

UCH-FC
Biotecnología
S211
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Relaciones entre diversidad microbiana y parámetros ambientales durante el compostaje de alperujo”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en biotecnología molecular

Ricardo Sánchez Sánchez

Directora del Seminario de Título: María Teresa Varnero

Co-Directora: Margarita Carú

Septiembre 2015

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

RICARDO MARIO SÁNCHEZ SÁNCHEZ

“Relaciones entre diversidad microbiana y parámetros ambientales durante el compostaje de alperujo”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Prof. María Teresa Varnero Moreno
Directora Seminario de Título

Dra. Margarita Carú Marambio
Co-Directora del Seminario de Título

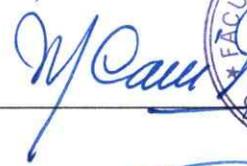
Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Nicolás Guilliani
Presidente Comisión

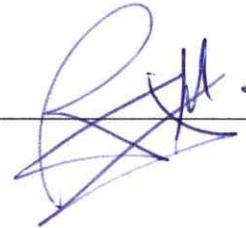
Dr. Marcelo Baeza Cancino
Evaluador

Santiago de Chile, septiembre de 2015





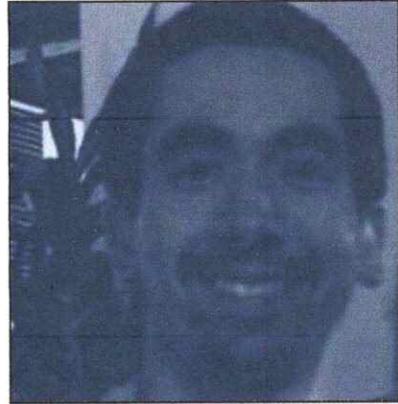






BIOGRAFÍA

Mi nombre es Ricardo Mario Andrés Sánchez Sánchez, nací en Santiago el 9 de noviembre de 1989 y viví en el pueblo de Calera, V Región, hasta los 4 años. Estudié en el colegio Pedro Aguirre Cerda hasta 1ero básico, el resto de la enseñanza escolar la realicé en el liceo Leonardo Murialdo, en la comuna de Recoleta. Gran parte de dicha etapa



pasaba con el cuidado de mi abuela a la cual le agradezco mucho su cariño, apoyo y conocimientos transmitidos. Junto con los amigos y amigas de esa época, que reí y disfruté mucho con ellos y ellas.

Siempre me atrajeron las humanidades y la reflexión crítica de nuestra realidad, por la influencia de mi entorno, especialmente de mis hermanos, junto con mi interés por la música, el cine y escribir sobre aquello. Sin embargo la ciencia me llamaba y llama mucho la atención, los descubrimientos, sus deducciones y teorías complejas, su metodología y rigurosidad a la hora de observar la realidad concreta. Era un desafío, ir en contra de lo esperable y por lo tanto un camino que quise afrontar en función de ello, de siempre en la vida tomar lo difícil, lo complicado, ya que ello me permitiría transformarme a mí y a las personas a mi alrededor, en esta realidad moldeada desde antes que nacemos.

Decidí entonces estudiar en la universidad, donde me agradó el área de biología molecular y decidí cambiarme de licenciatura en química a biotecnología. Hoy en día los proyectos realizados, incluyendo este seminario, son aprendizajes, adquisición de herramientas necesarias para poder afrontar proyectos más grandes y deseables, que contemplen por ejemplo; Grupos de trabajos interdisciplinarios, la integración de problemáticas sociales, como en el área ambiental, de salud y a la gente no académica en los proyectos, explicitando un posicionamiento y objetivo político anti hegemónico.

Esto será la que he llamado "nueva ciencia", inexistente en este trabajo y en pocos a la fecha de otras personas. Pero que espero y esperamos construir muchos y muchas conmovidos y conmovidas por transformar profundamente esta sociedad. Que si bien requiere un cambio político-estructural, estas futuras acciones se pueden considerar de resistencia, tensión, generación de condiciones y posibilidad de integración y enmarque en un proyecto político organizativo emancipatorio propiamente tal.

AGRADECIMIENTOS

A Cecilia, Mario, Carlos y Jorge, por ser mi fuente infinita de apoyo, amor y aprendizaje.

A las profesoras María Teresa Varnero, Margarita Carú y a las personas de sus laboratorios, que gran paciencia tuvieron y su apoyo material, de conocimientos y de cariño lo agradeceré siempre.

Y a mis amig@s de la universidad... ¡No los nombraré! Ustedes saben cómo soy. Créanme que antes era mucho más egoísta, propenso a la derrota y vivir en las nubes. Ustedes me han abierto de espíritu, me han levantado a la resistencia y aterrizado a la *pachamama*, a lo concreto, al inmediato. Larga vida a la lucha y a vuestros corazones en llamas, ¡incendiamos, vía la organización y la confrontación aquí y en cualquier parte, las paredes de esta realidad burguesa y patriarcal para construir la verdadera libertad!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE DE CONTENIDOS.....	v
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
2.1. Montaje de pilas de compostaje.....	10
2.2. Medición de parámetros fisicoquímicos.....	11
2.2.1. Temperatura.....	11
2.2.2. Porcentaje de humedad.....	11
2.2.3. Conductividad y pH.....	12
2.2.4. Porcentaje de materia orgánica.....	12
2.2.5. Porcentaje de nitrógeno total.....	13
2.3. Índice de madurez.....	14
2.3.1. Medición de índice de germinación.....	14
2.3.2. Medición de desprendimiento de CO ₂	15
2.4. Determinación de la diversidad genética de los grupos microbianos.....	17
2.4.1 Purificación del DNA y amplificación por PCR.....	17

2.4.2 Perfiles de T-RFLP.....	20
2.4.3 Análisis de perfiles de T-RFLP.....	21
2.4.4. Determinación de la dinámica (Di).....	22
2.5. Relaciones entre parámetros fisicoquímicos e índices de diversidad.....	22
2.6. Análisis estadístico.....	23
RESULTADOS.....	25
3.1. Parámetros fisicoquímicos durante el proceso de compostaje.....	25
3.1.1. Temperatura.....	25
3.1.2. Humedad.....	26
3.1.3. pH.....	27
3.1.4. Conductividad.....	28
3.1.5. Razón C/N.....	28
3.2. Índice de madurez.....	28
3.2.1. Determinación de fitotoxicidad.....	28
3.2.2. Estabilidad biológica de las muestras.....	30
3.3. Patrones de T-RFLP durante el compostaje.....	31
3.3.1. Purificación del DNA y amplificación de los marcadores moleculares.....	31
3.3.2. Análisis de perfiles de T-RFLP.....	31
3.3.3. Determinación de índices de diversidad y equidad.....	33
3.3.4. Dinámica de los grupos (Di).....	37
3.4. Relaciones entre parámetros fisicoquímicos y diversidad genética.....	40

DISCUSIÓN.....	43
4.1. Proceso de compostaje y calidad del compost.....	43
4.2. Diversidad microbiana durante el compostaje de alperujo.....	50
4.3. Dinámica de los grupos microbianos.....	54
4.4. Proyecciones.....	56
CONCLUSIONES.....	58
BIBLIOGRAFIA.....	59
ANEXOS.....	65
1) Parámetros fisicoquímicos.....	65
2) Determinación del índice de madurez.....	68
3) Identificación de TRFs.....	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Partidores usados para la amplificación de los genes marcadores.....	19
Tabla 2: Desprendimiento de CO ₂ de muestras.....	30
Tabla 3: Índices de diversidad (H) y equidad (J) para los distintos grupos microbianos durante el compostaje de alperujo.....	38
Tabla 4: Valores de tasa de cambio (Δ) del compostaje de alperujo para cada marcador.....	40
Tabla 5: Coeficientes de regresión lineal (R ²) en relación entre parámetros ambientales y muestras durante el compostaje para cada grupo y pila.....	41
Tabla 6: Comparación entre parámetros de normativa y compost obtenido.....	45
Tabla 7-15: Tablas de Anexo.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representación de los segmentos de DNA de <i>RNAr 16S</i> y <i>ITS1-ITS4</i>	8
Figura 2: Fotografías tomadas del sustrato trabajado.....	10
Figura 3: Montaje para la determinación de los índices de germinación.....	15
Figura 4: Esquema para la determinación del desprendimiento de CO ₂	17
Figura 5: Esquema de protocolo experimental para el T-RFLP.....	20
Figura 6: Medición de la temperatura durante el compostaje.....	26
Figura 7: Medición de pH, conductividad y razón C/N durante el compostaje.....	29
Figura 8: Porcentajes promedios de índices de germinación.....	30
Figura 9: Imágenes de geles de productos de amplificación de los marcadores utilizados.....	32
Figura 10: Abundancias relativas de TRFs para el marcador <i>RNAr 16S</i> a lo largo del tiempo de compostaje.....	34
Figura 11: Abundancias relativas de TRFs para el marcador <i>ITS1-ITS4</i> a lo largo del tiempo de compostaje.....	35
Figura 12: Abundancias relativas de TRFs para el marcador <i>ACT</i> a lo largo del tiempo de compostaje.....	36
Figura 13: Porcentajes de cambio de abundancias relativas de TRFs entre muestras consecutivas en el tiempo.....	39
Figura 14: Relación entre curvas de conductividad, temperatura e índices de diversidad durante el compostaje para el grupo actinobacteria.....	42
Figura 15-17: Figuras de anexo.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ITS: "Internal transcribed spacer" (espaciador intergénico transcrito)

PCR: "Polimerase chain reaction" (reacción en cadena de polimerasa)

DGGE: "Denaturing gradient gel electrophoresis" (electroforesis en gel denaturante)

RFLP: "*Restriction fragment length polymorphism*" (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)

T-RFLP: "Terminal restriction fragment length polymorphism" (polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción)

OTU: "*Operational taxonomic unit*" (unidad taxonómica operacional)

S: Siemens

σ : Conductividad eléctrica

Ω : Ohm

RESUMEN

En la producción de aceite de oliva mediante centrifugación en dos fases se genera el desecho "alperujo" el cual puede ser utilizado para producir compost. Durante el compostaje se establece una sucesión de grupos de microorganismos, con una diversidad característica en cada etapa y que se relacionaría con los cambios en los parámetros fisicoquímicos y con el tipo de material a compostar. El objetivo de este seminario de título fue estudiar el proceso de compostaje del alperujo: sus parámetros fisicoquímicos y las poblaciones de hongos, bacterias y actinobacterias. Para ello, se utilizó la técnica independiente de cultivo T-RFLP y los marcadores moleculares correspondientes, como la región intergénica *ITS1-ITS4* para hongos, el gen que codifica para el *RNAr 16S* de bacterias y una región específica del mismo gen para el seguimiento de las actinobacterias. Los grupos fúngico y bacteriano fueron los más diversos y dinámicos durante el proceso en comparación con las actinobacterias. No hay cambios significativos de la diversidad en el tiempo para los grupos bacteriano y fúngico y la diversidad del grupo actinobacteria se mantiene relativamente constante durante todo el proceso con un leve aumento al final del compostaje que se relacionó con la disminución de la temperatura y de la conductividad. El compost obtenido cumple con la normativa establecida considerando los parámetros pH, salinidad, relación carbono nitrógeno, humedad y el indicador de madurez. Los datos obtenidos de diversidad genética y parámetros fisicoquímicos durante el compostaje de alperujo permitirían diseñar estrategias para mejorar el proceso, tales como entregar condiciones ambientales más favorables (i.e. humedad o aireación) o el aislamiento de microorganismos, que puedan servir de base para formular inóculos, para acelerar y optimizar el compostaje de alperujo.

ABSTRACT

In the production of olive oil by centrifugation in two phases it is generated waste "alperujo" that can be used to produce compost. During composting a succession of groups of microorganisms it is established with a characteristic diversity at each stage and which relate to changes in the physicochemical parameters and the type of material to be composted. The aim of this seminar was to study the degree of composting process alperujo: their physico-chemical parameters and the populations of fungi, bacteria and actinobacteria. For this, independent culture technique T-RFLP and corresponding molecular markers, as the intergenic region *ITS1-ITS4* fungi, the gene coding for *16S rRNA* of bacteria and a specific region of the same gene to monitor was used to actinobacteria. The fungal and bacterial groups were the most diverse and dynamic during the process compared to the actinobacteria. No significant changes of the diversity for bacterial and fungal groups was detected and diversity of actinobacteria group remains relatively constant throughout the process with a slight increase at the end of composting which was associated with decreased temperature and conductivity. The compost obtained complies with established considering the parameters pH, salinity, carbon nitrogen ratio, moisture and maturity index. The data obtained from genetic diversity and physicochemical parameters during composting alperujo allow design strategies to improve the process, such as providing more favorable conditions (i.e humidity or ventilation) or isolation of microorganisms, which could serve as a basis for formulating inoculum, to accelerate and optimize the composting alperujo.

INTRODUCCIÓN

La producción nacional de aceite de oliva durante el año 2012 excedió las 11000 toneladas (Servicio Nacional de Aduanas y Chileoliva, 2013) generando una gran cantidad de desechos a partir de su metodología de extracción. En general, la extracción consiste en el lavado, molienda y batido de los frutos de olivo. El sustrato resultante se somete a centrifugación para obtener el aceite. Esta centrifugación puede ser de tres fases, donde se obtiene; aceite de oliva, orujo y agua de vegetación, siendo estos dos últimos desechos de la producción. Alternativamente, la centrifugación puede ser de dos fases, donde se obtiene; aceite de oliva y una mezcla de orujo y agua de vegetación que se conoce como "alperujo" y corresponde al desecho de producción (Alburquerque y cols., 2004). En su mayoría la producción de aceite de oliva se realiza en un sistema de dos fases, obteniendo como desecho el alperujo.

La composición química de la fracción orgánica del alperujo consta de lignina, hemicelulosa, celulosa, carbohidratos, proteínas, fenoles y carbohidratos solubles, estando estos tres últimos en baja cantidad (<10%) (Alburquerque y cols., 2004). El alperujo contiene compuestos fenólicos, grasas y ácidos orgánicos con propiedades fitotóxicas (Alburquerque., 2006), un pH que oscila entre 4 y 6, además de malos olores. La acidez y el mal olor del residuo pueden ser reducidos agregando una solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, que genera un producto distinto denominado "alperujo alcalino" (Ntougias y cols., 2006). La gran cantidad de generación de este desecho fitotóxico y con malos olores tiene un impacto ambiental negativo, por lo que el tratamiento del alperujo para generar nuevos productos es una opción para evitar esta problemática.

El alperujo puede ser tratado para producir aceite mediante una segunda centrifugación, secado y extracción química con hexano. Esta purificación es viable, pero de alto costo de producción, debido a los costos en la purificación del producto final el cual contiene hidrocarburos policíclicos contaminantes. Otro uso propuesto para el alperujo es la producción de compost.

Los análisis químicos para determinar la viabilidad del uso del alperujo para generar compost muestran que hay factores negativos, como su baja porosidad (mala aireación) y la presencia de componentes fenólicos y lipídicos que afectan al desarrollo de la microbiota y factores positivos, como su alta cantidad de lignina y carbohidratos que podrían ser utilizados como sustratos para la microbiota durante el compostaje (Alburquerque y cols., 2004).

Compost a partir de alperujo

El compost derivado del alperujo tiene un bajo costo de producción y usos significativos a nivel agrícola (O'Ryan., 2007). El compostaje corresponde a un proceso aeróbico, donde los residuos orgánicos biodegradables presentes en el producto a compostar se descomponen mediante oxidación bioquímica de la materia orgánica por acción, principalmente, de bacterias y hongos, generando agua, CO₂, energía calórica y materia orgánica estabilizada o "compost" (www.sinia.cl). Los principales parámetros que afectan el proceso de compostaje y por ende la calidad de compost son la temperatura, oxigenación, humedad y el tipo de material orgánico que se composte.

