

ESTUDIO DE LA POBLACIÓN MICROBIANA EN LAS ETAPAS INICIALES DEL COMPOSTAJE¹

Estela B. De Carlo²
Angela T. Rosa²
Silvia Benintende³
María E. Cariello²
Liliana Castañeda²
Elsa Figoni²
Norma Graso²
Ariel Ruiz²
Fabián Mascheroni²

RESUMEN

Se estudiaron poblaciones microbianas en las etapas iniciales del compostaje, con el objetivo de establecer relaciones con pH, temperatura y humedad a fin de elaborar con ellas inóculos que aceleren el proceso. Se caracterizaron las poblaciones morfológica y tintorialmente, evaluando su capacidad degradativa frente a distintos sustratos. Los resultados mostraron una actividad amilolítica mayor en bacterias en los primeros momentos de la pila. La actividad lipolítica fue más acentuada en la población fúngica, como también fue mayor la proporción de hongos con actividad celulolítica. Los datos obtenidos serán utilizados para la elaboración de los inóculos.

Palabras claves: bio-residuos, compost, microorganismos, actividad degradativa

ABSTRACT

Microbe populations were studied in the early stages of the composting process to evaluate their relationship with pH, temperature and moisture, and to use them to

¹ Aceptado para publicación en 14.12.2001.

² Facultad de Ingeniería. Bioingeniería UNER. Ruta 11, Km 10. 3100 Oro Verde, Paraná, Entre Ríos, Argentina. C.C. N° 57, Sucursal 3. E-mail: bio12@fi.uner.edu.ar

³ Facultad de Ciencias Agropecuarias UNER. Ruta 11, Km 10. 3100 Oro Verde, Paraná, Entre Ríos, Argentina. C.C. N° 24. E-mail: silviabe@gamma.com.ar

inoculate piles to accelerate the process. Microbe populations were characterized by differential staining and morphological criteria and evaluated by their ability to degrade different substrates. The results showed that while bacteria exhibited mainly amylolytic activity in the first pile stages, fungi population displayed a higher lipolytic and cellulolytic activity. The data obtained will be used to elaborate inocula.

Key words: bio-residue, compost, microorganisms, degradation activity.

INTRODUCCIÓN

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

El manejo de los desechos sólidos por medio del compostaje ha sido preocupación de muchas comunidades y objeto de estudios previos realizados por Benintende et al. (2), Carpio et al. (4), Dalzell et al. (5), Mc Clure et al. (11) y Mustin (13).

Los objetivos de este trabajo fueron el estudio de las poblaciones microbianas en las etapas iniciales del proceso de compostaje, su relación con el pH, la humedad y la temperatura de la pila y caracterizar morfológica y tintorialmente los aislamientos evaluando las aptitudes degradativas frente al almidón, grasas y celulosa con la finalidad de elaborar inóculos que aceleren el proceso.

Este trabajo se realizó en el marco del Proyecto: "Biorresiduos domiciliarios: aceleración de su degradación por inoculación de microorganismos", contándose para el mismo con los residuos del Municipio de Oro Verde – Provincia de Entre Ríos – Argentina.

MATERIAL Y MÉTODOS

La preparación de las pilas para el compostaje se realizó de acuerdo con la metodología desarrollada en un Proyecto precedente (4). Los residuos preseleccionados fueron triturados en partículas homogéneas pequeñas (2 a 3 cm) a fin de ofrecer un área superficial adecuada para la acción de los microorganismos. Se los depositó en plataformas de ladrillos (hileras separadas entre sí por 6 cm) a una profundidad de 0,30 m lográndose pilas de 1 m de altura, por 2 m de largo y 1 m de ancho.

Las pilas de tratamiento se sometieron a volteo permanente para favorecer la aireación y evitar así los núcleos de anaerobiosis y se tomaron muestras periódicas para el control de variables. Se numeraron en forma

consecutiva desde el inicio del proyecto. En el presente trabajo se muestran los resultados correspondientes a la tercera pila realizada (pila 3)

Variables medidas: relación C/N, pH y temperatura en las pilas.

La relación C/N inicial fue 23/1 (relación C/N ideal es entre 25 y 30 (5)), debido a la presencia de gran cantidad de residuos ricos en proteínas (15). La relación C/N se obtuvo determinando el C orgánico por cálculo a partir del dato de materia orgánica y el de N orgánico por el método de Kjeldahl en solución acuosa del producto (9). El pH se midió diariamente en una suspensión acuosa de los residuos triturados en una relación 1: 2,5 y la temperatura se tomó diariamente en 5 puntos del interior de la pila, promediándose los valores.

Aislamiento y purificación de microorganismos

Se extrajeron dos muestras por cada pila durante la primera y segunda semana del proceso, y se continuó con una por pila en las semanas siguientes. Las muestras se conformaron con submuestras extraídas de distintos sitios de las pilas con el objeto de obtener organismos que se desarrollan en la superficie, a menor temperatura y otros en la profundidad a temperaturas mayores. Cada muestra se diluyó al 10% (P/V) en solución fisiológica (SF). Se sembraron en agar nutritivo (AN) (3) y agar rosa de bengala estreptomicina (ARBE) (3), en placas en estrías por agotamiento a partir de diluciones de la muestra 10^4 (P/V). Una vez obtenidos los aislamientos de colonias se procedió a su purificación.

Para la purificación de bacterias de cada colonia macroscópicamente aislada, se hicieron repiques sucesivos en caldo nutritivo (CN) y AN, incubando a 37 °C hasta desarrollo visible. A cada colonia se le realizó tinción de Gram para la observación microscópica. Debido a que las condiciones y composición del medio de compostaje son variables, se eligieron los medios de cultivo mencionados para los aislamientos, por ser los utilizados habitualmente en los estudios de suelos y por su escasa selectividad, lo que permite el desarrollo de distintos microorganismos.

Para la purificación de hongos se repicó de colonias macroscópicamente diferentes a tubos con agar papa glucosa (APG) (3). A partir de un tubo se realizó una suspensión de esporos agregando 5 ml de H₂O estéril agitando suavemente para desprenderlas. La suspensión se diluyó convenientemente para obtener una concentración de esporos de entre 100 y 200/ml.

Se sembraron 0,1 ml de dicha dilución en superficie en placa de APG, incubándose a 37 °C hasta aparición de colonias aisladas. De cada

una se repicó en tubo con APG en pico de flauta para obtener un cultivo monospórico (3).

Evaluación de actividad metabólica de los microorganismos aislados

La actividad amilolítica se evaluó mediante la siembra en placas de AN con agregado de almidón (2%). La amilolisis se puso de manifiesto mediante agregado de lugol (16). Los grados de actividad se establecieron según cuatro criterios: Nula, Baja, Media y Alta, en función de los halos de degradación de almidón en las cercanías de la zona de crecimiento del microorganismo testeado.

La actividad lipolítica se evaluó mediante la siembra en placas de Agar Tributirium (12) y se estableció según los mismos criterios: Nula, Baja, Media y Alta, teniendo en cuenta el halo de degradación en las inmediaciones de las colonias.

Para la actividad celulolítica se utilizó el medio para celulolíticos de Wollum II con celulosa en polvo como única fuente carbonada. La actividad se puso de manifiesto por la aparición de halos de degradación de celulosa en las inmediaciones de las colonias (17). Se siguió la misma metodología estableciendo los cuatro criterios mencionados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Temperatura, humedad, relación C/N y pH

Los primeros microorganismos llegan con los residuos y en las primeras etapas se multiplican cambiando las condiciones del medio y haciéndolas más aptas para otro grupo microbiano. Esta actividad involucra procesos metabólicos que ocasionan un marcado aumento de la temperatura.

El aumento de la temperatura en la pila se inició entre el 4° y 5° día manteniéndose más elevada que la temperatura media ambiente. Esta situación cambió alrededor del día 20 a partir del cual se fue perdiendo progresivamente (Figura 1)

La humedad de las pilas se mantuvo en un rango entre el 50 y 60 % lo que posibilitó el ascenso de temperatura hasta valores cercanos a los 70 °C; rangos de humedad extremos limitan el crecimiento microbiano (6).

La relación C/N final obtenida: 13,5/1 permite la incorporación directa del producto al suelo ya que por su grado de madurez no compite por el N con semillas y/o plantas. Esto se debe a que el compost no libera

ácidos orgánicos ni amoníaco y tampoco absorbe N de la solución del suelo.

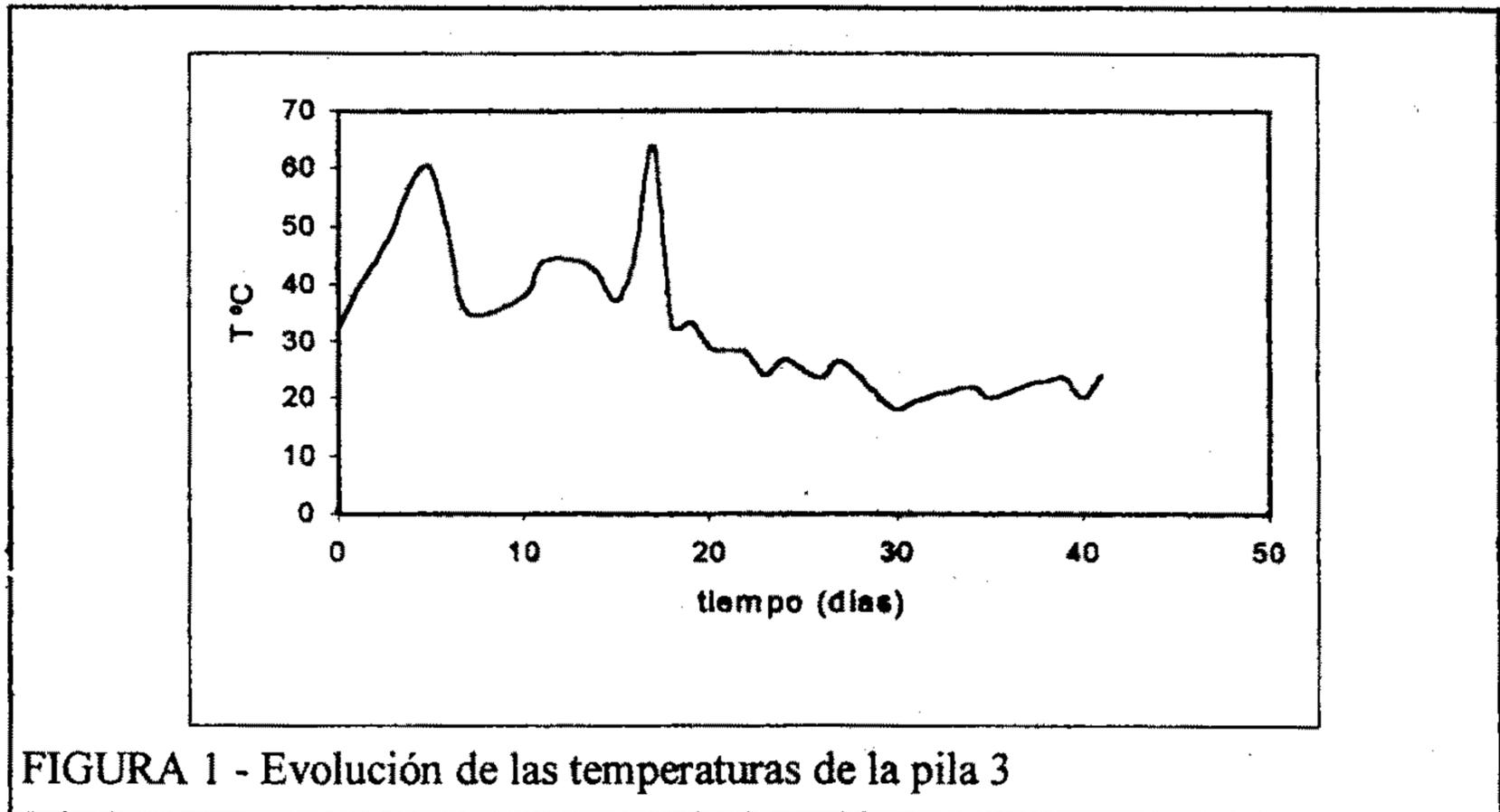


FIGURA 1 - Evolución de las temperaturas de la pila 3

La gran proporción de compuestos nitrogenados provocó el ascenso del pH en la pila manteniéndose alto a lo largo del proceso, ya que el exceso de N se libera como NH_3 (5, 6) (Figura 2). Dicha característica provocó también un marcado aumento de la temperatura en los primeros días del proceso (8).

