

**DETERMINACION DE POTENCIAL ENZIMÁTICO DE CEPAS MICROBIANAS  
PARA FORMULACIÓN DE PRODUCTO EXPERIMENTAL**

**JULY ANDREA RODRIGUEZ MARTÍN**  
Estudiante décimo semestre  
Programa de Microbiología

**TRABAJO DE GRADO**  
Modalidad pasantía  
Presentado como requisito para optar el título de  
**MICROBIÓLOGA**

**TUTOR ACADÉMICO**  
Francisco Rodríguez Rincón, Ph,D  
Profesor Titular Departamento de Microbiología

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS**  
**PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER**

**2019**

*Dedico a Dios por haberme dado sabiduría, el valor suficiente para subir un peldaño más en mi vida, A mis padres Ana María, Carlos Julio y hermanos Yenny Carolina y Carlos Daniel por su amor, constante apoyo y motivación, A mis maestros por hacer parte fundamental en mi formación como profesional y aportar en mi crecimiento personal, A mis amigos por su compañía, confianza y cariño.*

*July Rodríguez.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Doctor Francisco Rodríguez Rincón por su conocimiento, disposición, y asesoría

Al Ingeniero Fernando Castro por su continua orientación, apoyo, confianza y conocimiento

A la Ingeniera Blanca Lilia Romero por su continua orientación, conocimiento, apoyo y confianza

Al Ingeniero Iván Camilo Mahecha por su conocimiento, dedicación, apoyo, confianza y paciencia

A Organización Pajonales SAS, por permitirme hacer uso de sus instalaciones

Al Equipo de trabajo de la División Bioinsumos Laboratorio de Calidad y de Producción por su disposición, amistad y constante apoyo

Finalmente, mi profundo agradecimiento a todas las personas que hacen parte de Plantaciones Unipalma de los Llanos SA por su permanente apoyo, respeto y cordialidad que me permitieron realizar el proceso investigativo dentro de sus instalaciones.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
2.1 Definición de compostaje .....	3
2.2 Etapas del compostaje .....	3
2.3 Parámetros que influyen en el compostaje.....	5
2.3.1 Tamaño de partícula.....	5
2.3.2 Relación Carbono: Nitrógeno (C: N).....	5
2.3.3 Naturaleza del sustrato.....	5
2.3.3.1 Sustratos degradables de origen vegetal .....	6
2.3.3.1.1 Lignina .....	6
2.3.3.1.2 Celulosa.....	7
2.3.3.1.3 Hemicelulosa .....	9
2.4 Parámetros de monitoreo dentro del proceso de compostaje .....	10
2.4.1 Temperatura .....	10
2.4.2 Potencial de Hidrógeno (pH) .....	10
2.4.3 Aireación.....	10
2.4.4 Contenido de humedad .....	10
2.5 Cultivo de palma aceitera .....	11
2.6 Principales residuos agroindustriales de palma aceitera .....	12
2.6.1 Racimos de frutas vacías de palma aceitera (EFB).....	12
2.6.2 Efluente del molino de aceite de palma (POME).....	13
2.7 Compostaje de EFB y POME como estrategia biotecnológica .....	14
<b>3. MARCO CONTEXTUAL</b> .....	<b>16</b>
<b>4. MARCO LEGAL</b> .....	<b>17</b>
<b>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION</b> .....	<b>18</b>
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
6.1 Objetivo general.....	19
6.2 Objetivos específicos.....	19
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
7.1 Actividades específicas.....	20

7.1.1 Preparación de cepas bacterianas y fúngicas de ensayo.....	20
7.1.2 Pruebas de identificación .....	20
7.1.3 Prueba de estabilidad fisiológica a altas temperaturas y distintos pH .....	20
7.1.4 Prueba cualitativa de caracterización enzimática .....	20
7.1.5 Prueba de antagonismo microbiano .....	22
7.2 Actividades complementarias, Laboratorio de Bioinsumos.....	22
7.2.1 Asistencia en revisión documental .....	22
7.2.2 Prueba de antagonismo cepas microbianas.....	22
7.2.3 Ensayo de crecimiento en medio modificado con vísceras de pescado .....	23
7.2.4 Reactivación de cepa microbiana.....	23
7.2.5 Caracterización cepa microbiana e introducción a la conservación .....	23
7.2.6 Aplicación de muestreo ambiental y de superficie.....	24
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>25</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>37</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>37</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>38</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Etapas del proceso de compostaje.....	4
<b>FIGURA 2.</b> Esquema transversal de la hilera de compostaje (Zonas principales y corriente de convección indicada) .....	4
<b>FIGURA 3.</b> Rutas metabólicas para la biosíntesis de lignina: Ruta del shikimato (plastidio) y fenilpropanoide (citoplasma) .....	7
<b>FIGURA 4.</b> Estructura de la lignocelulosa.....	8
<b>FIGURA 5.</b> Estructura química de la molécula de celulosa.....	9
<b>FIGURA 6.</b> Esquema de complejo celulosómico presente en especies de clostridios .....	11
<b>FIGURA 7.</b> Esquema proceso de extracción aceite de palma y generación de efluente (POME). La línea punteada señala el subproducto y flujo de residuos .	15
<b>FIGURA 8.</b> Esquema, puntos (amarillo) de muestreo ambiental por sedimentación aplicado en área del cuarto Insectario, Planta de Bioinsumos, Organización PAJONALES SAS, Ambalema-Tolima .....	38

## INDICE DE IMÁGENES

- IMAGEN 1.** Prueba de actividad antagonista microbiana. Cepas de ensayo *Bacillus* sp.OP1, *Bacillus* sp.OP3 y *Saccharomyces* sp.OP4..... 36
- IMAGEN 2.** Cepas microbianas que presentaron crecimiento en medio de cultivo modificado con vísceras de pescado ..... 37
- IMAGEN 3.** Crecimiento fúngico en medio de cultivo PDA empleado en muestreo ambiental, Insectario, Instalaciones Planta de Bioinsumos PAJONALES SAS .... 38
- IMAGEN 4.** Crecimiento fúngico y de levadura en medio de cultivo PDA empleado en muestreo de superficie (mesa central), Insectario, Instalaciones Planta de Bioinsumos PAJONALES SAS ..... 38
- IMAGEN 5.** Microscopía de crecimiento fúngico presente en trozo de alimento para el mantenimiento de *Spodoptera frugiperda*. Montaje en azul de lactofenol, Objetivo 40X. Microscopio de luz ..... 39

## INDICE DE TABLAS

**TABLA 1.** Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas microbianas presentes en el cepario División de Bioinsumos, Organización PAJONALES SAS Planta de Bioinsumos PAJONALES SAS ..... 27

**TABLA 2.** Resultados pruebas de identificación bioquímica cepas bacterianas presentes en el cepario División de Bioinsumos, Organización PAJONALES SAS ..... 31

**TABLA 3.** Resultados estabilidad fisiología (pH) de cepas microbianas presentes en el cepario División de Bioinsumos, Organización PAJONALES SAS ..... 32

**TABLA 4.** Resultados estabilidad fisiología (Temperatura) de cepas microbianas presentes en el cepario División de Bioinsumos, Organización PAJONALES SAS ..... 32

**TABLA 5.** Resultados prueba de producción enzimática empleando medios modificados de cepas microbianas presentes en el cepario División de Bioinsumos, Organización PAJONALES SAS..... 33



## 1. INTRODUCCIÓN

La ejecución de los ciclos biológicos de los nutrientes es indispensable para la vida sobre la tierra, este fenómeno se encuentra mediado por los microorganismos presentes en la biosfera terrestre. La biotransformación efectuada por estos es una modificación biológica que altera la sustancia química estructural lográndose sintetizar átomos o moléculas simples en moléculas más complejas (biosíntesis), o viceversa (biodegradación). La biodegradación puede definirse como el rompimiento de una estructura molecular en sus componentes elementales o constitutivos, obteniéndose a su vez que se incorporan otros átomos para formar nuevos compuestos (Díaz et al, 2007).

Un ejemplo del proceso de biotransformación degradativa es el compostaje, el cual se refiere a un proceso de descomposición biológica de una mezcla sustratos orgánicos originado por una comunidad microbiana compuesta por varias poblaciones en condiciones aeróbicas que producto de su accionar eliminan al medio dióxido de carbono, agua y minerales, así como materia orgánica estabilizada denominada “compost” (Wan et al, 2020).

El compost, a su vez posee una serie de agregados microbianos que lo hacen un producto de excelente calidad con gran utilidad en la agricultura; por ello la tecnología de compostaje se ha convertido en un método relevante para la eliminación de residuos orgánicos. Uno de los aspectos por mejorar de esta estrategia es el lapso que requiere la transformación de la materia orgánica, de allí que el empleo de inóculos microbianos (preparados) como aceleradores de la degradación de la materia orgánica sea una práctica implementada en diversos sistemas agrícolas alrededor del mundo (Wan et al, 2020).

Para que estos preparados microbianos sean expuestos como alternativa, deben garantizar la constitución de agregados significativos en número, que logren producir una bioaumentación y la disminución del tiempo de formación y maduración del compost (Medina et al, 2018).

Uno de los principales retos que posee la industria productora de aceite de palma, es el manejo de los desechos agroindustriales originados; constituidos principalmente por materiales lignocelulósicos (celulosa (52%), hemicelulosa (28%) y lignina (17%)) cuyo proceso de compostaje es complejo debido a que su degradación requiere un largo periodo de tiempo (Mhdo et al, 2013).

Para lograr superar esta limitación y acelerar este proceso, el empleo de inóculos microbianos específicos surge como una posibilidad a evaluar, pero para ello se requiere que dichos microorganismos exhiban características de interés desde el punto de vista enzimático y fisiológico. De allí que el presente trabajo de pasantía se llevó a cabo en el laboratorio de Bioinsumos perteneciente a la Organización Pajonales SAS, el cual tiene como principal oficio productivo la fabricación de

formulaciones de microorganismos para uso agrícola que aportan al control de fitopatógenos por su actividad entomopatógena.

## 2. MARCO TEÓRICO

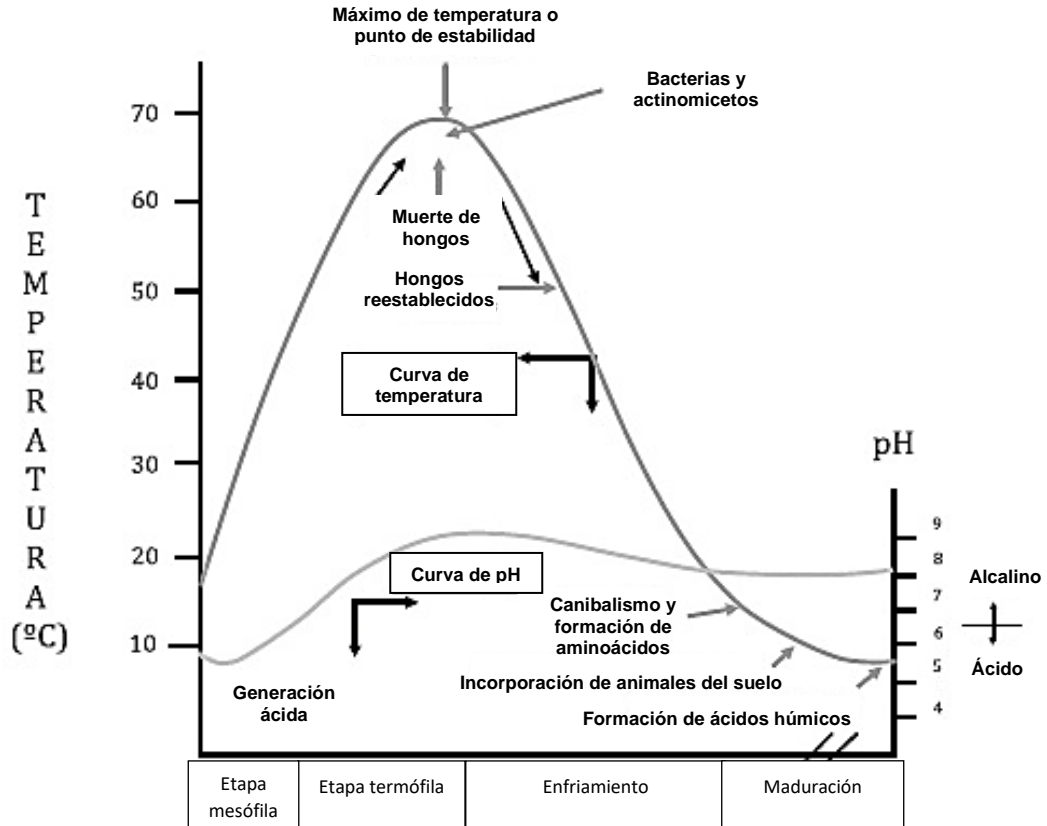
### 2.1 DEFINICIÓN DE COMPOSTAJE

El compostaje, es la transformación, de un material orgánico inestable, a un producto estabilizado, a través de respiración aerobia, dicho proceso, involucra la conversión biológica, de este material orgánico a productos útiles como fertilizantes. Independientemente del producto, las poblaciones microbianas, son el componente activo de los procesos de biodegradación y conversión durante el proceso conduciendo a la producción final de dióxido de carbono, agua, minerales y materia orgánica estabilizada (Escobar et al, 2012).

### 2.2 ETAPAS DEL COMPOSTAJE

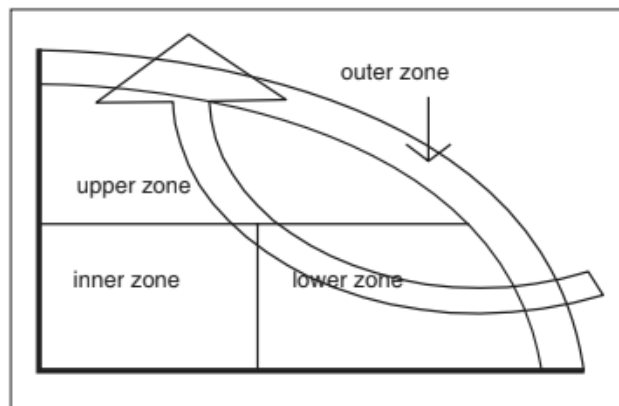
En este proceso biológico se distinguen dos etapas, la descomposición y la estabilización. En la primera, los microorganismos mesófilos aerobios convierten compuestos de mayor velocidad de degradación como lo son azúcares, proteínas, almidón y aminoácidos a especies orgánicas e inorgánicas más sencillas, prevaleciendo la producción de energía que se libera en forma de calor, el consumo de oxígeno ( $O_2$ ) y la emisión de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) (Gonzales & Medina, 2014) (Ballesteros et al, 2018).

Durante esta etapa se producen fitotóxicos como amoníaco ( $NH_3$ ) y ácidos grasos volátiles de cadena corta los cuales son incorporados en el metabolismo microbiano (Smårs et al, 2002). Esta actividad se ve reflejada en el aumento progresivo de la temperatura ( $> 45^{\circ}C$ ) y la selección de microorganismos como se observa en la figura 1, manteniéndose dentro del proceso los organismos termofílicos como bacterias termotolerantes y/o termofílicas y actinobacterias, ocasionando un incremento de la temperatura hasta alcanzar  $62^{\circ}C$  aproximadamente o más superando la barrera de los  $80^{\circ}C$ . Una de las cualidades destacables de progreso térmico durante el proceso de compostaje, es reducción de agentes fitopatógenos, cuya presencia en dicho producto de uso agrícola afecta su calidad y por ende de los cultivos donde sea aplicado. Este evento permanece hasta que los nutrientes y compuestos fácilmente degradables disminuyan (Gonzales & Medina, 2014).