El compost es una fuente de materia orgánica biodisponible e inorgánica (como micronutrientes tales como; N, P, K, Ca, Mg, entre otros) que aumenta la fertilidad de suelos mediante la mejora de sus propiedades físicas y estructura (formación de agregados, aumento de porosidad y por ende la aireación y circulación de agua (Sierra y Rojas., 2003) también ayuda al crecimiento de las plantas, dada la mineralización de la materia orgánica disponible y aumento y diversificación de la microbiota del suelo (aumento de actividades biológicas asociadas) (O’Ryan., 2007),

Algunos autores sugieren que el uso de compost de sustrato de hojas de olivo y fragmentos de orujo podría mejorar la resistencia sistémica ante patógenos como *Botrytis cinérea* como se demostró para la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Segarra y cols., 2013). El uso de compost podría también degradar xenobióticos y compuestos recalcitrantes en suelos contaminados por acción de la microbiota presente en el compost (Semple y cols., 2001).

Según la normativa chilena oficial, el compost comercializado e importado debe tener ausencia de materias inertes (vidrio, arena, plástico, metales pesados) y microorganismos patógenos (coliformes fecales, salmonella, huevos de helmintos viables). De acuerdo a su nivel de calidad el compost se puede clasificar en Clase A, el cual no tiene restricciones de uso y Clase B, de calidad intermedia, que puede presentar restricciones de uso debido a algunas propiedades fisicoquímicas como su mayor conductividad eléctrica, un indicador de salinidad, ya que hay plantas sensibles a este parámetro como por ejemplo algunas plantas ornamentales o de interés agrícola. Los parámetros fisicoquímicos deben estar dentro de rangos establecidos; pH (5,5-8,5), conductividad eléctrica (<3 dS/m para Clase A y ≤ 8 dS/m para Clase B) y razón carbono/nitrógeno “C/N” (≤ 25 para Clase A y ≤ 30 para Clase B) (www.sinia.cl).

Además, se requiere establecer el indicador de madurez para definir el término del compostaje y la obtención de compost maduro. Este indicador queda en función de 2 parámetros; el índice de germinación (IG), relacionado con la madurez química y que es determinable mediante un ensayo de fitotoxicidad del compost sobre especies de plantas indicadoras, debiendo tener un valor mayor a 80% y la estabilidad biológica, medida en relación al desprendimiento de CO₂ y que debe tener valores menores a 8 mg C-CO₂/g materia orgánica (M Org)/día (Varnero y cols., 2007; Varnero y cols., 2004).

Se denomina compost "maduro" al que tiene todas las propiedades anteriormente mencionadas dentro de los rangos establecidos y por lo tanto es apto para el uso agrícola. En el caso del alperujo, hay antecedentes bibliográficos que indican que el uso de agentes de carga como hojín (restos de hojas y ramas obtenidas tras la limpieza de las aceitunas) y estiércol de vacuno, el que permite la reducción de la relación C/N y la fitotoxicidad (www.expoliva.com), facilita el proceso de compostaje.

Microbiota en el compostaje del alperujo

Durante el compostaje se distinguen tres fases en función de la temperatura, la actividad metabólica de los microorganismos presentes en cada etapa y la liberación de calor. Por orden de aparición las fases son las siguientes: Mesofílica inicial (10-40 C°), termofílica (40-75 °C°), enfriamiento (<45 °C) y maduración (temperatura ambiente) (O’Ryan, 2007), luego de las cuales se obtiene por lo general un compost maduro en relación a los parámetros indicados anteriormente.

Para estudiar e identificar los microorganismos en las distintas etapas del compostaje se han usado métodos dependientes de cultivo, los cuales revelan la presencia de microorganismos específicos, por ejemplo de los grupos *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Actinobacterias* en compostaje de alperujo (Federici y cols., 2011) y bacterias oxidadoras de azufre como *Paracoccus* y *Halothiobacillus* en compostaje de alperujo alcalino (García de la Fuente y cols., 2011) ambos ejemplos corresponden a la etapa de maduración. También se han aislado hongos ascomicetes desde el sustrato inicial de alperujo y detectado actividades enzimáticas tales como; celulasa, β -glucanasa, β -glucosidasa, peroxidasa y poligalacturonasa (Romo-Sánchez y cols., 2010).

Sin embargo, debido a las limitaciones en el cultivo de microorganismos, se han desarrollado metodologías independientes de cultivo para detectar la diversidad microbiana en muestras ambientales. Estos procedimientos se basan en la extracción del DNA desde el compost, amplificación de marcadores moleculares específicos por PCR y resolución de los amplicones mediante DGGE, T-RFLP, librería de clones, entre otras. Entre los marcadores moleculares más usados para estudiar la diversidad microbiana están los genes que codifican para los RNAs ribosomales, los cuales revelan que, en las etapas iniciales del compostaje de alperujo, son dominantes las proteobacterias pertenecientes a los grupos *Alpha*, *Beta* y *Gamma* (Vivas y cols., 2008). En el caso de los hongos, usando como marcadores la región intergénica de los genes ribosomales (*ITS1-ITS4*), los grupos fúngicos que predominan en las etapas iniciales del compostaje son *Pichia caribbica*, *P. holstii* y *Zygosaccharomyces fermentati* (Romo-Sánchez y cols., 2010).

Las técnicas independientes de cultivo revelan que en alperujo mezclado con astillas de madera de olivo (95% alperujo, 5% astillas), se produce un aumento en la diversidad de bacterias hasta la etapa termofílica y también un aumento de la diversidad de hongos a lo largo de todo el proceso, usando como marcadores moleculares la región V3-V5 del gen ribosomal 16S y la región D1-D2 del gen ribosomal 28S respectivamente (Agnolucci y cols., 2013). Esto sugiere que existiría una relación entre los cambios de los parámetros fisicoquímicos del proceso y la diversidad de grupos de microorganismos.

Los estudios de diversidad también se pueden focalizar en grupos microbianos específicos, como las actinobacterias. Este grupo corresponde a bacterias filamentosas, gram positivas con alto contenido G+C que se encuentran en diversos ambientes y que son de importancia en la agricultura, industria, medicina, biorremediación, entre otras (Stach y cols., 2003). Las actinobacterias cumplirían un rol importante en la etapa de maduración, dada su actividad de degradación de la lignocelulosa y compuestos recalcitrantes en el compostaje (Steger y cols., 2007b).

Además, durante el compostaje, cada grupo microbiano tendría una dinámica particular, entendida como los cambios de abundancia de especies u OTUs (unidades taxonómicas operacionales) en un intervalo de tiempo definido. Un grupo dinámico es el que tiene un alto recambio de especies o OTUs en un tiempo definido (Marzorati y cols., 2008). En el compostaje existiría una relación entre la dinámica de los grupos microbianos y los cambios fisicoquímicos, dada la sucesión de microorganismos durante el proceso relacionados con las etapas térmicas.

Por lo tanto, el análisis de los cambios de diversidad (riqueza y abundancia) de los grupos bacteriano, fúngico y actinobacteria durante el compostaje del desecho industrial "alperujo" sería de relevancia para diseñar estrategias de mejora en la maduración y desarrollo del proceso.

Detección de cambios en la diversidad mediante técnica de T-RFLP

El T-RFLP corresponde a una técnica de "fingerprinting" del DNA (Liu y cols., 1997; Marsh y cols., 2000) generalmente basada en el uso de los genes ribosomales como marcadores moleculares; para bacterias el gen que codifican para el *RNAr 16S* y *23S* y en el caso de hongos los genes que codifican el *RNAr 18S*, *28S* y las regiones intergénicas *ITS1* e *ITS2* (Fig. 1). Esta técnica se usa para comparar la diversidad de comunidades microbianas y consiste en la amplificación de una región génica con un partidor marcado con un fluoróforo en el extremo 5'. Luego, el producto amplificado y marcado es digerido con una o más enzimas de restricción de corte frecuente, donde los fragmentos terminales (TRFs) marcados con fluorescencia son separados por electroforesis capilar.

Los perfiles de T-RFLP (electroferograma) proporcionan datos cuantitativos sobre cada TRF detectado, incluyendo el tamaño en pares de bases e intensidad de fluorescencia que es una medida de la riqueza y abundancia relativa de cada TRF respectivamente. Por lo tanto, este método proporciona información sobre la diversidad de las comunidades bacterianas presentes en muestras ambientales (Schütte y cols., 2008).

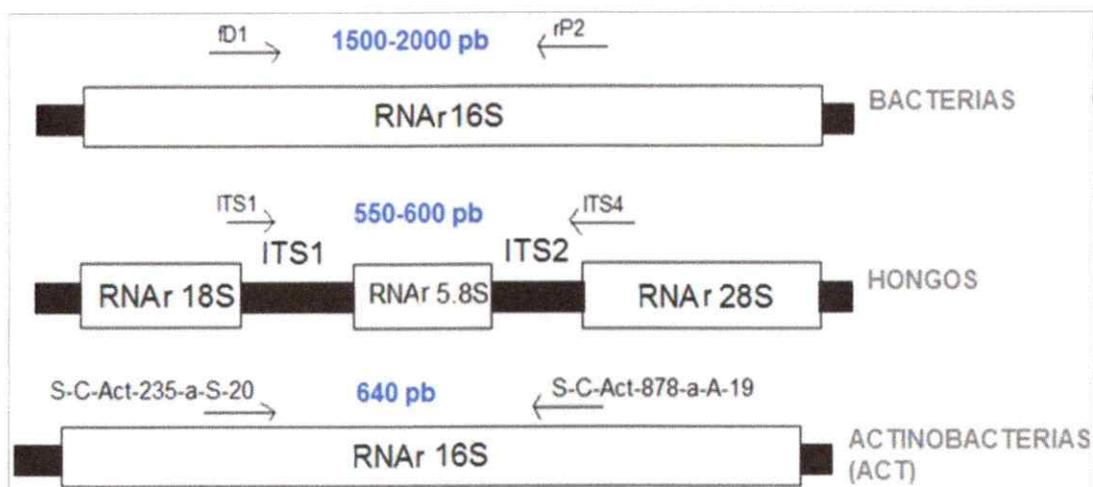


Figura 1. Representación de los segmentos de DNA que amplifican rDNA a utilizar para un experimento de T-RFLP. En la imagen superior se observa el gen del *RNAr 16S* en bacterias y la posición de los primarios *Fd1-Rp2*. En la imagen inferior se muestra la región de los genes ribosomales de hongos y la ubicación de los primarios *ITS1* e *ITS4* que amplifican la región intergénica que comprende a los segmentos intergénicos *ITS1* e *ITS2* incluyendo el gen *RNAr 5.8S*.

En este seminario de título se propone evaluar los cambios en abundancia relativa que experimentan los diferentes grupos microbianos (bacterias, actinobacterias y hongos) y relacionar dichas variaciones con los parámetros fisicoquímicos durante el proceso de compostaje de alperujo. Este enfoque permitiría conocer y comparar la dinámica de los grupos microbianos. La información sería relevante para diseñar estrategias de mejora del proceso de compostaje del alperujo, en cuanto a favorecer condiciones fisicoquímicas para el desarrollo de microorganismos o bien aislar cepas microbianas de interés aplicado en etapas específicas del proceso de alta diversidad. Estos aislados podrían servir de inóculos para optimizar el tiempo de compostaje, teniendo en cuenta la alta o baja dinámica del grupo microbiano.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis: Durante el proceso de compostaje del alperujo se espera que ocurran cambios en la diversidad y la dinámica de los grupos microbianos estudiados (hongos, bacterias y actinobacterias) en relación con los cambios en los factores fisicoquímicos durante el proceso, especialmente con la temperatura, que define etapas críticas durante el compostaje.

Objetivo general: Evaluar los cambios en la diversidad de los grupos bacterianos, fúngicos y actinobacterias y relacionarla con la variación de parámetros fisicoquímicos durante el compostaje de alperujo.

Objetivos específicos:

- a) Determinar los parámetros fisicoquímicos de temperatura, porcentaje de humedad, razón C/N, pH y conductividad eléctrica a lo largo del proceso de compostaje.
- b) Establecer el indicador de madurez del compost.
- c) Determinar la abundancia relativa y riqueza de los TRFs de bacterias, actinobacterias y hongos durante el compostaje del alperujo mediante patrones de T-RFLP.
- d) Determinar la dinámica de los grupos de microorganismos a lo largo del proceso de compostaje.
- e) Establecer correlaciones entre los parámetros fisicoquímicos y la diversidad de los grupos microbianos estudiados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Montaje de pilas de compostaje

En el mes de enero del año 2014 se montaron 3 pilas piramidales de 1 m³ con una mezcla de alperujo y paja de trigo, en una relación de 3:1 en la planta piloto de compostaje de AGRIMED ubicada en la comuna de La Pintana, Santiago de Chile. El alperujo provenía de "Comercial y Agroindustria SOHO S.A." (comuna de Paine) y tenía una edad de 3 meses (Fig. 2). El proceso de compostaje se realizó entre los meses de enero e inicios de junio. Para mantener una buena aireación de las pilas se realizaron volteos manuales cada semana evitando pozos anaerobios y sobrecalentamiento. Además se aplicaron riegos con agua de pozo dos veces por semana para controlar la humedad, que debe estar entre 40-60%.



Figura 2. Fotografías tomadas del sustrato trabajado. Imagen izquierda, alperujo con 3 meses de antigüedad; Imagen derecha, alperujo en proceso de compostaje.

2.-Medición de parámetros fisicoquímicos

Temperatura

La temperatura (T) se midió mediante un termómetro digital con vástago, en 6 puntos distintos: Dos al centro (20 cm y 40 cm de profundidad) y los otros cuatro a cada lado de la pila respectivamente (20 cm de profundidad). Luego, se calculó el promedio de las 6 mediciones para definir la temperatura final.

Las fechas de muestreo para mediciones de la humedad, la conductividad, el pH y la cantidad de carbono y nitrógeno se definieron en función de los cambios de temperatura significativos que se detectaron durante el compostaje (aproximación de isotermas).

Porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad (%H) se midió calculando la diferencia de peso de una muestra de una pila (peso inicial o "Pi"), alrededor de 90 g, con su peso resultante (peso final o "Pf") tras estar 3 días en una estufa de secado a 70 °C. El resultado se expresó en porcentaje, según la definición:

$$\% \text{Humedad} = \left(\frac{P_i - P_f}{P_i} \right) \times 100$$

Conductividad y pH

Los valores de conductividad (σ) y pH se obtuvieron de filtrados de muestra desde diluciones en una relación 1:5 v/v de muestra agua destilada, utilizando las muestras deshidratadas usadas previamente para el cálculo de la humedad. Los valores se obtuvieron mediante un conductímetro (unidad dS/m equivalente a $1/\Omega$ m) y un pH-metro basándose en las metodologías TMECC 04.10 y TMECC 04.11, respectivamente (TMECC., 2004). En cada medición, se determinó el pH y la conductividad de 3 réplicas por pila y se calculó posteriormente el promedio de los valores entre las 3 réplicas para obtener 1 valor por pila en cada medición. Los electrodos se lavan tras cada medición con agua destilada. El pH-metro es calibrado a pH 7 y 4 con soluciones tampones estándar específicas. En el caso del conductímetro es calibrado con yoduro de potasio. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente (alrededor de 25 °C).

Porcentaje de materia orgánica

El porcentaje de materia orgánica (%M Org) se midió según lo establecido por TMECC 0.507-A (TMECC., 2004) desde las muestras deshidratadas. Se pesaron con balanza analítica en crisol (peso de crisol o "pc") y se vertieron alrededor de 4 g de muestra por crisol y se determinó el peso resultante (peso de crisol con materia seca). Las muestras fueron calcinadas a 600 °C durante 2,5 h mediante una mufla. Posteriormente se pesaron los crisoles (peso de crisol con materia calcinada o "pcmc"), donde el contenido corresponde a la cantidad de cenizas por pérdida de masa y que en su mayoría correspondería a materia orgánica.

