando el pH había disminuido a 7,65; se lo realizó en este punto del proceso porque en la evaluación de supervivencia a pH 9, el crecimiento (UFC/mL) no fue el mismo comparado al crecimiento del pH 5,8 (Gráfico 2). Varma et al. (2017) manifiestan que “la mayoría de las especies de hongos prefieren un ambiente ácido; sin embargo, pueden tolerar un amplio rango de pH” (p. 7). Shahid et al. (2011) reportaron que “el máximo crecimiento y esporulación de *T. longibrachiatum* ocurre a una temperatura de 30°C y un pH de 7.0” (p. 149). Por su parte Neher et al. (2013) consideran que “la fase de curado ofrece un sustrato y un ambiente favorable para la recolonización microbiana, que puede lograrse con la inoculación de microorganismos con características adecuadas como la producción de enzimas” (p. 8).

4.3.2. Parámetros evaluados

a) Temperatura

La temperatura en ambas pilas fue superior a 50°C durante los días 2, 3, 4 y 5, alcanzando un pico máximo mayor a 55°C en el día 4 (Figura 5), tendencias similares en la temperatura presentaron Nair y Okamitsu (2010) (p. 979) y Yang et al. (2019) (p. 558); “el rápido incremento en la temperatura es indicativo de la descomposición microbiana activa y el proceso de degradación temprano presente en la mezcla de residuos (cáscara de maní + gallinaza)” (Nutongkaew et al., 2014, p. 278). Bazrafshan et al., (2006b) mencionan que “temperaturas superiores a los 60°C, reducen la actividad metabólica de los microorganismos” (p. 117). Acosta et al. (2006) consideran “óptimas las temperaturas entre 35-55°C para conseguir la eliminación de patógenos, parásitos y semillas de malas hierbas” (p. 223). Manifiestan también que “a temperaturas muy elevadas, muchos microorganismos de interés para el proceso mueren y otros no actúan al estar esporulados”. A partir de los 14 días de compostaje, las temperaturas en ambas pilas de compostaje fueron inferiores a 35°C.

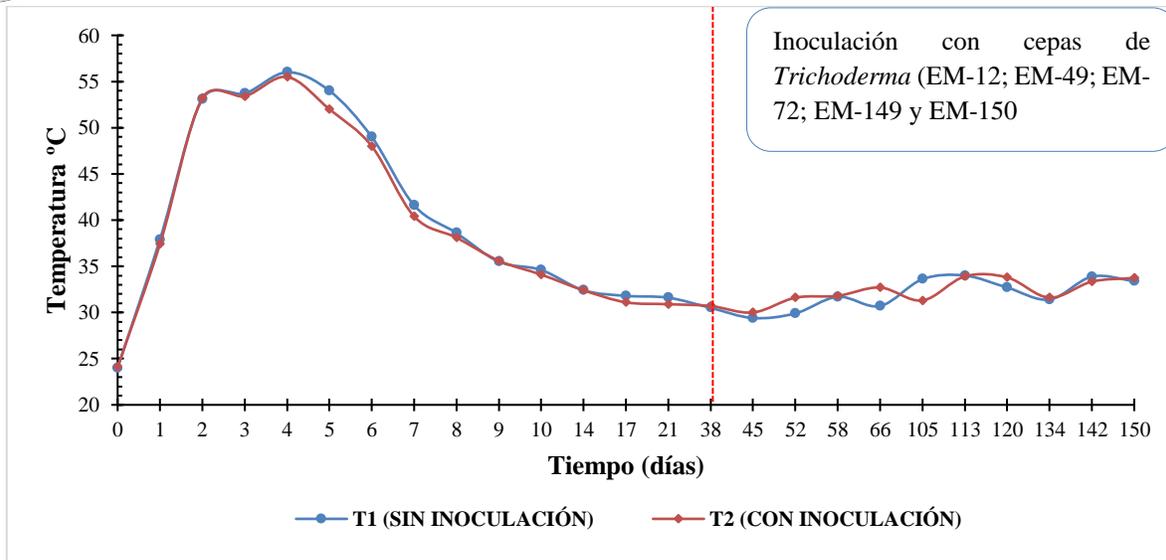


Figura 5. Cambios de temperatura durante el compostaje en T1 y T2

b) Potencial hidrógeno (pH)

El valor de pH inicial para las pilas 1 y 2 fue 8,58 y 8,72 respectivamente; posteriormente durante los primeros ocho días de compostaje, los valores de pH en las dos pilas aumentaron para alcanzar los picos máximos que oscilaron entre 9,53 y 9,47, similar a lo reportado por Pan et al. (2011) quienes obtuvieron “valores iniciales de pH entre 4,0 y 9,0 dependiendo del sustrato utilizado” (p. 131). “Los valores de pH superiores a 9,0 podrían estar relacionados con una elevada cantidad de compuestos de nitrógeno en el compost” (Voběrková et al., 2017, p. 159). En este estudio disminuyeron paulatinamente y llegaron a estabilizarse con valores finales de pH que fluctuaron entre 7,37 y 7,41 en ambas pilas de compost (Figura 6).

Los resultados obtenidos en este estudio fueron similares a los reportados por Nutongkaew et al. (2014) durante “el compostaje de lodo de biogás de molino de aceite de palma mezclado con racimos de fruta vacía de palma rallada y torta decantadora” (p. 278); y con el estudio de Huang et al. (2017) durante “el compostaje obtenido en la mezcla con estiércol de ganado” (p. 5). Los resultados obtenidos también se encuentran en los límites permisibles por la NCh2880 (2003), que establece “un límite comprendido entre 5 y 7,5”; también con la norma CCME, (2005), que establece “un límite comprendido entre 5 y 8,5 y

con la NADF-020-AMBT (2012) que establece “un límite comprendido entre 6,7 y 7,5 para compost tipo A” (p. 77).

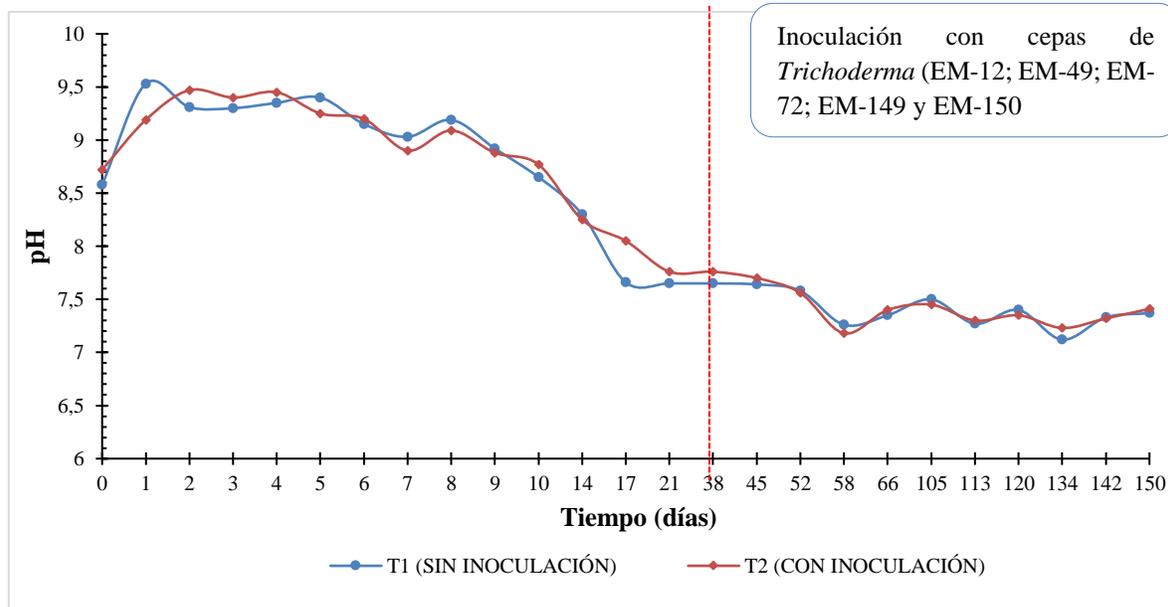


Figura 6. Variación del pH durante el proceso de compostaje en T1 y T2

c) Conductividad eléctrica

“El compost con alta CE libera un exceso de sales solubles, teniendo un efecto negativo en el crecimiento y el rendimiento de las plantas” (Chan et al., 2016, p. 840). La CE en las dos pilas (Sin inoculación y con inoculación) disminuyó y se estabilizó al final del proceso de compostaje, alcanzando valores que oscilaron entre 1,33 y 1,04 dS m⁻¹, respectivamente (Figura 7). Similares resultados fueron reportados por Rashad et al. (2010) quienes obtuvieron en diferentes compostas con valores “que oscilaron entre 0,79 y 1,04 dS m⁻¹” (p. 5954) y con Isaza-Arias, et al. (2009) quienes obtuvieron “un valor de 1.0 dS m⁻¹ en el tratamiento con volteo manual” (p. 238). A los 150 día ambos tratamientos estuvieron en el rango establecido por la NCh2880, (2003) “(<3 dS/m)” y la NADF-020-AMBT, (2012) “(< 4 dS/m) para compost tipo A” (p. 77).