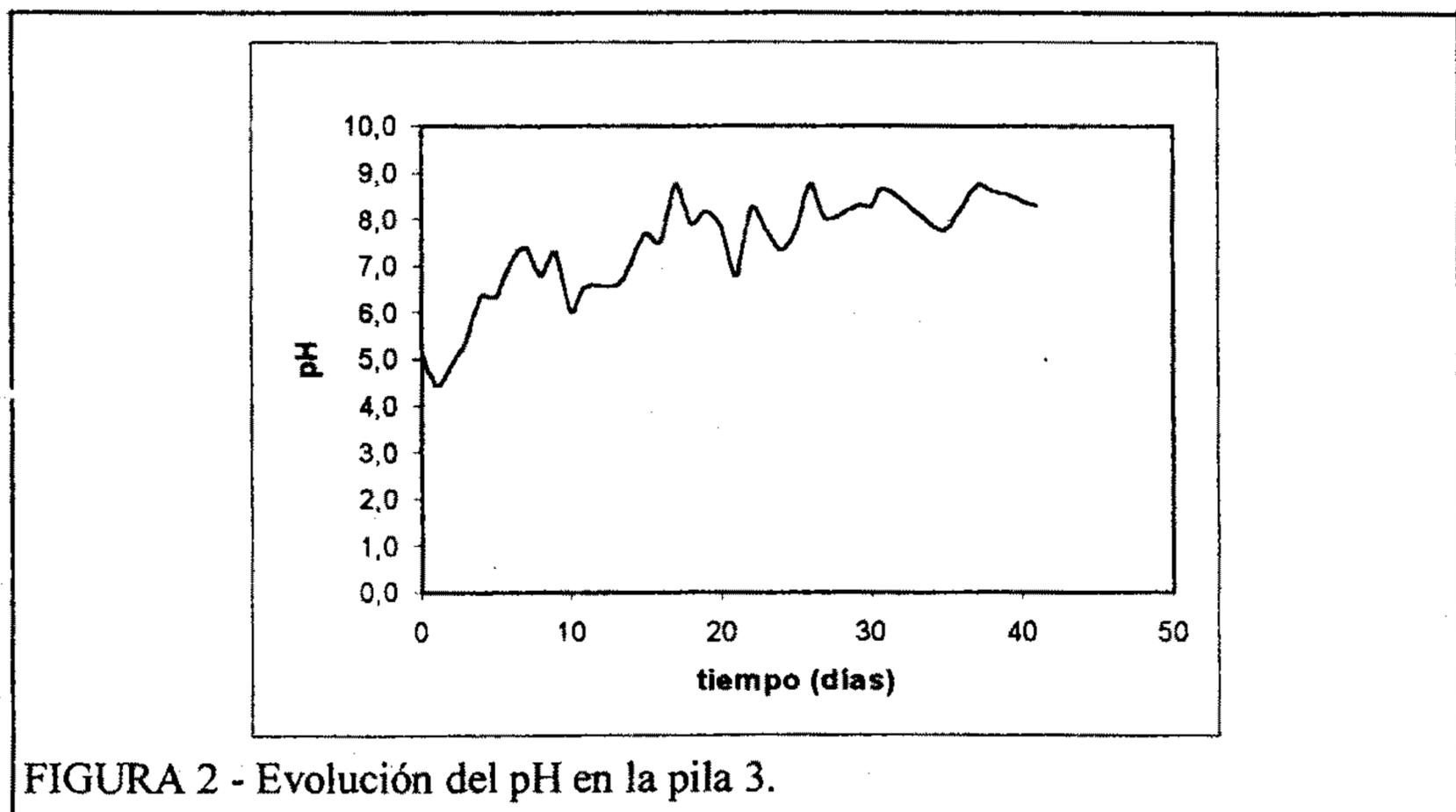


FIGURA 2 - Evolución del pH en la pila 3.

Caracterización morfológica y tintorial de los aislamientos.

Se realizó la caracterización morfológica y tintorial de los aislamientos obteniéndose 128 aislamientos, 79 de bacterias y 49 de

hongos. De los gérmenes totales, las bacterias aparecieron en todas las etapas del compostaje. Este grupo tuvo pocos atributos morfológicamente distintivos.

El estudio microscópico de los aislamientos bacterianos mostró un predominio de los bacilos (57%), frente a los cocos (37 %) y cocobacilos (6%) (Figura 3).

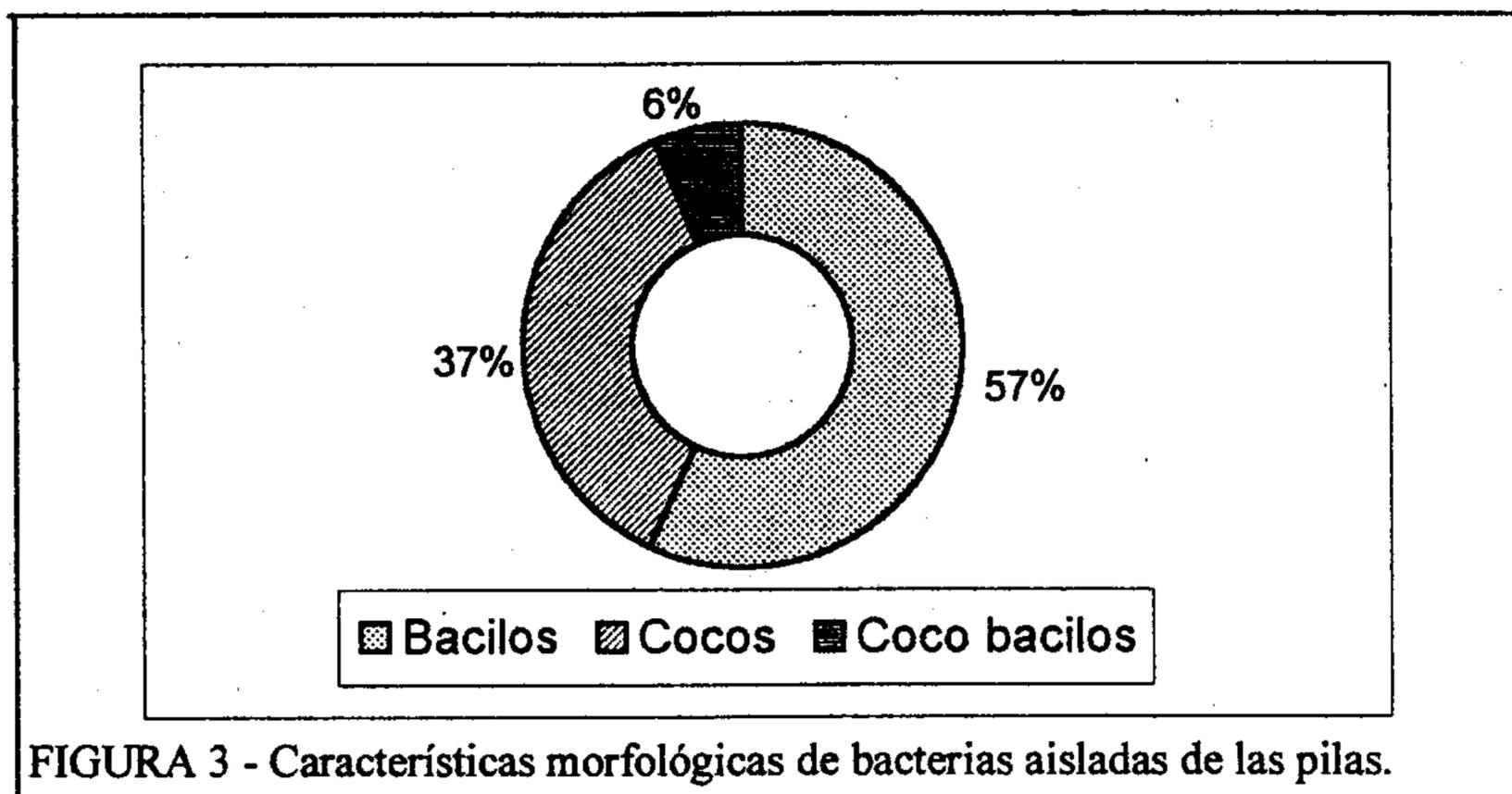


FIGURA 3 - Características morfológicas de bacterias aisladas de las pilas.

Se observó (Figura 4) que un 73% de las bacterias aisladas fueron Gram (+), lo que estuvo relacionado a las características del medio del que fueron aisladas, ya que muchas de ellas se caracterizan por poder hacer uso de una amplia variedad de sustancias presentes en las pilas.