**Figura 1. Etapas del proceso de compostaje.**  
**Fuente: Gonzales & Medina (2014)**

Uno de los puntos críticos a tener en cuenta para que se dé una higienización total de la materia orgánica lo constituye el proceso de homogenización o mezcla puesto que no se alcanzan las mismas temperaturas en todas las zonas de una pila de compost; por lo tanto, es importante que, cada parte del sustrato se mueva a la zona central, la parte más caliente de la pila (Díaz et al, 2007) como se observa en la figura 2.



**Figura 2. Esquema transversal de la hilera de compostaje (Zonas principales y corriente de convección indicada)**  
**Fuente: Bueno et al. (2008)**

En la segunda etapa se degradan las moléculas más complejas, ocasionando un declive de la temperatura debido a la actividad de ciertos microorganismos sobre estas moléculas, a su vez durante este lapso se mantiene el pH ligeramente alcalino hasta finalizado el proceso (Fig.1). Desde el punto de vista microbiológico la población termofílica desciende y predominan microorganismos mesófilos, así como los actinomicetos que degradan paulatinamente hemicelulosa, celulosa, almidón y ligninas, necesarias para la síntesis de productos húmicos (Gonzales & Medina, 2014) (Campos et al, 2016).

## **2.3 PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN EL COMPOSTAJE**

**2.3.1 Tamaño de partícula:** El volumen inicial de las partículas que componen la materia orgánica a transformar es una variable significativa para el óptimo desempeño del proceso, puesto que cuanto mayor sea la superficie expuesta a la actividad microbiana por unidad de masa, mayor será la velocidad de reacción y degradación. Por ende, fraccionar el material de partida favorece la actividad microbiana y la rapidez del proceso; a su vez se debe tener en cuenta que al disminuir el espacio entre partículas se aumentan las fuerzas de fricción y se limita la difusión de oxígeno hacia el interior, así como dióxido de carbono hacia el exterior. Esto representa una limitante fácilmente inhibitoria en la proliferación microbiana ya que sería imposible la aireación por convección natural, por ello la importancia de la aireación mecánica o manual (Morales-Maldonado & Casanova-Lugo, 2015) (Bueno et al, 2008).

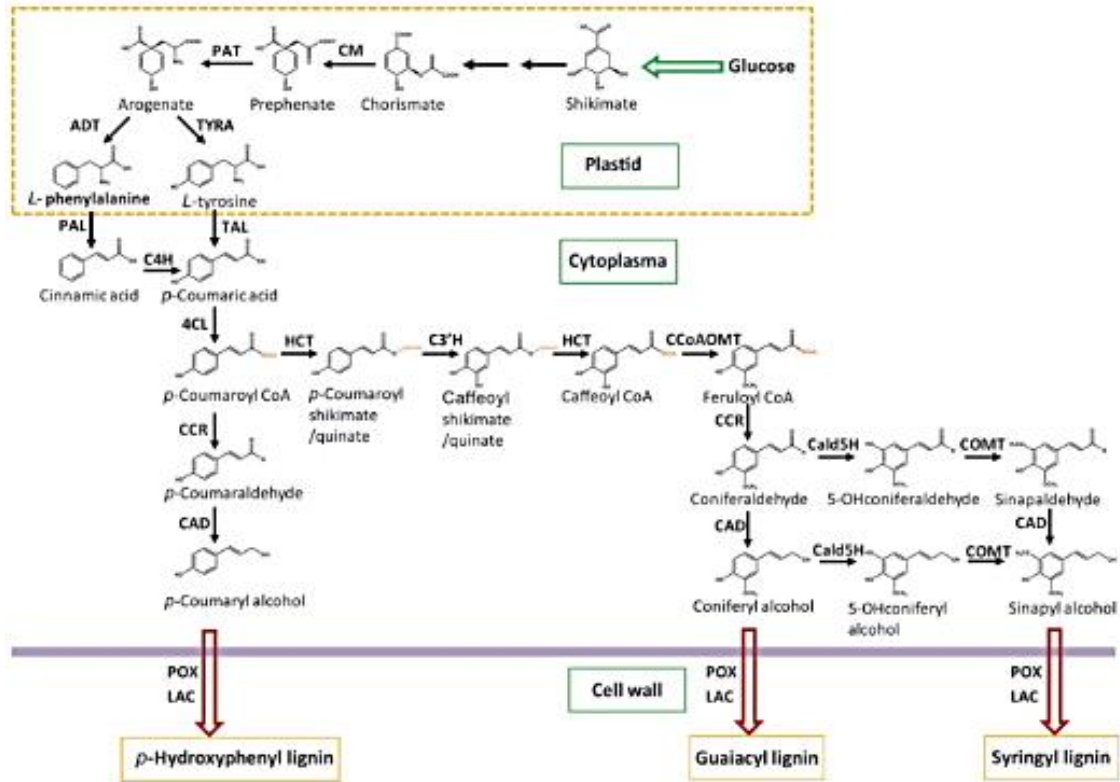
**2.3.2 Relación Carbono: Nitrógeno (C: N):** Es un factor significativo que influye en la velocidad de la descomposición y en la pérdida de amonio durante el compostaje. Una correlación C/N mayor que 40 afectará negativamente las actividades biológicas puesto que la microbiota debe oxidar las cantidades extras de carbono ocasionando una ralentización del proceso, debido a la insuficiente disponibilidad de nitrógeno para la biosíntesis de proteínas. Por otra parte, si la materia orgánica es poco biodegradable, pero con una alta relación C/N el proceso se desarrollará rápidamente, pero afectará sólo a una proporción de la masa total. Finalmente, si la relación es muy baja el proceso biodegradativo es más rápido autorregulándose el sistema en la liberación del exceso de nitrógeno en forma de amonio (Sánchez et al, 2008) (Arango et al, 2016).

**2.3.3 Naturaleza del sustrato:** La característica química más importante de los sustratos es su composición elemental, donde sobresalen sustancias ricas en carbono, nitrógeno, y fósforo. Estos macronutrientes esenciales permiten el desarrollo fisiológico de los microorganismos, siendo el carbono necesario en la síntesis celular (protoplasma, lípidos, grasas y carbohidratos), a su vez en la producción de energía luego de una ganancia oxidativa o en la formación de anhídrido carbónico luego del proceso de respiración celular. El nitrógeno por su parte es un elemento fundamental durante la reproducción celular asociado principalmente a la síntesis proteica del protoplasma, finalmente el fósforo juega un papel relevante en la formación de compuestos celulares altamente energéticos y necesarios en el metabolismo microbiano (López et al, 2015) (Arango et al 2016).

### **2.3.3.1 Sustratos degradables de origen vegetal**

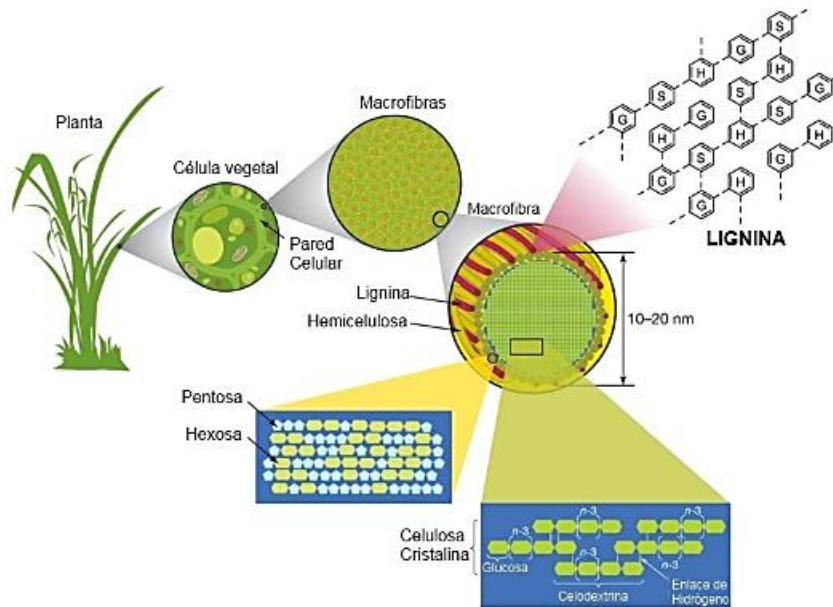
#### **2.3.3.1.1 Lignina**

Es uno de los componentes estructurales más importantes de las plantas, formado por un polímero tridimensional complejo cuyas subunidades aromáticas son sintetizadas a través de dos rutas metabólicas, iniciando por ruta de shikimato para la producción de L-fenilalanina y L-tirosina (Fig 3 recuadro punteado) y la ruta de los fenilpropanoides desde la L-fenilalanina hasta la biosíntesis final de los alcoholes cinamílicos así como estilbenos, coumarinas, flavonoides y algunas fitoalexinas (Lagunes & Zavaleta, 2016).



**Figura 3. Rutas metabólicas para la biosíntesis de lignina: Ruta del shikimato (plastidio) y fenilpropanoide (citoplasma)**  
**Fuente: Chang Lui (2012)**

En la planta, constituye un componente estructural fundamental para la preservación e integridad de la pared celular ya que provee de rigidez (Fig 4), resistencia, favorece el transporte de agua y solutos a través de los haces en el sistema vascular, y proporciona barreras físicas contra las invasiones de fitopatógenos y otros factores ambientales.



**Figura 4. Estructura de la lignocelulosa. La resistencia a la degradación de la celulosa se encuentra influenciada por capas de polisacáridos presentes. La hemicelulosa compuesta por azúcares tales como arabinosa, galactosa, glucosa, manosa y xilosa. Finalmente, la lignina formada por alcohol p- cumaril (H), alcohol coniferilico (G) y alcohol sinapilico (S). La combinación de estos constituyentes forma las macrofibrillas que aportan estabilidad a la pared celular de la planta. Tomado de Rødde et al, 2008**

Sin embargo, su presencia contribuye a la formación recalcitrada de la pared celular limitando su uso en la alimentación del ganado, para la fabricación de pulpa y papel, así como para la producción de biocombustibles líquidos y finalmente dificultando su degradación (Fig.4) (Chang Lui, 2012). Si bien este es un sustrato que exhibe una difícil biotransformación, existen en la naturaleza microorganismos que presentan dentro de su metabolismo producción de enzimas oxidantes extracelulares con actividad ligninolítica, que, aunque difieran en forma o síntesis debido a los genes codificantes y cambios postraduccionales, su función y actividad es la misma. Estas son principalmente producidas por hongos conocidos ampliamente como causantes de la podredumbre blanca, estas con las lacasas, pertenecientes al grupo del polifenol oxidasas que contiene cobre como cofactor, poseen capacidad de oxidar polifenoles sustituidos y diaminas, convertirlos en compuestos no tóxicos (quinonas) o degradarlos a dióxido de carbono y agua como es el caso de algunos compuestos (Álvarez et al,2016)

Estas lacasas o peroxidasas ligninolíticas involucran a la lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP) las cuales se caracterizan por su alto poder reductor y la degradación de las unidades de lignina no fenólicas por



parte la LiP y la generación de  $Mn^{3+}$  que ejerce como un oxidante difusible en unidades de lignina fenólicas o no fenólicas a través de lípido como es el caso de la MnP. Estas enzimas se han descrito regularmente en las especies fúngicas como *Trametes versicolor* (cola de pavo), *Stereum hirsutum* (cola de pavo falso), y *Pleurotus ostreatus* el cual a su vez posee la cualidad de co- degradar celulosa y lignina (Insam et al, 2010).

### 2.3.3.1.2 Celulosa

Es el compuesto orgánico natural más abundante encontrado en casi todo tipo de residuos orgánicos. Esta puede dilucidarse como una macromolécula (polisacárida) semicristalina, que está conformado por  $\beta$ -D-glucosa con un grado de polimerización de hasta 40.000, dichas moléculas están unidas por enlaces  $\beta$ -1-4-glucosídico. La celulosa consiste en dominios cristalinos y amorfos, que afectan ampliamente las propiedades mecánicas de las fibras de celulosa, si bien los arreglos de cristales en cada fibra de celulosa natural son diferentes según su fuente, las propiedades mecánicas de estas fibras difieren entre sí (Abdul et al, 2017).

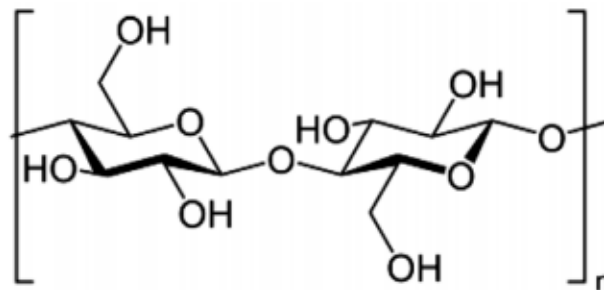


Figura 5. Estructura química de la molécula de celulosa  
Fuente: Abdul et al. (2017)

Como se evidencia en la figura 5, cada monómero posee tres grupos hidroxilo los cuales poseen la capacidad de formar enlaces de hidrogeno jugando un papel importante en la forma cristalina y las propiedades físicas de la molécula de celulosa. En plantas se ha demostrado que la porción principal de la celulosa está constituida por regiones amorfas intercaladas; polimórficamente la celulosa presenta dos formas principales, como lo es la celulosa nativa o celulosa tipo I es naturaleza cristalina y la celulosa tipo II se emplea en soluciones (celulosa precipitada) generalmente alcalinas (Siquiera et al, 2010).

La transformación de la celulosa tipo I en celulosa tipo II es un tema de interés, de denotándose que, al someter esta celulosa nativa a tratamiento con un álcali fuerte, de igual forma se expone la existencia de dos formas cristalinas diferentes de dicha celulosa nativa,  $I\alpha$  e  $I\beta$ , siendo esta primera

predominante en celulosas bacterianas y esta última en plantas anuales. La presencia de ambas formas estructurales puede ser encontradas en la misma molécula de celulosa o a lo largo de una microfibrilla dada siendo una diferencia sustancial entre ambas el patrón de enlace del hidrogeno en la conformación de las cadenas polisacáridos (Siquiera et al, 2010).

En la naturaleza, los microorganismos con capacidades celulolíticas utilizan diferentes habilidades para degradar las paredes celulares de las plantas con el fin de para obtener sus azúcares metabolizables, como es el caso de bacterias, hongos y mixomicetos que contengan en su metabolismo las enzimas involucradas en la degradación, como lo son las (1) endo- $\beta$ -1,4-glucanasas que escinden los enlaces  $\beta$ -1, 4 dentro de la molécula, lo que origina cadenas largas con extremos libres, (2) exo- $\beta$ -1,4-glucanasas separan el disacárido celobiosa de los extremos libres y las (3)  $\beta$ -glucosidasas hidrolizan la celobiosa para dejar monómeros de glucosa. Dentro de los microorganismos con capacidad de degradar este sustrato se encuentran los géneros *Chaetomium*, *Fusarium* y *Aspergillus* especies fúngicas los cuales tienen una ventaja competitiva puesto que la celulosa es rica en carbono, pero no contiene nitrógeno u otros elementos esenciales por lo tanto la estructura micelial les da una principal acción a los hongos. Por su parte *Pseudomonas*, *Cytophaga hutchinsonii*, como especies bacterianas activas bajo condiciones aeróbicas son degradadoras de este sustrato (Insam et al, 2010). Entre los paradigmas enzimáticos el “celulosoma” constituye un complejo de múltiples enzimas activas en carbohidratos, siendo un sistema eficiente para el rompimiento de la biomasa celulósica producido por microorganismos anaerobios particularmente especies clostridiales. Este fue dilucidado inicialmente en *Clostridium thermocellum* una bacteria termófila anaerobia en la cual se evidenció la presencia de una subunidad de alto peso molecular compuesta (Fig. 6) por varios nódulos de cohesina tipo I, dockerina tipo II y un enlace de carbohidratos (CBM) interconectado por segmentos ligantes ricos en prolina y treonina. Dicha estructura se encuentra unida a la superficie celular bacteriana mediante interacción cohesina-dockerina (tipo III), todo este andamiaje molecular permite la acción efectiva de degradación de los sustratos celulósicos recalcitrante (Phitsuwan et al, 2019) (Artzi et al,2016) .