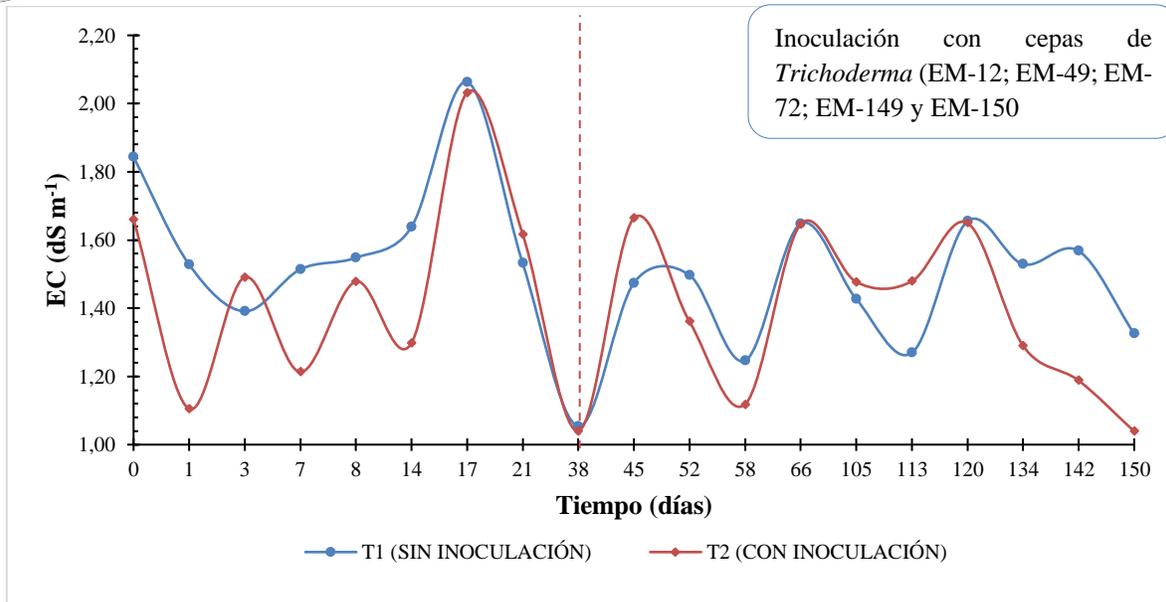


Figura 7. Cambios de CE durante el proceso de compostaje en T1 y T2

d) Humedad

El contenido de humedad en las dos pilas al inicio fue del 62,2 y 64,5% respectivamente y durante los 150 días de proceso, “se mantuvo en el rango recomendado del 50 al 65%” (Vallini et al., 2002, p. 197; Mohee y Mudhoo, 2005, p. 96; Elcik et al., 2016, p. 216). Durante el proceso de compostaje se registraron picos bajos en el contenido de humedad en ambos tratamientos en los primeros días (Figura 8) posiblemente “se debió a la temperatura elevada y durante el proceso por el volteo frecuente de las pilas de compostaje” (Nutongkaew et al., 2014, p. 278), y también pudo ser ocasionado “por la pérdida de agua en forma de lixiviado” (Krogmann y Woyczehowski, 2000, p. 235), “en dependencia de las materias primas empleadas” (Acosta et al., 2006, p. 223).

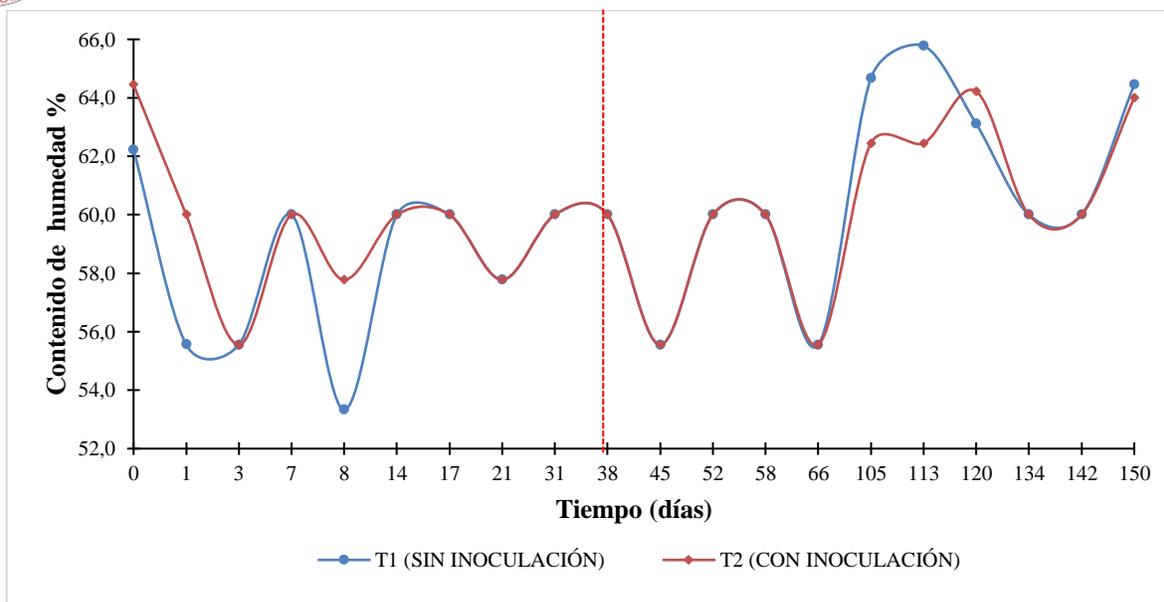


Figura 8. Cambios de humedad durante el proceso de compostaje en T1 y T2

e) Fitotoxicidad

“El índice de germinación de semillas es un indicador de la madurez del compost ya que comprueba si durante el proceso de compostaje se reducen los compuestos fitotóxicos que inhiben la germinación de las semillas y el crecimiento radicular” (Wong et al., 2009, p. 3329). En este estudio a los 150 días de proceso de compostaje, ambos tratamientos se ajustan a lo establecido en la NADF-020-AMBT, (2012) “(IG \geq 85 %) para compost tipo A” (p. 77); sin embargo, el IG fue más alto para el tratamiento inoculado que para tratamiento sin inocular (Tabla 6). similares resultados fueron reportados por Selim et al. (2012) “para las pilas que fueron inoculadas” (p. 71).

Tabla 6

Índice de germinación de semillas de rábano

Crecimiento de radícula relativo (cm)		Índice de germinación %	
Sin inoculación	Con inoculación	Sin inoculación	Con inoculación
13.1	13.8	87,58	93,50

f) Contenido nutricional

En ambos tratamientos el contenido de nitrógeno (Tabla 7) se encuentra en los límites establecidos por la NCh2880, (2003), “ $\geq 0,8\%$ ”; en cambio el fósforo debe ser $\geq 0,1\%$ sobre la base seca” (p. 11). El contenido de Cobre y Zinc se encuentran en los límites establecidos por la NCh2880, (2003), donde se estipula que “el contenido máximo de cobre y Zinc en el compost para utilizarlo en agricultura orgánica debe ser 50 y 60 ppm, respectivamente” (p.13). “Cuando se presentan bajos contenidos de nutrientes en el producto final es porque durante la segunda fase mesofílica (enfriamiento), los nutrientes se convierten en un factor limitante, provocando la disminución de la actividad microbiana y la producción de calor” (Ryckeboer et al., 2003, p. 352). De manera similar Jadia y Fulekar, (2008) reportaron que “con la concentración de 5 ppm de Cu en girasol obtuvieron la mayor tasa de germinación (75 %), sin embargo con la concentración de 20 ppm obtuvieron el mejor promedio en la longitud de la raíz (13,8 cm)”.

Tabla 7

Concentraciones totales de macro y micronutrientes en el compost

Elemento	Unidad	Sin inoculación	Con inoculación
Nitrógeno	N %	1,34	1,12
Fosforo	P %	0,87	0,83
Potasio	K %	0,80	0,70
Calcio	Ca %	7,53	5,96
Magnesio	Mg %	0,48	0,47
Azufre	S %	0,20	0,18
Boro	B ppm	0,1	0,1
Zinc	Zn ppm	36,7	35,5
Cobre	Cu ppm	11,1	9,8
Hierro	Fe ppm	1007	1443
Manganeso	Mn ppm	56,0	56,8

En lo que respecta al contenido de materia orgánica se obtuvieron valores finales de 71,55 % para el tratamiento sin inoculación y de 68,73% para el tratamiento inoculado; similar a lo reportado por Elorrieta et al. (2002), durante “el compostaje formado por la mezcla de desechos de pimiento e inoculado con *Trichoderma* sp., (p. 125), también es similar con el estudio de Gaiind et al. (2005) quienes utilizaron “un inóculo mixto *Trichoderma viride*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Aspergillus nidulans*” (p. 303). En ambos tratamientos el contenido de materia orgánica se encuentra en los límites establecidos por la NCh2880, (2003), ($\geq 45\%$) (p. 14).

g) Análisis microbiológico

Al final del proceso de compostaje se observó la presencia de *Staphylococcus*, coliformes totales y fecales (Tabla 8), similares resultados fueron reportados por Hassen et al. (2001), quienes obtuvieron “una reducción en el número de *Staphylococcus*, coliformes totales y fecales durante la fase termofílica del proceso de compostaje. Sin embargo, mencionan que a partir de la novena semana apareció una fase de resurgimiento en todas las hileras” (pp. 221-222). En el estudio realizado por Erickson et al. (2015) encontraron que “la inactivación de patógenos en mezclas de compost modificadas con paja de trigo o cáscara de maní dependía del patógeno objetivo, el nivel de humedad y la temperatura de almacenamiento” (p. 248).

En este ensayo el tratamiento inoculado presentó menores valores de UFC.g⁻¹ en todos los parámetros microbiológicos evaluados, debido posiblemente “por las cepas fúngicas que actúan como controladores biológicos contra patógenos. Los hongos del género *Trichoderma* utilizan mecanismos de biocontrol como el micoparasitismo, la antibiosis y la competencia por nutrientes o espacio” (Harman, 2000, p. 387; Sempere y Santamarina, 2010, p. 340). Sood et al. (2020) señalan que se debe de “promover el uso de especies de *Trichoderma* como alternativa válida a los plaguicidas en la era de una economía verde que tiene como objetivo promover la salud humana y la protección del medio ambiente” (p. 15).