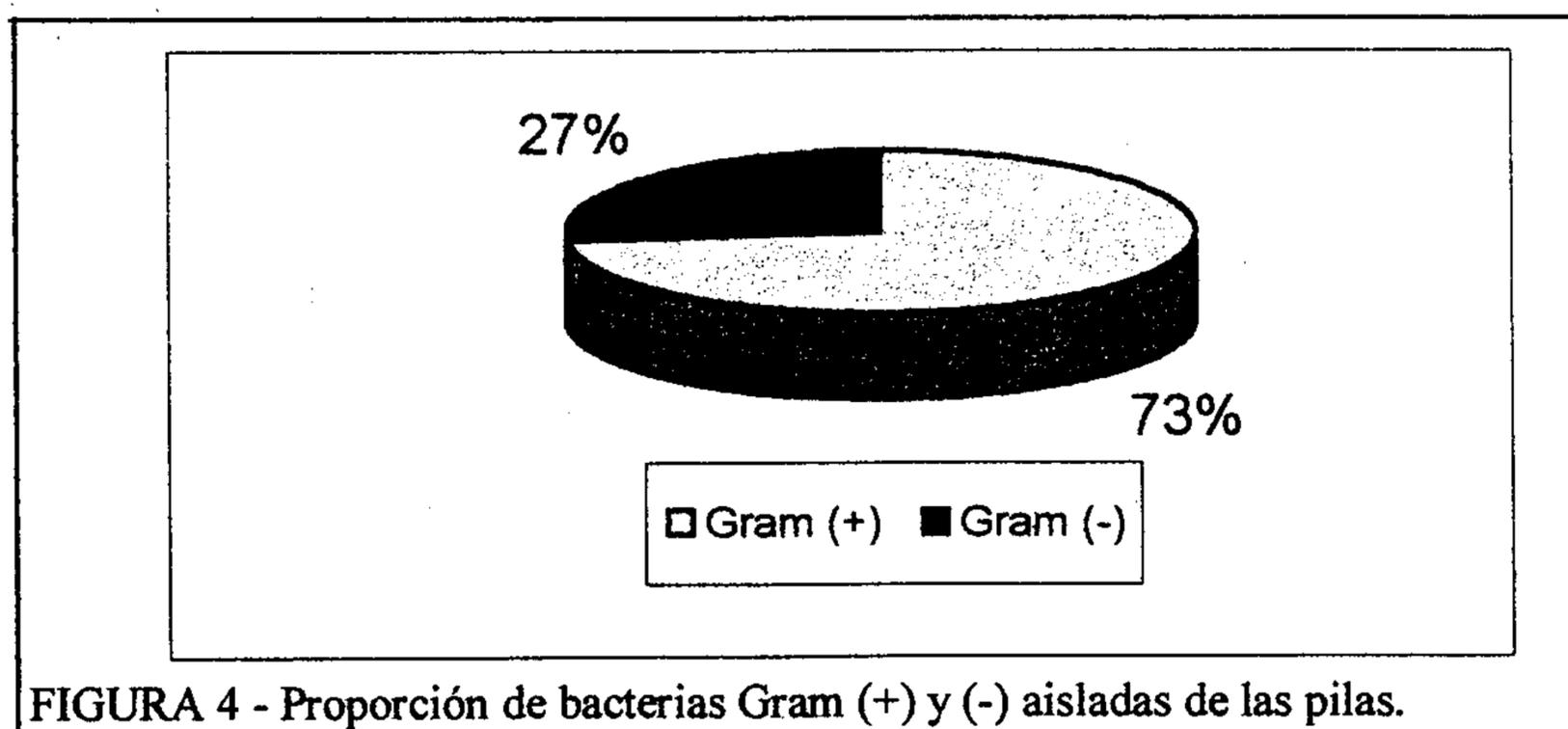


FIGURA 4 - Proporción de bacterias Gram (+) y (-) aisladas de las pilas.

Cuando se combinaron esas características morfológicas y tintoriales, hubo un amplio predominio de los bacilos Gram (+) totales, y una marcada disminución de los Gram (-) entre los días 6 y 10 de comenzado el proceso (Figuras 5 y 6).

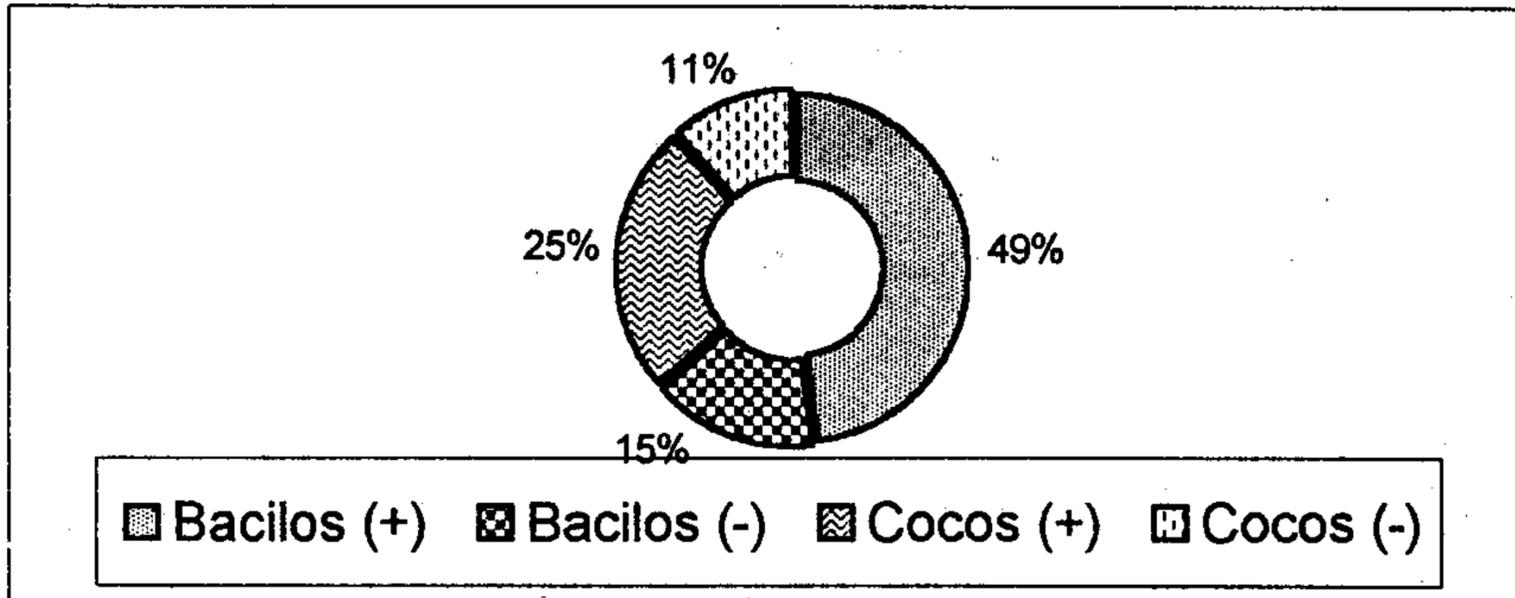


FIGURA 5 - Morfología asociada a la coloración de Gram de bacterias aisladas en las pilas.

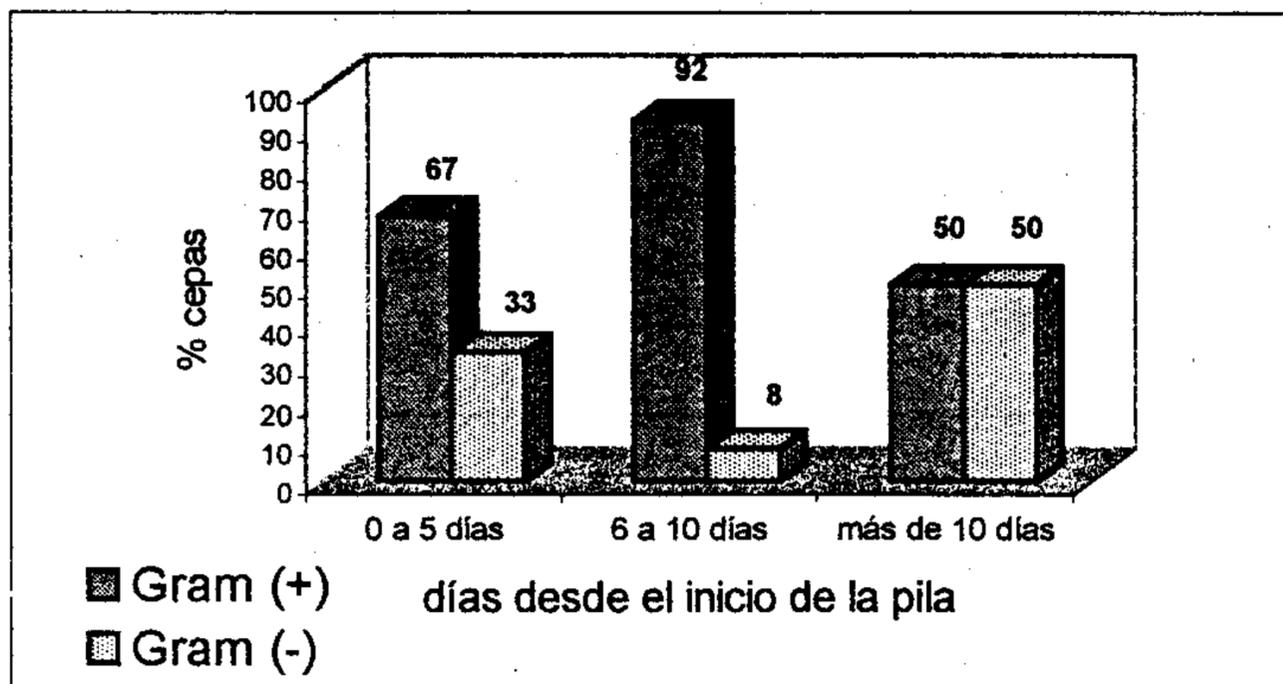


FIGURA 6 - Proporción de bacterias con características tintoriales diferentes en distintos momentos de las pilas.

Del total de la población bacteriana (Figura 7), el 37% fueron esporulados, incrementándose entre los días 6 y 10 de iniciado el proceso, vinculado con el aumento de la temperatura, la cual produjo una selección diferencial de aquellos con capacidad de formar estructuras de resistencia al calor. En las etapas siguientes se recolonizaron las partes más externas de las pilas, las cuales no habían logrado incrementos térmicos tan marcados (5).

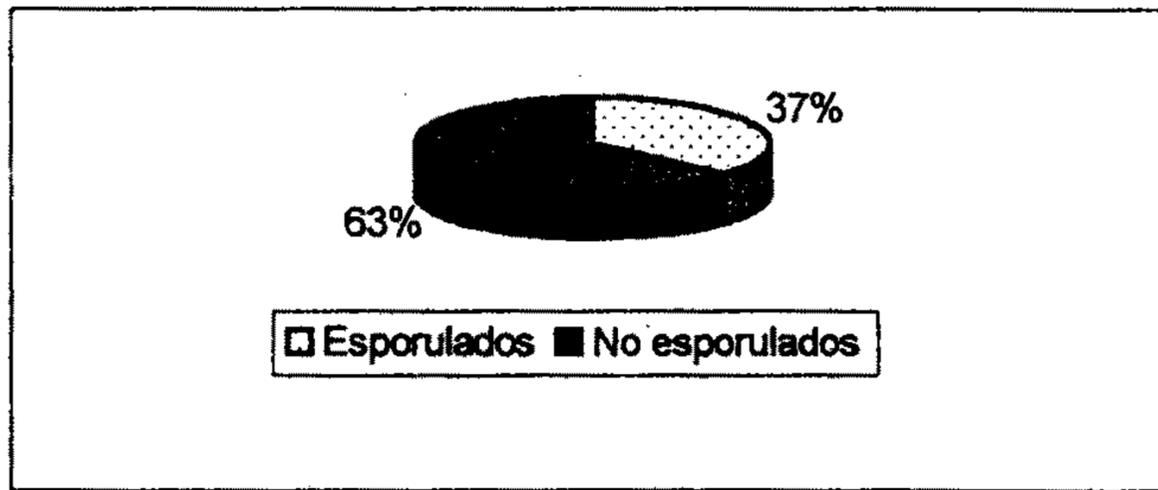


FIGURA 7 - Proporción de bacterias esporuladas y no esporuladas en las pilas.