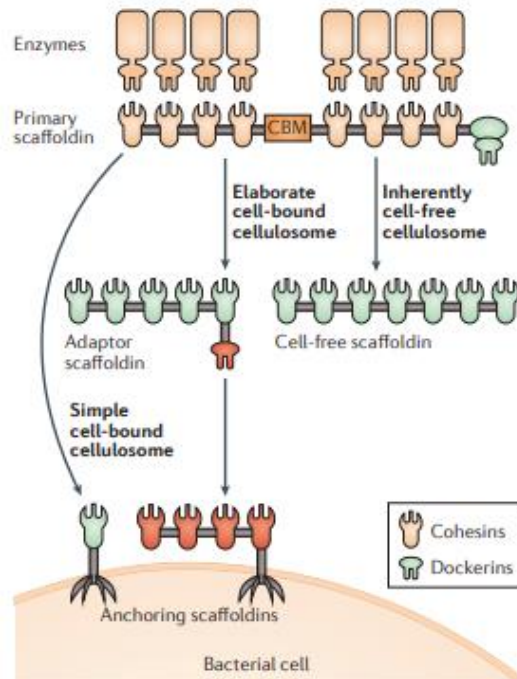


Figura 6. Esquema de complejo celulosómico presente en especies de Clostridios. Tomado de Artzi et al, 2016

### 2.3.3.1.2 Hemicelulosa

El xilano es el compuesto más relevante dentro de los constituyentes hemicelulósicos, este está conformado por pentosas (xilosa, arabinosa) o hexosas (glucosa, manosa, galactosa) con un grado de polimerización de 30–100; las principales enzimas degradantes de este sustrato son las xilanasas, producidas por muchas bacterias y hongos (Insam et al, 2010).

La pectina es otro compuesto constituyente formado por cadenas no ramificadas de ácido poligalacturónico que representan entre 2 y 35% de la pared celular de la planta; numerosos hongos y bacterias (muchos de ellos fitopatógenos) producen pectinasas que lo degradan (Insam et al, 2010).

Finalmente el almidón está compuesto de amilosa (20%), cadenas no ramificadas de D-glucosa y amilopectina que se ramifica en la posición 1,6 además de contener restos de fosfato e iones de Ca y Mg. Dentro de los grupos enzimáticos más importantes que escinden el almidón están las fosforilasas cuya actividad empieza en el extremo libre y no reductor de la cadena de amilosa, y liberan moléculas individuales de glucosa-1-fosfato, en los enlaces 1,6 la enzima se detiene y solo es nuevamente activa luego de acción de la amilo-1,6-glucosidasa. Para concluir los enlaces  $\alpha$ -1,4 dentro de la molécula son catalizados por la  $\alpha$ -amilasa (Insam et al, 2010).

## 2.4 PARÁMETROS DE MONITOREO DENTRO DEL PROCESO DE COMPOSTAJE

**2.4.1 Temperatura:** El proceso biooxidativo de la materia orgánica mixta es llevada a cabo por la actividad microbiana lo cual origina reacciones de naturaleza exotérmica, produciendo una cantidad relativamente grande de energía la cual solo del 40-50% de esta puede ser empleada por el microbiota presente para sintetizar ATP y la energía restante sale del sistema en forma de calor; de allí que la temperatura sea considerada como una variable fundamental de control dentro del compostaje (Hemidat et al, 2018).

**2.4.2 Potencial de hidrógeno (pH):** Generalmente, el pH comienza a descender al comienzo del proceso de compostaje (hasta 5.0) como resultado de la acción de las bacterias ácido-formadoras que degradan el sustrato rico en carbono a ácidos orgánicos como productos intermedios. Cuando esta fase acidificante culmina y los metabolitos intermedios están completamente mineralizados, el pH asciende para finalmente alcanzar valores de 8.0–8.5 (Díaz et al, 2007).

**2.4.3 Aireación:** El aire contenido en los espacios intermedios de la masa de compostaje, durante la actividad microbiana oxidativa varía en composición, ocurriendo un desplome en el contenido de oxígeno y un aumento gradual de dióxido de carbono favoreciéndose el desarrollo y multiplicación de microorganismos anaeróbicos e inhibiendo los aeróbicos siendo estos primeros desacelerantes del proceso de descomposición, la producción de sulfuro de hidrógeno y la consecuente producción de malos olores. Por lo tanto, es importante que los microorganismos tengan un suministro constante de oxígeno para mantener inalteradas sus actividades metabólicas puesto que después de algunas horas de compostaje, el nivel de oxígeno cae a niveles muy bajos y el oxígeno debe ser suministrado por ventilación mecánica o manual (Díaz et al, 2007).

**2.4.4 Contenido de humedad:** El agua un recurso fundamental para toda actividad microbiana y debe estar presente en cantidades apropiadas a lo largo del ciclo de compostaje. Un contenido óptimo de humedad en el material de partida varía ya que está en función del estado físico y el tamaño de las partículas, así como del compostaje sistema utilizado. Habitualmente, un contenido de humedad del 60% en el material de partida debe ser satisfactorio debido a que no todos los sustratos poseen las mismas capacidades de retención de agua, por lo tanto, no se puede realizar una generalización de niveles adecuados de humedad iniciales. Durante el proceso una baja humedad indica una deshidratación temprana de la masa y por ende un detenimiento de la actividad biológica volviendo el proceso inestable. Por otra parte, el exceso de agua dentro del sistema

tiende a tapar los poros e impidiendo el intercambio de gases ( $O_2$  y  $CO_2$ ) favoreciendo la aparición de los procesos anaeróbicos, lo que resulta en un proceso más lento y un producto final de baja calidad (Bing et al, 2016).

Como se indicó anteriormente, el contenido de humedad permisible, es decir el nivel en el cual no se desarrollan inconvenientes durante la biodegradación y la disponibilidad de oxígeno están estrechamente interrelacionados durante el proceso de compostaje. Un contenido máximo de humedad permitido se encuentra asociado a la resistencia estructural (compresión) de las partículas que componen el material orgánico de partida, por ello entre mayor sea su capacidad de resistencia mayor será el contenido de humedad permitido (Bueno et al, 2008).

## 2.5 CULTIVO DE PALMA ACEITERA

La palma de aceite cuyo nombre científico es *Elaeis guineensis Jacq* tiene sus comienzos en el siglo XV, siendo originaria de las costas del Golfo de Guinea, África occidental. Su amplia distribución en el mundo se ha dado en forma natural aprovechando las márgenes de grandes ríos y favoreciéndose por condiciones climáticas ideales.

Alrededor del siglo XVI, colonizadores y comerciantes de esclavos portugueses introdujeron la Palma de aceite en el continente americano, empleando los frutos de esta como parte de la dieta alimenticia durante los largos viajes trasatlánticos, haciéndose los primeros ingresos en la región de San Salvador (antigua capital del Brasil). Tiempo después aproximadamente siglo XIX en el continente europeo y africano se empezó a comercializar la palma de aceite como materia prima para la elaboración de velas y lubricantes de trenes.

A inicios de siglo la industria aceitera presentó un crecimiento exponencial con la aparición de sectores dedicados a la producción de jabones y grasas comestibles, provocando que se enfocaran los esfuerzos para mejorar las condiciones de aprovechamiento de palmas silvestres e incorporando los elementos necesarios para el procesamiento del fruto de palma en la región europea. Por su parte Asia en la zona de Java (Indonesia y Malasia) alrededor del año 1948 dio origen a métodos de plantaciones dando lugar que entre los años de 1961 y 1977 Malasia sembrara más de setecientas (700) mil hectáreas y pasó a ser el principal exportador del mundo en el año 1966.

En Colombia, Florentino Claes en el año de 1932 trajo consigo al país las primeras palmas de aceite africanas cuyo fin era ornamental para algunos

pueblos y lugares concretos de la Región Amazónica y en la Estación Agrícola de Palmira, en el Valle del Cauca. Su atractivo visual que poseía sumado a que el fruto que esta originaba era comestible, la multinacional “United Fruit Company” líder en la producción y comercialización de frutos tropicales se interesó en el cultivo, manufacturación y comercialización de palma de aceite a mediados de 1945 comenzando en la zona bananera del departamento de Magdalena; su alto rendimiento en unidad de superficie así como la diversidad de productos generados por la planta y sus partes fue razón de peso para que el país empezara a sembrar y producir palma de aceite en masa.

Su utilidad o aprovechamiento se encuentra en la industria alimentaria en la margarina, manteca, aceite de mesa y de cocina; de igual forma se emplea en la producción de acero inoxidable, concentrados minerales, aditivos para lubricantes, crema para zapatos, tinta de imprenta, velas, laminación de acero y aluminio. La mayor innovación está dada en la producción de biodiesel, donde este puede ser empleado en motores de combustión diésel, y como biocombustible en sistemas de calefacción (Mujica, 2010).

Actualmente Colombia cuenta con 500.000 hectáreas de palma de aceite distribuidas en cuatro zonas productivas, la zona norte comprende los departamentos de Magdalena, Norte del Cesar, Atlántico, Guajira; la zona central Santander, Norte de Santander, sur del Cesar y Bolívar; zona occidental el departamento de Nariño y finalmente la zona oriental donde se ubican los departamentos de Meta, Cundinamarca, Casanare y Caquetá. Con este potencial de producción en palma aceitera, Colombia, se encuentra en el cuarto puesto a nivel mundial, ubicados después de Malasia, Indonesia y Nigeria y es primer productor en el continente americano (Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite, 2018).

## **2.6 PRINCIPALES RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE PALMA ACEITERA**

### **2.6.1 Racimos de frutas vacías de palma aceitera (EFB)**

En el proceso de beneficio de palma aceitera, en promedio se pueden llegar a manejar diariamente aproximadamente de 100 toneladas métricas (tm) de racimos de fruta fresca. De este volumen más del 20% del peso de la fruta fresca se convierten en residuo sólido, siendo una práctica común la incineración de estos en calderas; esta actividad genera inconvenientes ambientales como la emisión de gases (especialmente metano) y partículas como alquitrán y gotas de hollín de 20–100 micras y una carga de polvo de aproximadamente 3000–4000 mg / nm. Desde el punto de vista estructural este residuo de naturaleza vegetal contiene en proporción entre el 45-50%

de celulosa, 25-35% de hemicelulosas y 25-35% de lignina; sin embargo, el contenido de macroelementos y microelementos es variable (Noor et al. 2012).

### 2.6.2 Efluente del molino de aceite de palma (POME)

El agua descargada denominada efluente proveniente del procesamiento de la palma de aceite es conocido como POME, contiene una serie de líquidos obtenidos luego del paso a través de materiales sucios que contienen químicos solubles, aceite residual y sólidos en suspensión. Este efluente se va originando a lo largo de las etapas que constituyen el proceso de aprovechamiento (fig.7) (Noor et al, 2012).

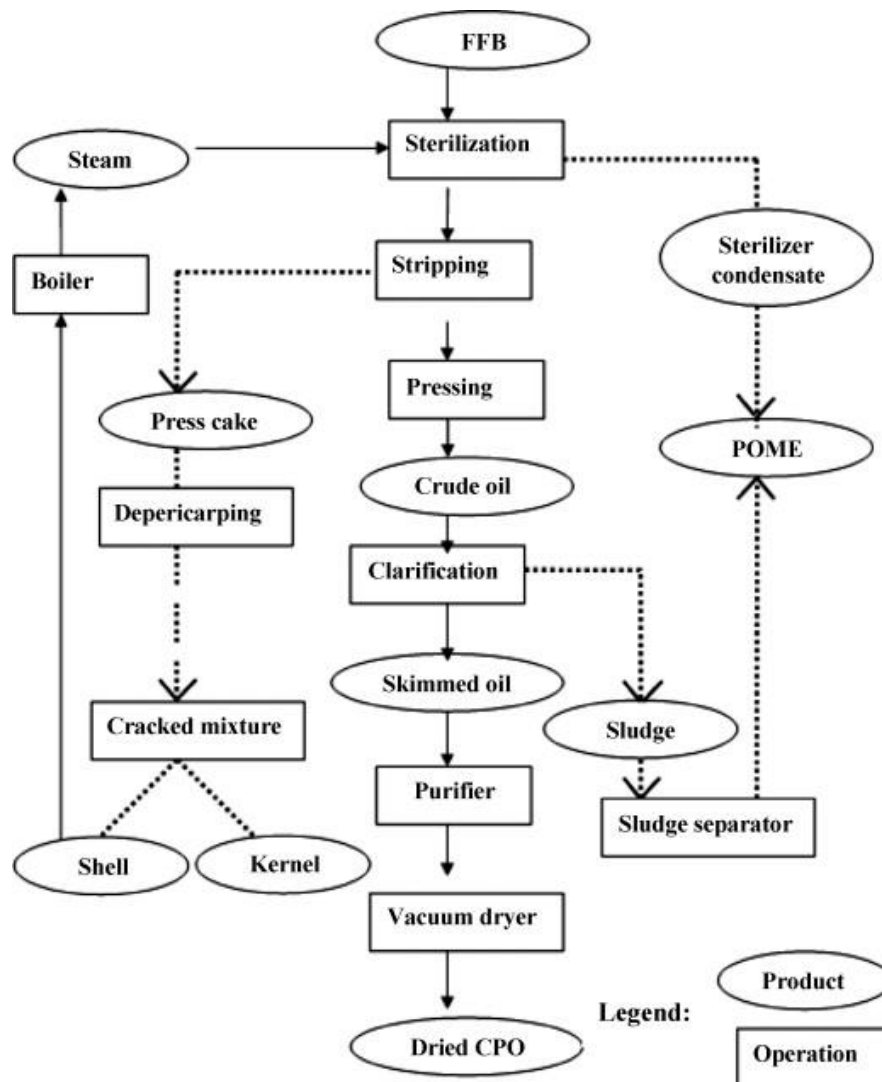


Figura 7. Esquema proceso de extracción aceite de palma y generación de efluente (POME). La línea punteada señala el subproducto y flujo de residuos  
 Fuente: Noor et al. (2012)

En datos puntuales se puede establecer que por cada 100 kilogramos de EFB que ingresan a la planta de beneficio, 20 kilogramos de racimos de fruto vacío, 14 kilogramos de fibra de fruto y entre 65 y 85 kilogramos de efluentes se obtienen al final del proceso (Castañeda & Romero, 2012).

Con estos volúmenes muy considerables de residuos se hace necesario determinar estrategias de manejo que permitan su tratamiento y reincorporación a la cadena productiva. Esto en armonía a lo establecido en la normativa vigente que rige el sector palmicultor puesto que esta exige una gestión adecuada de los subproductos que origina, sumado a ello el principio 5 de la RSPO (Roundtable Sustainable Palm Oil) establece en sus criterios 1, 2, 3, 4 y 6 que el reciclaje, la mitigación de impactos ambientales negativos y la eficacia energética son los ejes principales de desarrollo de una palmicultura ambiental y económicamente sostenible. Basados en esa premisa, el compostaje se establece como una alternativa a considerar por los productores de aceite de palma en el mundo ya que ofrece un mecanismo de solución a el tratamiento de dichos subproductos favoreciendo el retorno de nutrientes al agroecosistema (Centro de Investigación en Palma de aceite, 2012).