El %M Org queda definido de la siguiente manera:

$$\%M \text{ Org} = \frac{pcms - pcmc}{pcms - pc} \times 100$$

En cada medición, se determinó el %M Org de 3 réplicas por pila y se calculó posteriormente el promedio de los valores entre las 3 réplicas para obtener 1 valor por pila en cada medición. Desde el %M Org se puede obtener el porcentaje de carbono orgánico (%C Org) según la siguiente razón:

$$\%C \text{ Org} = \frac{\%M \text{ Org}}{1,8}$$

Porcentaje de nitrógeno total

La cantidad de nitrógeno se midió desde las muestras deshidratadas, estableciéndose una muestra única de 50 g en proporciones equitativa con el material de las 3 pilas. Las muestras fueron enviadas al laboratorio AGROLAB donde mediante el método TMECC 04.02-DD (TMECC., 2004), basado en el método *Kjeldahl* (determinación de nitrógeno total a partir de digestión de derivados y titulación de amoníaco) se determinó el porcentaje de nitrógeno total (%N).

Con los datos de carbono y nitrógeno se obtuvo el valor de la relación carbono nitrógeno (C/N).



3.- Índice de madurez

Medición de índice de germinación

El ensayo de germinación se realizó para evaluar la madurez química del compost proveniente de la fase de maduración y se utilizaron como especies indicadoras de fitotoxicidad rabanito (*Raphanus sativus*) y lechuga (*Lactuca sativa*) al ser altamente sensibles a compuestos fitotóxicos (Vamero y cols., 2007).

Para el test se realizaron 3 réplicas por cada pila y para cada especie indicadora más 3 réplicas control con agua destilada. Cada replica consistió en una placa donde se colocaron 10 semillas con 10 mL de filtrado de muestra, obtenido en una relación de 1:5 v/v de muestra y agua destilada (Fig. 3). Las semillas se incubaron durante 3 días a 25 °C y luego se determinó el porcentaje de germinación con respecto a las semillas germinadas en el control con agua (100 % de germinación). De igual forma, se midió el largo de la radícula de cada semilla germinada respecto del largo obtenido en el control (Vamero y cols., 2007).

Los porcentajes establecidos para el cálculo del índice de germinación son definidos a continuación:

Porcentaje de Germinación relativo (GR):

$$GR(\%) = \frac{N^{\circ} \text{ DE SEMILLAS GERMINADAS EN EXTRACTO}}{N^{\circ} \text{ DE SEMILLAS GERMINADAS EN TESTIGO}} \times 100$$

Largo de radícula relativo (ER):

$$ER(\%) = \frac{LARGO \text{ PROMEDIO DE RADÍCULAS EN EXTRACTO}(cm)}{LARGO \text{ PROMEDIO DE RADÍCULAS EN TESTIGO}(cm)} \times 100$$

Índice de germinación (IG):

$$IG(\%) = \frac{GR \times ER}{100}$$

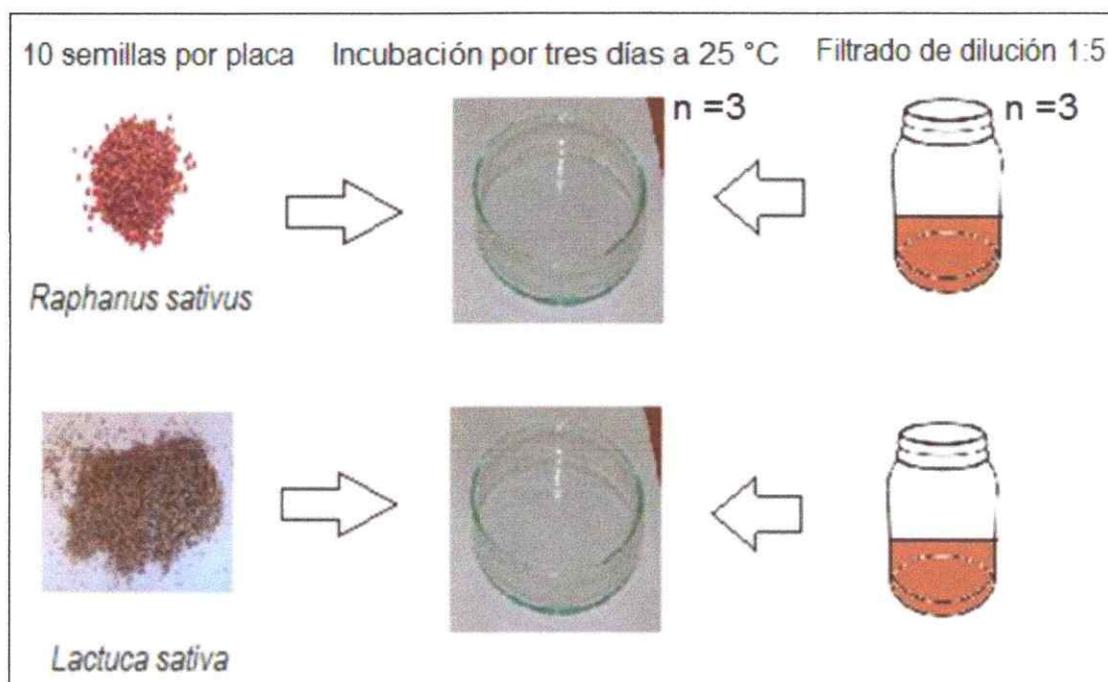


Figura 3. Montaje experimental para la determinación de los índices de germinación de cada especie indicadora utilizando el compost de alperujo como sustrato.

Medición de desprendimiento de CO₂

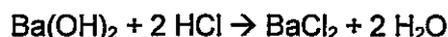
El desprendimiento de CO₂ se midió desde las muestras de compost durante la fase de maduración y tiene relación con el nivel de actividad de microorganismos heterotróficos (Varnero y cols., 2004); un bajo nivel indicaría estabilidad en la proliferación de estos microorganismos. Se utilizan 20 g por pila y cada muestra se lleva a humedad óptima con agua destilada (60% de humedad).

Se estableció además una muestra control, que solo contiene agua destilada. El montaje experimental se muestra en la Figura 4, el cual consiste en colocar un frasco grande con la muestra (compost) y un frasco pequeño destapado que contiene 10 mL de NaOH 0,2 M. Los frascos se incubaron durante 24 h a 28°C. Una vez terminada la incubación se destaparon los frascos grandes y los frascos con NaOH se taparon inmediatamente. Para determinar el desprendimiento de CO₂, se agregó a cada frasco con NaOH, 2 mL de BaCl₂ 0,2 M y entre 3 a 5 gotas de fenolftaleína. Las soluciones se titularon con HCl 0,1 M, identificando el punto de neutralización por el cambio de color de azul a blanco (Frioni., 1999).

Las reacciones químicas que ocurren en el proceso experimental se especifican a continuación:



Y el exceso de NaOH reacciona con BaCl₂ para formar Ba(OH)₂ el cual se titula con HCl;



El desprendimiento de CO₂ se determina a partir del volumen de HCl gastado, como se indica a continuación:

$$X \text{ ml de HCl } 0,1 \text{ M gastado} = X/2 \text{ ml NaOH } 0,2 \text{ M (que no reaccionó con CO}_2\text{)}.$$

$$1 \text{ ml de NaOH } 0,2 \text{ M equivale a } 1,2 \text{ mg de CO}_2.$$

La cantidad de carbono contenido en el CO₂ (C-CO₂) se define como:

$$\text{mg C-CO}_2 = \text{mg CO}_2 \times \frac{12}{44}$$

El C-CO₂ se divide por la cantidad de materia orgánica (g M Org), determinada por calcinación de las muestras utilizadas, de manera que el resultado final quede expresado como; mg C-CO₂/g M Org/día. El valor obtenido desde la muestra control o blanco es el correspondiente al del ambiente, por lo que se resta a los valores por pila.

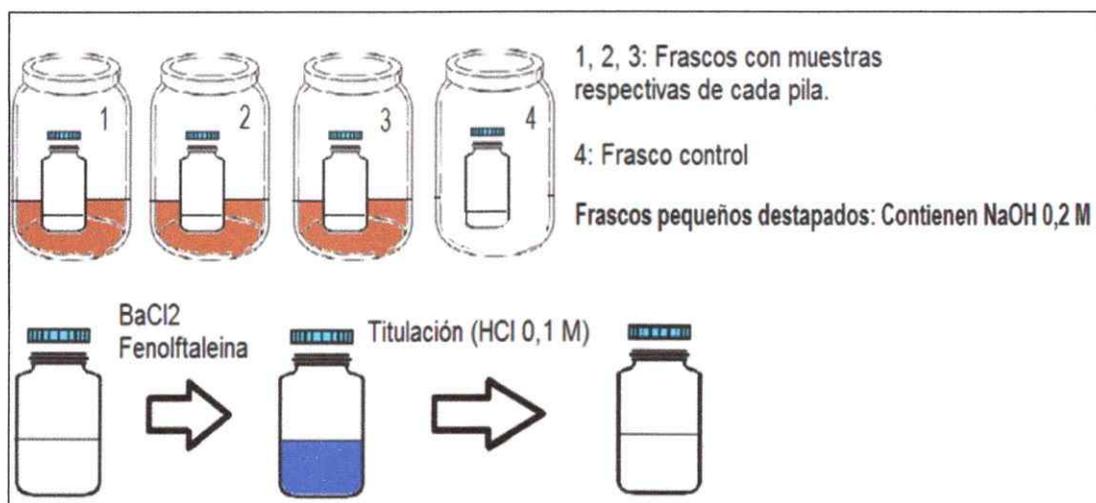


Figura 4. Esquema de experimento para la determinación del desprendimiento de CO₂ en cada muestra. Luego de la incubación, los frascos pequeños son sacados y tratados con BaCl₂ y titulados con HCl 0,1 M.

4.- Determinación de la diversidad genética de los grupos microbianos

Purificación del DNA y amplificación por PCR

Para el análisis de diversidad, se colectaron 3 muestras en 3 puntos al azar en cada pila (3 réplicas por pila) a 40 cm de profundidad. Los tiempos de colecta de las muestras son los mismos en que se realizó la determinación de los parámetros fisicoquímicos (Fig. 6). Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su uso.

La purificación del DNA se realizó con el kit "*Power soil isolation kit*" (MO-Bio) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Las muestras de DNA se amplificaron por PCR, utilizando partidores específicos para cada grupo microbiano (Tabla 1). Todas las reacciones de amplificación se prepararon con un GoTaq® Green Master Mix (DNA polimerasa en buffer de reacción 1X (pH 8,5), 200 uM de cada dNTP y 1,5 mM de MgCl₂) (Promega, WI, USA), 10 uM de cada partidor y 1 uL de muestra de ADN, completando con agua un volumen total de mezcla de 25 uL. Para el caso del par de partidores *Fd1-Rp2* se utilizó la mitad del volumen.

El ciclo para la amplificación del gen que codifica el *RNAr 16S* consistió en una denaturación inicial de 3 min a 94 °C, más 30 ciclos con denaturación a 94 °C por 1 min, alineamiento a 57 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 2 min. Se finalizó con una extensión de 7 min a 72 °C.

Para la amplificación de la región intergénica *ITS1-ITS4* el ciclo consistió en una denaturación inicial de 3 min a 94 °C más 30 ciclos con denaturación a 94 °C por 30 s, alineamiento a 57 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 min 30 s. Se finalizó con una extensión de 10 min a 72 °C.

Para la amplificación de la región del gen que codifica el *RNAr 16S* específico para actinobacterias, de ahora en adelante denominado *ACT*, el ciclo consistió en una denaturación inicial de 1 min a 94 °C más 15 ciclos con denaturación a 94 °C por 1 min, alineamiento a 57 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 2 min. Se finalizó con una extensión de 7 min a 72 °C.

La calidad de los amplificadores se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% p/v teñido con "Gel red". Las condiciones de electroforesis fueron 80 V, 400 mA y 70 min de corrida. Para todos los experimentos se utilizó el marcador de peso molecular 100-3000 bp (*Fermentas*) y agua esterilizada como control negativo. Los controles positivos utilizados fueron DNA de cianobacteria del género *Nostoc* para el gen *RNAr 16S*, *Penicillium expansum* para el segmento *ITS1-ITS4* y la actinobacteria *Frankia sp* para ACT.

Tabla 1. Partidores usados para la amplificación de los genes ribosomales

Nombre de partidor	Secuencia (5' → 3')	Gen que amplifica	Tamaño esperado (bp)	Referencia
S-C-Act-235-a-S-20	CGCGGCCTATCAGCTTGTTG	Región de <i>RNAr 16S</i> en actinobacterias	640	Stach y cols., 2003
S-C-Act-878-a-A-19	CCGTACTCCCCAGGCGGGG			
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Segmento <i>ITS1-ITS4</i> en hongos	550 – 600	Gardes y Bruns., 1993
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Región de <i>RNAr 16S</i> en bacterias	1500 – 2000	Weisburg y cols., 1990
rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT			

Perfiles de T-RFLP

Un esquema del protocolo experimental se muestra en la Figura 5. Para la amplificación de las regiones génicas en estudio se utilizaron pares de partidores (Tabla 1) en el cual uno de ellos, el partidador delantero o "forward", estaba marcado con el fluoróforo *FAM* en el extremo 5'. La calidad de los amplificados se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa, según lo descrito con anteriormente. Los productos de PCR obtenidos se purificaron mediante un protocolo establecido (*Promega Wizard SV gel and PCR clean up system*) y se realizó la digestión con la enzima de restricción de corte frecuente *HhaI* ($GCG^A C$). La solución se incubó a 37 °C por 16 h y se inactivó posteriormente a 80 °C por 20 min. Los fragmentos de restricción obtenidos fueron recuperados con etanol frío y resuspendidos en TE (pH 8). Las muestras fueron guardadas a -20 °C. La separación e identificación de los TRFs se realizó por electroforesis capilar, en un analizador genético (*Applied Biosystems*) del cual entrega un electroferograma característico de la comunidad en estudio, donde se observa el número de TRFs de cada muestra (riqueza) y la fluorescencia de cada TRF (abundancia).

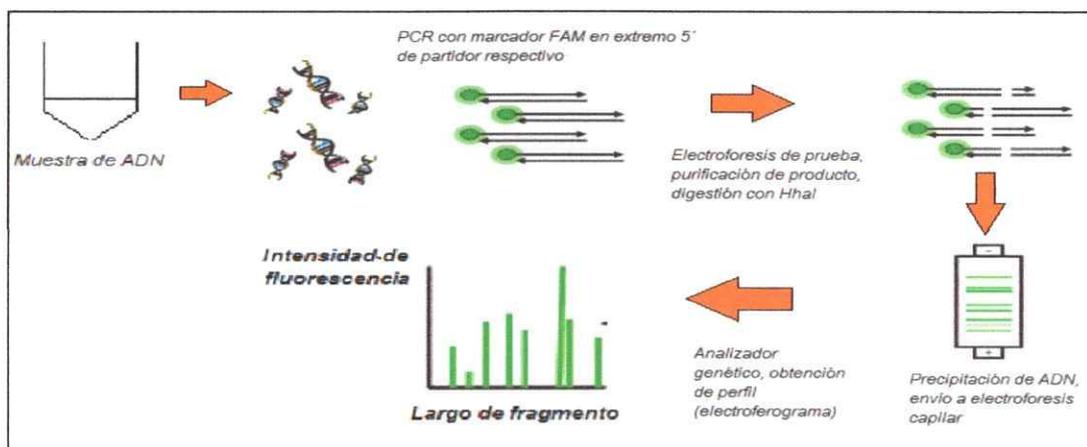


Figura 5. Esquema de protocolo experimental para el T-RFLP.