Del análisis de la evolución de la población en función del tiempo se observó que los bacilos Gram (+) predominaron en todas las fases, encontrándose el mayor porcentaje entre los días 6 y 10 en coincidencia con el aumento de temperatura y la supervivencia de las formas de resistencia. Comportamiento similar tuvieron los cocos Gram (+), mientras que los microorganismos Gram (-) tendieron a desaparecer frente a los incrementos de temperatura, debido a su incapacidad de formar dichas estructuras.

De los géneros conocidos como formadores de esporos, algunos son encontrados en los materiales como los que forman las pilas (14). Cabe destacar que muchos organismos patógenos que la bibliografía cita como inactivados durante la etapa termófila, pertenecen a las bacterias Gram (-), tal el caso de coliformes como *Salmonella*, *Escherichia*, etc. (10) (Figura 8).

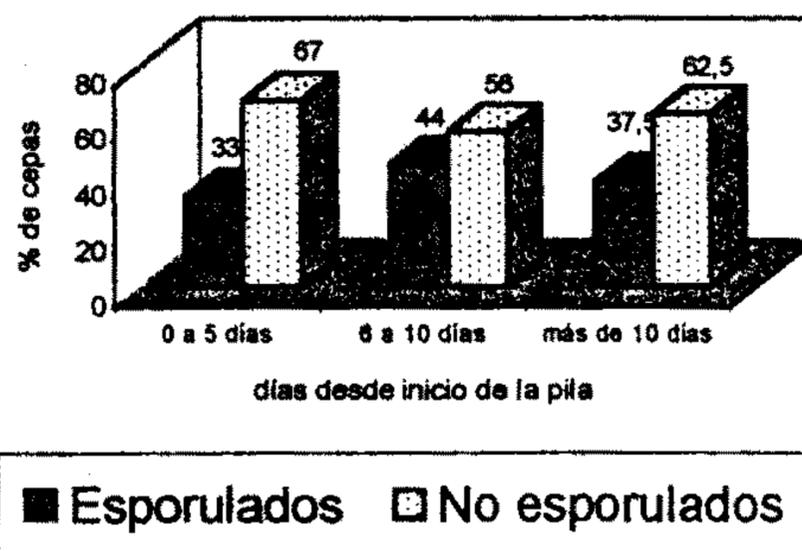
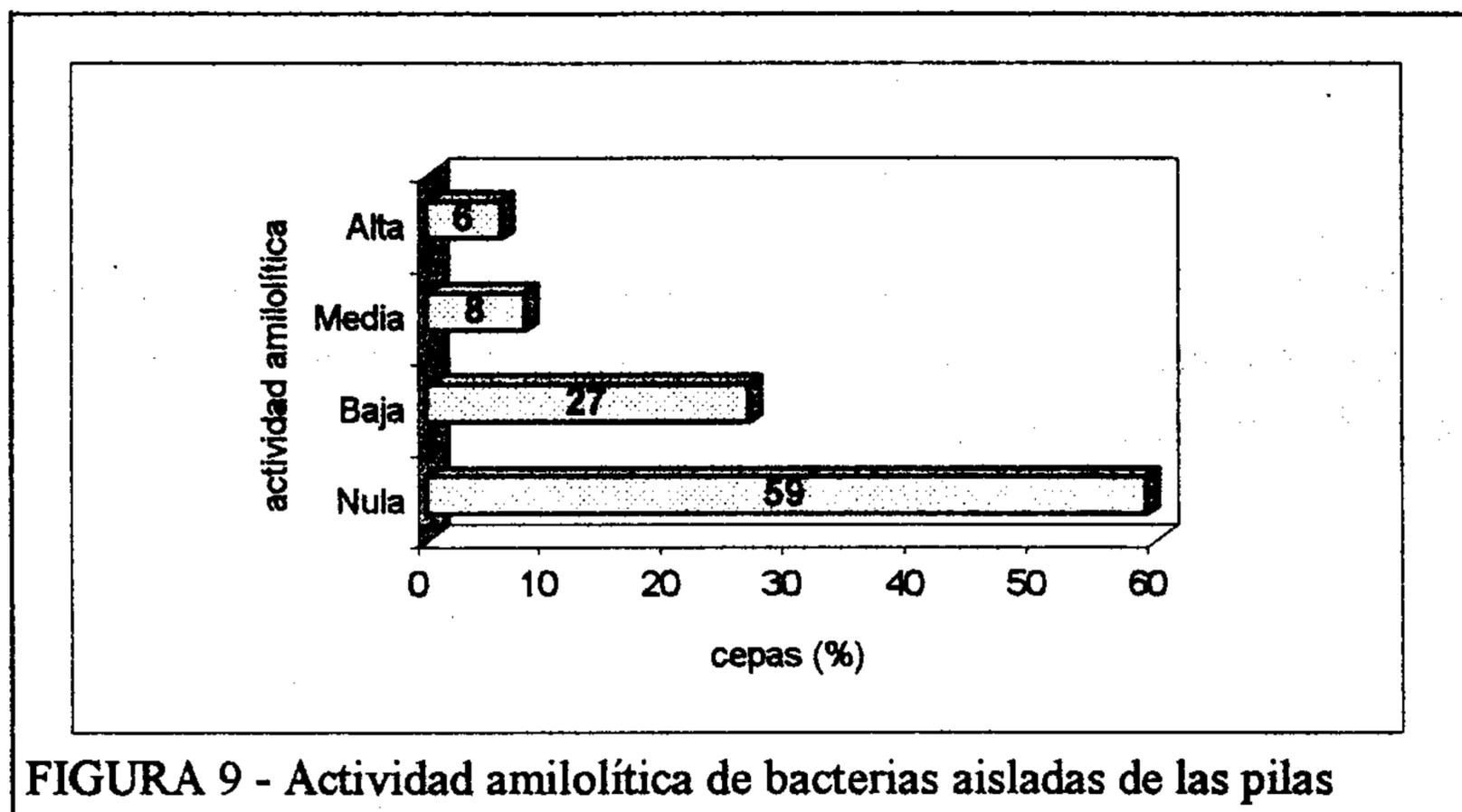


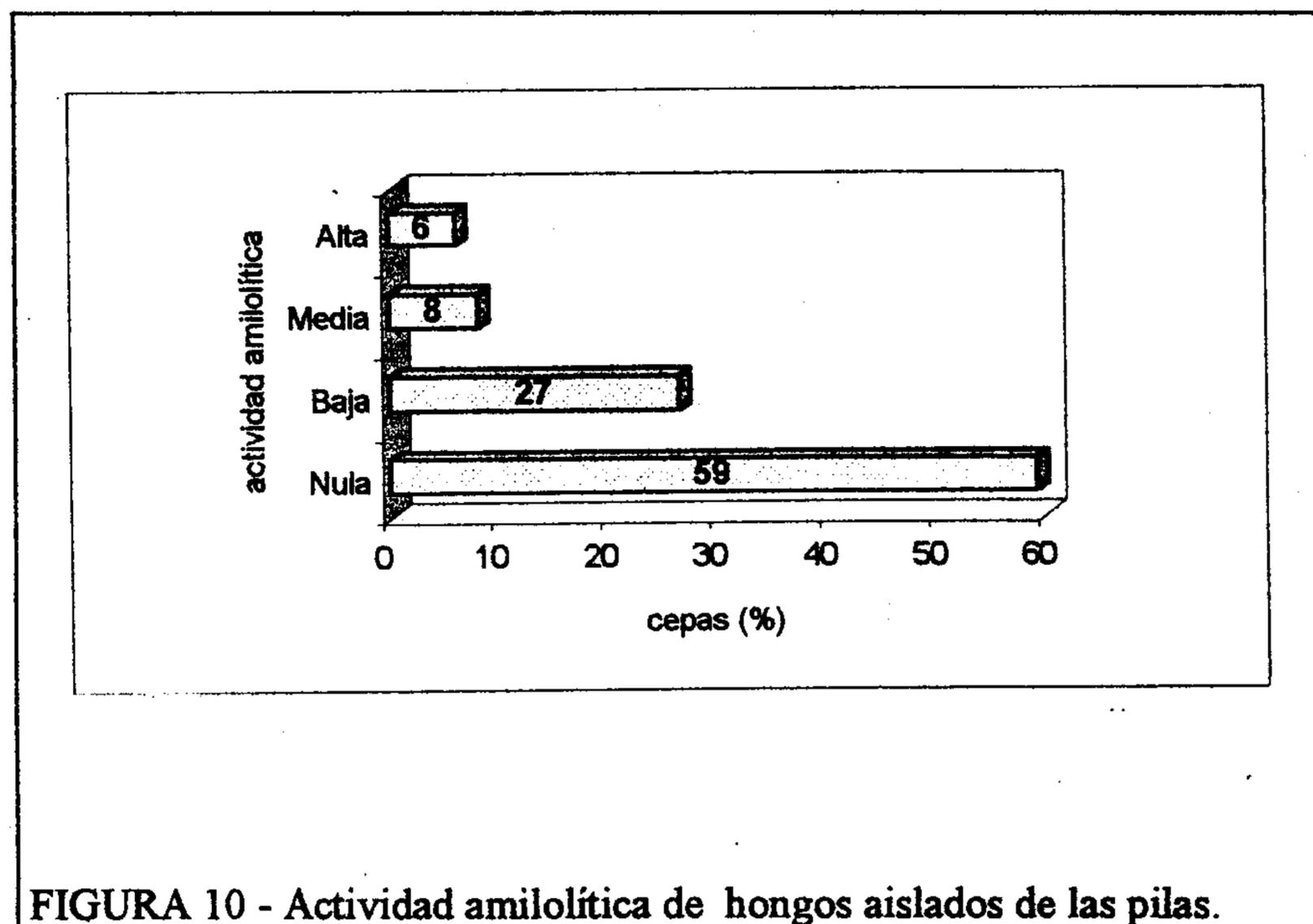
FIGURA 8 - Evolución de los aislamientos bacterianos con capacidad de esporulación en los distintos momentos de las pilas.

Actividad metabólica de los aislamientos

El 46% de las cepas bacterianas estudiadas no presentó actividad amilolítica, el 26% presentó actividad entre media a alta (Figura 9).



El 59 % de los hongos no presentaron actividad amilolítica. Del 41% restante, sólo el 14% presentó actividad media y alta (Figura 10).