## **2.7 COMPOSTAJE DE EFB Y POME COMO ESTRATEGIA BIOTECNOLÓGICA**

El compostaje de EFB es una alternativa viable convertir los racimos voluminosos en un producto apreciable y fácilmente aprovechable en la plantación, en función a ello se han planteado diversas investigaciones sobre las características que permitan de descomposición de los racimos de frutas vacías (EFB) durante el compostaje. Comúnmente se adicionan otros materiales con el fin de sopesar las deficiencias puntuales que limitan que el proceso principalmente asociadas con el bajo contenido de nitrógeno, de allí el empleo de estiércol de animales y POME. No obstante, este último posee un contenido importante de nutrientes y luego de su tratamiento, los sedimentos resultantes de su procesado poseen un valor nutritivo más alto fácilmente aprovechable en procesos de fertilización (Noor et al, 2012).

A pesar de no se conoce específicamente las características microbiológicas del proceso de compostaje empleando los subproductos de palma de aceite, se destacan en este campo los aportes realizados por Thambirajah et al, 1995 donde se demostró que el empleo de material celulósico presentó una correlación positiva en función al contenido de nitrógeno en el compost. Por su parte, Suhaimi y Ong (2001) evaluaron los sistemas de compostaje abierto y cerrado empleando composiciones de EFB, residuos líquidos de fermentación (POME) y estiércol de pollo para el



tratamiento abierto y EFB, POME y estiércol de pollo fueron los ingredientes para el compostaje en el tratamiento cerrado. Esto proporcionó como resultado una actividad biológica irregular ya que el proceso en el sistema abierto logro ser más rápido que en el cerrado evidenciándose una relación C / N alrededor de 16 en aproximadamente 50 días (abierto) y 85 días (cerrado).

Finalmente, la experimentación llevada a cabo por Baharuddin et al, 2010 presenta un completo seguimiento de las comunidades microbianas y las actividades celulolíticas durante el co-compostaje de EFB y POME parcialmente tratado en una escala piloto. Para ello se identificó la diversidad microbiológica empleando las técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y electroforesis en gel desnaturalizante (DGGE). De allí se destaca que en el proceso de biotransformación de EFB con POME parcialmente tratados prevalecían las especies bacterianas no cultivables.

Actualmente, en Colombia el centro de investigación en palma de aceite (CENIPALMA) expone en su boletín número 31, como estrategia eficiente y rentable el compostaje de los racimos de palma vacíos empleando como inóculo microbiano, las especies presentes en los efluentes y/o lodos de fondo (sistema de tratamiento de aguas residuales) obtenidos durante el proceso de beneficio puesto que el uso de inoculantes microbianos para agilizar las tasas de descomposición en compost de palma de aceite ha sido estudiado previamente, encontrándose resultados inconsistentes. Una de las herramientas se que han venido estudiando es la aplicación de microorganismos nativos y producidos *in situ*, con técnicas seleccionadas para aislar los lignolíticos y celulolíticos, que permitieran obtener un inoculante eficaz para agilizar de las primeras etapas de degradación de los racimos palma de aceite vacíos (Centro de investigaciones en palma de aceite,2012).

### 3 MARCO CONTEXTUAL

Unipalma de los llanos SA fue establecida en el año de 1981 por la multinacional británico-neerlandesa UNILEVER, en asociación con Inversionistas Colombianos (Corficolombiana, Mineros S.A., Federación Nacional de Cafeteros).

La Compañía PLANTACIONES UNIPALMA DE LOS LLANOS S.A., "UNIPALMA S.A.", tiene sus plantaciones de palma de aceite en los Llanos Orientales de Colombia, en los Municipios de Cumaral (Meta) y Paratebueno (Cundinamarca); geográficamente ubicada en las coordenadas 4° 13' 33" de latitud Norte y los 73° 14' 50" de longitud Oeste.

Entre sus principales productos y servicios ofrecidos se encuentra la producción y extracción de aceite crudo de palma a partir de racimos de fruto fresco, aceite de palmiste, torta de palmiste y entre otros. Resultado de esta actividad productiva se obtienen subproductos como el raquis (racimo de fruto de palma vacío), lodos y efluentes, ceniza, cascarilla y demás los cuales son dispuestos en un área de 12.000 m<sup>2</sup> ubicada a 900 metros de la planta de beneficio destinada al proceso de compostaje.

Esta disposición se ha realizado por un periodo de ocho años, en los cuales el proceso de elaboración del compost no ha sido estandarizado o llevado a cabo correctamente desde el punto de vista técnico y metodológico, originando que este acopio de materia orgánica sea un reservorio ideal para la multiplicación del díptero *Stomoxys calcitrans* o mosca brava, la cual ataca a equinos y bovinos que se encuentran en las zonas circundantes a la plantación. Como medida de choque se ha instaurado trampas físicas y control biológico empleando avispas de la familia *Pteromalidae* (*Spalangia*) la cual parasita la mosca en su estado de pupa evitando en gran parte la reproducción del díptero.

El profesional de apoyo asignado al área de compostaje y el departamento de gestión ambiental han adelantado experimentación con productos comerciales destinados a la degradación de materia orgánica, con el fin de evaluar su efecto sobre el ciclo de reproducción de *Stomoxys calcitrans* en el raquis de palma a compostar; obteniéndose en todos los ensayos resultados adversos o negativos en cuanto a la disminución de la incidencia de la mosca. Una de las observaciones o factor común en las experimentaciones es la falta de seguimiento de parámetros fisicoquímicos en la materia orgánica sumado a no finalización de los ensayos en función a la degradación de la materia orgánica.

#### 4 MARCO LEGAL

- **Ley 99 de 1993:** Procedimiento para el Otorgamiento de Licencias Ambientales, (Modificado por el art. 94 del Decreto 1122 de 1999); (Modificado por el art. 53 del Decreto 266 de 2000); (Modificado por el art. 224, Ley 1450 de 2011); (Modificado por el art. 179 de la Ley 1753 de 2015)
- **Resolución 150 de 2003:** Por la cual se adopta el Reglamento Técnico de Fertilizantes y Acondicionadores de Suelos para Colombia – Instituto Agropecuario Colombiano
- **Decreto 474 del 2005:** Por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y manejo de los residuos o desechos peligrosos generados en el marco de la gestión integral - Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.
- **Norma Técnica Colombiana (NTC) 5167 del 2011:** Materiales Orgánicos Utilizados como Fertilizantes o Acondicionadores de Suelos – INCONTEC
- **Norma Técnica Colombiana (NTC) 1927 del 2012:** Fertilizantes y acondicionadores de suelos. Definiciones, clasificación y fuentes de materias primas – INCONTEC
- **Resolución ICA 00012685:** Por medio de la cual se otorga el registro a la empresa UNIPALMA SA, como productor de Fertilizantes orgánicos: sólidos y líquidos y acondicionadores de suelos orgánicos: sólidos y líquidos.

## 5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

Los cultivos agrícolas empleados en los sistemas de producción agroindustrial generan un extenso volumen de residuos o subproductos vegetales ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales no tienen un posterior uso en la cadena productiva originando acumulaciones en el suelo. Esto genera impacto en los medios bióticos, abióticos y socioeconómicos para las empresas industriales.

Dentro de esa afectación negativa generada se encuentra la disminución de espacio para los cultivos, así como la generación de reservorios que favorecen la proliferación de plagas y hospederos fitopatógenos; una alternativa empleada en el sector agrícola para contrarrestar la acumulación de residuos agroindustriales fue la incineración a cielo abierto de estos. Actualmente esta fue prohibida por las entidades regulatorias nacionales y departamentales ya que se ocasiona una fuerte emisión de CO<sub>2</sub> a la atmosfera convirtiéndose en una amenaza para la salud humana y el medio ambiente.

Una de las estrategias para el tratamiento de estos residuos es el uso y aplicación de microorganismos capaces de sintetizar enzimas que catalicen los diferentes sustratos presentes en los residuos vegetales en moléculas menos complejas, ocasionando que se acelere el tiempo de degradación natural, así como la obtención de subproductos como el compost, incremento en el flujo de carbono lo cual generará mayor disponibilidad de nutrientes y mejora en la aptitud del suelo.

En este presente trabajo se esboza la determinación del potencial enzimático de las distintas cepas microbianas empleadas en el laboratorio microbiológico de la división de bioinsumos perteneciente a la organización PAJONALES SAS, con el fin de formular un producto biológico experimental que acelere el proceso de descomposición de los residuos agroindustriales (Racimos de fruto de palma vacíos) originados en UNIPALMA SA a partir del proceso de extracción de aceite; siendo estos materia orgánica rica en celulosa, lignina y ácidos grasos. Por lo cual el tratamiento biológico es una herramienta viable y de bajo costo, que garantizan la transformación de este sustrato y la obtención de un producto fácilmente aprovechable en los cultivos de palma presentes en la misma plantación, como lo es el compost.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Evaluar el potencial enzimático en cuanto a la producción de lipasas, amilasas, proteasas y celulasas de cepas microbianas presentes en el cepario laboratorio de Bioinsumos Pajonales SAS, con el fin de establecer su posible uso como acelerante en el compostaje de residuos agroindustriales de palma de aceite.

### 6.2 Objetivos específicos

- Determinar mediante pruebas de caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica la pureza de las cepas microbianas de ensayo; así como su estabilidad fisiológica a altas temperaturas y distintos pH con el fin de establecer su capacidad de crecimiento frente a estas variables
- Demostrar mediante observación cualitativa, la producción de enzimas proteolíticas, amilolíticas, celulíticas y lipolíticas empleando medios de cultivo modificados denotando el perfil enzimático de cada cepa de ensayo
- Seleccionar las cepas microbianas que presenten actividad enzimática lipolítica y celulolítica estableciendo mediante prueba de antagonismo microbiano la interacción del bioconsorcio.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 ACTIVIDADES ESPECÍFICAS

#### 7.1.1 Preparación de cepas bacterianas y fúngicas de ensayo

Se realizó una transferencia con asa de las cepas bacterianas *Bacillus* sp.OP1, *Bacillus* sp. OP2, *Lactobacillus* sp.OP3 y *Azotobacter* sp. OP7 en agar nutritivo el cual fue incubado a 30°C por 48 horas. Paralelamente se realizó un repique de las cepas fúngicas *Metarhizium* sp.OP5, *Trichoderma* sp.OP6 y *Lecanicillium* sp. OP8, así como de *Saccharomyces* sp.OP4 empleando para estos, agar PDA (Papa Dextrosa Agar) el cual fue incubado a 25°C por 7 días.

#### 7.1.2 Pruebas de identificación

Se realizó la observación macroscópica y microscópica (Tinción Gram) de las cepas bacterianas y (Azul de lactofenol) fúngicas, a partir de una colonia o crecimiento axénico bacteriano se realizó la evaluación bioquímica empleando los medios TSI (Hierro Triple Azúcar), Urea, Citrato, SIM (Motilidad, Indol, sulfuro de hidrógeno) e incubándose estas a 35°C por 48 horas. Paralelo a ello se realizaron las pruebas de catalasa empleando para ello peróxido de hidrogeno al 3%.

#### 7.1.3 Prueba de estabilidad fisiológica a altas temperaturas y distintos pH

Para el establecimiento de la estabilidad fisiológica en función de la temperatura y pH se siguió realizando modificaciones al método de Jiménez et al, (2018). Para ello se sembró cada una de las cepas microbianas en tubos con caldo nutritivo (Bacterias) o caldo Sabouraud el cual se ajustó a valores de pH de 2 - 4 - 7 - 9 los cuales se incubarán a 37°C por 5 días. Finalizado este periodo se tomaron como positivos los tubos que presentaron turbidez, este procedimiento se realizó por duplicado y tomándose como control negativo medio sin inocular. Paralelo a ello se realizó prueba de crecimiento a distintas temperaturas empleando siembras en medio sólido (Agar nutritivo y PDA según corresponda) de cada una de las cepas microbianas y se llevaron a incubación a 4°C, 25°C, 37°C y 55°C durante cinco días. Transcurrido este tiempo se tomó como positivo las cajas que presenten colonias en el medio sólido, este procedimiento se realizará por duplicado y se tendrá como control negativo medio solido sin inocular.

#### 7.1.4 Prueba cualitativa de caracterización enzimática

Para la evaluación de la producción enzimática de las cepas microbianas se efectuó la preparación de los medios de cultivos modificados para la detección de lipasas, amilasas, proteasas, celulasas siguiendo el método de Valencia et al, (2011) y efectuando modificaciones; por lo cual se llevó a cabo la elaboración de medios de cultivo con sustratos específicos como se describe a continuación:

- **Medio Lipolítico:** Se tomaron 2 huevos frescos y se depositaron en un vaso precipitado estéril. Luego estos se rociaron con alcohol a 70% y se dejaron reposar 10 minutos aproximadamente. Seguidamente se procedió a extraer las yemas de los huevos las cuales se homogenizaron en 110 ml de agua ultrafiltrada estéril. Finalmente, esta mezcla fue depositada en un Erlenmeyer con 110 ml de agua ultrafiltrada estéril con 4,9 g de agar - agar previamente fundido y no tan caliente, con lo cual se procedió a servir el medio en cajas estériles
- **Medio Amilolítico:** Se tomaron 110 ml de agua ultrafiltrada estéril y se le adicionó 4,4g de fécula de almidón, la mezcla se calentó a temperatura media, hasta que no se observaran grumos. Paralelamente se fundió el medio de cultivo que contenía 110 ml de agua ultrafiltrada estéril que contenía 4,9 g de agar - agar, luego se mezclaron las dos preparaciones cuando esta última se encontrara a menor temperatura seguido por la disposición en cajas de Petri estériles.
- **Medio Proteolítico:** Se pesaron 4,9 g de agar - agar y 4,9 g de leche en polvo lo cual se diluyó en 220 ml de agua ultrafiltrada estéril, seguidamente se procedió a calentar y esterilizar para finalmente ser depositado en cajas de Petri estériles.
- **Medio Celulolítico A:** Se pesaron 4,9 g de agar - agar y 4,9 g de aserrín los cuales se diluyeron en 220 ml de agua ultrafiltrada estéril, seguidamente se procedió a calentar y esterilizar para finalmente ser depositado en cajas de Petri estériles.
- **Medio Celulolítico B:** Se pesaron 4,9 g de agar - agar y 4,9 g de tamo de arroz los cuales se diluyeron en 220 ml de agua ultrafiltrada estéril, seguidamente se procedió a calentar y esterilizar para finalmente ser depositado en cajas de Petri estériles.

Finalmente se llevó a cabo la inoculación de cada uno de los medios previamente elaborados, realizando una punción en uno de los extremos del agar para el caso de las cepas fúngicas y de una siembra en forma de

estría en el centro del agar para la levadura y las cepas bacterianas. Estas fueron llevadas a incubación por 5 días a 25°C y 30°C respectivamente, este ensayo se realizó por duplicado y se tomó como control negativo medio de cultivo modificado (de cada uno) sin inocular.

*Actividad Amilolítica:* La actividad amilolítica se estableció por la aparición de zonas de aclaramiento alrededor de las colonias o crecimiento microbiano, debido a la hidrólisis del almidón, revelado con Lugol.