Análisis de perfiles de T-RFLP

El electroferograma identifica a cada TRF por su tamaño en pares de base (bp) y su abundancia relativa en unidades de fluorescencia (UF). El electroferograma se estandarizó en base a;

(i) Establecimiento de un rango de longitud de fragmentos para la comparación de 50-1100 bp, señales de menor longitud no se consideraron, con el fin de eliminar la señal del partidor.

(ii) Identificación de las bandas significativas desde 200 UF.

(iii) Alineamiento manual de los perfiles en relación al tamaño molecular, según los siguientes criterios: Identificación de los TRFs que están presentes en al menos 2 muestras del total (TRFs principales) y agrupamiento entorno a los TRFs cercanos al principal en un rango de 10 bp.

(iv) Normalización de las unidades de fluorescencia en fluorescencia relativa de los TRFs (expresión de fluorescencia de cada TRF en porcentajes con respecto al total por muestra).

La fluorescencia relativa de cada TRF se utilizó como un indicador de la abundancia relativa de los OTUs presentes en cada muestra.

Se definió una matriz de abundancia relativa de los TRFs presentes en cada muestra y para cada marcador molecular utilizado. Ésta fue llevada al programa *Past software* donde se determinó el índice de diversidad de Shannon (H) y el índice de equidad (J) en cada muestra según las siguientes ecuaciones:

$$H = - \sum p_i \times \ln p_i$$

Donde "pi" corresponde a la abundancia de cada OTU con respecto al total de OTUs presentes en la muestra o riqueza (Begon y col., 1990).

$$J = \frac{H}{H_{\max}}$$

Determinación de la dinámica (Di)

La Di se define como el cambio en el número de especies dominantes en un intervalo de tiempo (Marzorati y cols., 2008). Por lo tanto este parámetro ecológico puede ser evaluado a partir de los perfiles de T-RFLP en relación al número de TRFs que se mantienen entre dos tiempos consecutivos de muestreo durante el proceso de compostaje según lo esquematizado en la Figura 6. Para ello se calculó la similitud entre los patrones de T-RFLP entre tiempos consecutivos utilizando el coeficiente de Dice. A partir de la similaridad entre los patrones, se calculó el porcentaje de cambio según la definición (Marzorati y cols., 2008);

$$\%cambio = 100 - \%similitud$$

Se grafican en el tiempo los porcentajes de cambio (entre dos tiempos consecutivos). La Di se cuantifica vía la tasa de cambio (Δt), correspondiente al promedio de los porcentajes de cambio en el tiempo. El análisis fue realizado desde el programa *Past software*.

5.- Relaciones entre parámetros fisicoquímicos e índices de diversidad

Las posibles correlaciones entre los parámetros fisicoquímicos y la diversidad medidos como índice de Shannon (H), determinada a partir de los perfiles de T-RFLP, se cuantificó vía el coeficiente R^2 (desde regresión lineal).

6.- Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas (RM ANOVA) de una vía con los datos de promedios de los parámetros fisicoquímicos de porcentaje de humedad y razón C/N, con el tiempo como factor de variabilidad, para detectar diferencias significativas entre las réplicas y diferencias entre los tiempos de muestreo. Se tomaron las pilas como réplicas al no tener los valores de los parámetros de porcentaje de humedad y razón C/N en replicados. Para los parámetros de temperatura, pH y conductividad se realizó un RM ANOVA de dos vías, con el tiempo y las pilas de procedencia como factores de variabilidad, para detectar diferencias significativas entre las pilas y diferencias entre los tiempos de muestreo, donde se realizó un post test (test de Tukey) para encontrar rangos de tiempo específico en que hay diferencias entre las pilas.

Para los índices de germinación se realizó un RM ANOVA de dos vías, con las especies indicadoras y las pilas como factores de variabilidad, para detectar diferencias significativas entre las especies indicadoras y entre las pilas.

Para los índices de diversidad y equidad (análisis por separado) se realizó un RM ANOVA una vía para detectar diferencias significativas entre los tiempos de muestreo para cada grupo microbiano, tomando el tiempo como factor de variabilidad.

Para los análisis de significancia estadística en los parámetros fisicoquímicos, índices de diversidad y equidad y índices de germinación se utilizó un porcentaje de confiabilidad de un 95% ($p= 0,05$), definiendo homogeneidad como hipótesis nula y diferencias como hipótesis alternativa. Los análisis se realizaron con el programa *Graphpad Prism (v.6.0)*.

La significancia de las correlaciones entre los índices de diversidad y los parámetros fisicoquímicos en el tiempo se realizó un ANOVA de una vía sobre los coeficientes R^2 , donde la hipótesis nula es que no hay relación entre las variables dependientes con las variables independientes y la hipótesis alternativa es que si hay relación, con un porcentaje de confiabilidad de un 95% ($p = 0,05$). Ambos análisis se realizaron utilizando el programa *Microsoft Excel 2010*.

RESULTADOS

1.-Parámetros fisicoquímicos durante el proceso de compostaje

Temperatura

El proceso de compostaje se realizó entre los meses de Enero y Junio. La duración total del proceso de compostaje fue de 155 días dado que en dicho periodo las pilas alcanzaron la temperatura ambiente tras la fase termofílica y están dentro de la normativa en relación al indicador de madurez, como se muestra en resultados posteriores. En cada pila se distinguieron una etapa termofílica inicial entre 1-37 días con 65-70 °C, una etapa termofílica secundaria, entre los días 40-115 días con 60-42 °C, una fase de enfriamiento entre los días 121-129 con temperaturas entre 42-23 °C y finalmente una fase de maduración a partir del día 137 que corresponde a la fase donde las pilas mantienen la temperatura ambiente (Fig. 6). Las 3 curvas, correspondientes a cada pila de compostaje, poseen valores promedios de temperatura significativamente distintos en la etapa final, con un valor de p igual a 0,022, dado que las principales diferencias estarían entre los tiempos 108 a 125 (post test Tukey, valores de p para cada tiempo (comparación entre pilas) entre 0,0001 y 0,03). Y los valores promedios de temperatura durante el tiempo de compostaje (comparación entre tiempos) serían significativamente distintos, con un valor de p igual a 0,0001, los que definen las distintas etapas del compostaje (Fig. 6).

En la Figura 6 se indican los tiempos de muestreo que se seleccionaron para la medición de los otros parámetros fisicoquímicos y los perfiles de T-RFLP. Estas siete

muestras se designaron como: T1 a T7. Donde T7 es una muestra que se realiza con el objetivo de establecer el término del proceso, determinando el indicador de madurez.

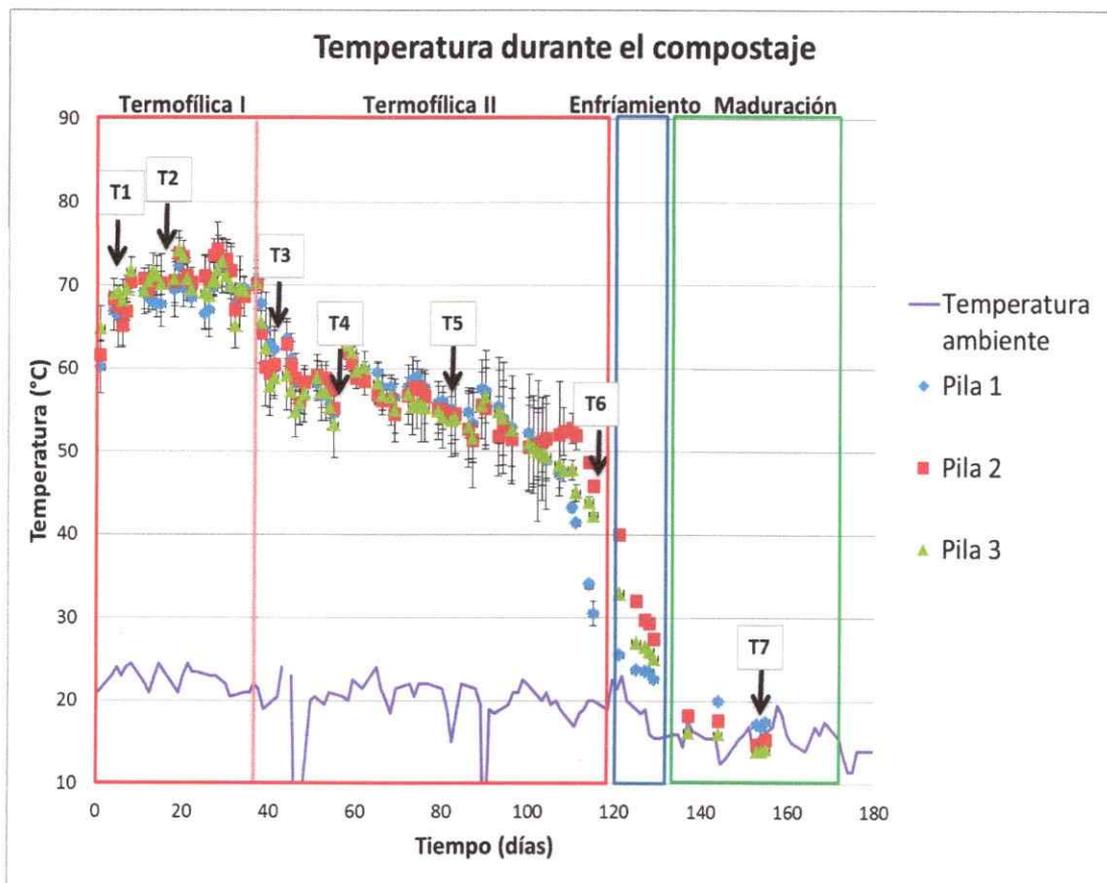


Figura 6. Medición de la temperatura durante el proceso de compostaje de alperujo. Las temperaturas corresponden al promedio de 6 valores registrados por pila. Las líneas verticales corresponden a la desviación estándar. Se indican las fechas de muestreo (T1 – T7) seleccionadas para las determinaciones de los parámetros fisicoquímicos y diversidad de los grupos microbianos. Las etapas del compostaje se identifican y se encuadra en rojo la etapa termofílica (primaria (Termofílica I) y secundaria (Termofílica II) separadas), en azul la etapa de enfriamiento y en verde la etapa de maduración. La línea continua representa la temperatura ambiente promedio entre máxima y mínima por día (Fuente: accuweather.com).

Humedad

Para mantener la humedad del sustrato (alperujo/paja de trigo) las pilas fueron regadas dos veces por semana. Los valores de humedad de las pilas se registraron durante

todo el proceso y en promedio entre las pilas fluctuaron entre el 26% al 42% (Anexo, Tabla 8). No hay diferencias significativas entre los valores de porcentajes de humedad entre las 3 pilas ($p= 0,5787$) y los valores promedios de porcentaje de humedad durante el tiempo de compostaje no presentan diferencias significativas ($p= 0,071$) lo que indica que las secuencias de riego fueron adecuadas para mantener una humedad relativamente constante del sustrato durante el compostaje.

pH

En la Figura 7A se muestra las determinaciones de pH durante el proceso de compostaje para las tres pilas estudiadas, las cuales siguen una tendencia similar, observándose una reducción del pH al término de la fase termofílica I (T3 a T4). Posteriormente, las 3 pilas muestran un aumento de pH entre T5-T6 que corresponde al término de la fase termofílica II y luego una ligera disminución hasta el término del proceso, situándose en rangos de pH ligeramente ácido (Fig. 7A). Existen diferencias significativas entre las pilas en los valores promedios de pH ($p= 0,026$); estas diferencias se producen entre los 4 y 40 días de compostaje (T1 y T4) (post test Tukey, valores de p para cada tiempo (comparación entre pilas) entre 0,0004 y 0,03) aunque no se observan diferencias de pH entre las pilas en las etapas finales del compostaje. Por otra parte, los valores promedios de pH durante el tiempo compostaje (comparación entre tiempos) serían significativamente distintos ($p= 0,0001$), indicando variación del parámetro durante el proceso de compostaje del sustrato.

Conductividad

Los valores de conductividad de las pilas registrados durante el compostaje muestran una disminución del parámetro hasta el término del proceso (Fig. 7B). Las tres pilas

exhiben una tendencia similar en los valores de conductividad y no presentan diferencias significativas ($p= 0,047$). Los valores promedios de conductividad durante el tiempo de compostaje (comparación entre tiempos) serían significativamente distintos ($p= 0,0001$) donde la reducción de la conductividad al final del proceso indica la disminución de la concentración de iones durante el proceso de compostaje del sustrato.

Razón Carbono/Nitrógeno (C/N)

El alperujo muestra una alta relación C/N al inicio del proceso, a medida que avanza el compostaje estos valores muestran una disminución progresiva del parámetro hasta el día 80 y luego se estabiliza alcanzando valores de C/N entre 20-18 hasta el término del proceso (Fig. 7C). Las 3 curvas, correspondientes a cada pila, no muestran diferencias significativas entre los valores de C/N a lo largo del compostaje ($p= 0,5412$). La disminución de los valores de razón C/N durante el tiempo de compostaje (comparación entre tiempos) es estadísticamente significativa ($p= 0,0002$) lo que indica variación de este parámetro durante el proceso de compostaje del sustrato.

2.- Indicador de madurez

Determinación de fitotoxicidad

Para evaluar el nivel de fitotoxicidad del compost se determinó el índice de germinación de dos especies indicadoras; lechuga (*Lactuca sativa*) y rabanito (*Raphanus sativus*), en el extracto de compost de alperujo. Los porcentajes se calcularon en relación a los valores del control que corresponden al 100% de germinación y elongación de la radícula de semillas en agua destilada. Los valores promedios de índice de germinación estarían dentro de la normativa (>80%) (Fig. 8) y muestran que hay

diferencias significativas entre el comportamiento de ambas especies indicadoras, siendo más sensible el rabanito que la lechuga (p igual a 0,044).