El tratamiento con inoculación está dentro de “los límites permisibles de la norma de compostaje CCME, (2005) que estipula $<1000 \text{ UFC.g}^{-1}$ de Coliformes fecales” (p. 16).

Tabla 8

Densidad de patógenos (UFC.g^{-1}) al final del proceso de compostaje

Microorganismos	Sin inoculación (UFC.g^{-1})	Con inoculación (UFC.g^{-1})
Coliformes totales	$4,3 \times 10^6$	$5,8 \times 10^2$
Coliformes fecales	$3,0 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$
<i>Salmonella</i>	>3	<3
Mesófilos aerobios	$3,4 \times 10^6$	$9,6 \times 10^5$
<i>Staphilococos</i>	$1,67 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$

h) Supervivencia de las cepas inoculadas

En el recuento realizado en los sustratos a los 150 días del proceso de compostaje se detectaron cepas de *Trichoderma* con características parecidas a las cepas inoculadas. Esto se lo detectó en placas con agar papa dextrosa. Se hace conocer que en el tratamiento no inoculado no se detectó el crecimiento de hongos del género *Trichoderma*, pero si se detectaron otros tipos de hongos como *Aspergillus* y *Penicillium*.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Se aislaron un total de 89 cepas de microorganismos (41 bacterias y 48 hongos) del suelo de la Loma de Mil Pesos; de las cuales por la capacidad de degradación de la celulosa se seleccionaron 50 microorganismos (18 bacterias y 32 hongos).

La bacteria EMB-265 produjo el mayor halo de hidrólisis de la celulosa (1,68 cm), mientras que el hongo EM-72 fue el que produjo el mayor halo de hidrólisis de la celulosa (3,46 cm).

Las bacterias EM-236 y EM-265 se identificaron como *Bacillus cereus*; mientras que las cepas de hongos EM-12, EM-72, EM-149, EM-150 se identificaron como *Trichoderma longibrachiatum* y la cepa EM-49 se identificó como *Trichoderma reesei*.

En lo relacionado al compostaje los parámetros evaluados en ambos tratamientos se encuentran dentro de los rangos exigidos por la NCh2880, (2003) y la norma NADF-020-AMBT, (2012). En lo que respecta al seguimiento se encontró la supervivencia de las cepas fúngicas inoculadas, a los 150 días del proceso de compostaje.

5.1. RECOMENDACIONES

Evaluar la actividad enzimática de las cepas de *T. longibrachiatum* y *T. reesei* en compostaje empleando otros residuos agropecuarios.

Evaluar el potencial de las cepas de *T. longibrachiatum* y *T. reesei* como biocontroladoras de patógenos en especies vegetales de importancia agroalimentaria.

Determinar la capacidad promotora de crecimiento de las cepas de *T. longibrachiatum* y *T. reesei* en diferentes cultivos de importancia agroalimentaria.

Evaluar la producción de celulasas por las cepas de *T. longibrachiatum* y *T. reesei* en un amplio rango de valores de pH y de temperatura de incubación.

Hacer análisis metagenómico a partir de muestras suelo para explotar el potencial oculto de los microorganismos no cultivables.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, Y., Cayama, J., Gómez, E., Reyes, N., Rojas, D., y García, H. (2006). Respiración microbiana y prueba de fitotoxicidad en el proceso de compostaje de una mezcla de residuos orgánicos. *Multiciencias*, 6(3), 220-227. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/904/90460303.pdf>
- Ahmed, M., Idris, A., y Syed, S. R. (2007). Physicochemical characterization of compost of the industrial tannery Sludge. *Journal of Engineering Science and Technology*, 2(1), 81-94. <https://jestec.taylors.edu.my/Vol%202%20Issue%201%20April%2007/81-94%20Ahmed.pdf>.
- Al-Taweil, H. I., Osman, M. B., Hamid, A. A., y Yusoff, W. M. W. (2009). Optimizing of *Trichoderma viride* cultivation in submerged state fermentation. *American Journal of Applied Sciences*, 6(7), 1284–1288. <https://doi.org/10.3844/ajassp.2009.1284.1288>.
- Anwar, Z., Irshad, M., Fareed, I., y Saleem, A. (2015). Characterization and Recycling of Organic Waste after Co-Composting - A Review. *Journal of Agricultural Science*, 7(4). <https://doi.org/10.5539/jas.v7n4p68>.
- Anyanwu, Ch. F., Ngohayon, S. L., Ildefonso, R. L., y Ngohayon, J. L. (2015). Application of Indigenous Microorganisms (IMO) for Bio-Conversion of Agricultural Waste, *International Journal of Science and Research*. 4(5). <https://www.ijsr.net/archive/v4i5/SUB154125.pdf>.
- Apun, K., Jong, B. C., y Salleh, M. A. (2000). Screening and isolation of a cellulolytic and amylolytic *Bacillus* from sago pith waste. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 46(5), 263–267. <https://doi:10.2323/jgam.46.263>.
- Ariffin, H., Abdullah, N., Kalsom, MSU, Shirai, Y, Hassan, MA. (2006). Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *International Journal of Engineering and Technology*. 3(1), 47–53. <https://core.ac.uk/download/pdf/154924657.pdf>.
- Avery, S. M., Moore, A., y Hutchison, M. L. (2004). Fate of *Escherichia coli* originating from livestock faeces deposited directly onto pasture. *Letters in Applied Microbiology*, 38(5), 355–359. <https://doi:10.1111/j.1472-765x.2004.01501.x>.

- Ávila, J. Quito, D. 2019. Identificación de la biodiversidad fúngica a través del análisis metagenómico del suelo en el área de la concesión minera loma larga Azuay – Ecuador. Tesis Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca Ecuador 115.
- Bazrafshan E, Mohammad ali Zazouli, Javad Bazrafshan y Anoushirvan Mohseni Bandpei, (2006a). Co-composting of Dewatered Sewage Sludge with Sawdust. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(8), 1580-1583. <https://doi:10.3923/pjbs.2006.1580.1583>.
- Bazrafshan, E., A. Zarei, F. Kord, N. Poormollae, S. Mahmoodi, M. Zazouli. (2016c). Maturity and Stability Evaluation of Composted Municipal Solid Wastes. *Health Scope*, 5(1), 1-9. <https://doi:10.17795/jhealthscope-33202>.
- Bazrafshan, E., Zazouli, M., Bazrafshan, J., y Bandpei, A. (2006b). Evaluation of microbiological and chemical parameters during wastewater Sludge and Sawdust Co-composting. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 10(2), 115-119. <https://doi:10.4314/jasem.v10i2.43683>.
- Bello, A., Han, Y., Zhu, H., Deng, L., Yang, W., Meng, Q., Sun, Y. Egbeagu, U., Sheng, S., Wu, X., Jiang, X y Xu, X. (2020). Microbial community composition, co-occurrence network pattern and nitrogen transformation genera response to biochar addition in cattle manure-maize straw composting. *Science Total Environment*, 137759. <https://doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137759>.
- Bernal, M. P., Albuquerque, J. A., y Moral, R. (2009). Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology*, 100(22), 5444-5453. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.027>
- Bernal, M. P., Sommer, S. G., Chadwick, D., Qing, C., Guoxue, L., y Michel, F. C. (2017). Current Approaches and Future Trends in Compost Quality Criteria for Agronomic, Environmental, and Human Health Benefits. *Advances in Agronomy*, 143–233. <https://doi:10.1016/bs.agron.2017.03.002>.
- Borken, W., Muhs, A., y Beese, F. (2002). Application of compost in spruce forests: effects on soil respiration, basal respiration and microbial biomass. *Forest Ecology and Management*, 159(1-2), 49-58. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(01\)00709](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00709)
- Boulter, J., J. Trevors, G. Boland, (2002). Microbial studies of compost: bacterial identification, and their potential for turfgrass pathogen suppression. *World Journal*

- of *Microbiology and Biotechnology*, 18, 661-671.
<https://doi:10.1023/A:1016827929432>.
- Brewer, L., Andrews, D., Sullivan, D., y Gehr W. (2013). *Agricultural Composting and Water Quality*. Oregon State University.
<https://catalog.extension.oregonstate.edu/em9053>.
- Canadian Council of the Ministers of the Environment [CCME]. (2005). *Guidelines for Compost Quality*, Ministry of Public Works and Government Services Canada. Cat. No. PN1340. https://www.topspray.com/wp-content/uploads/2020/06/compostgdlns_1340_e-1.pdf.
- Castellano-Hinojosa, A., y Strauss, S. L. (2020). Impact of Cover Crops on the Soil Microbiome of Tree Crops. *Microorganisms*, 8(3), 328.
<https://doi:10.3390/microorganisms8030328>.
- Chan, M. T., Selvam, A., y Wong, J. W. C. (2016). Reducing nitrogen loss and salinity during “struvite” food waste composting by zeolite amendment. *Bioresource Technology*, 200, 838–844. <https://doi:10.1016/j.biortech.2015.10.093>.
- Chand, K., Babu, A., Bordoloi, M. y Ali, A. (2014). Evaluation of culture media for biomass production of *Trichoderma viride* (KBN 24) and their production economics. *American Journal of Agriculture and Forestry*. 2(6): 317-320.
<https://doi:10.11648/j.ajaf.20140206.24>.
- Chapman, G.H. (1945). The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. J. *Bacteriol*, 50, 201-203.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC374126/pdf/jbacter00684-0068.pdf>.
- Chaudhary, D.K., Khulan, A. y Kim, J. (2019). Development of a novel cultivation technique for uncultured soil bacteria. *Sci Rep* 9(6666). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43182-x>.
- Chen, L., De Haro Marti, M., Moore, A., y Falen, C. *Dairy Compost Production and Use in Idaho: The Composting Process*. University of Idaho, Moscow, 2011.
<https://www.extension.uidaho.edu/nutrient/culturalpractices/PDF/The%20composting%20Process.pdf>.
- Chin, K. L., H'ng, P. S., Chai, E. W., Khoo, P. S., Lee, C. L., y Go, W. Z. (2019). Valorization of Lignocellulosic Food Industry Waste in Malaysia by Accelerated Co-composting