*Actividad Lipolítica:* La actividad lipolítica se estableció directamente por zonas de precipitación alrededor de las colonias o crecimiento microbiano.

*Actividad Proteolítico:* La actividad proteolítica se estableció directamente por la observación de zonas de aclaramiento alrededor de las colonias o crecimiento microbiano debido a la hidrólisis de la caseína.

*Actividad Celulolítica:* La actividad celulolítica se estableció por la presencia de zonas de aclaramiento, ocasionado por la hidrólisis de la celulosa, revelado con rojo Congo y Cloruro de sodio al 0,1M.

### **7.1.5 Prueba de antagonismo microbiano**

Esta evaluación se realizó llevando a cabo modificaciones a la metodología reportada por Pérez et al, (2014) empleando el método difusión en agar, donde se preparó una suspensión microbiana en caldo nutritivo (Bacterias) o caldo dextrosa (Hongos) según sea el caso, a un McFarland 2 ( $6 \times 10^8$  UFC/ml). Posteriormente se tomaron medios de cultivo agar nutritivo o PDA, a cada una de estas placas se le realizó un número de pocillos (El número de estos estarán sujetos a la cantidad de microorganismos a ensayar) de 6mm de diámetro aproximadamente procurando no tocar completamente el fondo de la placa, en los cuales se depositarán 40µL de los microorganismos de ensayo. Para este procedimiento se efectuó tomando como suspensión inicial cada microorganismo seleccionado e instaurando como control negativo agar TSA sin inocular. Finalmente, las placas se incubarán a 25°C de 24 a 96 horas.

## **7.2 ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS, LABORATORIO DE BIOINSUMOS**

Estos procedimientos fueron llevados a cabo en el laboratorio de calidad, División de bioinsumos, Organización PAJONALES SAS Ambalema, Tolima.

### **7.2.1 Asistencia en revisión documental**



Se efectuó una revisión de documentación a ser complementada y/o modificada en función de parámetros requeridos ante el ICA (Instituto Colombiano de Agricultura) puesto que es la entidad regulatoria nacional de insumos biológicos.

### **7.2.2 Prueba de antagonismo cepas microbianas**

Se realizó empleando caja de Petri provista de agar nutritivo al cual se procedió a realizar tres pocillos de 6 mm diámetro aproximadamente los cuales fueron rotulados con las iniciales de cada uno de los microorganismos a enfrentar: *Bacillus* sp.OP1, *Lactobacillus* sp.OP3 y *Saccharomyces* sp.OP4. Seguidamente se procedió a inocular 40 µL de cada cepa (McFarland 2) en el pocillo predeterminado, esto procedimiento se efectuó por triplicado. Finalmente se llevó a incubación por 96 horas a 30°C.

### **7.2.3 Ensayo de crecimiento microbiano en medio modificado con vísceras de pescado**

Se realizó la preparación de un medio modificado empleando para ello 2,2% de vísceras de pescado y 2,2% de Agar - Agar como solidificante, el cual, se calentó hasta ebullición seguido por esterilización mediante calor húmedo. Luego de ello se sirvió el medio en cajas de Petri estériles las cuales fueron finalmente inoculadas por duplicado con las cepas microbianas: *Bacillus* sp.OP1, *Lactobacillus* sp.OP3, *Saccharomyces* sp.OP4, *Metarhizium* sp.OP5, *Trichoderma* sp.OP6, *Azotobacter* sp. OP7 y *Lecanicillium* sp. OP8. Estos se llevaron a incubación a 27°C por cinco días. Como control negativo se tomó medio de cultivo modificado sin inocular.

### **7.2.4 Reactivación de cepa microbiana**

Para ello se empleó crioperlas de la cepa microbiana *Paecilomyces* sp. OP9 contenidas en vial de conservación, donde se tomaron dos perlas las cuales fueron introducidas en caldo Sabouraud e incubado a 25°C por cinco (5) días. Transcurrido en este periodo, se procedió a inocular en medio sólido PDA por método en superficie, realizándose por triplicado y tomando una placa de medio sólido sin inocular, con el fin de establecer control de medio de cultivo.

### **7.2.5 Caracterización cepa microbiana e introducción a la conservación**

A partir de una cepa microbiana adquirida y mantenida en medio líquido bajo condiciones axénicas se procedió a realizar una reactivación retirándose de la temperatura de congelamiento y disponiéndose inmediatamente en condiciones de refrigeración hasta que se evidenció una reconstitución líquida del medio. Se procedió a inocular de este 0,1mL empleando puntas estériles y disponiéndose en medio de cultivo PDA bajo condiciones de esterilidad. Estos se llevaron a incubación a 25°C siete (7) días. Concluido este periodo se realizó descripción macroscópica y microscópica.

### **7.2.6 Aplicación de muestreo ambiental y de superficie**

Esta metodología se llevó a cabo en el área delimitada como insectario ubicada dentro de la división de producción de bioinsumos. El muestreo ambiental se realizó empleando método por sedimentación, donde se colocaron cuatro cajas de Petri provistas de agar PDA las cuales se dispusieron en cuatro puntos equidistantes y distintos dentro del área concerniente al Insectario (Figura 1), los cuales fueron codificados como MA01, MA02, MA03 y MA04. Estas se dejaron abiertas y en exposición el medio de cultivo durante 20 minutos, finalizado este tiempo se procedió a cerrar y sellar las cajas de Petri para ser incubadas a 25°C durante tres días.


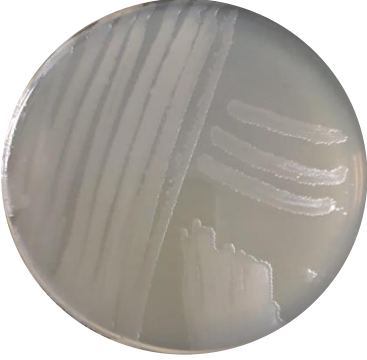
Paralelamente se realizó un muestreo de superficie empleando hisopos y tubos con caldo Sabouraud estériles, con los cuales se procedió a realizar un frotis en 25cm<sup>2</sup> de la mesa central de trabajo del área (esta es en la cual se realiza la totalidad de las actividades diarias). Seguidamente se procedió a introducir y suspender los hisopos en el tubo con el medio de cultivo los cuales fueron transportados al laboratorio de calidad y procesados inmediatamente. Para ello se inoculó por duplicado medio de cultivo sólido PDA previamente rotulado e incubado a 25°C por tres días.



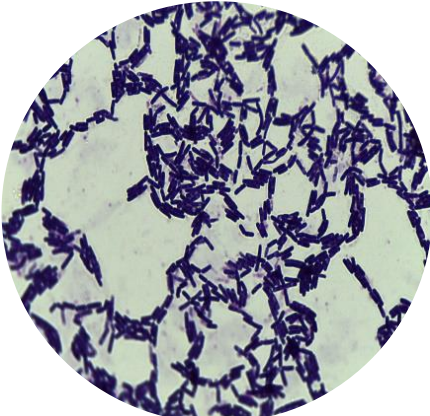
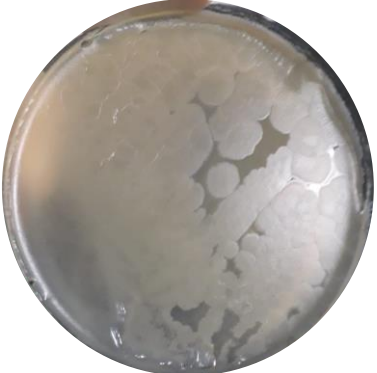
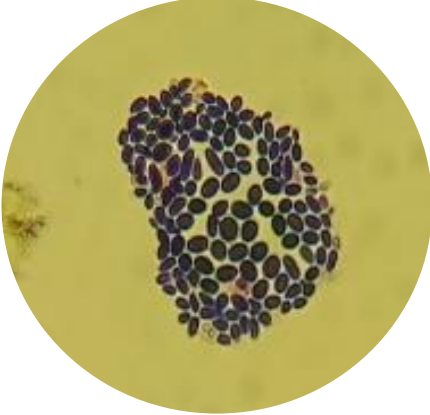
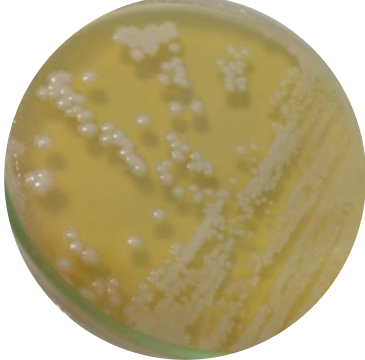
## 8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN






### 8.1 ACTIVIDADES ESPECÍFICAS

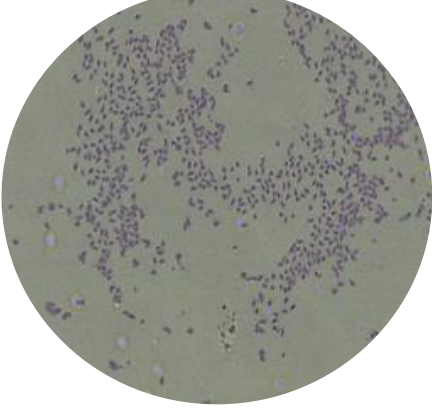
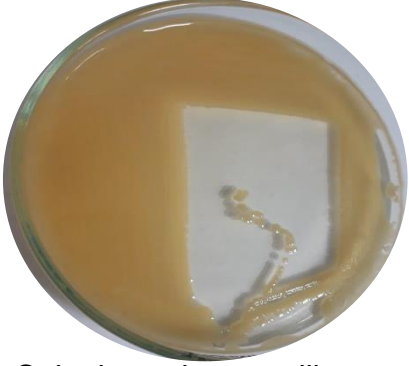



Dentro del banco de cepas del laboratorio de Bioinsumos de la Organización Pajonales SAS se cuenta con diversidad microbiológica que engloban bacterias, hongos y levaduras, los cuales exhiben potencial enzimático sumado a la eficiencia en el control de fitopatógenos en el campo. Su descripción macroscópica y microscópica fue verificada en el presente estudio de acuerdo con lo consignado en formato FR-BIN-038 de manejo interno y los resultados fueron consignados en la tabla 1.

**Tabla 1. Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas microbianas presentes en el cepario División de Bioinsumos, Organización PAJONALES SAS**

<u>Microorganismo</u>	<u>Observación Microscópica</u>	<u>Descripción Macroscópica</u>
<i>Bacillus</i> sp.OP1	 <p>Microscopio óptico, tinción Gram, Objetivo 100X</p> <p><b>Descripción:</b> Bacilo Gram positivo que forma pequeñas cadenas</p>	 <p>Colonias blanco opaco, planas, de forma irregular con bordes ondulados.</p>
<i>Bacillus</i> sp. OP2		

	 <p>Microscopio óptico, tinción Gram, Objetivo 100X  <b>Descripción:</b> Bacilo Gram positivo</p>	 <p>Colonias grandes blanco opaco, planas, de forma irregular con bordes lobulados.</p>
<p><i>Lactobacillus</i> sp.OP3</p>	 <p>Microscopio óptico, tinción Gram, Objetivo 100X  <b>Descripción:</b> Bacilo Gram positivo</p>	 <p>Colonias medianas de color blanco, lisas, borde redondeado,</p>
<p><i>Saccharomyces</i> sp.OP4</p>	 <p>Microscopio óptico, tinción con Fucsina ácida, Objetivo 40 X  <b>Descripción:</b> Células diferenciadas de forma redondeada y/o ovaladas</p>	 <p>Colonias circulares, convexas color blanco crema, con bordes redondeados</p>

<p><i>Metarhizium</i> sp.OP5</p>	 <p>Microscopio óptico, tinción azul de lactofenol, Objetivo 40 X</p> <p><b>Descripción:</b> Conidios verdosos en cadena, conidióforo señalado (Flecha roja) con tres ramificaciones.</p>	 <p>- <b>Anverso:</b> Colonias con micelio blanco – amarillo verdoso de textura algodonosa</p>  <p>- <b>Reverso:</b> Coloración amarillo pálido</p>
<p><i>Trichoderma</i> sp.OP6</p>	 <p>Microscopio óptico, tinción azul de lactofenol, Objetivo 40 X</p> <p><b>Descripción:</b> Micelio septado, ramificado, conidios ovoides unicelulares, conidióforo (Flecha roja) hialino no verticilado, fiálides singulares.</p>	 <p>-<b>Anverso:</b> Micelio color blanco con verde de textura aterciopelada</p> <p>-<b>Reverso:</b> Color blanco</p>

<p><i>Azotobacter</i> sp. OP7</p>	 <p>Microscopio óptico, tinción Gram, Objetivo 100X <b>Descripción:</b> Células de forma ovalada Gram negativas</p>	 <p>Colonias color amarillas en agar nutritivo, de aspecto lisas y puntiformes</p>
<p><i>Lecanicillium</i> sp. OP8</p>	 <p>Microscopio convencional, tinción azul de lactofenol, Objetivo 40 X <b>Descripción:</b> Micelio septado, delgado y hialino, conidióforos verticilados con fiálides en forma de punzón, conidios elipsoidales (Flecha roja).</p>	 <p><b>-Anverso:</b> Micelio color blanco de textura aterciopelada</p>  <p><b>-Reverso:</b> Color blanco</p>

Las observaciones y características evidenciadas se ajustan a las fichas técnicas conservadas para cada cepa microbiana presente en el banco de cepas del laboratorio, ya sea por adquisición certificada ATCC – American Type Culture Collection (*Bacillus* sp.OP1, *Lactobacillus* sp.OP3, *Metarhizium* sp.OP5, *Azotobacter* sp. OP7, *Lecanicillium* sp. OP8) o por aislamientos nativos caracterizados molecularmente (*Saccharomyces* sp.OP4, *Trichoderma* sp.OP6).



La caracterización bioquímica en este caso permitió establecer particularidades metabólicas de las cepas bacterianas de estudio (*Bacillus* sp.OP1, *Bacillus* sp. OP2, *Lactobacillus* sp.OP3 y *Azotobacter* sp. OP7). Una de las cuales emplea un método rápido es la detección de catalasa puesto que su reacción está dada en un corto tiempo ya que se evalúa la presencia de la enzima sintetizada por el microorganismo a evaluar, en este caso todas las especies bacterianas arrojaron resultado positivo (tabla 2) indicando la capacidad de catalizar el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno gaseoso que es liberado en forma de burbujas. Por su parte la aplicación de pruebas como TSI (Triple Sugar Iron), Citrato Urea y Sim (Sulfide Indole Motility) permiten determinar la capacidad que poseen las bacterias para emplear en su crecimiento glucosa, lactosa y sacarosa, el uso de citrato como única fuente de carbono, la eficiencia para desdoblar la urea formando moléculas de amoníaco por la actividad de la enzima ureasa (Cercenado & Cantón, 2010). Finalmente permite detectar la presencia de indol mediante la presencia de la enzima triptofanasa, motilidad por estar provistas de flagelos, sumado a la observación directa de la producción de ácido sulfhídrico (oscurecimiento del medio).

Para el caso del presente estudio, el azúcar fermentable más empleado fue la glucosa (tabla 2), ya que metabolizado por las cuatro cepas bacterianas de ensayo *Bacillus* sp.OP1, *Bacillus* sp OP2, *Lactobacillus* sp.OP3 y *Azotobacter* sp. OP7 a excepción de la cepa *Lactobacillus* sp.OP3 la cual posee la capacidad de fermentar glucosa, sacarosa y lactosa presente en el medio. Caso similar ocurre con la cepa *Azotobacter* sp. OP7 que muestra capacidad de emplear la ureasa presente en su metabolismo para actuar sobre la urea y *Bacillus* sp OP2 que logra emplear el citrato como única fuente de carbono, así como compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio empleado.