Las figuras 11 y 12 muestran la distribución de estos aislamientos en el tiempo. Se observó una disminución relativa de la microbiota con actividad amilolítica media y alta en el transcurso de los días, siendo más notoria esta disminución en la población fúngica. Estos resultados se relacionan a que el almidón y los azúcares simples desaparecen rápidamente de la pila por la actividad de la microbiota inicial (7). Al desaparecer este sustrato, la flora amilolítica es sucedida por microorganismos que utilizan otro tipo de fuentes carbonadas más difíciles de degradar. Generalmente en esta etapa del compostaje las grandes moléculas disponibles deben ser degradadas por enzimas extracelulares antes de ingresar al microorganismo

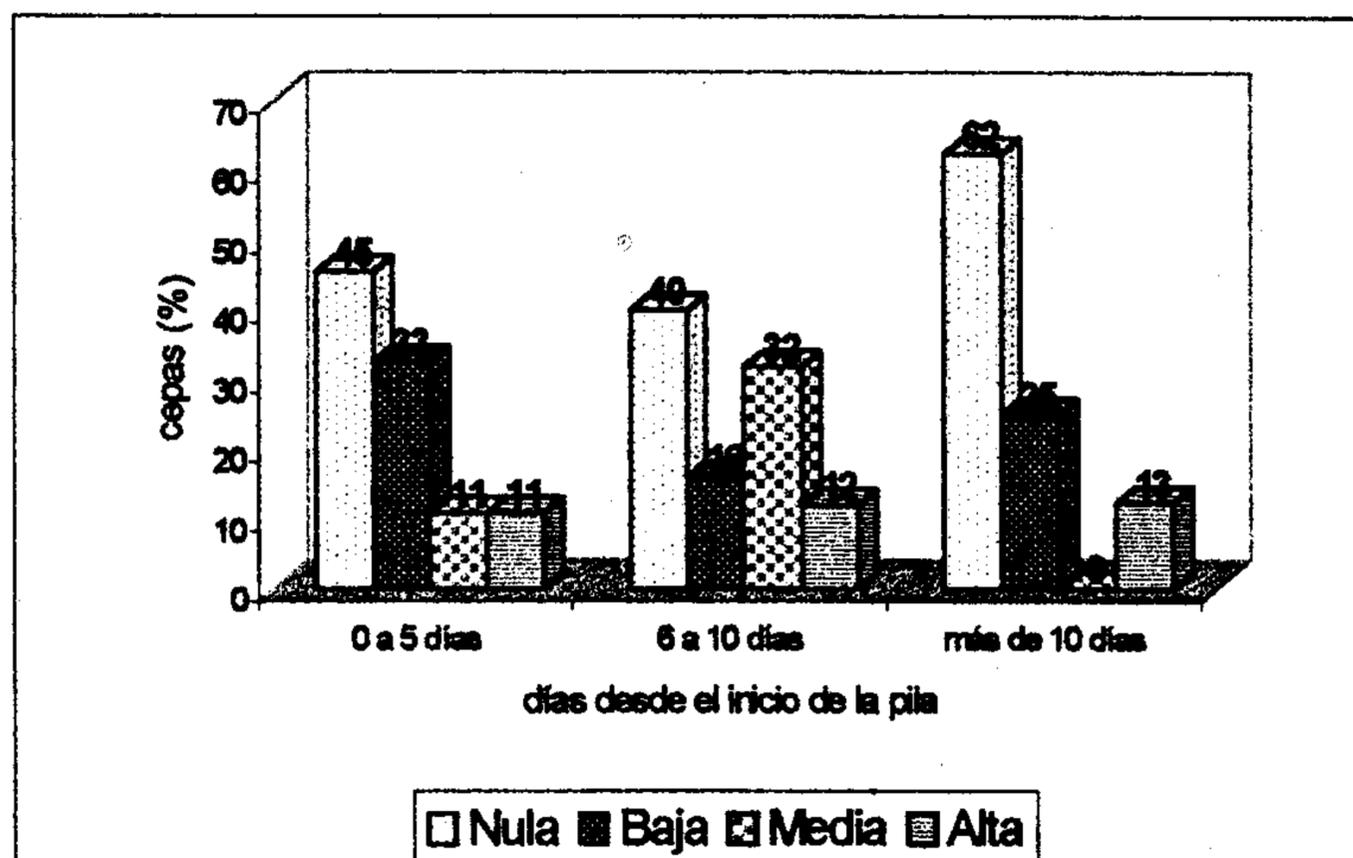


FIGURA 11 - Proporción de bacterias con actividad amilolítica aislados de las pilas en distintos momentos.

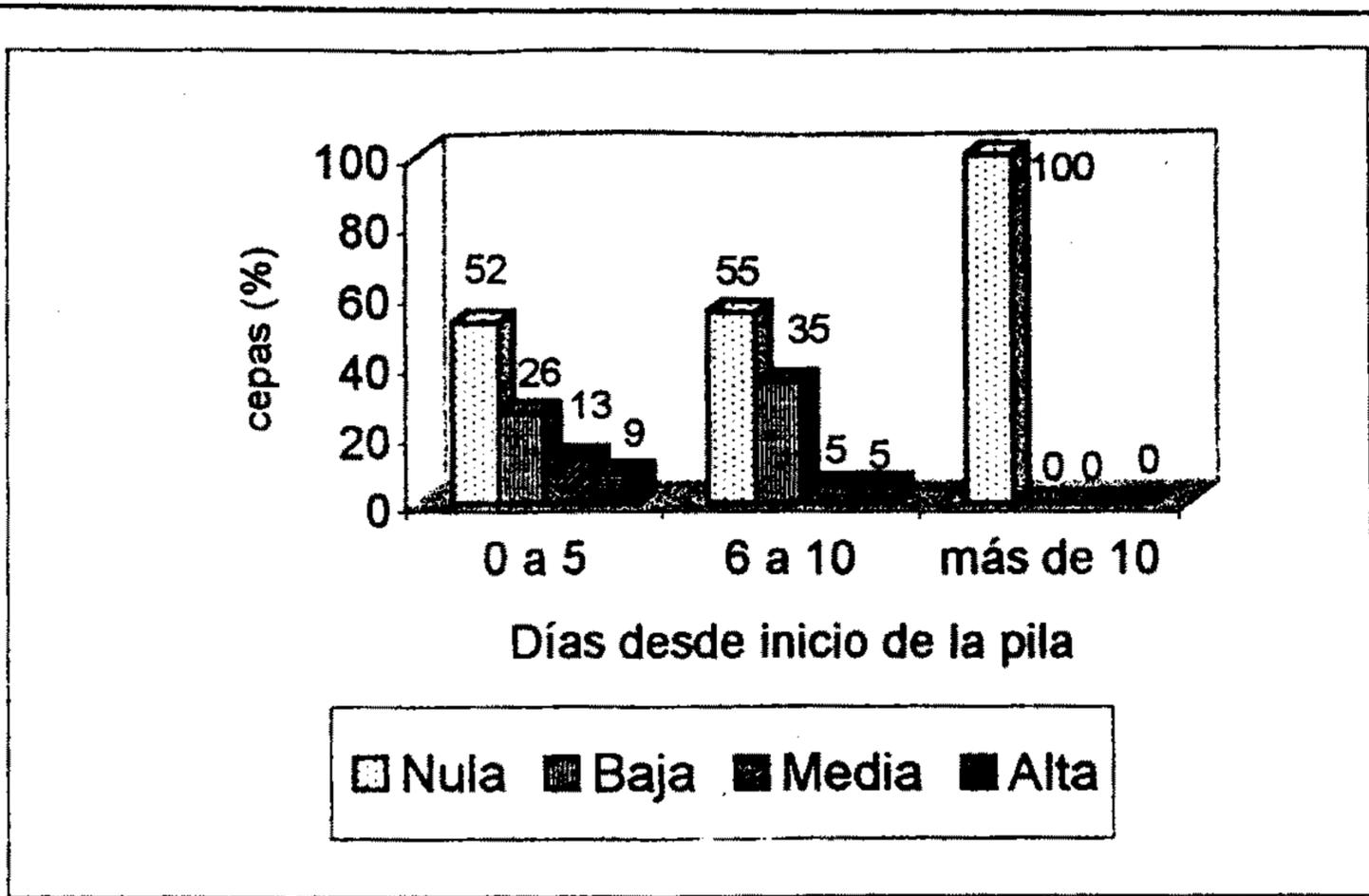


FIGURA 12 - Proporción de hongos con actividad amilolítica aislados de las pilas en distintos momentos.

La actividad lipolítica media y alta fue del 38% sobre el total de aislamientos bacterianos, siendo solo del 22% para la población de hongos. Fue alto el porcentaje de cepas con actividad baja y nula (62% para bacterias y 77% para hongos). Cabe destacar que la población fúngica con actividad nula solo alcanzó el 16% frente al 42% de la bacteriana (Figuras 13 y 14).