- Method: Changes in Physicochemical and Microbial Community. *Waste and Biomass Valorization*, 11: 4871–4884. <https://doi:10.1007/s12649-019-00825-4>
- Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación (COES, 2016). Registro Oficial N° 899. <https://www.wipo.int/edocs/lexdocs/laws/es/ec/ec075es.pdf>.
- Convention on biological diversity [CBD]. (2016). n.d.b. What is forest biological diversity? Montreal, Canada. <https://www.cbd.int/forest/what.shtml>.
- Cuéllar, L. Serra, S. Collado, A. Reyes, R. (2010). La bioética desde la perspectiva de la salud ambiental: su expresión en Cuba. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(3), 321-334. <https://scielo.sld.cu/pdf/hie/v48n3/hie11310.pdf>.
- Da Silva, LCA., Honorato, TL., Cavalcante, RS., Franco, TT y Rodrigues, S. (2012). Effect of pH and Temperature on Enzyme Activity of Chitosanase Produced Under Solid Stated Fermentation by *Trichoderma spp.* *Indian J Microbiol*, 52(1), 60–65. <https://doi10.1007/s12088-011-0196-0>.
- De Paula CCP., Montoya QV., Meirelles LA., Sánchez CF, Rodrigues A y Selegim MHR. (2019). High cellulolytic activities in filamentous fungi isolated from an extreme oligotrophic subterranean environment (Catão cave) in Brazil. *An Acad Bras Cienc* 91(3): e20180583. <https://doi10.1590/0001-3765201920180583>.
- De Souza, A. N. y Martins, M. L.L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(4): 271-275. <https://doi:10.1590/s1517-83822001000400003>.
- Droussi, Z., D'orazio, V., Provenzano, M. R., Hafidi, M., y Ouattmane, A. (2009). Study of the biodegradation and transformation of olive-mill residues during composting using FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2-3), 1281–1285. <https://doi:10.1016/j.jhazmat.2008.09.081>.
- Eichorst, S. A., Breznak, J. A., y Schmidt, T. M. (2007). Isolation and Characterization of Soil Bacteria That Define *Terriglobus* gen. nov., in the Phylum Acidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2708–2717. <https://doi:10.1128/AEM.02140-06>.
- Elcik, H., Zoungrana, A., Bekaraki, N. 2016. Laboratory-scale investigation of aerobic compost stability of municipal solid waste in Istanbul. *Sigma Journal Engineering*

- and Natural Sciences, 34(2): 211-220.
<https://eds.yildiz.edu.tr/ajaxtool/GetArticleByPublishedArticleId?PublishedArticleId=2290>.
- Elorrieta, M.A., López, M.J., Suárez-Estrella, F.F., Vargas-García, M.C y Moreno, J (2002). Composting of different horticultural wastes: Effect of fungal inoculation. *Microbiology of Composting*. 119–132. https://doi.org/10.1007/978-3-662-08724-4_10.
- Erickson, M.C., Smith, C., Jiang, X., Flitcroft, I.D., y Doyle, M.P. (2015). Survival of *Salmonella* or *Escherichia coli* O157:H7 during Holding of Manure-Based Compost Mixtures at Sublethal Temperatures as Influenced by the Carbon Amendment. *Journal of Food Protection*, 78(2), 248-255. <https://doi:10.4315/0362-028x.jfp-14-289>.
- Erickson, MC, Liao, J., Jiang, X. y Doyle, MP. (2014). Inactivation of Pathogens during Aerobic Composting of Fresh and Aged Dairy Manure and Different Carbon Amendments. *Journal of Food Protection*, 77 (11), 1911-1918. <https://doi:10.4315/0362-028x.jfp-14-194>.
- Escobar, F., Ponce, J. S., y Azero, M. (2012). Evaluación del proceso de compostaje con diferentes tipos de mezclas basadas en la relación C/N y la adición de preparados biodinámicos en la Granja Modelo Pairumani. *Acta Nova*, 5(3), 390-410. <https://www.scielo.org.bo/pdf/ran/v5n3/v5n3a04.pdf>.
- Estrella, J., Manosalvas, R., Mariaca, J., y Ribadeneira, M. (2005). Biodiversidad y recursos genéticos: Una guía para su uso y acceso en el Ecuador. EcoCiencia, INIAP, MAE y Abya Yala. Quito. <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/56358.pdf>.
- Fourti, O., Jedidi, N., y Hassen, A. (2008). Behaviour of Main Microbiological Parameters and of Enteric Microorganisms during the composting of municipal solid wastes and sewage sludge in a semi-industrial composting plant. *American Journal of Environmental Sciences*, 4(8), 103-110. <https://doi.org/10.3844/ajessp.2008.103.110>.
- Fourti, O., Jedidi, N., y Hassen, A. (2011). Comparison of methods for evaluating stability and maturity of co-composting of municipal solid wastes and sewage sludge in semi-arid pedo-climatic condition. *Natural Science*, 3(2), 124-135. <https://doi.org/10.4236/ns.2011.32018>.

- Gagelidze, NA, Amiranashvili, LL, Sadunishvili, TA, Kvesitadze, GI, Urushadze, TF y Kvrivishvili, TO (2018). Composición bacteriana de diferentes tipos de suelos de Georgia. *Annals of Agrarian Science*, 16(1), 17–21. <https://doi:10.1016/j.aasci.2017.08.006>.
- Gaind, S., Pandey, A. K., y Lata. (2005). Biodegradation study of crop residues as affected by exogenous inorganic nitrogen and fungal inoculants. *Journal of Basic Microbiology*, 45(4), 301–311. <https://doi:10.1002/jobm.200410483>.
- Gaitán, D., y Pérez, L. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá. P 81. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8296/tesis274.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Gao, M., Liang, F., Yu, A., Li, B., y Yang, L. (2010). Evaluation of stability and maturity during forced-aeration composting of chicken manure and sawdust at different C/N ratios. *Chemosphere*, 78(5), 614-619. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.056>.
- Ghinea, C., y Leahu, A. (2020). Monitoring of Fruit and Vegetable Waste Composting Process: Relationship between Microorganisms and Physico-Chemical Parameters. *Processes*, 8(3), 302. <https://doi:10.3390/pr8030302>.
- Gigliotti, G. Valentini, F. Erriquens, F. Said-Pullicino, D. (2005). Evaluating the efficiency of the composting process: a comparison of different parameters. *Geophysical Research Abstracts*, 7. <https://meetings.copernicus.org/www.cosis.net/abstracts/EGU05/09606/EGU05-J-09606-1.pdf>.
- Gobierno autónomo descentralizado de la parroquia Membrillo [GAD]. (2014). Plan de cogestión en la micro cuenca Membrillo. Calceta-Ecuador. p. 15.
- Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., y Domínguez, J. (2008). The evaluation of stability and maturity during the composting of cattle manure. *Chemosphere*, 70(3), 436–444. <https://doi:10.1016/j.chemosphere.2007.06.065>.

- Guardabassi, L., A. Dalsgaard, y M. Sobsey, (2003). Occurrence and survival of viruses in composted human faeces, Technical Report 32, Danish Environmental Protection Agency, Copenhagen, Denmark. 59. <https://www2.mst.dk/udgiv/publications/2003/87-7972-715-8/pdf/87-7972-716-6.pdf>
- Guo, R., Li, G., Jiang, T., Schuchardt, F., Chen, T., Zhao, Y., y Shen, Y. (2012). Effect of aeration rate, C/N ratio and moisture content on the stability and maturity of compost. *Bioresource Technology*, 112, 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.099>.
- Gupta, P., Samant, K., y Sahu, A. (2012). Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential. *International Journal of Microbiology*, 1–5. <https://doi.10.1155/2012/578925>.
- Guzmán, A. Zambrano, D. Rivera, R. Rondón, A. Laurencio, M. Pérez, M. (2015). Aislamiento y selección de bacterias autóctonas de Manabí-ecuador con actividad celulolítica. *Cultivos Tropicales*, 36(1): 7-16. <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v36n1/ctr01115.pdf>.
- Guzmán, A. Zambrano, R. Rondón, A. Laurencio, D. Pérez, M. León, R. Rivera, R. (2014). Aislamiento, selección y caracterización de hongos celulolíticos a partir de muestras de suelo en Manabí-Ecuador. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. 46(2): 177-189. <https://bdigital.uncu.edu.ar/7409>.
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* 84(4), 377-393. <https://doi:10.1094/PDIS.2000.84.4.377>.
- Hassen, A., Belguith, K., Jedidi, N., Cherif, A., Cherif, M., y Boudabous, A. (2001). Microbial characterization during composting of municipal solid waste. *Bioresource Technology*, 80(3), 217–225. [https://doi:10.1016/s0960-8524\(01\)00065-7](https://doi:10.1016/s0960-8524(01)00065-7).
- Hoffmeister D., Germani J.C. y Van Der Sand S.T. 2005. Characterization of bacterial population during composting of municipal solid waste. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33(3), 283-290. <https://www.redalyc.org/pdf/2890/289021856007.pdf>.
- Huang, J., Yu, Z., Gao, H., Yan, X., Chang, J., Wang, C., Hu, J y Zhang, L. (2017). Chemical structures and characteristics of animal manures and composts during composting and