**Tabla 2. Resultados pruebas de identificación bioquímica cepas bacterianas presentes en el cepario División de Bioinsumos, Organización PAJONALES SAS**

<b>Cepa Microbiana</b>	<b>TSI</b>	<b>Urea</b>	<b>Citrato</b>	<b>Sim</b>	<b>Catalasa</b>
<i>Bacillus</i> sp.OP1	K/A H <sub>2</sub> S (-)	Negativo	Negativo	Motilidad Indol (-)	Positivo
<i>Bacillus</i> sp OP2	K/A H <sub>2</sub> S (-)	Negativo	Positivo	Motilidad Indol (-)	Positivo
<i>Lactobacillus</i> sp.OP3	A/A H <sub>2</sub> S (-)	Negativo	Negativo	Negativo Indol (-)	Positivo
<i>Azotobacter</i> sp. OP7	K/A H <sub>2</sub> S (-)	Positivo	Negativo	Motilidad Indol (-)	Positivo

En cuanto a la capacidad fisiológica de las cepas microbianas se demuestra una capacidad de crecimiento en medios ácidos de las cepas fúngicas (tabla 3) siendo esta una característica ampliamente reconocida en estos. Por su parte las cepas bacterianas *Bacillus* sp.OP1, *Bacillus* sp. OP2 y *Azotobacter* sp. OP7 presentan crecimiento en medios neutros, mientras que *Lactobacillus* sp.OP3 exhibe capacidad de crecer en pH bajos o ácidos siendo esto una cualidad muy representativa de este género pues se emplean comúnmente en procesos fermentativos

**Tabla 3. Resultados estabilidad fisiología (pH) de cepas microbianas presentes en el cepario División de Bioinsumos, Organización PAJONALES SAS**

Cepa Microbiana	pH			
	2	4	7	9
<i>Bacillus</i> sp.OP1	-	-	+	+
<i>Bacillus</i> sp. OP2	-	-	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp.OP3	-	+	+	+
<i>Saccharomyces</i> sp.OP4	-	+	+	+
<i>Metarhizium</i> sp.OP5	-	+	+	+
<i>Trichoderma</i> sp.OP6	-	+	+	+
<i>Azotobacter</i> sp. OP7	-	-	+	+
<i>Lecanicillium</i> sp. OP8	-	+	+	+

Con respecto a la temperatura, la presencia de crecimiento visible sobre los medios de cultivo se obtuvo entre 25°C y 37°C (tabla 4), lo cual indica que ninguna de las cepas microbianas de ensayo presenta aptitudes psicrófilas y/o termófilas, siendo esta última de mayor interés, teniendo en cuenta las etapas en las que se desarrolla el proceso de compostaje y la búsqueda de emplearlos en un inóculo acelerante de éste.

**Tabla 4. Resultados estabilidad fisiología (Temperatura) de cepas microbianas presentes en el cepario División de Bioinsumos, Organización PAJONALES SAS**

Cepa Microbiana	Temperatura °C			
	4	25	37	55
<i>Bacillus</i> sp.OP1	-	+	+	-
<i>Bacillus</i> sp. OP2	-	+	+	-
<i>Lactobacillus</i> sp.OP3	-	+	+	-
<i>Saccharomyces</i> sp.OP4	-	+	+	-
<i>Metarhizium</i> sp.OP5	-	+	+	-



<i>Trichoderma</i> sp.OP6	-	+	+	-
<i>Azotobacter</i> sp. OP7	-	+	+	-
<i>Lecanicillium</i> sp. OP8	-	+	+	-

Finalmente, la evaluación enzimática con respecto a producción en el medio extracelular “exoenzimas” se tuvo en cuenta las enzimas más ampliamente empleadas en la industria biotecnológica como es el caso de las amilasas, proteasas, lipasas y celulasas. Siendo estas primeras empleadas para la degradación de carbohidratos complejos, por su parte las proteasas catalizan restos de complejos proteicos y las lipasas son capaces de degradar restos de grasas (Rendueles & Díaz, 2014). Para esta investigación, la enzima que mayor relevancia presentaban son las celulasas, ya que la acción secuencial para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica una acción sinérgica de un grupo de celulasas que presentan actividad en distintos enlaces dentro de compleja molécula de celulosa, dentro de las cuales se encuentra la endo- $\beta$ -1,4-glucanasas, que realiza una escisión aleatoria de los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 específicamente en las áreas internas (amorfas) de la molécula; por su parte las exo- $\beta$ -1,4-glucanasa realizan la eliminación de subunidades en los extremos reductores y no reductores de la cadena de celulosa por ende se da la formación de cadenas poliméricas más cortas. Finalmente, las exo- $\beta$ -1,4- glucanasas y  $\beta$ -glucosidasas realizan la degradación de la celobiosa; de manera general el efecto final es la formación de monómeros de glucosa a partir de la degradación de la celulosa (Szentner et al, 2019).

Este interés central se encuentra asociado en apartados anteriormente expuestos, donde el sustrato sobre el cual se requiere efectuar una biotransformación es rico principalmente en celulosa.

**Tabla 5. Resultados prueba de producción enzimática empleando medios modificados de cepas microbianas presentes en el cepario División de Bioinsumos, Organización PAJONALES SAS**

Microorganismo	Medio Modificado				
	Amilolítico	Proteolítico	Lipolítico	Celulolítico (tamo de arroz)	Celulolítico (aserrín)
<i>Bacillus</i> sp.OP1	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Bacillus</i> sp. OP2	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Lactobacillus</i> sp.OP3	Negativo	Negativo	Positivo	No crecimiento	Negativo

<i>Saccharomyces</i> sp.OP4	Negativo	No Crecimiento	Negativo	No crecimiento	Negativo
<i>Metarhizium</i> sp.OP5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No Crecimiento
<i>Trichoderma</i> sp.OP6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No Crecimiento
<i>Azotobacter</i> sp. OP7	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
<i>Lecanicillium</i> sp. OP8	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

Para este caso (tabla 5) ninguna de las cepas microbianas en experimentación presento actividad celulolítica, sobre los medios modificados empleados, los cuales por su naturaleza (tamo de arroz y aserrín) son residuos vegetales constituidos por celulosa y lignina; la presencia de halos de aclaramiento alrededor del crecimiento sería indicativo de actividad celulolítica sobre el sustrato empleado. Esto evidencia, que a pesar de que la celulosa sea el carbohidrato más abundante en la biomasa vegetal no es fácilmente degradable debido a la complejidad de su estructura en su forma nativa, constituido por una cadena lineal de subunidades de glucosa unidas con enlaces  $\beta$ - 1,4 glicosídicos, lo cual lo configura como una fuente carbonada limitada para los microorganismos que no poseen la capacidad de hidrolizar estos enlaces. Por ello la fácil hidrólisis enzimática de la celulosa se ve fuertemente influenciada por la estructura natural de los sustratos celulósicos ya que mayoritariamente, la celulosa esta asociada a hemicelulosas y lignina lo cual permite la conformación capilar, un ordenamiento molecular versátil y fuerte cristalinidad, de allí que sea necesario un pretratamiento de los sustratos lignocelulósicos como un paso obligatorio para una hidrólisis enzimática óptima, esto con el fin de aumentar la accesibilidad a la molécula de celulosa. A pesar de que las celulasas son producidas por una amplia variedad de bacterias y hongos, son muy pocos los microorganismos capaces de producir las enzimas requeridas para degradar la celulosa cristalina, como lo son especies de *Clostridium* sp y hongos filamentosos, siendo estos últimos los más empleados industrialmente debido a sus diversos y eficientes sistemas celulolíticos capaces de romper compuestos celulósicos en la naturaleza, además de poseer ventajas adaptativas (Ferrer et al, 2011) (Binayak et al, 2019).

Dentro de las especies fúngicas celulolíticas más estudiadas se encuentran los géneros de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora* y *Trichiderma*. Este último es considerado uno de los mejores productores de enzimas celulolíticas como es el caso de la especie *Trichoderma reesei* (*viridae*), capaz de sintetizar secuencialmente diferentes enzimas celulolíticas incluidas las

endoglucanasas, exoglucanasas y glucosidasas. Dentro de su genoma se han revelado al menos 200 genes codificantes de glucósidos hidrolasas (GH) y 17 de ellos han sido determinados bioquímicamente para codificar celulasas funcionales, incluidas ocho endoglucanasas (EG), dos celobiohidrolasas (CBH) y siete  $\beta$ -glucosidasas (BGL), que actúan sinérgicamente para finalmente degradar la celulosa en glucosa. Su accionar consisten en que las EG hidrolizan aleatoriamente las cadenas de celulosa en las regiones amorfas internas, generando extremos para que los CBH ataquen progresivamente para liberar celobiosa, que BGLs hidroliza aún más hasta moléculas de glucosa; dentro del complejo enzimático, *T. reesei* posee cuatro celulasas principales, CBHI (Cel7A), CBHII (Cel6A), EGI (Cel7B) y EGII (Cel5A), siendo EGI quien posee una amplia especificidad de sustrato que ocasiona la liberación de extremos reductores hidrolizando celulosa amorfa, hidroxietilcelulosa y carboximetilcelulosa, así como xilanos (Qing et al, 2018)

Por otra parte, es importante destacar que no todos los aislamientos microbianos productores de enzimas extracelulares son capaces de degradar *in vitro* la celulosa insoluble, por ello se hace imprescindible buscar productores enzimáticos de celulasas en ambientes naturales, así como también de optimizar las condiciones de cultivo para potenciar la producción enzimática.

Finalmente, y debido a la ausencia de actividad celulolítica *in vitro* de las cepas microbianas de ensayo en el presente estudio, no se instauró la prueba de antagonismo microbiano ya que el fin de esta era establecer la interacción entre las cepas microbianas seleccionadas como posible inóculo acelerante del proceso de compostaje de subproductos de palma aceitera.

## 8.2 ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS LABORATORIO DE CALIDAD

- **Asistencia en revisión documental:** Se realizó apoyo en cuanto a la revisión y ajuste a documentación interna concerniente a protocolos de ensayos en campo de productos biológicos elaborados en dichas instalaciones y a los cuales se requiere llevar seguimiento documental, según lo establecido en la resolución 0698 del 2011 proferida por el Instituto Colombiano de Agricultura. En visita realizada por personal ICA en las instalaciones se plantearon no conformidades en cuanto a gestión documental, por lo cual fue preciso ajustar los protocolos de eficiencia de los productos en trámite de registro con el fin de homogenizar los lineamientos en todos los bioinsumos elaborados. Para ello se tuvieron como referentes las Normas técnicas colombianas (NTC) específicamente la 4422-2/2017 la cual habla de los requisitos que deben cumplir los agentes biológicos empleados para el manejo y control de plagas y enfermedades, así como los métodos de ensayo a que deben someterse.

De igual forma el laboratorio esta armonizado según lo estipulado en la NTC 4422-1/2012 que contempla los requisitos para la producción, el empaque y almacenamiento de agentes biológicos, la NTC 4612/2018 que establece los requisitos para el etiquetado de los envases y embalajes destinados para contener productos elaborados con base en agentes biológicos y la NTC 5842 la cual establece los requisitos de los inoculantes biológicos y métodos de ensayo empleados en el control de calidad de dichos productos agrícolas.

- **Prueba de antagonismo cepas microbianas:** Transcurrido este periodo se evidencia crecimiento de cada una de las cepas evaluadas siendo este resultado repetitivo en las réplicas efectuadas (imagen 1); la ausencia de halos inhibitorios o no crecimiento en los pocillos y/o áreas circundantes entre los diferentes microorganismos permite denominar esta prueba como negativa para antagonismo, ya que la visualización de crecimiento colonial en formas no radiales puede estar asociado a la producción de metabolitos secundarios que pueden ser volátiles o difusibles pueden inhibir así como restringir el crecimiento microbiano de las cepas presentes en el medio sin entrar en contacto físico (Villamil et al. 2012).

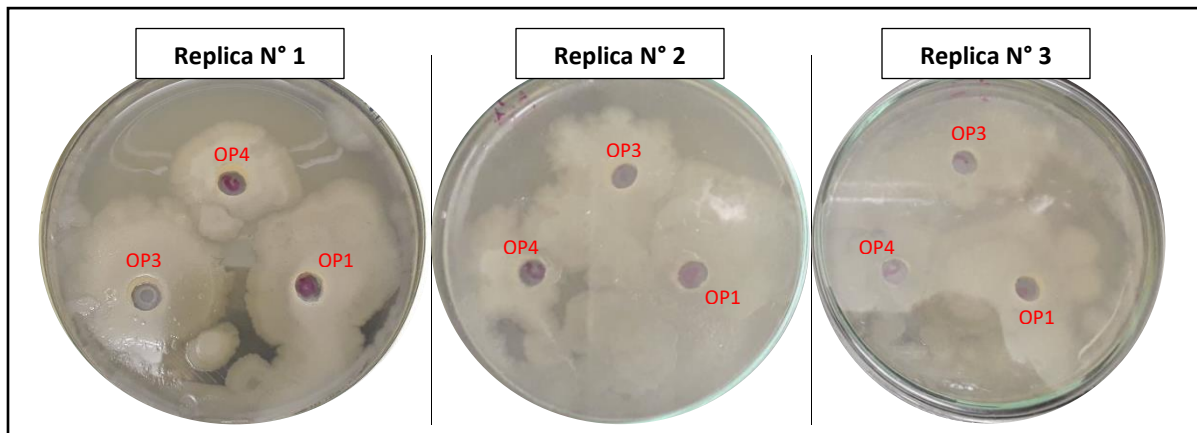
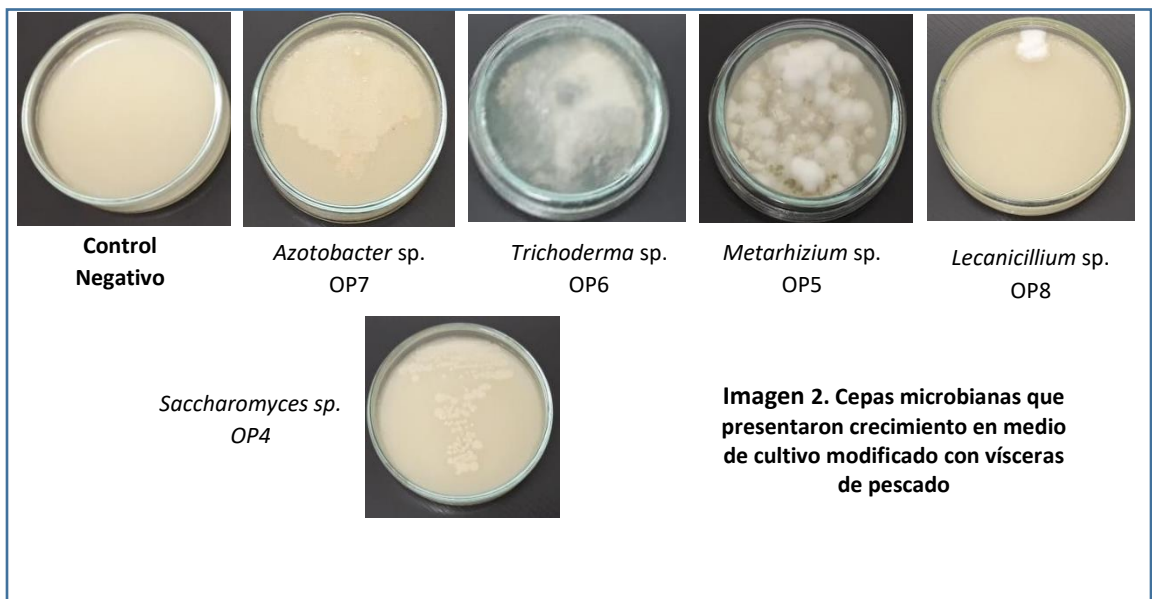