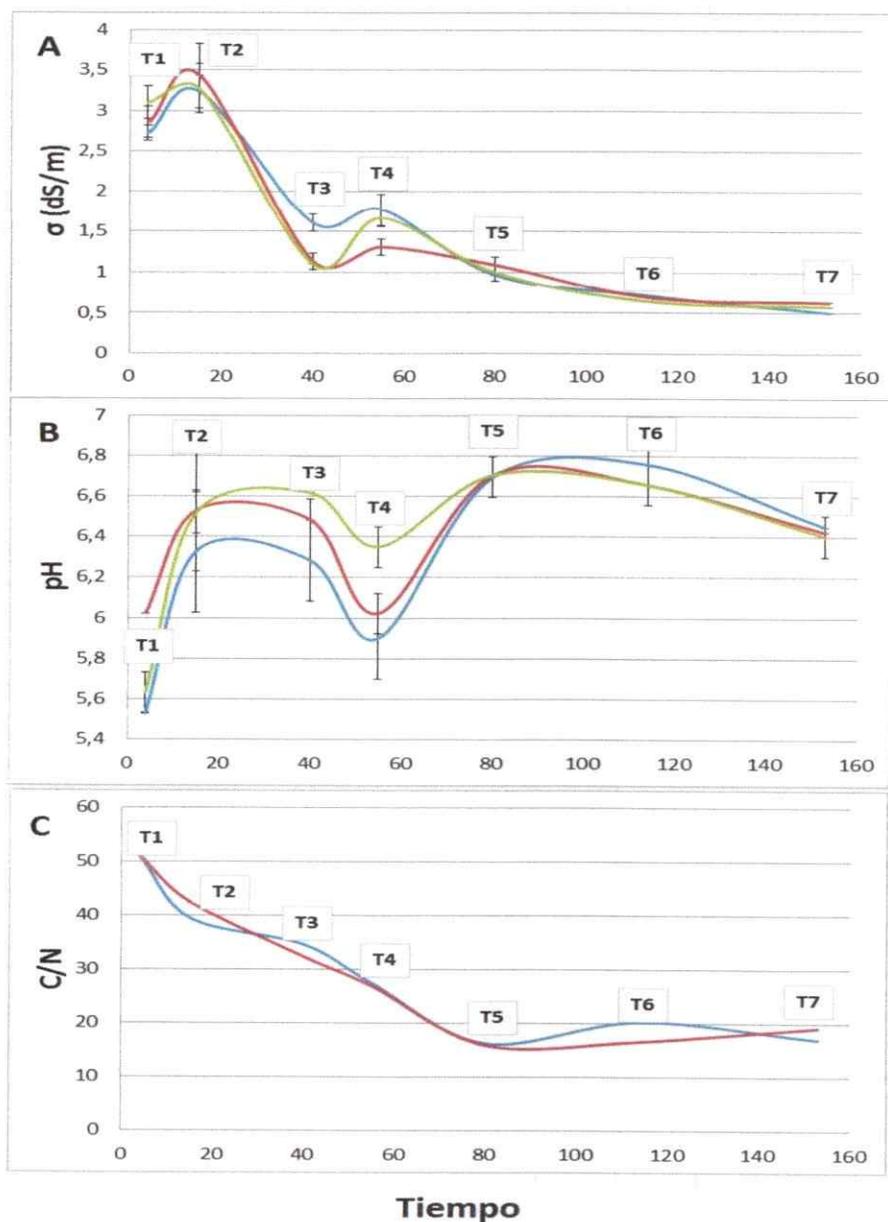


Figura 7. Medición de (A) pH, (B) conductividad y (C) razón C/N durante el compostaje de alperujo. La curva celeste corresponde a la pila 1, la curva roja a la pila 2 y la curva verde a la pila 3. Los valores de pH y conductividad corresponden al promedio de 3 valores registrados para cada una de las pilas, con su respectiva desviación estándar.

Sin embargo, no hay diferencias significativas entre las pilas en el nivel de fitotoxicidad, para cada especie indicadora (p igual a 0,547).

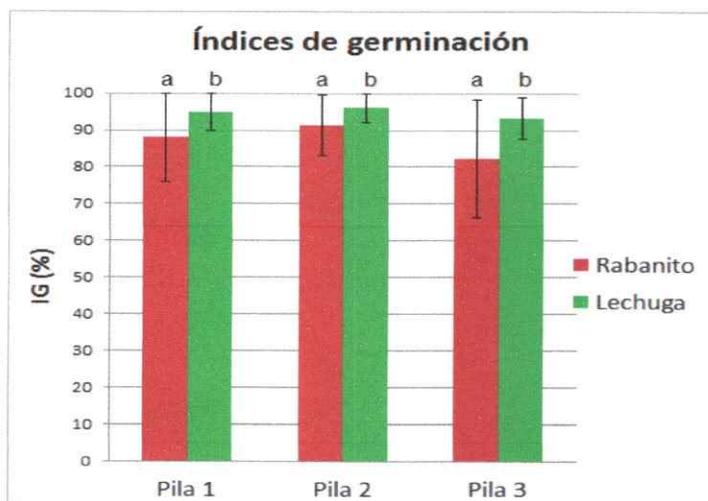


Figura 8. Índices de germinación de las especies indicadoras utilizadas. Los valores corresponden al promedio de triplicados por pila con su respectiva desviación estándar. a y b; diferencias significativas.

Estabilidad biológica de las muestras

La estabilidad biológica del compost se determinó por el desprendimiento de CO_2 . En la tabla 2 se muestra el valor de desprendimiento de CO_2 alcanzado por cada pila de compostaje al final de proceso. El valor promedio es de $0,821 \pm 0,232$ mg C- CO_2 /g M Org/día, el que está dentro de la normativa (<8 mg C- CO_2 /g M Org/día) indicando que el compost obtenido es biológicamente estable.

Tabla 2. Desprendimiento de CO_2 por día (mg C- CO_2 /g M Org/ día) de muestras.

Pila 1	1,077
Pila 2	0,762
Pila 3	0,624

3.- Patrones de T-RFLP durante el compostaje

Purificación del DNA y amplificación de los marcadores moleculares

Para determinar la diversidad genética de los grupos microbianos (bacterias, hongos y actinobacterias) en las distintas etapas del compostaje de alperujo se utilizó una aproximación molecular independiente de cultivo conocida como T-RFLP.

Para ello, el DNA extraído de las muestras de compost en distintos tiempos de muestreo (T1-T6, incluyendo para este análisis T0 o pila de origen) se amplificó con marcadores moleculares específico de cada grupo mediante PCR. Las muestras de DNA utilizadas como molde presentaron una concentración en el rango de 15-50 ng/ μ L. La calidad del DNA amplificado y la confirmación de los tamaños esperados para los amplicones se muestra en la Figura 9.

Los amplicones obtenidos para el gen bacteriano que codifica el *RNAr 16S* tienen un tamaño aproximado de 1500 bp, para la región fúngica intergénica *ITS1-ITS4* un tamaño entre 500-600 bp y para la región *ACT* de las actinobacterias un tamaño de 700 bp.

Análisis de perfiles de T-RFLP

A partir de las muestras amplificadas se determinaron los perfiles de T-RFLP para cada uno de los marcadores moleculares a lo largo del tiempo de compostaje y en las distintas pilas.

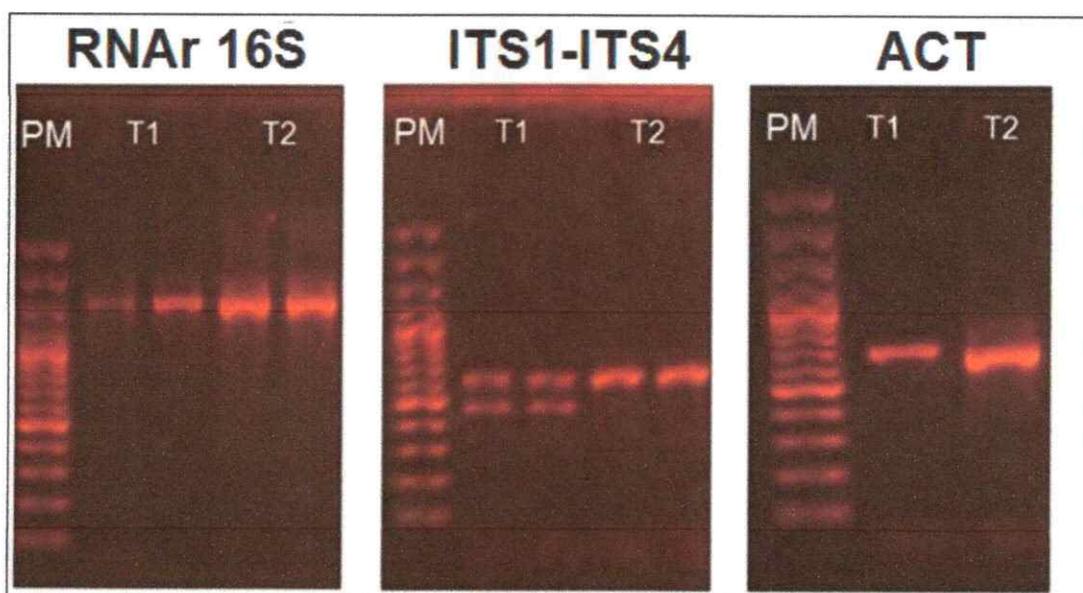


Figura 9. Electroforesis en geles de agarosa de los amplicones correspondientes a los marcadores moleculares específicos para los tres grupos microbianos (*RNAr 16S*: bacterias, *ACT*: actinobacterias e *ITS1-ITS4*: hongos). Se muestra solo el resultado para la pila 1 correspondiente a los tiempos de muestreo T1 y T2, para geles completos consultar Anexo. PM: Marcador de peso molecular; 100-3000 bp. El tamaño de los productos de amplificación para el amplicon del gen del *RNAr 16S* se estima en 1500 bp, para el segmento *ITS1-ITS4* entre 500 y 600 bp y para la región *ACT* 700 bp.

En la Figura 10 se muestra el perfil de T-RFLP de la comunidad bacteriana donde se detectaron 12 TRFs con un rango de tamaño de 43 a 451 bp. Con el marcador fúngico correspondiente a la región intergénica *ITS1-ITS4* se revelaron 13 TRFs en el rango de 56 a 1098 bp (Fig. 11) y para el marcador *ACT* que representa a las actinobacterias se encontraron 5 TRFs con tamaños en el rango de 134 a 441 bp (Fig. 12). La identificación, denominación de los TRFs y su tamaño en bp se indican en sección de Anexo (Tabla 15).

Para identificar posibles géneros microbianos en las muestras de compostaje, representados por TRFs más abundantes, se realizó un análisis adicional mediante el programa virtual MiCA (Microbial Community Analysis) (mica.ibest.uidaho.edu). En el

grupo bacteriano, el TRF 236 permanece durante el compostaje y correspondería a *Paenibacillus* y el TRF 90 permanece en gran abundancia desde T4 en adelante (Termofílica II) y correspondería a los géneros *Flavobacterium* y *Chlorobium*. En el grupo fúngico el TRF 139 es el más abundante en T4 para la pila 1 y en T3 para las pilas 2 y 3, siendo desde T4 en adelante no detectable en las pilas 2 y 3 (Termofílica II), sin embargo el programa Mica no aproximó a ningún género dicho fragmento. En el grupo actinobacteria el TRF 134 permanece en gran abundancia durante el compostaje y correspondería al género *Actinomadura*.

Determinación de los índices de diversidad y equidad

A partir de los perfiles de T-RFLP se determinó la diversidad genética de cada grupo microbiano mediante el índice de diversidad de Shannon (H) y el índice de equidad (J). Los índices de diversidad en las distintas etapas del compostaje (comparación de los valores de índice de diversidad entre los tiempos de muestreo) mostraron que para el grupo bacteriano no hay diferencias significativas (p igual a 0,163) y para el grupo fúngico tampoco se observaron diferencias significativas (p igual a 0,21).

Para el grupo actinobacteria hay diferencias significativas entre los valores de diversidad en el tiempo cuando se comparan las etapas inicial (T0 -T1) con la final (T6) (p igual a 0,009), donde se observó un leve aumento de la diversidad al término de la fase termofílica II (Tabla 3).

En el caso de los índices de equidad, para las muestras de los grupos bacteriano y fúngico se observa que este factor siempre estuvo cercano a 1, indicando que estas comunidades son más equitativas.

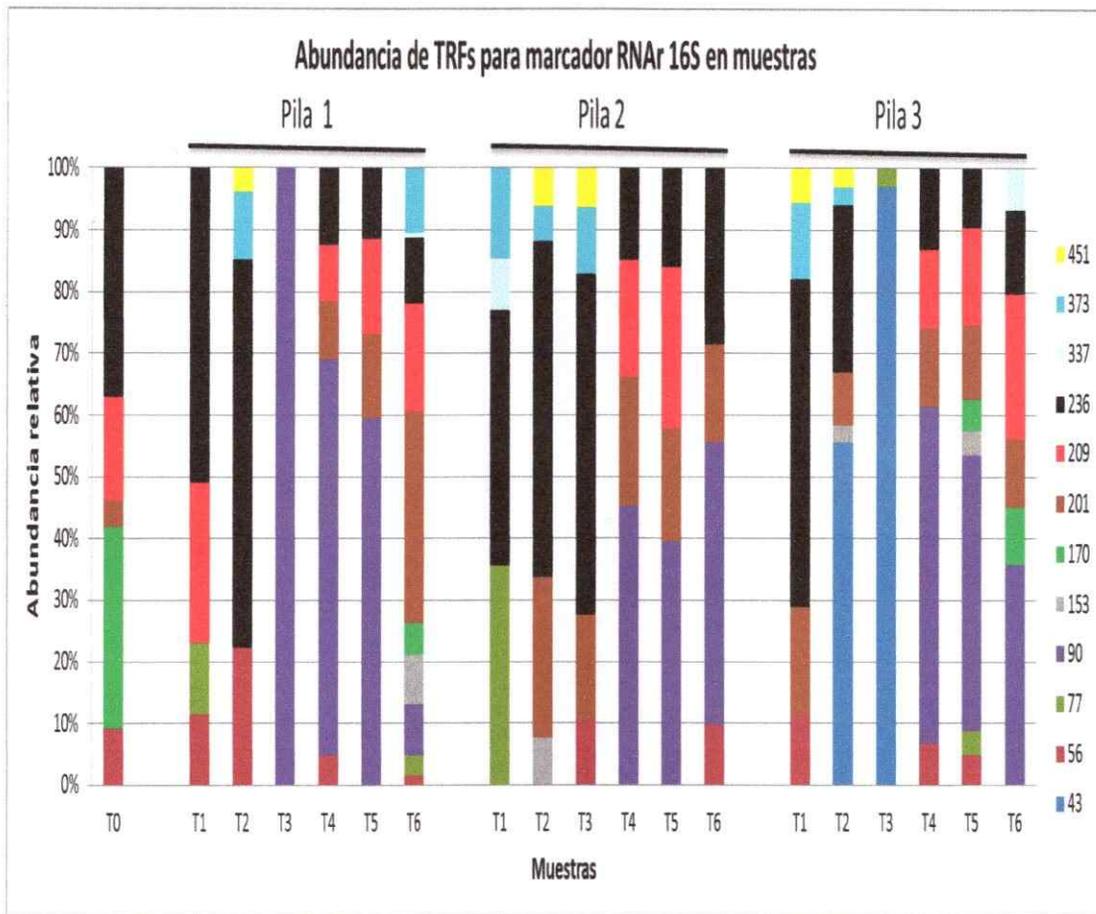


Figura 10. Abundancias relativas de TRFs para el grupo bacteriano en distintos tiempos de muestreo a lo largo del compostaje y para las distintas pilas. T1-T6; Muestras nombradas según tiempo de muestreo, se incluye para un análisis comparativo T0 o pila de origen (alperujo).