- assessment of maturity indices. *PLOS ONE*, 12(6), e0178110.
<https://doi:10.1371/journal.pone.0178110>.
- Hubbe, M., Nazhad, M., Sánchez, C. (2010). Composting as a way to convert cellulosic biomass and organic waste into highvalue soil amendments: A review. *BioResources*, 5(4): 2808-2854.
https://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_05_4_2808_Hubbe_NS_Composting_Review/781.
- Huck, J. R., Woodcock, N. H., Ralyea, R. D., y Boor, K. J. (2007). Molecular Subtyping and Characterization of Psychrotolerant Endospore-Forming Bacteria in Two New York State Fluid Milk Processing Systems. *Journal of Food Protection*, 70(10), 2354–2364. <https://doi:10.4315/0362-028x-70.10.2354>.
- Instituto Nacional de Biodiversidad [INABIO], (2017). Agenda Nacional de Investigación sobre la biodiversidad. MAE, SENESCYT e INABIO. Quito. 20pp.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias [INIAP], (2008). Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación en Ecuador. Quito-Ecuador.
- Isaza-Arias, G. Pérez-Méndez, M. Laines-Canepa, J. Castañón-Nájera, G. (2009). Comparación de dos técnicas de aireación en la degradación de la materia orgánica. *Universidad y Ciencia*. 25(3):233-243.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792009000300005.
- Jadia, Ch y Fulekar, M. (2008). Phytoremediation: the application of vermicompost to remove zinc, cadmium, copper, nickel and lead by sunflower plant. *Environmental Engineering and Management Journal*. 7(5), 547-558.
http://www.eemj.icpm.tuiasi.ro/pdfs/vol7/no5/10_Jadia_C.pdf.
- Jayasekara, S., y Ratnayake, R. 2019. Microbial Cellulases: An Overview and Applications. <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84531>.
- Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L. R., y Fields, M. W. (2006). Microbial Diversity in Water and Sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(6): 3832-3845.
<https://doi:10.1128/AEM.02869-05>.
- Jiang, J., Wang, Y., Guo, F., Zhang, X., Dong, W., Zhang, X., Zhang, X., Zhang, Ch., Cheng, K., Li, Y., y Zhu, G. (2020). Compostaje de estiércol de cerdo y aserrín con inhibidor

- de ureasa: sucesión de genes funcionales de nitrógeno y comunidad bacteriana. *Investigación en ciencias ambientales y contaminación*. doi: 10.1007 / s11356-020-09696-y
- Jiang-ming, Z. (2016). Effect of turning frequency on co-composting pig manure and fungus residue. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 67(3), 313–321. <https://doi:10.1080/10962247.2016.1232666>.
- Jiménez-Delgado, R. Valdés-Rodríguez, S. Olalde-Portugal, V. Abraham-Juárez, R. y García-Hernández, J. 2018. Effect of pH and temperature on the growth and antagonistic activity of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani*. *Revista mexicana de fitopatología*. 36(2), 256-275. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1711-3>.
- Jouraihy, A., Amir, S., El Gharous, M., Revel, J.-C., y Hafidi, M. (2005). Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformation during composting of sewage sludge and green plant waste. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 56(2), 101-108. <https://doi:10.1016/j.ibiod.2005.06.002>.
- Jurado, M. M., Suárez-Estrella, F., López, M. J., Vargas-García, M. C., López-González, J. A., y Moreno, J. (2015). Enhanced turnover of organic matter fractions by microbial stimulation during lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology*, 186, 15–24. <https://doi:10.1016/j.biortech.2015.03.059>
- Kala DR, Rosenani AB, Fauziah CI, Thohirah LA (2009). Composting oil palm wastes and sewage sludge for use in potting media of ornamental plants. *Malaysian Journal of Soil Science*, 13(1), 77-91. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1058.8456&rep=rep1&type=pdf>
- Kalamdhad, A. S., y Kazmi, A. A. (2009). Effects of turning frequency on compost stability and some chemical characteristics in a rotary drum composter. *Chemosphere*, 74(10), 1327–1334. <https://doi:10.1016/j.chemosphere.2008.11.058>
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., y Gulati, A. (2008). A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Current Microbiology*, 57(5), 503–507. <https://doi:10.1007/s00284008-9276-8>.

- Khandelwal, M., Datta, S., Mehta, J., Naruka, R., Makhijani, K., Sharma, G., Kumar, R., Chandra, S. (2012). Isolation, characterization & biomass production of *Trichoderma viride* using various agro products- A biocontrol agent. *Advances in Applied Science Research*, 3 (6):3950-3955. <https://www.imedpub.com/articles/isolation-characterization--biomass-production-of-trichoderma-viride-usingvarious-agro-products-a-biocontrol-agent.pdf>.
- Kim, Y.K., Lee, S. Ch., Cho Y.Y., Oh. H.J., y Ko. Y.H (2012). Isolation of cellulolytic *Bacillus subtilis* strains from agricultural environments. *International Scholarly Research Network*. <https://doi:0.5402/2012/650563>.
-
- Krogmann, U., y Woyzechowski, H. (2000). Selected characteristics of leachate, condensate and runoff released during composting of biogenic waste. *Waste Management and Research*, 18(3), 235–248. <https://doi:10.1034/j.1399-3070.2000.00131.x>.
- Legodi, L. M., La Grange, D., van Rensburg, E. L. J., y Ncube, I. (2019). Isolation of Cellulose Degrading Fungi from Decaying Banana Pseudostem and *Strelitzia alba*. *Enzyme Research*, 2019, 1–10. <https://doi:10.1155/2019/1390890>.
- Liang, C., Das, K.C., y McClendon, R.W. (2003). The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend. *Bioresource Technology*, 86(2): 131-137. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00153-0](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00153-0).
- López, D y López, M. (2004). Influencia del pH y de los medios de cultivo en la expresión de los caracteres de valor diagnóstico de las especies del género *Fusarium* en Cuba. *Fitosanidad*. 8(3):7-11. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209117853002.pdf>.
- Lopez, M.A., Funamizu, N., y Takakuwa, T. (2004). Temperature effect on aerobic biodegradation of feces using sawdust as a matrix. *Water Research*, 38(9): 2406–2416. <https://doi:10.1016/j.watres.2004.02.026>.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., Stahl, D. (2015). *Brock Biology of Microorganisms*. Fourteenth edition. p. 1041. ISBN 978-0-321-89739-8.
- Maki, M., Leung, K. T., y Qin, W. (2009). The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biological Sciences*, 500–516. <https://doi:10.7150/ijbs.5.500>.

- Martínez-Anaya, C., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., y Folch-Mallol, J. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Rev Latinoam Microbiol.* 50(3-4), 119-131. https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2008/mi08-3_4i.pdf.
- Miaomiao, H., Wenhong, L., Xinqiang, L., Donglei, W., y Guangming, T. (2009). Effect of composting process on phytotoxicity and speciation of copper, zinc and lead in sewage sludge and swine manure. *Waste Management*, 29(2), 590–597. <https://doi:10.1016/j.wasman.2008.07.005>.
- Ministerio del ambiente [MAE], (2014). Programa Nacional de Reforestación con Fines de Conservación Ambiental, Protección de Cuencas Hidrográficas y Beneficios Alternos. <https://www.ambiente.gob.ec/wpcontent/uploads/downloads/2020/04/REFORESTACION.pdf>.
- Mohee, R. y Mudhoo, A. 2005. Analysis of the physical properties of an in-vessel composting matrix. *Powder Technology* 155(1), 92–99. <https://doi:10.1016/j.powtec.2005.05.051>.
- Mohkam, M., Nezafat, N., Berenjian, A., Mobasher, M. A., y Ghasemi, Y. (2016). Identification of Bacillus Probiotics Isolated from Soil Rhizosphere Using 16S rRNA, recA, rpoB Gene Sequencing and RAPD-PCR. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8(1), 8–18. <https://doi:10.1007/s12602-016-9208-z>.
- Naciones Unidas, (2015). Objetivos de Desarrollo del Milenio: Informe de 2015. P. 56. Disponible en: <https://mdgs.un.org/unsd/mdg/Resources/Static/Products/Progress2015/Spanish2015.pdf>.
- Nair, J., y Okamitsu, K. (2010). Microbial inoculants for small scale composting of putrescible kitchen wastes. *Waste Management*, 30(6), 977–982. <https://doi:10.1016/j.wasman.2010.02.016>.
- Neher, D. A., Weicht, T. R., Bates, S. T., Leff, J. W., & Fierer, N. (2013). Changes in Bacterial and Fungal Communities across Compost Recipes, Preparation Methods, and Composting Times. *PLoS ONE*, 8(11), e79512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079512>.