Imagen 1. Prueba de actividad antagonista microbiana. Cepas de ensayo *Bacillus* sp.OP1, *Lactobacillus* sp.OP3 y *Saccharomyces* sp.OP4

- **Ensayo de crecimiento microbiano en medio modificado con vísceras de pescado (Área de piscicultura):** Transcurrido el periodo de incubación se tomaron como positivas las cepas microbianas que presentaron crecimiento visible sobre el medio sólido modificado (imagen 2), esto asociado a que la capacidad de multiplicación de un microorganismo, (cepas microbianas de ensayo) sobre un medio de cultivo está determinada por la presencia de sustancias necesarias para la generación de energía y biosíntesis celular (macronutrientes y micronutrientes).El empleo de medios de cultivo ya sean preparaciones sólidas, semisólidas o líquidas,

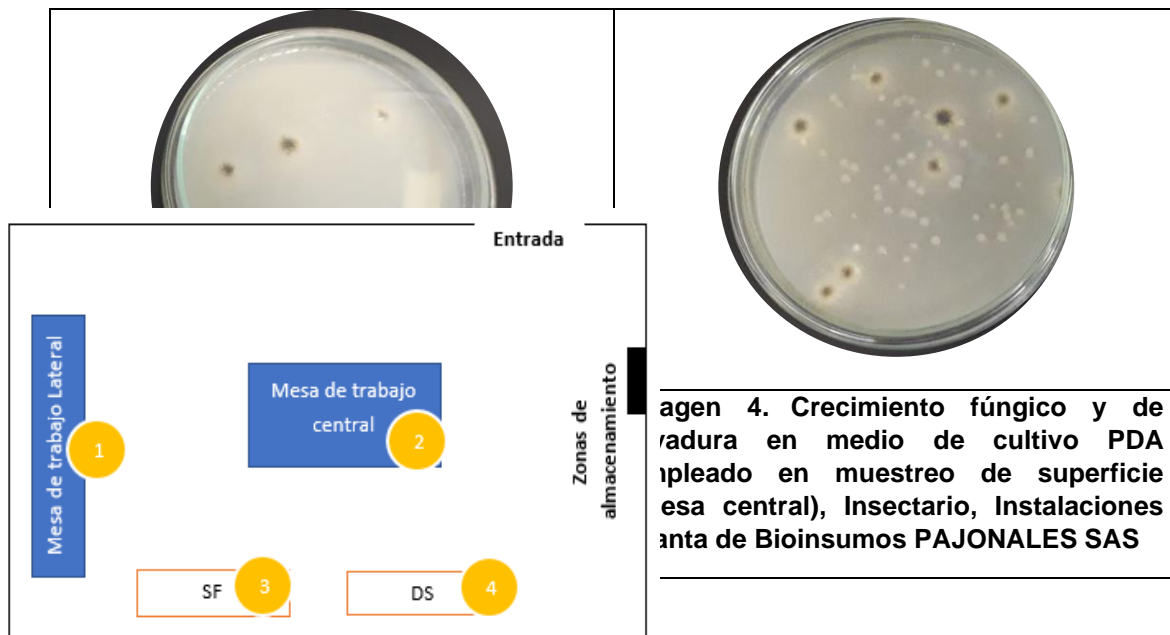
constituyen el micromundo de los microorganismos bajo condiciones de laboratorio, intentando ser un reflejo de un hábitat natural, por ello el uso de medios modificados como el empleado en el presente ítem busca determinar si posee cualidades necesarias para las exigencias metabólicas microbianas cuya respuesta estará dada con la multiplicación del mismo (Nápoles et al. 2006). Dichas cepas microbianas que presentaron crecimiento visible sobre el medio sólido fueron seleccionadas para análisis posteriores.



- **Reactivación de cepa microbiana:** Finalizado el periodo de incubación se procedió a realizar una verificación del crecimiento pudiéndose evidenciar una lentitud en la colonización del medio, lo cual es característico en esta cepa microbiana, haciéndose extensivo en 3 días más el periodo de incubación el fin de poder establecer plenamente la caracterización macroscópica y microscópica. Luego de transcurrido el periodo extra de incubación se evidencia un crecimiento inicialmente blanco, pero cuando avanza su crecimiento se torna a color rosado claro con textura es algodonosa. La observación microscópica se realizó posteriormente por parte del personal de Calidad, laboratorio de Bioinsumos, dilucidando que la cepa reactivada corresponde a *Paecilomyces* sp. OP9.
- **Caracterización cepa microbiana e introducción a la conservación:** Finalizado el tiempo de incubación se procedió a realizar una revisión de crecimiento evidenciándose colonias con micelio color blanco y textura aterciopelada y presencia de hifas septadas, delgadas y hialinas,

conidióforos verticilados con fiáldes en forma de punzón bajo microscopia empleando el colorante azul de lactofenol. Esta información coincide con lo reportado en la literatura científica con respecto al género microbiano *Lecanicillium* sp. el cual finalmente se procedió a conservar en crioperlas siguiendo la metodología recomendada por el fabricante.

- **Aplicación de muestreo ambiental y de superficie:** Finalizado el periodo de incubación se evidencia crecimiento en los medios de cultivo con agar PDA colocados en los cuatro puntos de muestreo ambiental (fig.8).



agen 4. Crecimiento fúngico y de radura en medio de cultivo PDA (empleado en muestreo de superficie esa central), Insectario, Instalaciones anta de Bioinsumos PAJONALES SAS

**Figura 8. Esquema, puntos (amarillo) de muestreo ambiental por sedimentación aplicado en área del cuarto Insectario, Planta de Bioinsumos, Organización PAJONALES SAS, Ambalema-Tolima**

SF: Estante de mantenimiento y conservación de *Spodoptera frugiperda*.  
 DS: Estante de mantenimiento y conservación de *Diatraea saccharalis*.

Observación similar se obtuvo en el muestreo de superficie siendo particular el crecimiento fúngico sobre el medio (Imagen 3 y 4); de igual forma dicho crecimiento es idéntico al que se evidenciaba sobre los insumos susceptibles a la contaminación, como lo es el sustrato alimentario proporcionado a los insectos conservados.

A partir del crecimiento fúngico del contaminante sobre trozo de alimento se realizó un montaje empleando azul de lactofenol y observándose mediante microscopio de luz, pudiéndose concluir que el contaminante es *Aspergillus niger* basados en la observación macroscópica donde se presenta



crecimiento inicialmente blanco amarillento cubriéndose paulatinamente de color negro y microscópicamente empleando método de cinta engomada (Imagen 5).

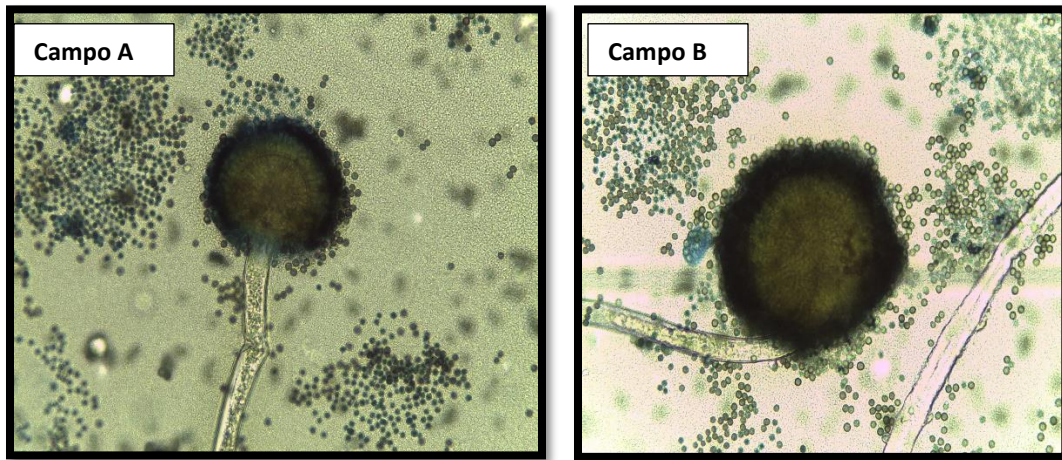


Imagen 5. Microscopia de crecimiento fúngico presente en trozo de alimento para el mantenimiento de *Spodoptera frugiperda*. Montaje en azul de lactofenol, Objetivo 40X. Microscopio de luz. Cabezas conidiales biseriadas y radiales, estipes de paredes gruesas, lisos y hialinas, Vesícula casi esférica, métulas ocupando toda la superficie de esta.

Finalmente se procede al recuento del crecimiento presente en los medios de cultivo empleados estableciéndose que: Informe muestreo Ambiental **6 UFC / 20 min** e Informe muestreo Superficie **115 UFC / 25 cm<sup>2</sup>**.

Esta observación macroscópica y descripción microscópica concuerda con lo obtenido por Villalba et al (2018) donde se aisló un hongo en suelo con actividad minera, el cual presentó crecimiento *in vitro* de micelio blanco – amarillento que posteriormente se vuelve negro, microscópicamente observaron conidióforos lisos de color café claro y conidios o esporas globosas; concluyéndose que la cepa fúngica corresponde a *Aspergillus niger*. Su presencia en ambientes y superficies se ha documentado, como el caso de Gonzales et al (2010) donde obtuvieron 14 aislamientos de *A. Niger* mediante método de hisopado en superficies presentes en planta procesadora de alimentos; su principal importancia o interés biológico es su capacidad de producir micotoxinas por lo cual su incidencia debe ser monitoreada y controlada.

## 9 CONCLUSIONES

- Se logró confirmar mediante observaciones macroscópicas, microscópicas y bioquímicas la pureza de las cepas microbianas presentes en el laboratorio de Bioinsumos Organización Pajonales SAS empleadas en el presente estudio, a su vez su identificación total hasta ESPECIE queda bajo reserva de la empresa y por ende no se permite su publicación en este trabajo.
- Las cepas microbianas de estudio presentan características mesófilas en función del rango de temperatura de crecimiento, por ende, no serían viables en procesos termófilos prolongados como el compostaje si se considera como inóculo inicial.
- Las cepas bacterianas del género *Bacillus* sp.OP1, *Bacillus* sp. OP2, *Lactobacillus* sp. OP3 y *Azotobacter* sp. OP7 exhiben capacidad de producción de lipasas, siendo esta actividad de interés en la presente investigación debido a la naturaleza primaria del sustrato (Racimo de palma aceitera).
- Finalmente, las cepas microbianas evaluadas no presentan preliminarmente un perfil ideal (producción de lipasas y celulasas) para ser empleadas como posible acelerante bajo formulación experimental en el proceso de compostaje de residuos agroindustriales de palma aceitera

## 10 RECOMENDACIONES

- Se sugiere repetir el experimental de producción enzimático, empleando para ello un compuesto orgánico CMC (Carboximetilcelulosa) con el fin de corroborar completamente la ausencia de actividad celulolítica por parte de los microorganismos empleados en este ensayo.
- Realizar aislamiento de microorganismos autóctonos o nativos con actividad celulolítica presentes en el suelo o en el mismo sustrato antes de ingresar a la etapa de esterilización – Proceso de beneficio.
- Ejecutar experimentación empleando métodos ya demostrados en la literatura que conlleven al manejo de esta materia orgánica hasta la



obtención de un sustrato estabilizado (Compost) realizando ajustes o modificaciones si así se requiere.

## 11 BIBLIOGRAFIA

Abdul Khalil, H.P.S; Chaturbhuj, K; Saurabh, Mustapha Asniza; Ying, Y; Tye Mohammad, R; Nurul, Fazita; Muhammad, I; Syakir, Hashim, M; Fizree Abdul, Fatah I; Yusra Mohamad, Kassim M; Haafiz, Mohd A & Kassim, Noorul Linda, M (2017). Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites. Chapter 1. Nanofibrillated cellulose reinforcement in thermoset polymer composites. *In Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering*.1-24, ISBN 9780081009574. Recuperado en enero 05 del 2020 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081009574000012>

Alvarez – Cervantes,J; Sanchez, C; Diaz, R & Diaz G (2016) Caracterización de la producción de lacasas, celulasas y xilanasas de *Pleurotus ostreatus* cultivado en fermentación sólida utilizado un soporte inerte. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 15(2): 323-331. Recuperado en Enero 24 del 2020 de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62046829003>

Arango, S; Montoya, J & Vasquez, Y (2016). Análisis fisicoquímico y microbiológico del proceso de co-compostaje a partir de biomasa de leguminosa y ruminaza. *Revista colombiana de ciencias hortícolas*. 10(2): 345-354. Recuperado en enero 29 del 2020 de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v10n2/v10n2a15.pdf>

Artzi, Lior; Bayer Edward A & Sarah Morais (2016). Cellulosomes: bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides. *Microbiology*. 15(2):83-95. Recuperado en enero 28 del 2020 de <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.164>

Baharuddin, A; Wikisaka, M; Shirali, Y & Abd-aziz S (2009). Co-composting of empty Fruit bunches and partially treated palm oil mill effluents in pilot scale. *International Journal of agricultural research*.4(2):69-78. ISSN 1816-4897. Recuperado en Enero 10 del 2020 de <http://docsdrive.com/pdfs/academicjournals/ijar/2009/69-78.pdf>

Ballesteros, M; Hernandez, M; Rosa, I; Mañon, M & Carreño, M (2018). Crecimiento microbiano en pilas de compostaje de residuos orgánicos y biosólidos después de la aireación. *Revista Centro Azúcar*. 45(1),1-10. ISSN: 2223-4861. Recuperado en Noviembre 14 del 2019 de <http://scielo.sld.cu/pdf/caz/v45n1/caz01118.pdf>

Binayak Raj, Pandey; Sanjaya, Ghimire; Shakep, Bhattarai; Eileen, Shrestha; Pratiksha, Thapa & Bhupal Govinda, Shrestha, (2019). Isolation, growth, enzyme assay and identification via 16S rRNA full sequencing of cellulolytic microbes from Nepal for biofuel production. *Renewable Energy*. 132: 515-526. ISSN 0960-1481. Recuperado en enero 27 del 2020 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148118309170>

Bing, Zang; Shuyan, Li; Frederick, Michel; Guoxue, Li; Yuan, Luo; Difang, Zhang & Yangyang, Li (2016) Effects of mix ratio, moisture content and aeration rate on sulfur odor emissions during pig manure composting. *Waste Management*. 56 (498-505). ISSN 0956-053X. Recuperado en Enero 07 del 2020 de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X16303312>

Bueno, P; Diaz, M & Cabrera, F (2008). Factores que afectan al proceso de compostaje. En Moreno Casco, J & Moral Herrero, R (Eds), *Compostaje* (93-110). Barcelona: Ediciones multiprensa. Recuperado en Enero 25 del 2020 de [https://books.google.com.co/books/about/Compostaje.html?id=IWYJAQAAQBAJ&printsec=frontcover&source=kp\\_read\\_button&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.co/books/about/Compostaje.html?id=IWYJAQAAQBAJ&printsec=frontcover&source=kp_read_button&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

Campos, R; Brenes, L & Jiménez M (2016). Evaluación técnica de dos métodos de compostaje para el tratamiento de residuos sólidos biodegradables domiciliarios y su uso en huertas caseras. *Tecnología en Marcha*. 29(5):25-32. ISSN 0379-3982. Recuperado en Diciembre 05 de <https://dx.doi.org/10.18845/tm.v29i8.2982>