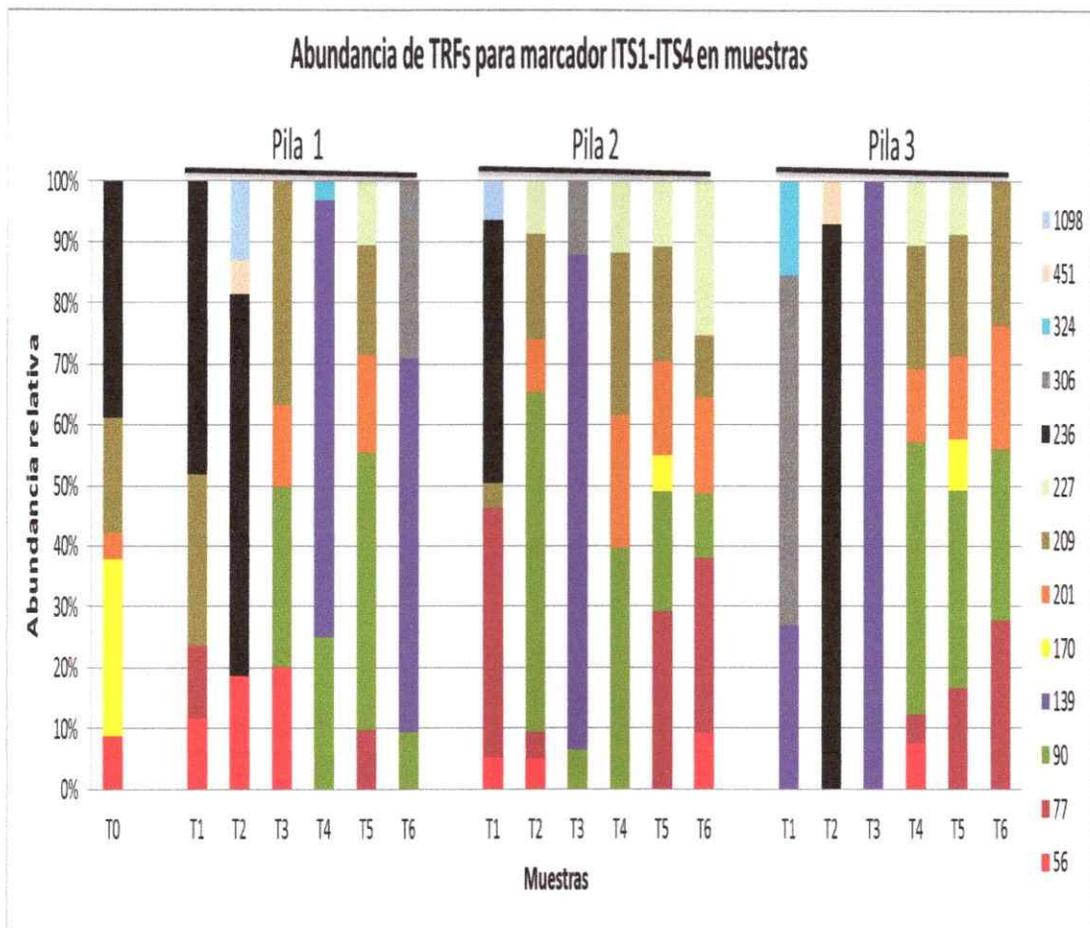


Figura 11. Abundancias relativas de TRFs para el grupo fúngico en distintos tiempos de muestreo a lo largo del compostaje y para las distintas pilas. T1-T6; Muestras nombradas según tiempo de muestreo, se incluye para un análisis comparativo T0 o pila de origen (alperujo).

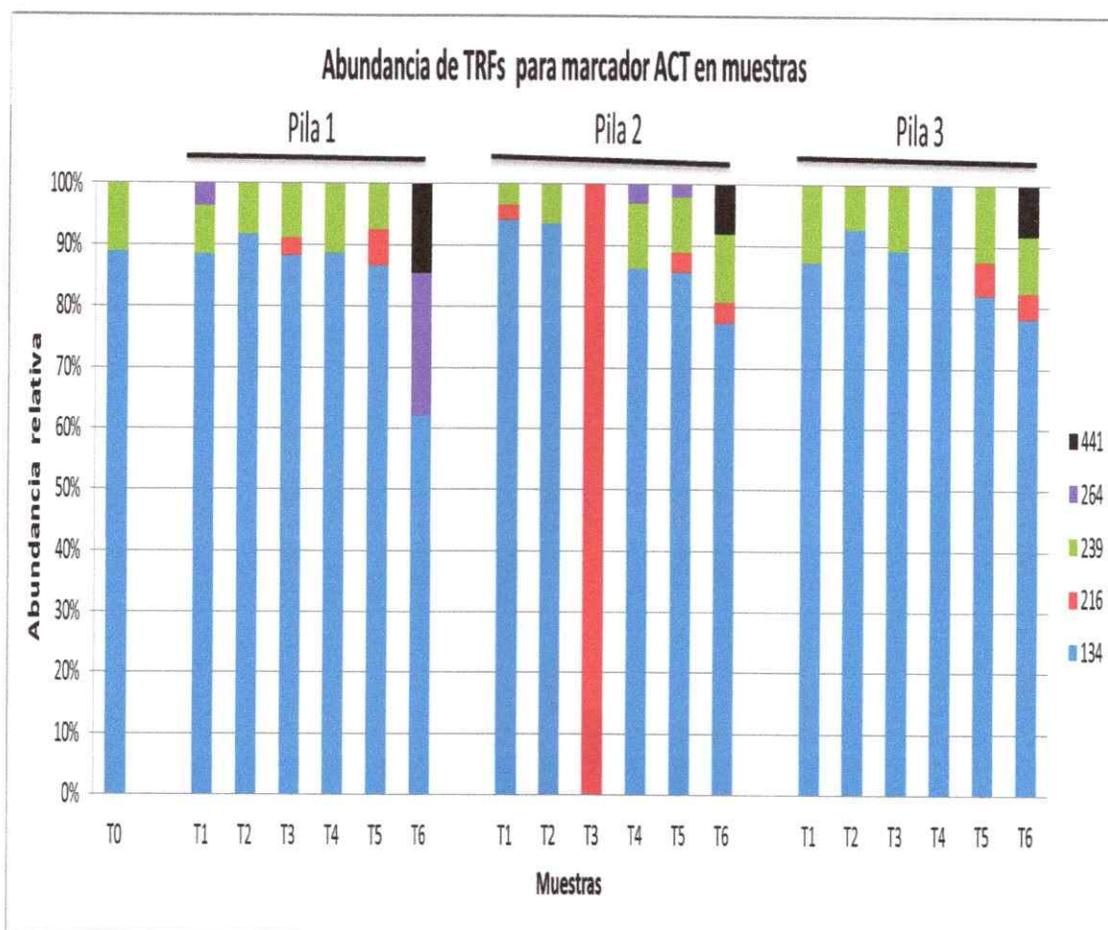


Figura 12. Abundancias relativas de TRFs para el grupo actinobacteria en distintos tiempos de muestreo a lo largo del compostaje y para las distintas pilas. T1-T6; Muestras nombradas según tiempo de muestreo, se incluye para un análisis comparativo T0 o pila de origen (alperujo).

Esto no se observa en el caso del grupo actinobacteria donde los valores estuvieron cercanos a 0,6 (Tabla 3), coincidiendo con la presencia de un TRF predominante de 134 bp durante todo el proceso. Los valores de J no fueron significativamente diferentes entre los tiempos de muestreo en el grupo bacteriano (p igual a 0,118), ni en el grupo fúngico (p igual a 0,141). Sin embargo, en el grupo actinobacteria se encontraron diferencias significativas entre la etapa inicial (T0, T1 y T2) con la final (T6) (p igual a 0,009).

Dinámica de los grupos

Cada etapa del compostaje no sólo se puede caracterizar en términos del índice de diversidad genética y equidad sino también por la dinámica que exhibe cada grupo, la cual fue evaluada en relación al número de TRFs que se mantienen entre dos tiempos consecutivos durante el proceso de compostaje del alperujo. En la Figura 13 se muestran los gráficos de porcentaje de cambio de los perfiles de T-RFLP para cada grupo en los distintos intervalos de tiempos. Aunque el comportamiento de las pilas no es homogéneo, en general en los tres grupos microbianos se observa una disminución del porcentaje de cambio en los intervalos finales, sin embargo los porcentajes de cambios son menores en el grupo de las actinobacterias. La dinámica se puede expresar mediante la tasa de cambio (Δt) que experimenta cada grupo microbiano durante el proceso de compostaje de alperujo (Tabla 4).

De acuerdo a Marzorati y cols (2008) valores de $D_i < 5\%$ se consideran de baja dinámica, dinámica media $5 > D_i > 15$ y una alta dinámica a una $D_i > 15\%$. Por lo tanto, para los tres grupos microbianos (bacterias, hongos y actinobacterias) el valor de la tasa de

cambio (Δt), en todas las pilas es alto, indicando que todos los grupos son muy dinámicos durante este proceso.

Tabla 3. Índices de diversidad (H) y equidad (J) para los distintos grupos microbianos durante el compostaje de alperujo (*)

Días de compostaje (**)	Etapa (***)	RNAr 16S		ITS1-ITS4		ACT	
		H	J	H	J	H	J
0	-	1,4 ^a	0,87 ^a	1,4 ^a	0,87 ^a	0,34 ^a	0,49 ^a
4	Termofílica I	1,24 ± 0,06 ^a	0,85 ± 0,04 ^a	1,12 ± 0,14 ^a	0,83 ± 0,08 ^a	0,35 ± 0,08 ^a	0,49 ± 0,15 ^a
15	Termofílica I	1,14 ± 0,13 ^a	0,72 ± 0,04 ^a	0,88 ± 0,57 ^a	0,62 ± 0,23 ^a	0,26 ± 0,02 ^a	0,48 ± 0,03 ^a
40	Termofílica II	ND	ND	ND	ND	ND	ND
55	Termofílica II	1,24 ± 0,10 ^a	0,82 ± 0,11 ^a	1,18 ± 0,44 ^a	0,81 ± 0,17 ^a	ND	ND
80	Termofílica II	1,39 ± 0,3 ^a	0,86 ± 0,08 ^a	1,62 ± 0,16 ^a	0,93 ± 0,04 ^a	0,53 ± 0,05 ^a	0,53 ± 0,07 ^a
114	Termofílica II	1,62 ± 0,36 ^a	0,89 ± 0,04 ^a	1,32 ± 0,42 ^a	0,92 ± 0,10 ^a	0,81 ± 0,09 ^b	0,54 ± 0,17 ^b

Letras iguales: No hay diferencias significativas.

(*) Los índices corresponden al promedio entre las tres pilas.

(**) Se considera T0 (día 0 o pila de origen) para el análisis.

(***) Según lo indicado en Figura 6.

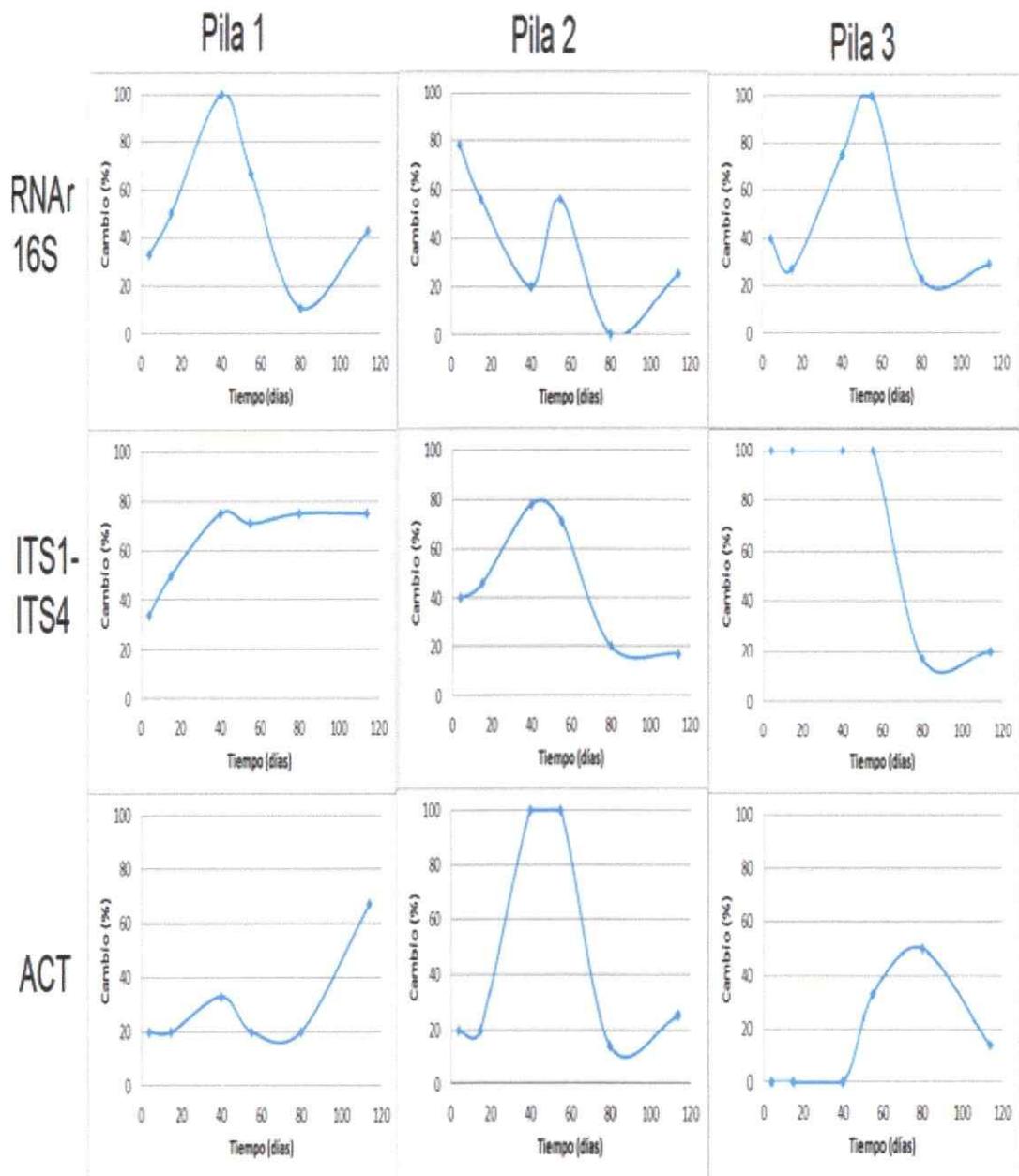


Figura 13. Porcentajes de cambio de abundancias relativas de TRFs entre muestras consecutivas en el tiempo (comparación de a pares), para cada grupo y pila respectivo.

Tabla 4. Valores de tasa de cambio (Δt) del compostaje de alperujo para cada marcador y pila.

Marcador	Pila 1 (%)	Pila 2 (%)	Pila 3 (%)	Promedio (%)
<i>RNAr 16S</i>	50,7±30,5	39,2±28,9	49±31,4	46,3±1,2
<i>ITS1-ITS4</i>	63,3±17,4	45,3±25,3	72,8±42,1	60,5±14
<i>ACT</i>	30±18,9	46,5±41,6	16,2±21,1	30,9±15,2; 19,8±8,98 (*)

* Valor sin considerar T3 de Pila 2 (posible problema metodológico)

4.- Relaciones entre parámetros fisicoquímicos y diversidad genética

Para determinar si los cambios en los parámetros fisicoquímicos tales como temperatura, pH, conductividad, humedad y relación C/N se relacionan con los cambios en la diversidad de los distintos grupos microbianos, se determinó el coeficiente R^2 , correspondiente al entregado por una regresión, para observar si las relaciones siguen una tendencia lineal. Se consideró T0 (pila de origen) dentro del análisis, extrapolando dichos valores fisicoquímicos y de diversidad a las tres pilas, con el fin de analizar los efectos del compostaje en los cambios de diversidad y parámetros fisicoquímicos.

Los datos del análisis de correlación se muestran en la tabla 5. En general, no se observa correlación entre los factores fisicoquímicos y la diversidad de los grupos. No obstante, los datos muestran que la conductividad eléctrica presenta una relación lineal inversa con la diversidad del grupo de las actinobacterias (Fig. 14A). También se observa una correlación significativa entre la temperatura y la diversidad de las actinobacterias (Fig. 14B).

Tabla 5. Coeficientes de regresión lineal (R^2) en relación entre parámetros fisicoquímicos y muestras durante el compostaje para cada grupo y pila *

Parámetros fisicoquímicos	<i>RNAr</i> 16S (grupo bacteriano)		<i>ITS1-ITS4</i> (grupo fúngico)		<i>ACT</i> (grupo actinobacteria)	
	R^2	p	R^2	p	R^2	p
pH	0,21	0,365	0,03	0,736	0,21	0,426
	0,008	0,864	0,76	0,024	0,44	0,222
	0,3	0,262	0,06	0,64	0,2	0,451
σ (dS/m)	0,33	0,233	0,02	0,789	0,67	0,089
	0,03	0,741	0,53	0,102	0,93	0,008
	0,75	0,026	0,58	0,08	0,91	0,011
H (%)	0	0,974	0,11	0,52	0,08	0,635
	0,78	0,019	0,02	0,782	0,05	0,721
	0,1	0,538	0,07	0,604	0,27	0,367
C/N	0,06	0,637	0,08	0,58	0,39	0,257
	0	0,937	0,66	0,048	0,76	0,054
	0,57	0,084	0,35	0,217	0,73	0,065
T (C°)	0,72	0,033	0,18	0,407	0,94	0,007
	0,06	0,638	0,56	0,087	0,96	0,003
	0,56	0,086	0,53	0,101	0,92	0,01

* Se indican pilas en orden secuencial para cada parámetro ambiental.