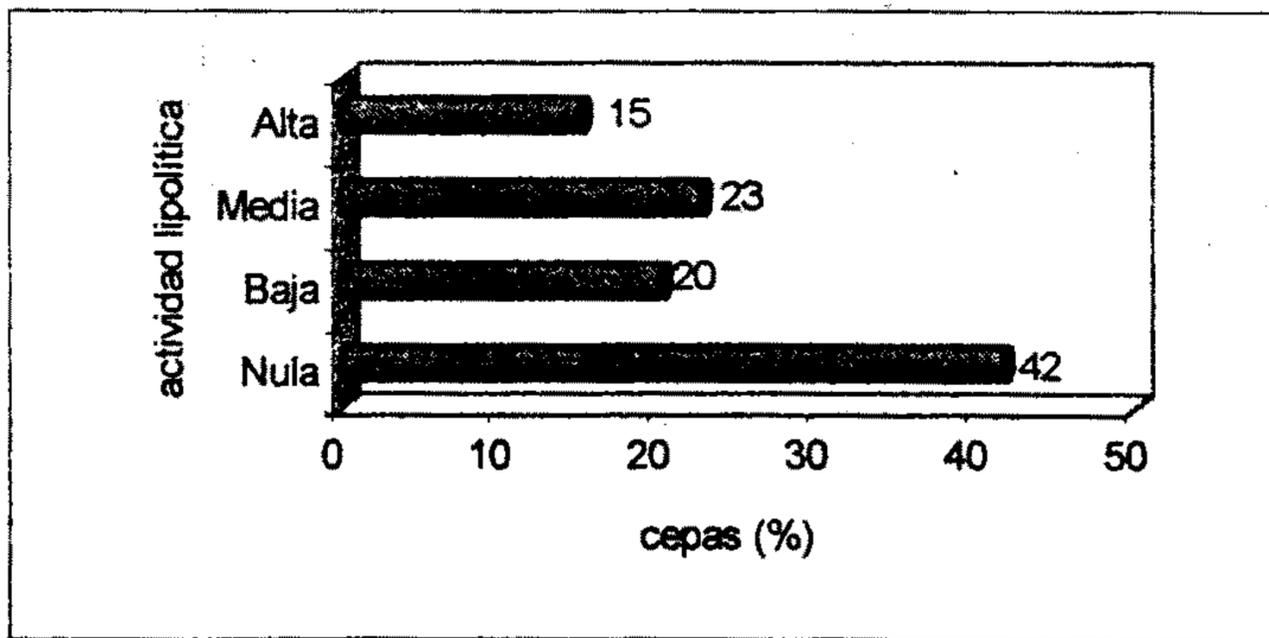
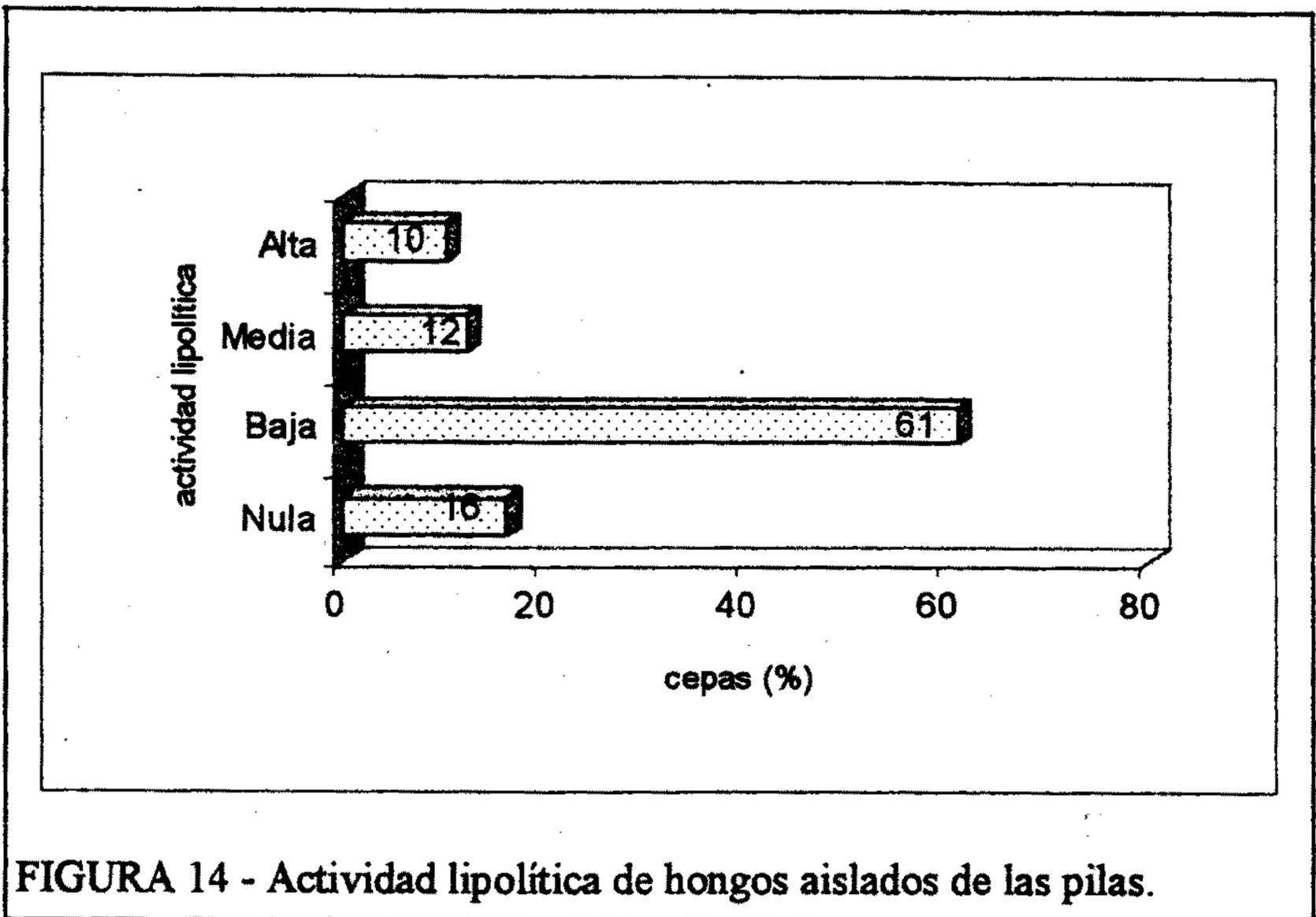


FIGURA 13 - Actividad lipolítica de bacterias aisladas de las pilas



Durante las primeras etapas del compostaje se pudo ver que en bacterias un 46% presentó actividad lipolítica entre media y alta en los primeros días y luego los porcentajes decrecieron notoriamente. No sucedió así en la población de hongos, donde los porcentajes, aunque bajos, 20%, no sólo se mantuvieron en un principio sino que se observó un aumento relativo a partir de los 10 días (Figuras 15 y 16).

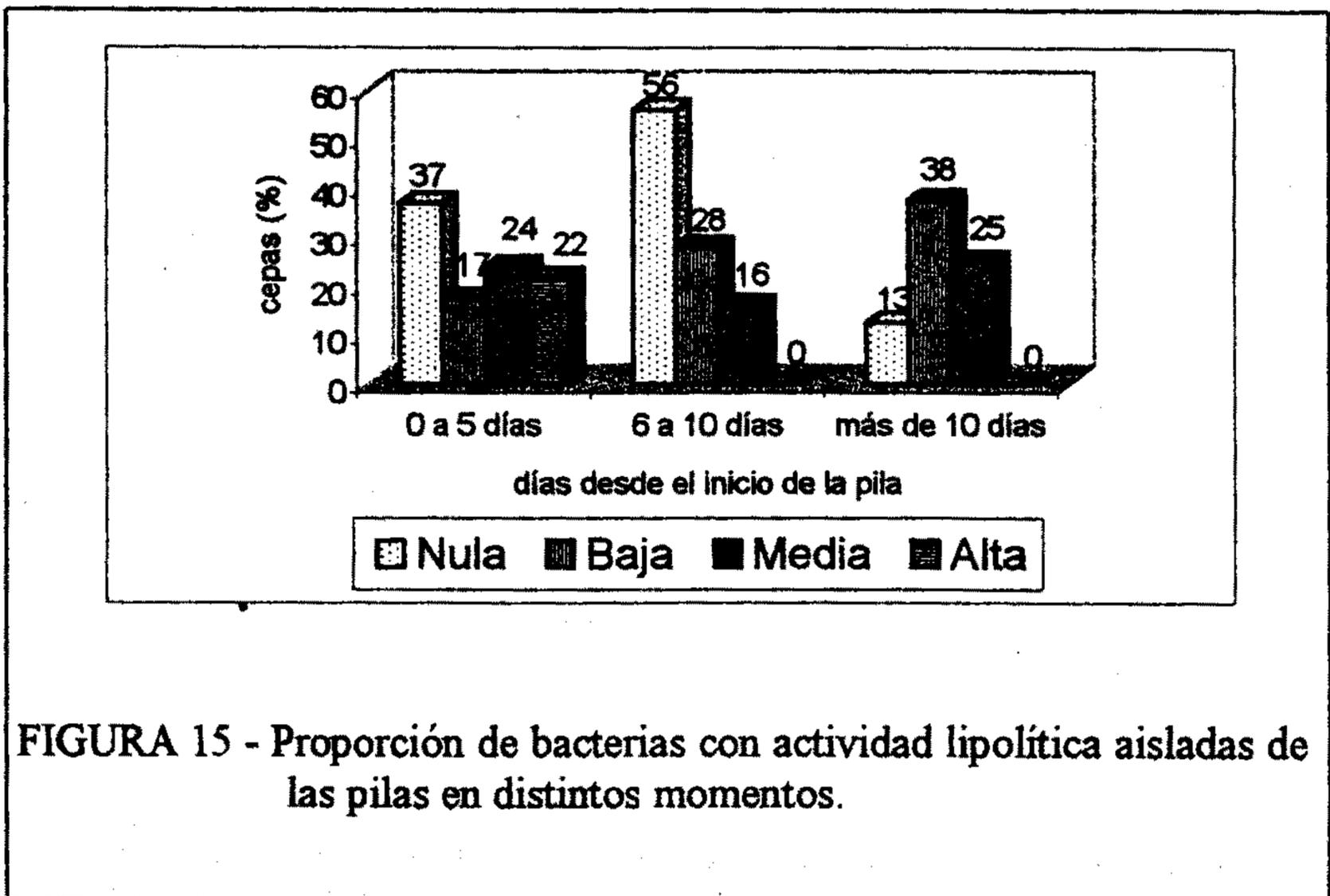


FIGURA 15 - Proporción de bacterias con actividad lipolítica aisladas de las pilas en distintos momentos.

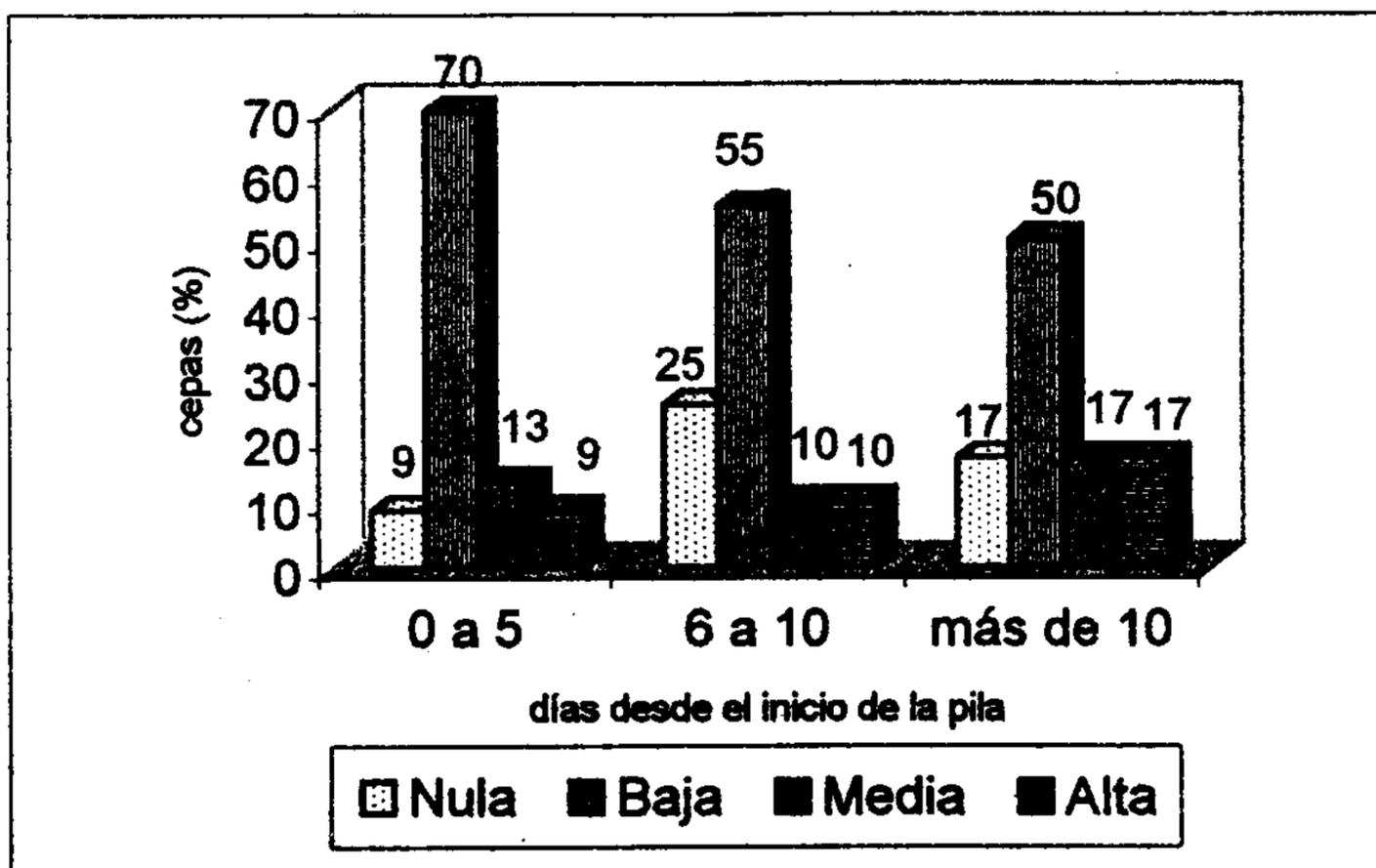


FIGURA 16 - Proporción de hongos con actividad lipolítica aislados de las pilas en distintos momentos.