Castañeda, T & Romero H. (2012). Compostaje de subproductos de la agroindustria de palma de aceite en Colombia: estado del arte y perspectivas de investigación. *Centro de Investigación en Palma de Aceite – Cenipalma*. N° 31, 7. Recuperado Diciembre 04 del 2019 de <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/1333>

CENIPALMA, Centro de Investigaciones en palma de aceite. (2012). Compostaje de subproductos de la agroindustria de palma de aceite en Colombia: estado del arte y perspectivas de investigación. N° 31,11-33. Recuperado Diciembre 04 del 2019 de <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/boletines/issue/view/1087>

Cercenado, E & Cantón, F (2010). Procedimientos en Microbiología Clínica, Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. ISBN-978-84-614-7932-0. Recuperado en Noviembre 14 de 2019 de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

Chang-Jun, Liu (2012). Deciphering the Enigma of Lignification: Precursor Transport, Oxidation, and the Topochemistry of Lignin Assembly. *Molecular Plant*, 5 (2), 304 – 317 Recuperado en Enero 25 de 2020 de [https://www.cell.com/molecular-plant/fulltext/S1674-2052\(14\)60120-9?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1674205214601209%3Fshowall%3Dtrue#](https://www.cell.com/molecular-plant/fulltext/S1674-2052(14)60120-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1674205214601209%3Fshowall%3Dtrue#)

Diaz, L; Bertoldi, M; Bidlingmaier, W & Stentiford E. (2007). Compost Science and Technology. Chapter 4 Factors that affect the process. *Imprint: Elsevier Science Published*. 8(1). ISBN: 9780080545981 Page Count: 380. Recuperado en Enero 07 del 2020 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1478748207800078>

Escobar, N; Delgado, J & Romero N. (2012). Identificación de poblaciones microbianas en compost de residuos orgánicos de fincas cafeteras de Cundinamarca. *bol.cient.mus.hist.nat.* 16 (1): 75 – 88. ISSN 0123 – 3068. Recuperado en Diciembre 19 del 2019 de <http://www.scielo.org.co/pdf/bccm/v16n1/v16n1a06.pdf>

Fedepalma, Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite. (2018). El palmicultor. Edición Agosto. No. 558. Recueperado en Enero 05 de 2020 de [https://web.fedepalma.org/sites/default/files/files/Fedepalma/semanario-palmero/publicaciones/8\\_Palmicultor\\_Agosto\\_2018.pdf](https://web.fedepalma.org/sites/default/files/files/Fedepalma/semanario-palmero/publicaciones/8_Palmicultor_Agosto_2018.pdf)

Ferrer-Marcelo, Yoandy; León-Rodríguez, Marta; Michelena-Álvarez, Georgina; Dustet-Mendoza, Julio César; Duque-Ortiz, Arianna; Ibañez-Fuentes, My-Lai; Tortoló-Cabañas, Keyla (2011). Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales. *ICIDCA*. 45(1):3-12. ISSN 0138-6204. Recuperado en enero 27 del 2020 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223122251001>

González-Díaz, Javier Mauricio & Medina, María Alejandra. (2014). Diseño y evaluación del compostaje como alternativa para el tratamiento de residuos de aditivos en la construcción. *Producción + Limpia*, 9(1), 44-62. Recuperado en Diciembre 13 del 2019 de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1909-04552014000100004&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-04552014000100004&lng=en&tlng=es).

González, L; Manrique, M; Montilla, P; Rojas, T; Perelli, A & Calzolaio, V (2010). Identificación de flora fúngica en una empresa procesadora de alimentos del estado Carabobo. *Kasmera*, 38(1), 45-52. Recuperado en Diciembre 07 del 2019 de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0075-52222010000100005&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222010000100005&lng=es&tlng=es)

Hemidat, S., Jaar, M., Nassour, A., & Nelles, M. (2018). Monitoring of Composting Process Parameters: A Case Study in Jordan. *Waste and Biomass Valorization*. 9, 2257–2274. DOI:10.1007/s12649-018-0197-x. Recuperado en Enero 05 del 2020 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-018-0197-x>

Insam, H; Franke-Whittle, I & Goberna, M. (Eds.). (2010). *Microbes at Work*. Springer Heidelberg Dordrecht London New York. ISBN: 978-3-642-04042-9. Recuperado en Enero 10 del 2020 de <https://www.springer.com/la/book/9783642040429>

Jiménez, R; Valdés, S; Olalde, V; Abraham, R & García J (2018). Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(2):256-275. Recuperado en Noviembre 17 del 2019 de <https://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1711-3>

Lagunes-Fortiz, E., & Zavaleta-Mejía, E. (2016). Función de la lignina en la interacción planta-nematodos endoparásitos sedentarios. *Revista mexicana de fitopatología*, 34(1), 43-63. Recuperado en diciembre 15 del 2019 de <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-mexicana-de-fitopatologia/articulo/funcion-de-la-lignina-en-la-interaccion-planta-nematodos-endoparasitos-sedentarios>

López- López, M; Masaguer Rodríguez, A; Paredes, C; Roca, L; Muñoz, M; Salas M & Boluda R (2015). Procesos de biotransformación de la materia orgánica. En Moreno, J; Moral, R; García-Morales, J & Pascual, (Eds). *De residuo a recurso, el camino a las sostenibilida*. (170). Ediciones Multiprensa. ISBN: 978-84-8476-707-7

Medina-Lara, M. Socorro; Quintero-Lizaola, Roberto; Espinosa-Victoria, David; Alarcón, Alejandro; Etchevers-Barra, Jorge; Trinidad-Santos, Antonio; Conde-Martínez, Víctor. (2018). Generación de un inoculante acelerador del compostaje. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(2), 206-210. Recuperado en diciembre 07 del 2019, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754117301050>

Mohd-Zainudin, Mohd; Hassan, Mohd; Tokura, Mitsunori; Shirai, Yoshihito. (2013). Indigenous cellulolytic and hemicellulolytic bacteria enhanced rapid co-composting of lignocellulose oil palm empty fruit bunch with palm oil mill effluent anaerobic sludge. *Bioresource technology*. 147. 632-635 DOI 10.1016/j.biortech.2013.08.061. Recuperado en Diciembre 26 del 2019 de <https://www.sciencedirect.com.unipamplona.basesdedatosezproxy.com/science/article/pii/S0960852413012911>

Morales-Maldonado, Emilio & Casanova-Lugo, Fernando (2015) Mezclas de Sustratos Orgánicos e Inorgánicos, Tamaño de Partícula y Proporción. *Agronomía mesoamericana*. 26(2): 365-372. ISSN 2215-3608 Recuperado en enero 29 de 2020 de [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1659-13212015000200365&script=sci\\_abstract&tlng=es](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1659-13212015000200365&script=sci_abstract&tlng=es)

Nápoles M, Martínez J, Costales D, Gómez G, Somers E. (2006). Efecto de diferentes medios de cultivo en la multiplicación celular de *Bradyrhizobium*

elkanii. *Cultivos Tropicales*. Vol. 27(1): 35-38. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193215885006.pdf>

Noor, Mohammad; Zahangir, Alam; Nassereldeen, A; Kabbashi, Amimul Ahsan (2012). Effective composting of oil palm industrial waste by filamentous fungi: A review, *Resources, Conservation and Recycling*, 58, 69-78, ISSN 0921-3449. Recuperado en Diciembre 10 del 2019 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921344911002205>

Oviedo-Ocaña, Edgar Ricardo, Marmolejo-Rebellon, Luis Fernando, & Torres-Lozada, Patricia. (2017). Avances en investigación sobre el compostaje de biorresiduos en municipios menores de países en desarrollo. Lecciones desde Colombia. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 18(1), 31-42. Recuperado en diciembre 23 de 2019, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-77432017000100031&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-77432017000100031&lng=es&tlng=es).

Pérez, R, Gonzalez T, Muñoz J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicum esculentum Mill*) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*. Vol 1(3): 53-60. ISSN: 2334-2501. Disponible en: <http://www.reibci.org/publicados/14/agosto/3300118.pdf>

Phitsuwan, Paripok; Morais, Sarah; Dassa, Bareket, Henrissat, Bernard & Bayer, Edward A. The Cellulosome Paradigm in An Extreme Alkaline Environment. *Microorganisms*. 7, 347; doi:10.3390/microorganisms7090347.

Qing-Shan Meng, Chen-Guang Liu, Xin-Qing Zhao, Feng-Wu Bai (2018). Engineering *Trichoderma reesei* Rut-C30 with the overexpression of *egl1* at the *ace1* locus to relieve repression on cellulase production and to adjust the ratio of cellulolytic enzymes for more efficient hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Journal of Biotechnology*. 285:56-63. ISSN 0168-1656. Recuperado en enero 27 del 2020 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816561830628X>

Ragauskas, AJ; Beckham, GT; Bidy, MJ, Chandra, R; Chen, F; Davis, MF; Davison, BH; Dixon, RA; Gilna, P; Keller, M; Langan, P; Naskar, AK; Saddler, JN; Tschaplinski, TJ; Tuskan, GA & Wyman, CE (2014). Lignin Valorization:

Improving Lignin Processing in the Biorefinery. *Science*. 344(6185): 1246843. Recuperado en enero 23 del 2020 de <https://science.sciencemag.org/content/344/6185/1246843.long>

Rendueles, M. & Díaz, M. (2014). "Biotecnología industrial". *Arbor*, 190 (768). Recuperado en enero 02 del 2020 de <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4009>

Rødde, Ruth; Einbu, Aslak & Varum, Kjell (2008). A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). *Carbohydrate Polymers*. 71: 388-393 Recuperado en enero 29 del 2020 de [https://www.researchgate.net/publication/223541195\\_A\\_seasonal\\_study\\_of\\_the\\_chemical\\_composition\\_and\\_chitin\\_quality\\_of\\_shrimp\\_shells\\_obtained\\_from\\_northern\\_shrimp\\_Pandalus\\_borealis](https://www.researchgate.net/publication/223541195_A_seasonal_study_of_the_chemical_composition_and_chitin_quality_of_shrimp_shells_obtained_from_northern_shrimp_Pandalus_borealis)

Sánchez, Óscar J; Ospina, Diego A & Montoya, Sandra (2017). Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste Management*. 69:136-153. ISSN 0956-053X. Recuperado enero 29 del 2020 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X17305846>

Siquiera, G; Bras, J & Dufresne, A (2010). Cellulosic Bionanocomposites: A Review of Preparation, Properties and Applications. *Polymers*. 2, 728-765. ISSN 2073-4360. Recuperado enero 27 del 2020 de [www.mdpi.com/journal/polymers](http://www.mdpi.com/journal/polymers)

Smårs, S; Gustafsson, L; Beck-Friis, B; Jönsson, H. (2002).Improvement of the composting time for household waste during an initial low pH phase by mesophilic temperature control. *Bioresource Technology*, 84(3) 237-241, ISSN 0960-8524, Recuperado en enero 02 del 2020 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852402000561>

Suhaimi, M & Ong, H. K (2001) Composting empty fruit bunches of oil palm. *Food & Fertilizer Technology*. Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI),505, 1-8. Recuperado en Enero 10 del 2020 de [http://www.fftc.agnet.org/htmlarea\\_file/library/20110804151206/eb505a.pdf](http://www.fftc.agnet.org/htmlarea_file/library/20110804151206/eb505a.pdf)



Szentner, Kinga; Waśkiewicz, Agnieszka; Kaźmierczak, Sandra; Wojciechowicz, Tatiana; Goliński, Piotr; Lewandowska, Elżbieta & Wasielewski, Oskar (2019). Enzymatic hydrolysis of cellulose using extracts from insects. *Carbohydrate Research*, 485,107811, ISSN 0008-6215, Recuperado en Enero 10 del 2020 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621519302204>

Thambirajah, J.J; Zulkali, M.D; Hashim, M.A (1995) Microbiological and biochemical changes during the composting of oil palm empty-fruit-bunches. Effect of nitrogen supplementation on the substrate, *Bioresource Technology*, 52(2) 133-144, ISSN 0960-8524. Recuperado en Enero 10 del 2020 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0960852495000083>

Valencia, M; Quevedo, B; Franco, M; Díez, H; Parra, C & Rodríguez M (2011). Evaluación de actividades enzimáticas de *Fusarium* spp., aislados de lesiones en humanos, animales y plantas. *Universitas Scientiarum*, 16(2), 147-159. Recuperado en Diciembre 21 de 2019 de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-74832011000200004&lng=en&tlng=](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832011000200004&lng=en&tlng=)

Villalba, A; Cruz, M & Azuara G (2018). *Aspergillus niger* Tiegh., aislado en Sonora, México: evaluación de tolerancia a metales. Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente, 24(2), 131-146. Recuperado en Diciembre 11 de 2019 de: <https://dx.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.03.023>

Villamil, J; Blanco, J & Viteri S (2012). Evaluación in vitro de Microorganismos Nativos por su Antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en Cacao (*Theobroma cacao* L.) Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín 65(1): 6305-6315. Recuperado en Noviembre 16 del 2019 de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v65n1/v65n1a02.pdf>

Wan, Leibing; Wang, Xitao; Cong, Cong; Li, Jingbo; Xu, Yongping; Li, Xiaoyu; Hou, Fuqin; Wu, Yanyan & Wang, Lili. (2020). Effect of inoculating microorganisms in chicken manure composting with maize straw. *Bioresource Technology*. 122730. DOI 10.1016/j.biortech.2019.122730. Recuperado en Enero 07 del 2020 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852419319595>

## ANEXO



• **CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES**

ACTIVIDADES	MESES (SEMANAS)															
	SEPTIEMBRE				OCTUBRE				NOVIEMBRE				DICIEMBRE			
Revisión de documentación interna	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Revisión de literatura científica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Instauración prueba experimental degradación de materia orgánica con productos biológicos comerciales	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
Instauración prueba experimental degradación de materia orgánica inoculando lodos de fondo (STAR)	X	X	X	X	X	X	X	X								
<b>Desarrollo actividades laboratorio de Bioinsumos Pajonales SAS y propuesta investigativa</b>																
Preparación de medios de cultivo					X	X	X	X								
Inoculación de medios de cultivo para producción						X	X									
Generación de inóculo inicial proceso de fermentación							X	X								
Aislamiento y caracterización macroscópica y microscópica					X	X	X	X								
Identificación Bioquímica microbiana					X	X	X	X								
Evaluación medios de cultivo modificados (Producción enzimática y vísceras de pescado)						X	X	X								
Reactivación de cepas microbianas					X	X	X	X								
Introducción a la conservación cepa microbiana						X										
<b>Actividades específicas Unipalma SA</b>																
Elaboración de informe de resultados									X							

Unipalma SA																	
Presentación de informe de resultados Unipalma SA										X							
Instauración de proyecto macro investigativo (Líneas de acción)											X						
Elaboración de documentación inicial requerida y elaboración de protocolo de estandarización de muestreo de suelos e indicadores microbiológicos											X	X					
Elaboración de protocolos de control biológico frente <i>Haplaxius crudus</i>												X	X				
Elaboración de protocolo control biológico frente <i>Stomoxys calcitrans</i>												X	X				
Elaboración de protocolo de experimentación in vitro, determinación de eficiencia de <i>Metarhizium anisopliae</i> como controlador biológico específico														X	X		
Elaboración de protocolo de experimentación <i>in vitro</i> , determinación de eficiencia de Solubilizadores de minerales en el suelo																	En curso