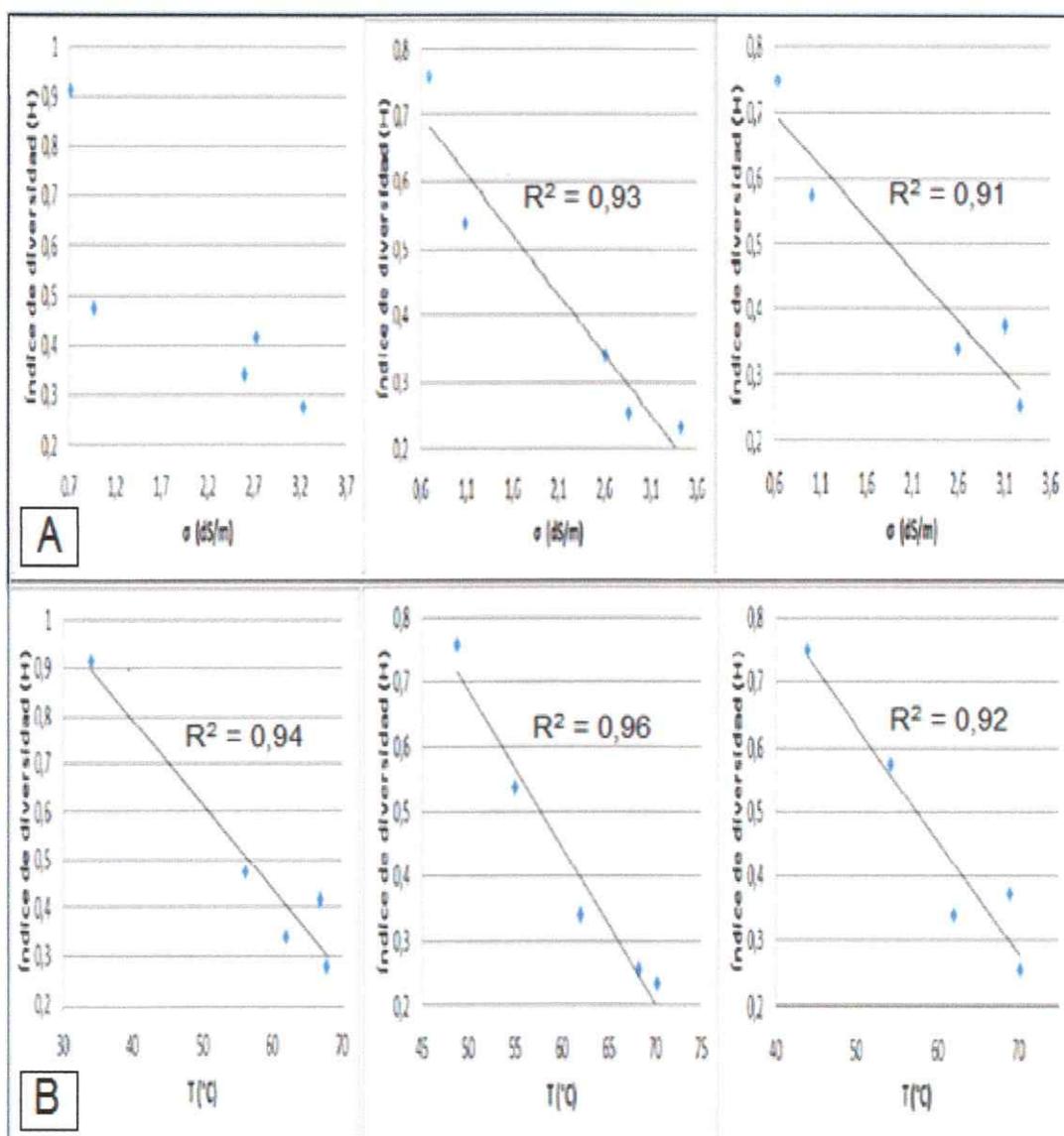


Figura 14. Relación entre índices de diversidad (variable dependiente) y (A) conductividad y (B) temperatura (variables independientes) durante el compostaje de alperujo para el grupo actinobacteria. Se indica con línea de tendencia donde se encontró una relación lineal significativa.

DISCUSIÓN

Proceso de compostaje y calidad del compost

La duración total del proceso de compostaje de alperujo con paja de trigo (3:1) fue de 155 días, dado que en dicho período se alcanzó la temperatura ambiente en las pilas y el indicador de madurez, tras el muestreo respectivo en este período, está dentro del rango de la normativa establecida. El tiempo de compostaje sobrepasó la duración de compostajes con otros sustratos, como estiércol de cerdo (74-126 días) (Tiquia., 2005) o mezclas de vegetales y frutas (84 días) (Ryckeboer y cols., 2003). Esto posiblemente debido al bajo pH y presencia de fases fenólicas y lipídicas en el alperujo, que afectan el establecimiento y desarrollo de microbiotas, además de la baja porosidad que produce mala aeración del material (Alburquerque y cols., 2004).

Aun así, a nivel de compostaje de alperujo, el proceso está dentro de la duración observada por otros autores como el caso de 140 días para una mezcla de alperujo (84%) con residuos de lana (5%) hojas de olivo (5%) paja (3%) y estiércol de paloma (3%) (Federici y cols., 2011). En otros casos el compost maduro se alcanzó a los 200 días para una mezcla con astillas de madera de olivo (95% alperujo, 5% astillas) (Agnolucci y cols., 2013) y 255 días para la mezcla de alperujo alcalino (91% alperujo, con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para reducir malos olores) y pellet de caballo (9%) (García de la Fuente y cols., 2011). Estos últimos sustratos resultaron menos eficientes comparado con el tiempo de compostaje logrado en este trabajo con una mezcla de alperujo/paja de trigo (3:1).

Dentro de los factores que probablemente ayudaron al desarrollo del proceso más eficiente del compost fueron los volteos, cuya función fue el recambio del sustrato, homogenización y oxigenación del mismo, junto a la paja de trigo en la mezcla con alperujo, la que vendría a ser considerada como un agente de carga o estructurante. Además la alta cantidad de lignina y hemicelulosa biodisponible en la paja de trigo podría colaborar con la proliferación temprana de los microorganismos y degradación de la materia orgánica general a partir de ellos y con esto reducir la duración del proceso, en comparación con el uso de otros agentes de carga como astillas de madera de olivo y pellet de caballo (Agnolucci y cols., 2013; García de la Fuente y cols., 2011).

Tras el término del proceso, el compost obtenido se ajusta a la normativa en cada uno de los parámetros establecidos, siendo de clase A, por lo que sería un compost maduro, de uso agrícola y sin restricciones de utilización (Tabla 6). La ausencia de materias inertes como plásticos y vidrios se determinó de manera cualitativa, ya que se observó la ausencia a nivel macro de estas materias. La ausencia de patógenos se podría confirmar dado que se alcanzaron altas temperaturas durante la fase termofílica produciéndose una disminución de la riqueza de microorganismos patógenos, junto con la estabilidad biológica cuantificada en el desprendimiento de CO₂ obteniendo valores bajos y dentro del rango establecido. Aunque la ausencia de patógenos se podría asegurar de forma absoluta mediante técnicas de cultivo, en medios selectivos para coliformes y cuantificación de unidades formadoras de colonias (TMECC., 2004) o por PCR (Hoffmeister y cols., 2005).

El índice de germinación estuvo sobre el 80% y por lo tanto dentro de la normativa, donde el rabanito sería una especie bioindicadora más sensible al presentar menores

valores de IG que la lechuga. Según la normativa chilena (INN, 2004) el rabanito es la especie adecuada para realizar ensayos de fitotoxicidad, dada su baja tolerancia a conductividades altas y dada esta sensibilidad permite determinar si el compost obtenido es de Clase A o B. Sin embargo, el uso de lechuga como especie indicadora, a pesar de ser menos sensible, daría más cuenta del nivel de polifenoles presentes en el sustrato, donde en los ensayos para evaluar la fitotoxicidad de polifenoles las semillas y plántulas de lechuga son las recomendadas por su sensibilidad (Cardona., 2012). Este ensayo de fitotoxicidad con lechuga es especialmente característico dado que el alperujo se caracteriza por tener alta cantidad de polifenoles que se correlacionan positivamente con el nivel de fitotoxicidad (Hachicha y cols., 2009). Y dado que el índice de germinación de la lechuga obtenido al final del proceso es alto, sería relevante, para confirmar esta reducción de polifenoles, la medición de estos compuestos antes y después del compostaje de alperujo.

Tabla 6. Comparación entre parámetros de normativa y compost obtenido.

	Clase A	Clase B	Compost obtenido
pH	5 - 8,5	5,5 - 8,5	6,43 ± 0,02
Conductividad (dS/m)	<3	≤8	0,57 ± 0,06
C/N	≤25	≤30	18 ± 1,10
Índice de germinación (%)	>80	>80	87,3 ± 6,4 Rabanito 95 ± 1,7 Lechuga *
Desprendimiento de CO ₂ (mg C-CO ₂ /g M Org/día)	<8	<8	0,84 ± 0,23

* Porcentajes promedios entre 3 pilas para cada especie indicadora

En relación a los parámetros fisicoquímicos evaluados (temperatura, pH, conductividad, humedad y razón C/N) durante el compostaje de alperujo, la tendencia

de variación de estos factores coincide con lo anteriormente descrito por otros/as autores/as (Federici y cols., 2011; Suárez., 2012; Agnolucci y cols., 2013).

Se observa para el pH, la conductividad y razón C/N una estabilización de los valores o leve variación desde el día 80 de compostaje en adelante. Esto coincide con la disminución de la temperatura en las pilas, de 55-15 °C, el paso de la fase termofílica a la de enfriamiento y posterior maduración.

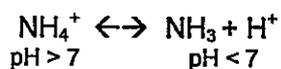
La temperatura fue el indicador de monitoreo del proceso. No se observó la fase mesofílica inicial, lo que se relacionaría con el tiempo en que estuvo el alperujo en la industria (3 meses) y la degradación anticipada de la materia orgánica desde microorganismos, iniciando con la fase termofílica al montar el proceso de compostaje. A pesar de que las temperaturas promedio durante los días fueron distintas en cada pila, donde las diferencias se focalizan entre los días 108-125 (Termofílica II), se observan las mismas curvas y las fases termofílica, enfriamiento y maduración en los mismos tiempos para las 3 pilas. Hubo parámetros cualitativos, adicionales a los otros análisis, que permitieron dar término al proceso, como el olor del compost ("tierra mojada") y no el fuerte olor del alperujo y la granulometría fina en comparación a la alta compactación del material sin compostar.

La conductividad determinada durante el compostaje daría cuenta de la concentración de sales o iones en las muestras, donde habrían principalmente iones bi valentes (Ca^{+2} , Mg^{+2}) y mono valentes (Na^{+} , K^{+}) (Albuquerque y cols., 2004). Durante el compostaje ocurriría una disminución de la conductividad producto de la captación de iones solubles o consumo de la materia inorgánica del sustrato desde los microorganismos en proliferación (Albuquerque y cols., 2006).

Un compost con alta conductividad eléctrica aportaría sales al suelo las cuales reducen la disponibilidad de agua a los cultivos, donde sobre los 4 dS/m se puede considerar un suelo salino y perjudicial para el cultivo de plantas (Badía., 1992). El compost de alperujo alcanzó una conductividad baja (promedio de 2,57 dS/m), sugiriendo que su calidad se ajusta a la normativa ya que su aplicación no reduciría la disponibilidad hídrica para la planta.

En el caso del pH a lo largo del compostaje, se observó un aumento gradual que alcanza un valor de 6,4 en el compost maduro y que dista de los valores observados que alcanzan otros compost, con valores de 8,04 en compost de estiércol de vacuno (Tiquía S., 2010), 8,45 en compost de alperujo y otros desechos (Federici y cols., 2011) y 8,1 en compost de alperujo con astillas de madera (Agnolucci M., 2013). El valor de pH promedio del producto final, 6,4 (Anexo, Tabla 7), es ligeramente ácido. Sin embargo, está dentro de la normativa y por lo tanto se considera un compost óptimo para el uso agrícola en relación a su pH, como para el cultivo de plantas como la arveja, el trigo, el maíz, hortalizas y frutos varios. La acidez de un suelo (pH bajo 5) produce en plantas vasculares, como las ya mencionadas, la inhibición del crecimiento del sistema radicular y con esto la reducción de absorción de agua y nutrientes, provocando una disminución generalizada del crecimiento. Por lo que es un factor de importancia el obtener productos acondicionadores de suelo con valores de pH en el rango agronómico establecido (Bernier y Alfaro., 2006).

Dentro de los elementos relacionados con el cambio de pH uno de ellos es la producción de amoníaco desde los microorganismos. El equilibrio químico, en función del pH para este compuesto nitrogenado es el siguiente;



Durante el compostaje, se observó al término de la fase termofílica I una reducción del pH que se generaría por los procesos biológicos de mineralización y amonificación del nitrógeno orgánico (R-NH₃) del sustrato, bajo estas condiciones el amonio pasaría a amoniaco, liberado a la atmósfera y que sería uno de los factores que generaría los malos olores en las fases iniciales del proceso (Moreno y Moral., 2007). Luego, se observa un aumento del pH al término de la fase termofílica II y estabilización, por la posible disminución de los procesos de amonificación de derivados de nitrógeno de parte de los microorganismos.

Al analizar la razón carbono/nitrógeno se observa un descenso en el tiempo del parámetro y estabilización tras el día 80 de compostaje, llegando hasta un 64% menos con respecto al sustrato inicial (Anexo, Tabla 7). La disminución del carbono orgánico se podría relacionar con la degradación de la materia orgánica por los microorganismos heterotróficos presente en el compost (mineralización y desprendimiento de CO₂) y consecuente disminución del porcentaje de carbono orgánico. La materia orgánica tiende a acidificar (presencia de ácidos húmicos), por lo que su disminución generaría también un aumento de pH (Sierra y Rojas., 2003). Asegurar una baja cantidad de carbono orgánico en el compost o producto final se relaciona con evitar la continuación de la degradación de compuestos orgánicos desde microorganismos, ya que esto produciría altas temperaturas y fitotoxicidad, por falta de degradación de compuestos fitotóxicos, factores que afectarían los suelos de cultivo.

El aumento del porcentaje de nitrógeno total (Anexo, Tabla 9), se podría relacionar con el aumento de derivados de nitrógeno debido a los procesos de mineralización que

ocurren en el compostaje (Alburquerque y cols., 2004). Estos compuestos nitrogenados serían utilizados por los microorganismos como fuente de energía (nitrificación a partir de amonio) y/o reincorporación a la fracción orgánica (Moreno y Moral., 2007).

El porcentaje de humedad fue un parámetro controlado externamente durante el proceso, pero la recepción y los procesos internos de las pilas de compostaje frente a esta incidencia son importantes de observar. La humedad debe permanecer durante el proceso entre un 40-60%, con el fin de facilitar el intercambio gaseoso y el transporte de nutrientes. Un valor por sobre el 60% podría generar anaerobiosis afectando la actividad de los microorganismos y con esto el proceso de compostaje en general (O’Ryan, 2007). La humedad estuvo entre un 26% y 50%, no se mantuvo constante y en momentos por debajo del 40% (Anexo, Tabla 8), lo que posiblemente pudo haber afectado el buen desarrollo del proceso y con esto su duración.