- Nicholson, F. A., Groves, S. J., y Chambers, B. J. (2005). Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology*, 96(2): 135–143. <https://doi:10.1016/j.biortech.2004.02.030>.
- Nigam, P. (2013). Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. *Biomolecules*, 3(4), 597–611. <https://doi:10.3390/biom3030597>.
- Norma ambiental para el distrito federal [NADF-020-AMBT], (2012). Gaceta oficial del distrito federal. Mexico DF. https://data.sedema.cdmx.gob.mx/padla/images/stories/normatividaddf/nadf_020_a_mbt_2011.pdf.
- Norma Chilena 2880 [NCh2880], (2003). Norma Chilena Oficial. Compost-Clasificación y requisitos. Instituto Nacional de Normalización (INN), Santiago, Chile.
- Nutongkaew, T., Duangsuwan, W., Prasertsan, S., y Prasertsan, P. 2014. Effect of inoculum size on production of compost and enzymes from palm oil mill biogas sludge mixed with shredded palm empty fruit bunches and decanter cake. *Songklanakar J. Sci. Technol*, 36(3), 275-281. <https://rdo.psu.ac.th/sjstweb/journal/36-3/36-3-4.pdf>.
- Paco-Pérez, V. Loza-Murguía, M. VINO-NINA, L. Calani-Bueno, E. Serrano-Canaviri, T. J. 2017. Población fúngica en suelos productores de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), bajo diferentes sistemas de manejo en la comunidad Kerecaya Municipio de Salinas de Garci Mendoza. *J. Selva Andina Res. Soc.* 8(1), 26-47. https://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v8n1/v8n1_a03.pdf.
- Pan, I., Dam, B., y Sen, S. K. (2011). Composting of common organic wastes using microbial inoculants. *3 Biotech*, 2(2), 127–134. <https://doi:10.1007/s13205-011-0033-5>.
- Partanen, P., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P., y Romantschuk, M. (2010). Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiology*, 10(94), <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-94>.
- Pérez, I. (2012). *Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias. *Revista Cubana de Salud Pública*. 38(1), 98-108. <https://www.scielosp.org/pdf/rcsp/2012.v38n1/98-108/es>.
- Pérez, M., Sánchez, R., Palma-López, D., y Salgado, S (2011). Caracterización química del compostaje de residuos de caña de Azúcar en el sureste de México. *Interciencia*, 36(1), 45-52. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33917727007.pdf>.

- Petrisor, C. Paica, A. Constantinescu, F. (2016). Influence of abiotic factors on in vitro growth of *Trichoderma* strains. *Proc. Rom. Acad.* 18(1):11–14. <https://acad.ro/sectii2002/proceedingsChemistry/doc2016-1/art02Petrisor.pdf>.
- Rashad, FM, Saleh, WD y Moselhy, MA (2010). Bioconversion of rice straw and certain agro-industrial wastes to amendments for organic farming systems: 1. Composting, quality, stability and maturity indices. *Bioresource Technology*, 101(15): 5952-5960. <https://doi:10.1016/j.biortech.2010.02.103>.
- Rastogi, M., Nandal, M., y Khosla, B. (2020). Microbes as vital additives for solid waste composting. *Heliyon*, 6(2), e03343. <https://doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03343>.
- Reglamento al Régimen Común Sobre Acceso a los Recursos Genéticos (2011). Decreto Ejecutivo 905. <https://www.competencias.gob.ec/wp-content/uploads/2017/06/06NOR2011-DECRETO04.pdf>.
- Reysenbach, A.L., Longnecker, K., y Kirshtein, J. (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from an *in situ* growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3798–3806. <https://doi:10.1128/aem.66.9.3798-3806.2000>.
- Ribeiro, N. Souza, T. Costa, L. Castro, C. Souza, E. 2017. Microbial additives in the composting process. *Ciência e Agrotecnologia* 41(2):159-168. *Ciência e Agrotecnologia*, 41(2), 159-168. <https://dx.doi.org/10.1590/1413-70542017412038216>.
- Richard, T. L., (Bert) Hamelers, H. V. M., Veeken, A., y Silva, T. (2002). Moisture Relationships in Composting Processes. *Compost Science & Utilization*, 10(4), 286–302. <https://doi:10.1080/1065657x.2002.10702093>.
- Roslan, M.A., Amirudin, N.A., Abidin, Z.A., y Omar, S. (2015). Isolation of bacteria from the acidic peat swamp forest soil and their lignin degradation potential. *Jurnal Teknologi Sciences & Engineering*, 77(24): 77–81. <https://doi:10.11113/jt.v77.6711>.
- Russell, F. M., Biribo, S., S. N. Selvaraj, G., Oppedisano, F., Warren, S., Seduadua, A., Mulholland, E. K., Carapetis, J. R. (2006). As a Bacterial Culture Medium, Citrated Sheep Blood Agar Is a Practical Alternative to Citrated Human Blood Agar in Laboratories of Developing Countries. *Journal of clinical microbiology*. 44(9), 3346–3351. <https://doi:10.1128/jcm.02631-05>.

- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K., y Swings, J. (2003a). Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *Journal of Applied Microbiology*, 94(1), 127–137. <https://doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01800.x>.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., Swings, J. (2003b). A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of Microbiology*, 53(4): 349-410. <https://www.researchgate.net/publication/228558663>.
- Saha A., y Santra SC (2014). Isolation and characterization of bacteria isolated from municipal solid waste for production of industrial enzymes and waste degradation. *J Microbiol Exp*. 1(1):12-19. <https://doi:10.15406/jmen.2014.01.00003>.
- Saidi, N., Cherif, M., Jedidi, N., Mahrouk, M., Fumio, M., Boudabous, A., y Hassen, A. (2008). Evolution of Biochemical Parameters during Composting of Various Wastes Compost. *American Journal of Environmental Sciences*, 4(4), 332-341. <https://doi.org/10.3844/ajessp.2008.332.341>.
- Saini, A., Aggarwal, N., Yadav, N. (2017). Isolation and Screening of Cellulose Hydrolyzing Bacteria from Different Ecological Niches. *Bioengineering and Bioscience* 5(1): 7-13. <https://doi.10.13189/bb.2017.050102>.
- Secretaria Nacional de Planificación y Desarrollo [SENPLADES], (2017). Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021. Toda una Vida”. Resolución N° CNP-003-2017. https://www.planificacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/10/PNBV-26-OCT-FINAL_0K.compressed1.pdf.
- Selim, S., Zayed, M., y Atta, H. (2012). Evaluation of phytotoxicity of compost during composting process. *Nature and Science*, 10(2), 469-475. https://www.academia.edu/7665778/evaluation_of_phytotoxicity_of_compost_during_composting_process.
- Sempere, F., y Santamarina, M. P. (2010). Efficacy of *Trichoderma harzianum* in suppression of *Fusarium culmorum*. *Annals of Microbiology*, 60(2), 335–340. <https://doi.10.1007/s13213-010-0047-y>.

- Semple, K., Reid, B.J., y Fermor, T.R. (2001) Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution*, 112(2), 269–283. [https://doi:10.1016/s0269-7491\(00\)00099-3](https://doi:10.1016/s0269-7491(00)00099-3).
- Sha, Y., Zeng, Q. y Sui, S. (2020). Screening and Application of *Bacillus* Strains Isolated from Nonrhizospheric Rice Soil for the Biocontrol of Rice Blast. *Plant Pathol J*, 36(3), 231–243. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.02.2020.0028>.
- Shahid, M. Singh, A. Srivastava, M. Mishra, R. Biswas, S. 2011. Effect of temperature, pH and media for growth and sporulation of *Trichoderma longibrachiatum* and its shelf life study in carrier-based formulation. *Ann. Pl. Protec. Sci.* 19 (1): 147-149. https://www.researchgate.net/publication/270339292_Effect_of_temperature_pH_and_media_for_growth_and_sp.
- Silas, K. Kwaji, B. Zubairu, A. (2017). Effects of Temperature and pH on *Trichoderma reesei* Cellulase Activity in Glucose Production from Water Melon Peel. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 7(3), 2250-3153. <https://www.researchgate.net/publication/316876962>.
- Singh J., y Kaur P (2012). Optimization of process parameters for cellulase production from *Bacillus* sp. JS14 in solid state fermentation using response surface methodology. *Braz. arco. biol. technol.* 55(4):505–512. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000400004>.
- Singh, A. Shahid, M. Srivastava, M. Pandey, S. Sharma, A. Kumar, V. (2014b). Optimal Physical Parameters for Growth of *Trichoderma* Species at Varying pH, Temperature and Agitation. *Virol Mycol*, 3(1), 127. <https://doi:10.4172/2161-0517.1000127>.
- Singh, RP, Singh, P., Araujo, ASF, Hakimi, M. y Sulaiman, O. (2011). Management of urban solid waste: Vermicomposting a sustainable option. *Resources, Conservation and Recycling*, 55(7), 719–729. <https://doi:10.1016/j.resconrec.2011.02.005>.
- Singh, S., y Nain, L. (2014a). Microorganisms in the Conversion of Agricultural Wastes to Compost. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 80(2), 473-481. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i2/4>.
- Singh-Nee P., Gupta, N., y Anthwal., A. (2009). Pre-treatment of Agro-Industrial Residues. Singh-Nee P & Pandey, A. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. (p 26). *Springer*. <https://doi:10.1007/978-1-4020-9942-7>.