El número de individuos con actividad lipolítica media y baja pareció mantenerse a lo largo del proceso mesófilo (como mínimo hasta los 20 días más o menos), por estar relacionado con la necesidad de un mayor tiempo para la degradación. Por ejemplo, la presencia de cutina, que directa o indirectamente protege a algunos lípidos de la degradación, prolonga este período provocando que haya mayor cantidad de aislamientos con actividad lipolítica que amilolítica.

En el total de aislamientos bacterianos y fúngicos no se detectaron poblaciones con actividad celulolítica media y alta. En cuanto a los que presentaron actividad baja, un 20 % correspondió a bacterias y un 33 % a hongos. El mayor porcentaje de microorganismos aislados presentó actividad nula (Figuras 17 y 18).

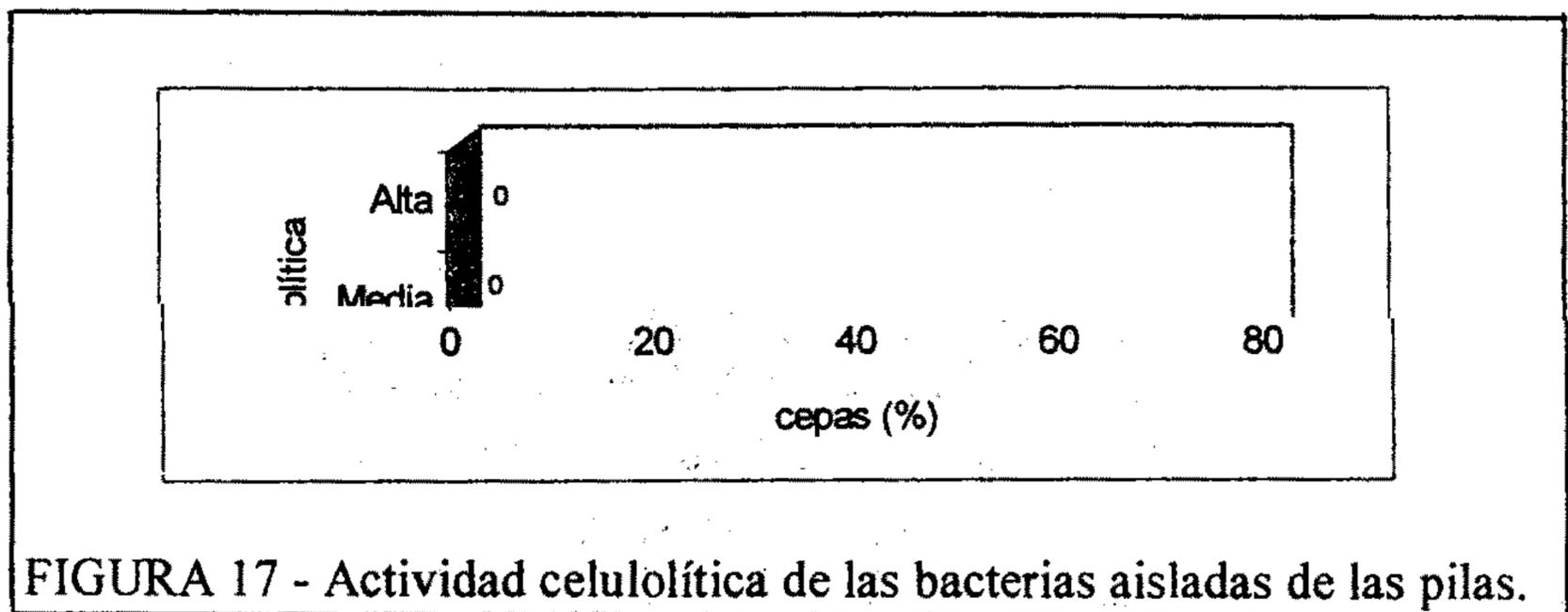


FIGURA 17 - Actividad celulolítica de las bacterias aisladas de las pilas.

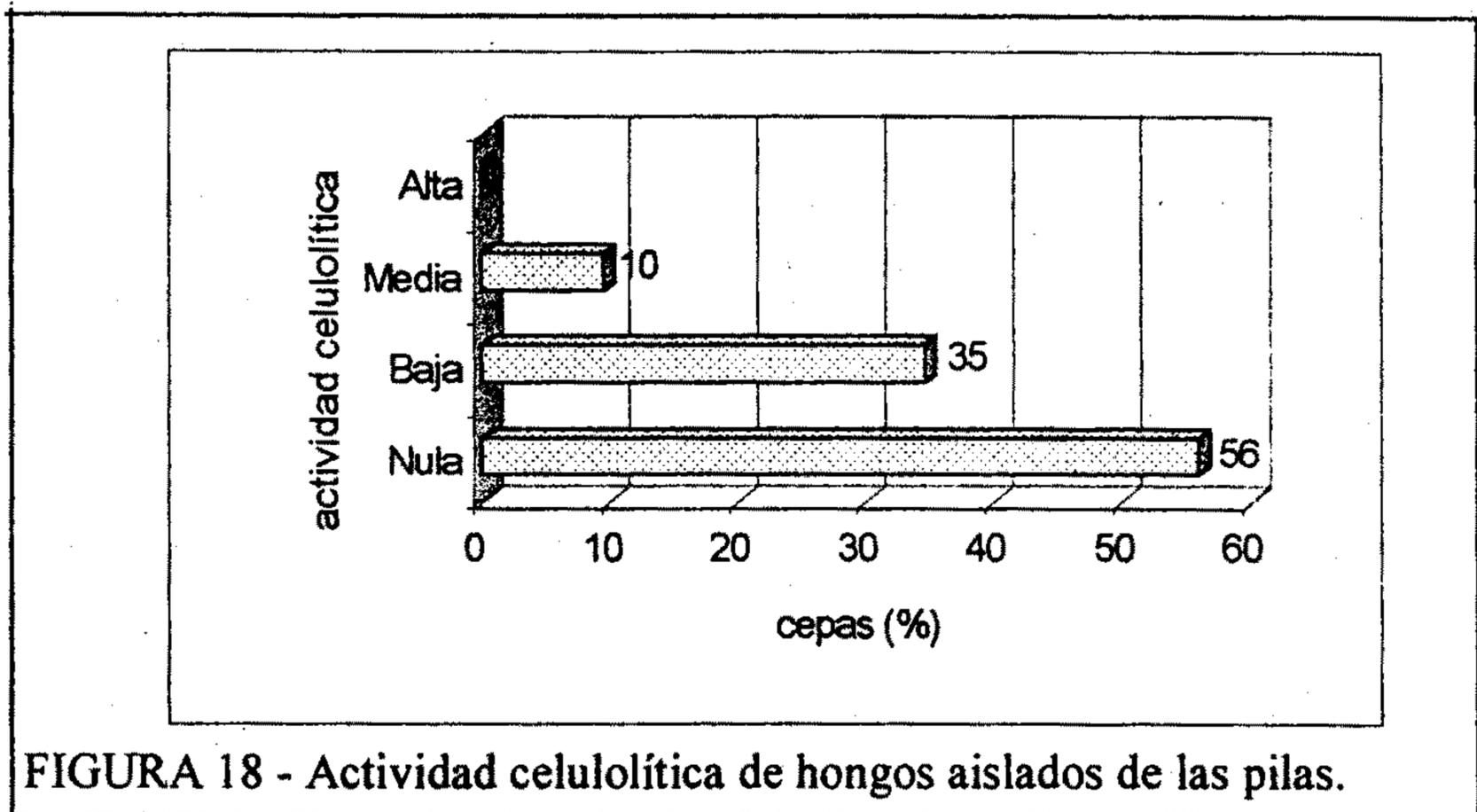


FIGURA 18 - Actividad celulolítica de hongos aislados de las pilas.

La evolución de la actividad en los primeros estadios del proceso mostró que en las bacterias disminuyó la proporción de individuos con actividad baja hasta desaparecer después de los 10 días y aumentó la de aquellos con actividad nula. En los hongos también se incrementó notablemente la proporción de individuos con actividad baja hasta el día 10, desapareciendo luego. En cambio los de actividad nula disminuyeron entre los días 6 y 10, aumentando luego considerablemente.

En los hongos se encontró una mayor proporción de aislamientos capaces de realizar, al menos, una degradación parcial de este compuesto, que necesita un proceso más complejo de descomposición. La hemicelulosa y celulosa son moléculas que deben ser atacadas por enzimas extracelulares antes de ser incorporadas por los microorganismos para su uso (5) (Figuras 19 y 20).

La población fúngica es importante en la descomposición de estas moléculas altamente polimerizadas. Los resultados obtenidos del 33% de actividad celulolítica coinciden con las investigaciones sobre actividad celulolítica en suelos, especialmente en condiciones poco favorables a las bacterias (1, 7).