- Sood, M. Kapoor, D. Kumar, V. Sheteiwy, M. Ramakrishnan, M. Landi, M. Araniti, P. Sharma, A. 2020. *Trichoderma*: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent. *Plants*. 9(6), 762. <https://doi:10.3390/plants9060762>.
- Tampoebolon, B. I. M., Bachruddin, Z., Yusiati, L. M., y Margino, S. (2014). Isolation and lignocellulolytic activities of fiber-digesting bacteria from digestive tract of termite (*Cryptothermes* sp.). *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 39(4): 224-234. <https://doi.org/10.14710/jitaa.39.4.224-234>.
- Tchegueni, S., Koriko, M., Koledzi, E., Bodjona, M., Kili, K., Tchangbedji, G., Baba, G y Hafidi, M. (2013). Physicochemical characterization of organic matter during co-composting of shea-nut cake with goat manure. *African Journal of Biotechnology*, 12(22), 3466-3471. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/132037>.
- Teather, R. M., y P. J. Wood. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(4):777–780. <https://aem.asm.org/content/43/4/777>.
- Thomas, L., Ram, H., y Singh, V. P. (2018). Inducible cellulase production from an organic solvent tolerant *Bacillus* sp. SV1 and evolutionary divergence of endoglucanase in different species of the genus *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(2), 429–442. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.010>
- Tian, L., Lin, X., Tian, J., Ji, L., Chen, Y., Tran, L.-S. P., y Tian, C. (2020). Research Advances of Beneficial Microbiota Associated with Crop Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1792. <https://doi:10.3390/ijms21051792>
- Tiquia, S. M., y Tam, N. F. Y. (1998). Elimination of phytotoxicity during co-composting of spent pig-manure sawdust litter and pig sludge. *Bioresource Technology*, 65(1-2), 43–49. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(98\)00024-8](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(98)00024-8).
- Vallini, G., Gregorio, S., Pera, A., y Cunha Queda, A., (2002) Exploitation of composting management for either reclamation of organic wastes or solid-phase treatment of contaminated environmental matrices. *Environmental Reviews*, 10(4):195-207.
- Varma, V. S., Das, S., Sastri, CH. V., & Kalamdhad, A. S. (2017). Microbial degradation of lignocellulosic fractions during drum composting of mixed organic waste. *Sustainable Environment Research*, 27(6), 265–272. <https://doi:10.1016/j.serj.2017.05.004>.

- Varma, V.S y Kalamdhad, A. S. (2014). Stability and microbial community analysis during rotary drum composting of vegetable waste. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 3(52). <https://doi:10.1007/s40093-014-0052-4>.
- Varnero, M., Rojas, C., y Orellana, R. (2007). Índices de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*, 7(1), 28-37. <https://doi.org/10.4067/S0718-27912007000100003>.
- Vimal, S. R., Singh, J. S., Arora, N. K., y Singh, S. (2017). Soil-Plant-Microbe Interactions in Stressed Agriculture Management: A Review. *Pedosphere*, 27(2), 177–192. [https://doi:10.1016/s1002-0160\(17\)60309-6](https://doi:10.1016/s1002-0160(17)60309-6).
- Voběrková, S., Vaverková, MD, Burešová, A., Adamcová, D., Vršanská, M., Kynický, J., Brtnický, M & Adam, V. (2017). Effect of inoculation with white-rot fungi and fungal consortium on the composting efficiency of municipal solid waste. *Waste Management*, 61:157-164. <https://doi:10.1016/j.wasman.2016.12.039>.
- Warcup, J. H. (1955). On the origin of colonies of fungi developing on soil dilution plates. *Transactions of the British Mycological Society*, 38(3), 298–301. [https://doi:10.1016/s0007-1536\(55\)80075-7](https://doi:10.1016/s0007-1536(55)80075-7).
- Wen, Z. (2004). Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production. *Bioresource Technology*, 91(1), 31–39. [https://doi:10.1016/s0960-8524\(03\)00166-4](https://doi:10.1016/s0960-8524(03)00166-4).
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols*, 315–322. <https://doi:10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wong, JW-C., Fung, SO y Selvam, A. (2009). Coal fly ash and lime addition enhances the rate and efficiency of decomposition of food waste during composting. *Bioresource Technology*, 100(13), 3324–3331. <https://doi:10.1016/j.biortech.2009.01.063>.
- Yaman, C. (2020). Monitoring of Biochemical Parameters and GHG Emissions in Bioaugmented Manure Composting. *Processes*, 8(6), 681. <https://doi:10.3390/pr8060681>.
- Yang, X.-C., Han, Z.-Z., Ruan, X.-Y., Chai, J., Jiang, S.-W., y Zheng, R. (2019). Composting swine carcasses with nitrogen transformation microbial strains: Succession of microbial community and nitrogen functional genes. *Science of The Total Environment*, 688, 555–566. <https://doi:10.1016/j.scitotenv.2019.06.283>.

- Zaved, H.K., Rahman, M., Rahman, M. Rahma., Arafat, S. & Rahman, S. 2008. Isolation and characterization of effective bacteria for solid waste degradation for organic manure. *KMITL Sci. Tech. J*, 8(2), 44-55. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/cast/article/view/136635/101865>.
- Zehra, A. Dubey, M. Meena, M. Upadhyay, R. (2017). Effect of different environmental conditions on growth and sporulation of some *Trichoderma* species. *Journal of environmental biology*. 38, 197-203. https://www.jeb.co.in/journal_issues/201703_mar17/paper_03.pdf.
- Zeng, G. M., Huang, H. L., Huang, D. L., Yuan, X. Z., Jiang, R. Q., Yu, M., Yan, H. Zhang, J. Ch. Wang, R. Y. y Liu, X. L. (2009). Effect of inoculating white-rot fungus during different phases on the compost maturity of agricultural wastes. *Process Biochemistry*, 44(4), 396–400. <https://doi:10.1016/j.procbio.2008.11.012>.
- Zhou, S., Zhang, X., Liao, X., Wu, Y., Mi, J. y Wang, Y. (2019). Effect of Different Proportions of Three Microbial Agents on Ammonia Mitigation during the Composting of Layer Manure. *Molecules*, 24, 2513; <https://doi:10.3390/molecules24132513>.

ANEXOS

Anexo 1. Aislados bacterianos

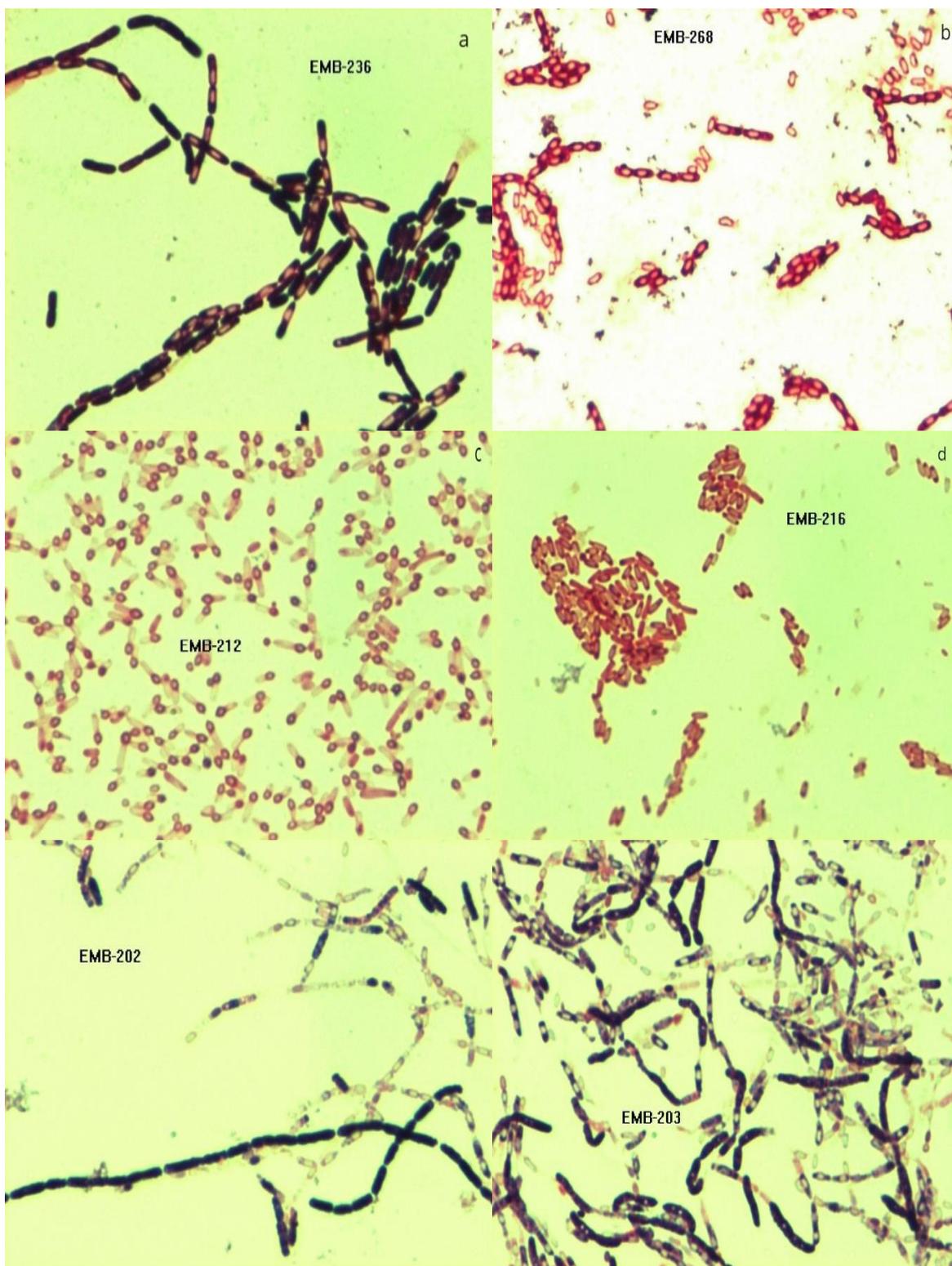


Foto 1. Estructuras morfológicas de aislados bacterianos

Anexo 2. Aislados fúngicos

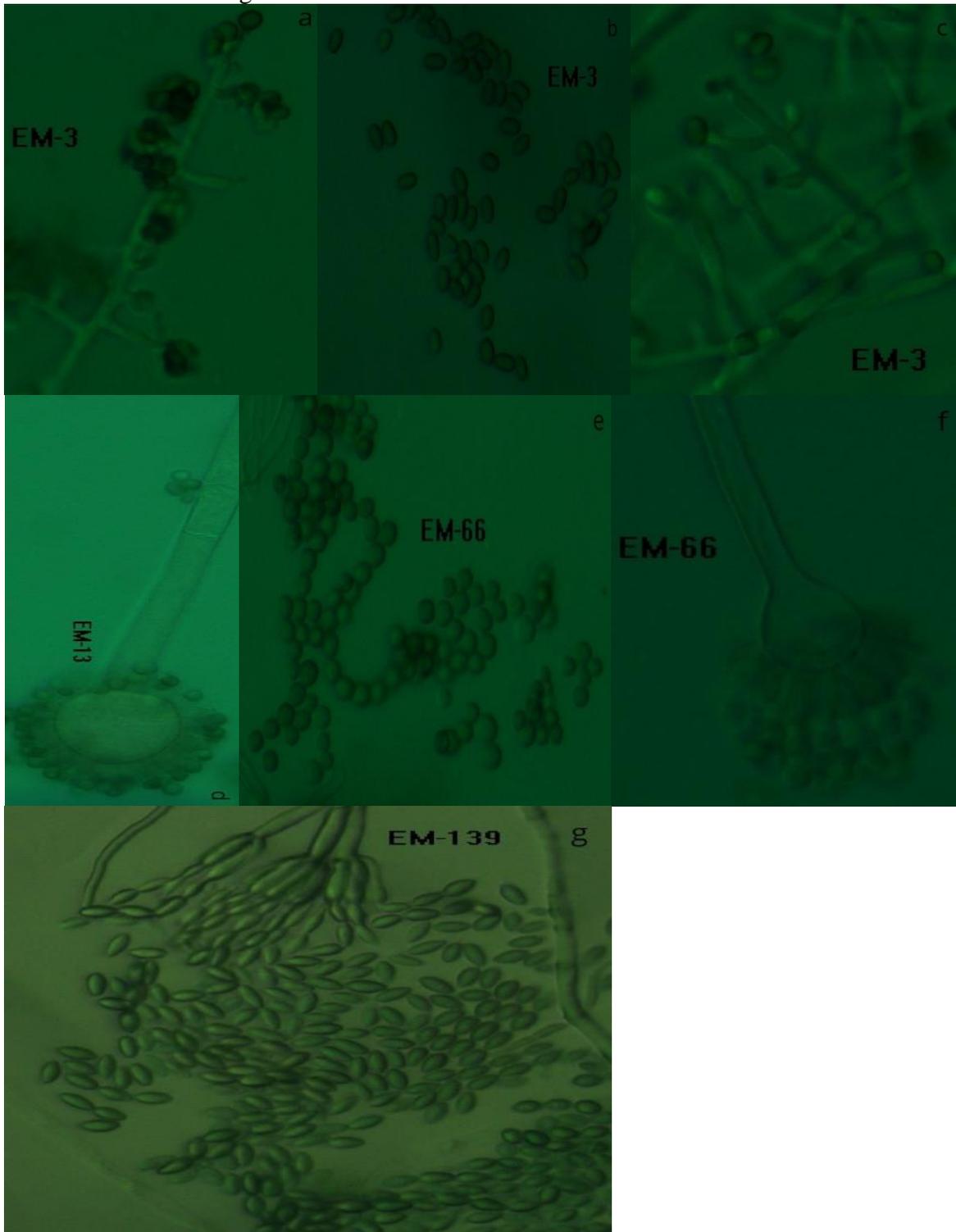


Foto 2. Estructuras morfológicas de aislados fúngicos

Anexo 3. Halos de hidrólisis en placas de agar carboximetilcelulosa con rojo Congo



Foto 3. Zona de aclaramiento de cepas bacterianas

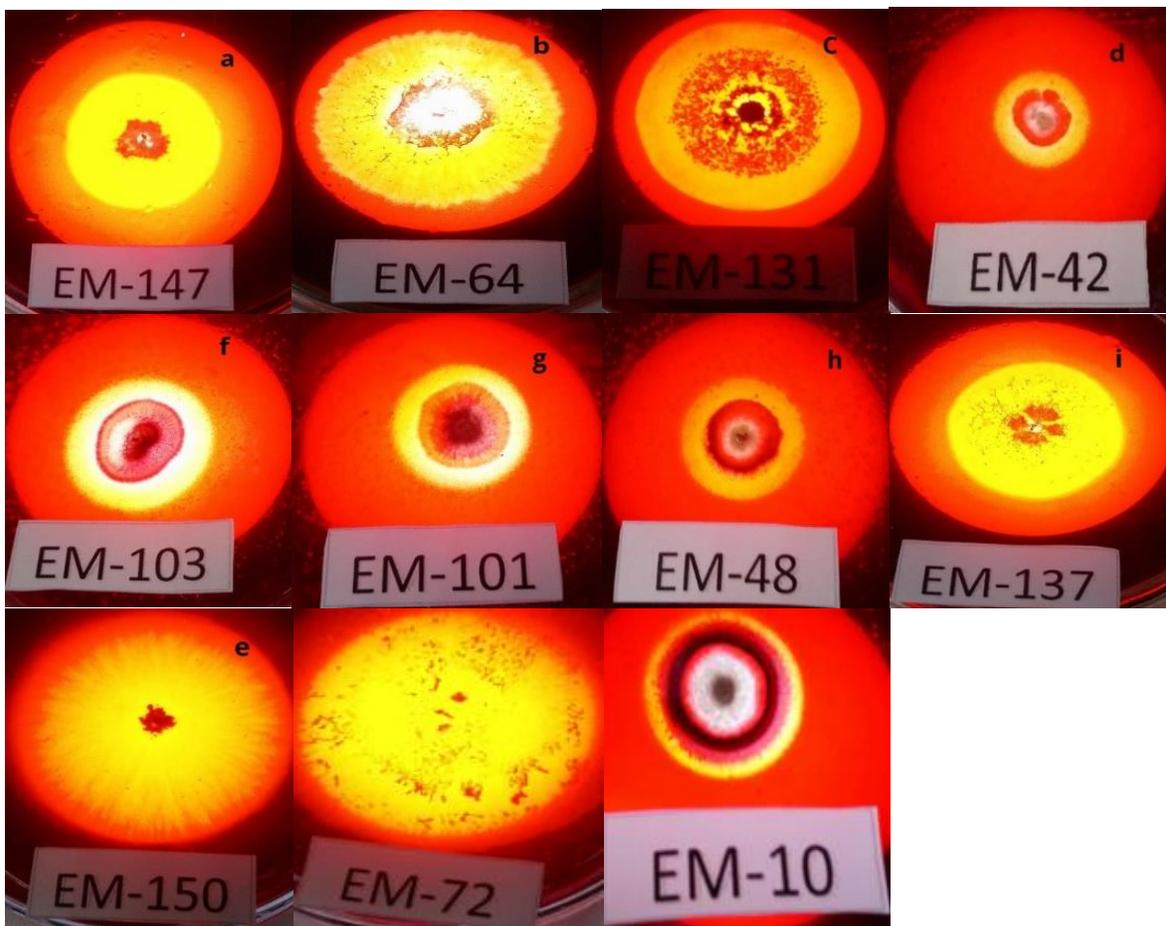


Foto 4. Zona de aclaramiento de cepas fúngicas

Anexo 4. Supervivencia de cepas fúngicas a pH y temperaturas

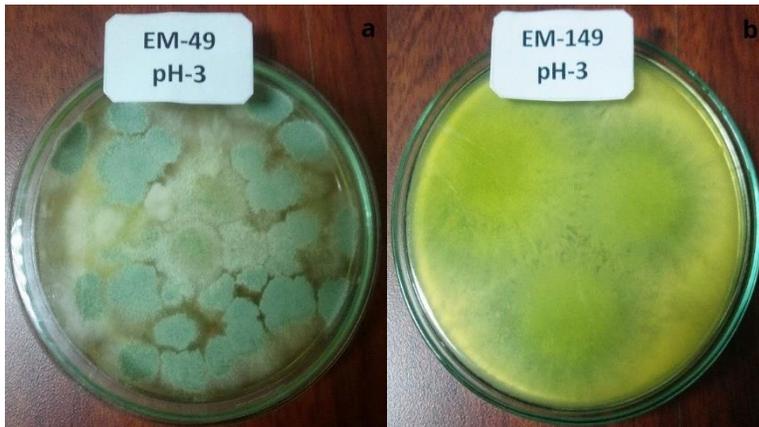


Foto 5. Supervivencia de las cepas EM-49 y EM-149 a pH-3

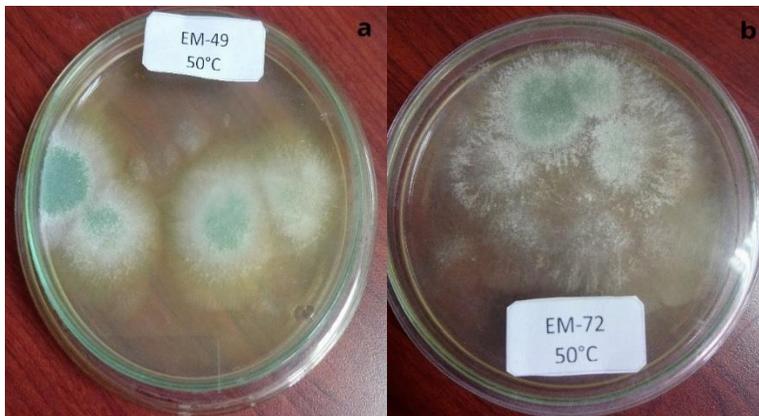


Foto 6. Supervivencia de las cepas EM-49 y EM-72 a 50°C

Anexo 5. Evaluación de la fitotoxicidad



Foto 7. Filtración (a y b), semillas en papel filtro (c) y plántulas de rábano (d).