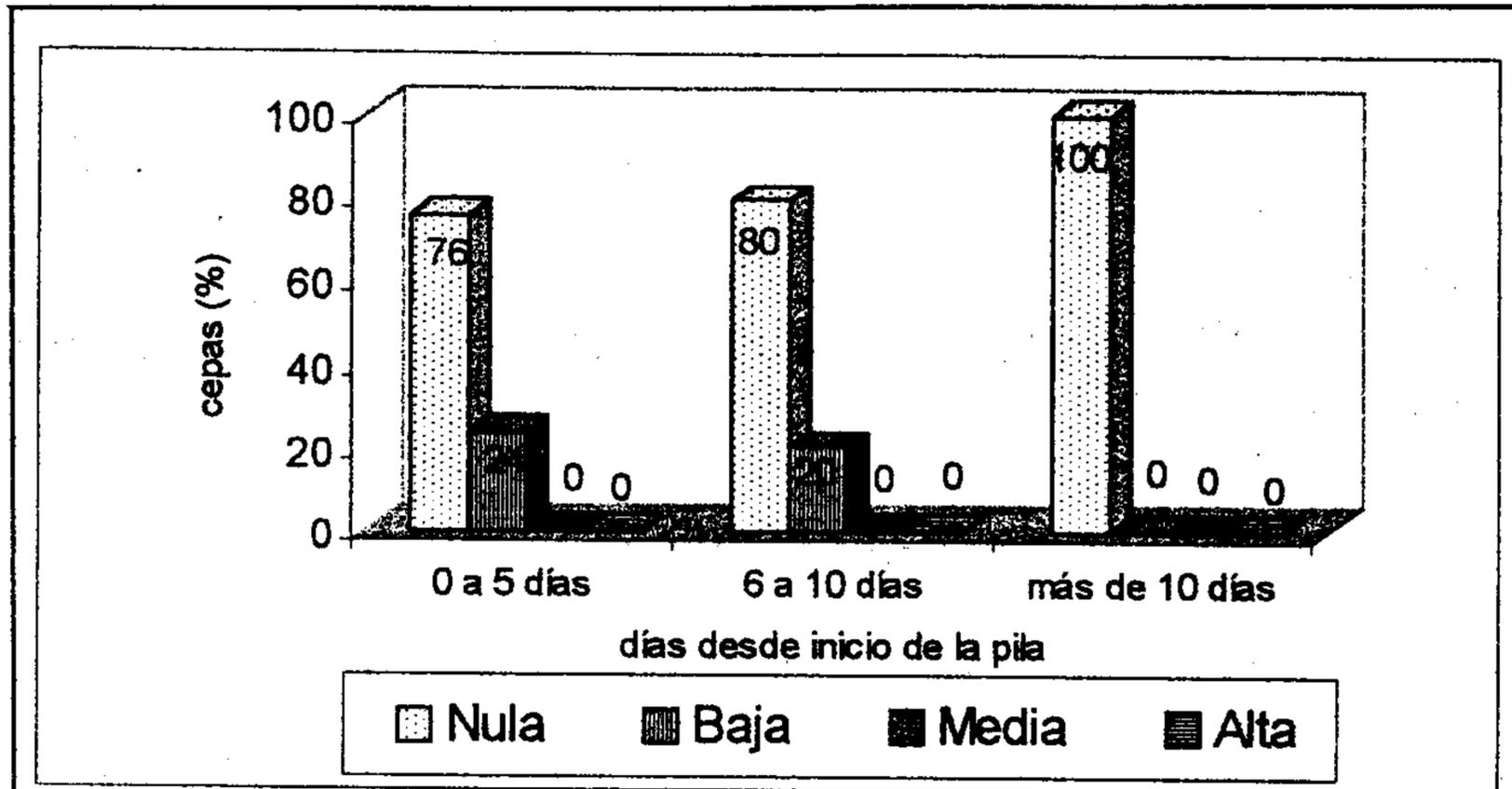


FIGURA 19 - Proporción de bacterias con actividad celulolítica aisladas de las pilas en distintos momentos.

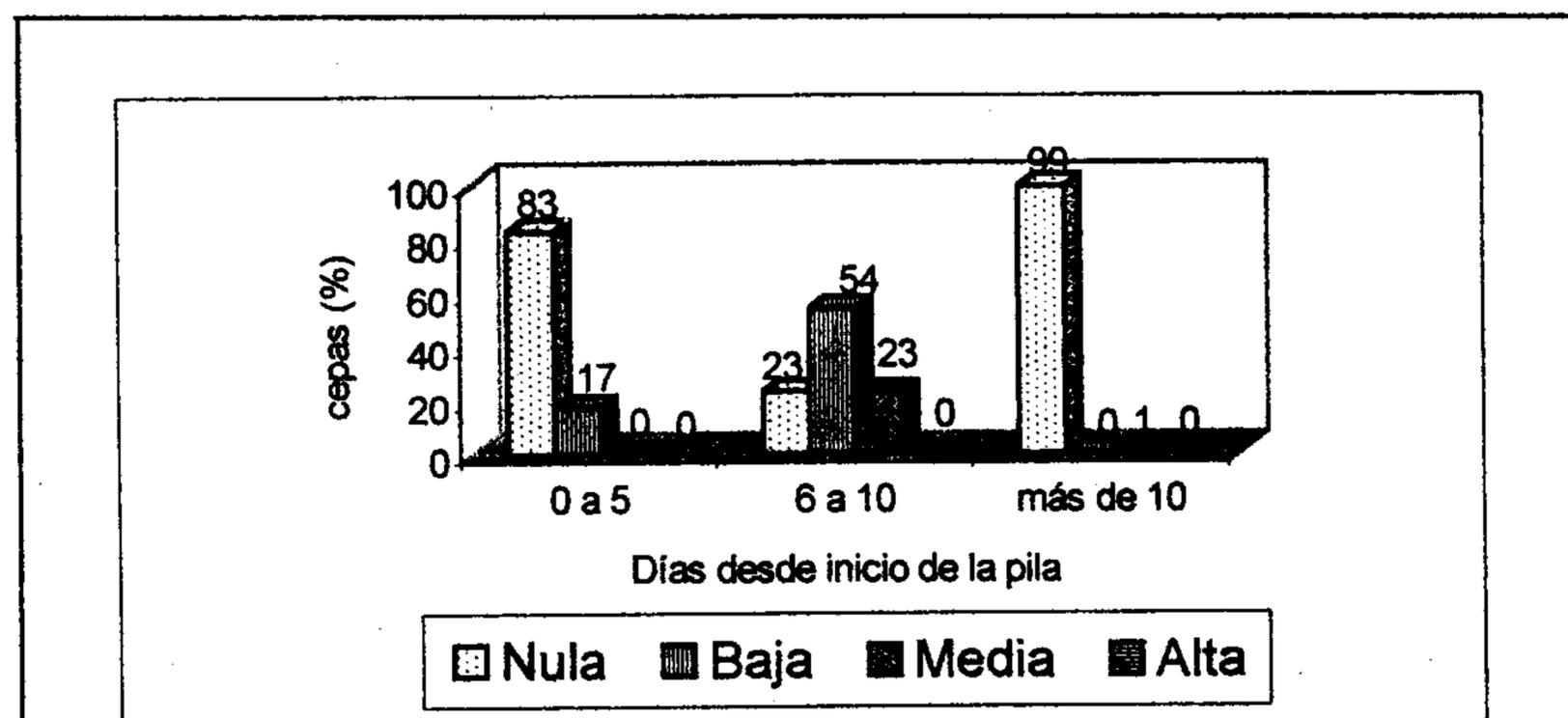


FIGURA 20 - Proporción de hongos con actividad celulolítica aislados de las pilas en distintos momentos.

CONCLUSIONES

1) De la población bacteriana los bacilos Gram (+) predominaron durante todo el período estudiado y las formas de resistencia en la etapa termófila.

2) Hubo una mayor proporción de bacterias que de hongos con actividad amilolítica, desapareciendo pronto esta población debido al agotamiento del almidón como fuente de C.

3) La actividad lipolítica se mantuvo por más tiempo que la amilolítica.

4) Existió una mayor proporción de hongos que de bacterias con actividad celulolítica.

REFERENCIAS

1. ALEXANDER, M. Introducción a la microbiología del suelo. México, AGT Editor, 1980. 481 p.
2. BENINTENDE, S.; DE CARLO, E.; ROSA, A.; RODRIGUEZ, J.; CARIELLO, M.; CASTAÑEDA, L.; FIGONI, E.; GRASSO, N.; MASCHERONI, F. & RUIZ, A. Evolución de la población microbiana en el proceso de compostaje de residuos orgánicos domiciliarios. In: Stegmayer, Permasetti & Bello (eds). II Reunión Científico Técnica de la Biología del Suelo del NOA y el II Encuentro sobre Fijación Biológica del Nitrógeno, Catamarca, Argentina, 1999, p. 89-91
3. BROCK, T. D. & MASIGAN, M. T. Microbiología. 6ª ed. México, Prentice Hall Hispanoamericana, 1993. 953 p.
4. CARPIO, A.; DE CARLO, E.; ROSA, A.; CARIELLO, M.; CASTAÑEDA, L.; FIGONI, E.; GRASSO, N.; MASCHERONI, F. & RUIZ, A. Optimización de técnicas para la obtención de un compost regional y su utilización por la comunidad como mejorador de suelos. Ciencia, Docencia y Tecnología, 15: 25-42, 1997.
5. DALZELL, H. W. ; BIDDLESTONE, A. J.; GRAY, K. R. & THURAIRAJAN, K. Manejo del suelo: producción y uso de compost en ambientes tropicales y subtropicales. Roma, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1991. 178 p.
6. FINSTEIN, M. S. & MORRIS, M. L. Microbiology of municipal solid waste composting. Adv Ind. Mic., 14: 113-51, 1975.
7. FRIONI, L. Procesos microbianos. Córdoba, Editorial de la Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, 1999. Tomo II, 286 p.
8. GALLER, W. S. & DAVEY, C. B. Livestock waste management and pollution abatement. Publ. PROC., 271: 159-62, 1971.
9. JACKSON, M. Análisis químico del suelo. 2º ed. Barcelona, Editorial Omega, 1964. 662 p.
10. LAMBAIS, M. R. Poluição orgânica e seu controle, em microbiologia do solo. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 91-104.
11. MC CLURE, K. E.; KLOSTERMAN, E. W. & JOHNSON, R. R. Ohio report on research and developments in agriculture, home economics and natural resources. Ohio Agricultural Research and Development Center, 55: 78 - 9, 1970.

12. MORREY, A. & KILBERS, G. Simple media containing stabilized Tributyrin for demonstrating lipolytic bacteria in food and soils. *Applied Microbiology*, 19: 25-32, 1975.
13. MUSTIN, M. *Le compost: gestion de la matière organique*. Paris, Ed. Dubus, 1987. 954 p.
14. O'LEARY, W. *Practical handbook of microbiology*. USA, CRC Press, 1989. 681 p.
15. SEGOVIA, R. F.; GIULIETTI, A. L.; PENNACCHIONI, J. R.; NUÑEZ, S. N.; VERGARA, L. M. & MORENO DE NEME, M. Biotecnología aplicada a la producción de abonos orgánicos biológicos. In: Stegmayer, Pernasetti & Bello (eds.). II Reunión Científico Técnica de Biología del Suelo del NOA y II Encuentro sobre Fijación Biológica del Nitrógeno. Catamarca, Argentina, 1999, p. 97 - 100
16. SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. & HOLT, J. G. *Manual of systematic bacteriology*. Baltimore, USA, William & Wilkins, 1986. Vol. 2.
17. WOLLUM II, A. Cultural methods for soil microorganisms. In: Page et al. (eds.). *Methods of soil analysis. Part 2*. USA, ASA, 1982. p. 781-801.