En cuanto a las propiedades fitotóxicas del compost se observó que, para el experimento de elongación de radícula, el porcentaje de elongación en algunas de las placas con compost fue mayor que en las placas del control con agua, llegando como máximo a un 63% más de crecimiento (Anexo, Tablas 11-13). El aumento de la elongación de la radícula en relación al control posiblemente estaría indicando la propiedad del compost de acelerar el crecimiento de las plantas utilizadas en etapas tempranas y su nula fitotoxicidad.

Por último, la calidad agrícola del compost de alperujo puede evaluarse en experimentos de campos con diferentes tipos de cultivos y suelos.

Diversidad microbiana durante el compostaje de alperujo

La diversidad de los distintos grupos microbianos (bacterias, hongos y actinobacterias) durante el compostaje de alperujo se determinó mediante la técnica independiente de cultivo denominada T-RFLP. Este protocolo resultó adecuado para determinar los cambios en diversidad durante el proceso ya que entrega información sobre la abundancia y riqueza de fragmentos de restricción terminales correspondientes a regiones génicas que se usan como marcadores moleculares de grupos microbianos y con esto entrega una aproximación de la estructura genética del ensamble microbiano en estudio. Además, esta técnica ha sido ampliamente utilizada para estudiar las comunidades microbianas de distintos ambientes (Schütte y cols., 2008). En este trabajo, los perfiles de T-RFLP se utilizaron para determinar los cambios de la diversidad de los grupos microbianos durante el compostaje y la dinámica que experimentan estos grupos microbianos durante el proceso. Asimismo, permitió relacionar la variación de la diversidad con los cambios de los parámetros fisicoquímicos durante el compostaje de alperujo.

En los grupos bacteriano y fúngico se encontraron los mayores valores de diversidad en relación a los encontrados en el grupo actinobacteria, pero no se observaron cambios significativos en el tiempo. En lo investigado por Agnolucci y cols (2013) usando alperujo mezclado con astillas de madera de olivo (95% alperujo, 5% astillas) con similares condiciones de compostaje, observó que la diversidad bacteriana durante la etapa termofílica se mantuvo en valores altos y disminuyó al término del proceso a un índice cercano al inicial, coincidente con lo encontrado por Federici y cols (2011) en compostaje de alperujo con hojas de olivo y estiércol de paloma. Con respecto a la diversidad fúngica, ésta también aumentó desde la fase termofílica hasta el término del

proceso. Posiblemente, las diferencias observadas con el presente trabajo pueden explicarse por las diferencias en el sustrato a compostar (alperujo y paja de trigo) y por las temperaturas alcanzadas en la fase termofílica, valores cercanos a 45 °C (Agnolucci y cols 2013) versus los 70 °C alcanzados en el presente trabajo. El mayor incremento de la temperatura en la fase termofílica inicial alcanzado en este trabajo, sugiere que en la pila se establece una fuerte presión de selección sobre la mayoría de los miembros de la comunidad microbiana, prevaleciendo aquellos que son termófilos e hipertermófilos.

En otros sustratos, como biosólidos domiciliarios se ha detectado un aumento de la diversidad bacteriana durante la fase termofílica (Takaku y cols., 2006), por el contrario Novinscak y cols (2009) observaron que con desechos domiciliarios hay disminución de la diversidad en la fase termofílica. En compostaje de desechos agrícolas no se ha encontrado ninguna relación significativa de la diversidad con la temperatura (Zhang y cols., 2010) coincidente con los resultados obtenidos en el presente seminario. La relación diversidad/temperatura es variable y dependería de los valores máximos de temperatura alcanzados y de otros factores, como las combinaciones de sustrato, la cual según López-González y cols (2014) llevaría a una composición microbiana distinta.

La variación de diversidad de la microbiota, en general, se relaciona con las fases térmicas durante el compostaje, en las cuales debido a las altas temperaturas de la etapa termofílica, disminuiría la abundancia de microorganismos mesófilos. Tras la disminución de la temperatura, ocurriría la recuperación o recolonización de estos microorganismos y que se expresa en un aumento de la diversidad de la comunidad (Moreno y Moral., 2007). El rol observable en el compostaje de los microorganismos

mesófilos en las fases finales sería la degradación de la materia orgánica restante en el sustrato, para así obtener el compost maduro (O'Ryan, J., 2007).

En relación con la identidad de algunos miembros dominantes de la microbiota, el análisis de algunos TRFs con el Programa online Mica, señala que el TRF 236 que permanece durante el compostaje correspondería a un miembro del género *Paenibacillus*. En otros sistemas de compostaje como mezclas de basura/suelo se aisló la especie *Paenibacillus motobuensis* (Iida y cols., 2005) así como *Paenibacillus humicus* sp. aislada desde compost de desechos de pollo (Vaz-Moreira., 2007) donde especies del género han sido usadas para promover el crecimiento de plantas (Huo., 2012). Por otra parte, el TRF 90 que aparece en la fase termofílica II, cuando la temperatura comienza a descender, permanece en la comunidad hasta el final del proceso y correspondería a miembros del género *Flavobacterium*. Estas bacterias se han aislado en compost de hojas y ramas (Kim y cols., 2012) y en compost de orujo (Balis y cols., 2002). Además, especies de este género son usadas para el biocontrol contra organismos patogénicos en plantas (Gershuny., 2004). Es relevante el TRF 170, que aparece en el sustrato de origen (T0) y reaparece al término del compostaje, éste correspondería a miembros del género *Nocardia*, que han sido encontrados en la fase termofílica de compostajes (Tuomela., 2000). Por lo tanto, los géneros más abundantes detectados han sido observados en otros procesos de compostaje y con aplicaciones adicionales en algunos casos.

En el grupo actinobacteria se encontró una relación significativa de la variación del índice de diversidad en el tiempo, entre los valores iniciales de diversidad con los valores de la etapa final del compostaje de alperujo. Se observó un leve aumento a los 42,2 °C en comparación con los valores iniciales a los 68 °C. Tian y cols (2013)

encontraron que durante el compostaje de paja de arroz y estiércol de vacas las actinobacterias son dominantes durante fase termofílica intermedia (60°C), por su parte Steger y cols (2007 a) en compostaje de basura orgánica doméstica y paja de trigo observaron que el crecimiento de actinobacterias es favorecido a 40 °C (más de la mitad de la biomasa total microbiana correspondería a actinobacterias), indicando que un componente relevante de la comunidad en la etapa termofílica son las actinobacterias.

El análisis de correlación muestra que la diversidad del grupo actinobacteria aumenta linealmente con la disminución de la temperatura y con la disminución de la conductividad. Esto sugiere que si bien las actinobacterias son importantes en la etapa termofílica, habría actinobacterias mesófilas que incrementan su abundancia al término del proceso.

Por otra parte, los datos también sugieren que estas actinobacterias serían sensibles a la salinidad, expresada en la conductividad. Estos datos se relacionan con lo encontrado por Ghorbani-Nasrabadi y cols (2013), que observó una correlación negativa de la conductividad en suelos de pasto con la abundancia de actinobacterias expresadas en unidades formadoras de colonias (CFU) por gramo de suelo y con los estudios de Mokrane y cols (2013) quienes observaron una disminución de la densidad de actinobacterias (CFU) con el aumento de la conductividad, al analizar distintas muestras de suelo con conductividad variable. Por lo que el nivel de salinidad del ambiente sería un posible factor involucrado en el leve aumento de la diversidad de actinobacterias con la disminución de la conductividad eléctrica.



El análisis de los TRFs correspondiente a actinobacterias con el programa online Mica señala que el TRF 134, el más abundante durante el compostaje, correspondería al género *Actinomadura*. Actinobacterias pertenecientes a este género, también se han aislado en compostaje de estiércol de bovino (Puhl y cols., 2009) y en compostaje de aves de corral (Taibi y cols., 2012). Los otros TRF del grupo actinobacteria que permanecen durante todo el compostaje fueron: El TRF 239 y el TRF 441. El TRF 239 se asocia al género *Streptomyces*, el cual es abundante en suelo y compost, ampliamente reconocido como productor de metabolitos secundarios como antibióticos (Watve y cols., 2001), como promotor de crecimiento de plantas de arroz en conjunto con otras especies de actinobacterias (Gopalakrishnan., 2014) y también se ha usado como inoculante para acelerar el compostaje de cascara de oliva (Echeverria y cols., 2012). Y el TRF 441 se asoció a bacterias del género *Micrococcus*, donde se ha descrito la capacidad de estas bacterias de degradar contaminantes ambientales (Zhuang y cols., 2003). Estos géneros de Actinobacterias presentan potenciales aplicaciones como inoculantes para optimizar el compostaje.

Dinámicas de los grupos microbianos

El análisis de la dinámica de los grupos revela que para varios casos en los grupos bacteriano y fúngico desde el término de la fase termofílica II (54-42 °C) el porcentaje de cambio disminuye, lo que posiblemente se relacionaría con la estabilización de la comunidad microbiana y la madurez del compost. En contraste, en la etapa termofílica I (68-54 °C) se observa un alto recambio de poblaciones en los grupos bacterianos y fúngicos lo que posiblemente se relacionaría con la mayor presión de selección que ejerce los cambios en las condiciones fisicoquímicas de las etapas iniciales (i.e. Temperatura, pH, conductividad eléctrica) que generaría una sucesión de

microorganismos en el compostaje. Por otra parte, la mayor dinámica (DI) de los grupos bacteriano y fúngico, correspondiente al promedio de los valores de porcentaje de cambio en el tiempo, podría ser explicada por la alta disponibilidad de recursos en el compostaje (De Vries y Shade., 2013).

En contraste con lo anterior, el grupo actinobacteria presentó una baja dinámica por lo que existiría una comunidad de actinobacterias con pocos cambios de sus poblaciones en el hábitat de compostaje de alperujo, independiente de la variación en la disponibilidad de recursos. Las poblaciones de las actinobacterias dominantes exhibirían una alta resistencia a los cambios ambientales durante el compostaje.

Estas poblaciones dominantes de actinobacterias podrían cumplir un rol en la disminución de los polifenoles presentes en el alperujo lo cual podría sustentar su permanencia durante el todo el proceso, dando cuenta de su baja dinámica. De hecho, se han obtenido aislados de actinobacterias desde muestras de suelo con actividad lacasa. Esta actividad se relaciona con la degradación de polifenoles (Escudero y cols, 2012).

La persistencia de actinobacterias a lo largo de todo el proceso de compostaje fue descrita por Jurado y cols (2014) en compostaje de desecho de plantas de tomate seco y astillas de madera (1:1). Este sustrato posee un contenido de compuestos lignocelulósicos al igual que el alperujo (Albuquerque y cols., 2004). Estos autores (Jurado y cols 2014) observaron que los géneros *Microbacterium*, *Brachybacterium*, *Arthrobacter* y *Corynebacterium*, tanto de actinobacterias termófilas (45—55 °C) como mesófilas (25-30 °C) estarían presentes a lo largo de todo el compostaje. Asimismo se sugiere que estas actinobacterias tienen la habilidad de degradar compuestos

lignocelulósicos (Steger y cols., 2013 b). Ahora bien, los resultados encontrados en el presente seminario y en los reportes antes mencionados se contraponen con lo encontrado por Zhang y cols (2014) que observó en compostaje de hongos y paja de trigo una alta variación de las poblaciones y altos valores de riqueza de actinobacterias en comparación con el compostaje de otros sustratos como estiércol y desechos orgánicos domiciliarios. Por lo que las combinaciones de sustrato se relacionarían con la dinámica de grupos microbianos en el compostaje, para este caso específico, los cambios del grupo actinobacteria.

Proyecciones

Si bien el compostaje es un proceso microbiológico ampliamente utilizado y establecido, hay aún varios aspectos que pueden ser mejorados para su optimización, entre ellos:

- i) El recambio de grupos fúngicos y bacterianos es muy alto, lo que indica que estos grupos son más sensibles a las perturbaciones ambientales que ocurren durante el proceso. Esto da pie para indagar en la composición microbiológica para cada una de las fases, los metabolismos presentes y las funciones asociadas al proceso.
- ii) Las actinobacterias permanecen como una comunidad con pocas variaciones a lo largo del compostaje de alperujo, aunque durante la etapa de término del compostaje aumentan levemente de diversidad. Por lo que el aislamiento de nuevas especies de actinobacterias sería más probable en esta etapa, El aislamiento de actinobacterias nos permitiría comprobar su potencial de degradadoras de polifenoles, compuestos recalcitrantes y su

resistencia a altas temperaturas. Estos aislados podrían ser útiles como inoculante (optimización del compostaje).

El compostaje es un proceso que permite la reducción de residuos para la obtención de un producto con valor agregado para fines agrícolas. Por lo tanto, un compost de buena calidad puede mejorar su valor como acondicionador de suelos y a su vez ser un reservorio de cepas microbianas de interés aplicado (Ntougias y cols., 2013).

CONCLUSIONES

- El compost obtenido a partir de alperujo/paja de trigo (3:1) es de clase A, por lo tanto no tiene restricciones para su uso agrícola.
- Las actinobacterias observadas presentaron una baja diversidad, teniendo un TRF dominante a lo largo del compostaje. Este fragmento podría representar al género *Actinomadura*, observado en compostajes con otros sustratos.
- Los grupos fúngico y bacteriano no presentaron cambios significativos en la diversidad durante el compostaje, aunque fueron más diversos y dinámicos comparado con el grupo de las actinobacterias.
- Un leve aumento de la diversidad del grupo actinobacteria se relaciona con la disminución de los parámetros ambientales de temperatura y conductividad eléctrica.

REFERENCIAS

Linkografía

Accuweather (<http://www.accuweather.com/>), en línea, 02/07/2014

Expo Oliva 2005 (<http://www.expoliva.com/expoliva2005/simposium/comunicaciones/OLI-66.pdf>), en línea, 26/01/2014.

INN. Instituto Nacional de Normalización. 2004. Norma Chilena Oficial Nch2880: Compost, Clasificación y Requisitos. Chile (http://www.sinia.cl/1292/articles-32296_Norma.pdf), en línea, 26/01/2014.

MiCA Microbial community analysis III (mica.ibest.uidaho.edu/pat.php), en línea, 11/05/2015.

Servicio Nacional de Aduanas y Chileoliva 2013 (<http://www.chileoliva.cl/files/Noticia%20export%202012%20informativo.pdf>), en línea, 26/01/2014

TMECC. 2004. Test methods for the Examination of Composting and Compost. U.S. Composting Council Research and education Foundation (<http://compostingcouncil.org/tmecc>), en línea, 02/03/2014

Bibliografía

Alburquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J. 2004. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, 91: 195-200

Alburquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J. 2006. Composting of a solid olive-mill by product ("alperujo") and the potential of the resulting compost for cultivating pepper under commercial conditions. *Waste Management*, 26: 620-626.

Agnolucci, M., Cristani, C., Battini, F., Palla, M., Cardelli, R., Saviozzi, A., Nuti, M. 2013. Microbially-enhanced composting of olive mill solid waste (wet husk): Bacterial and fungal community dynamics at industrial pilot and farm level. *Bioresource Technology*, 134: 10-16.

Badia, D. 1992. Suelos afectados por sales. *Boletín de la Sociedad Catalana de Ciencias*, 13: 609-629.

Balis, C., Tassiopoulus, V., Lasaridi, K. 2002. Hydrogen peroxide effects on composting and its use in assessing the degree of maturity. *En* Insam, H., Riddech, N., Klammer, S. (eds.), *Microbiology of composting*. pp 323-332. Springer Science & Business Media.

Bernier, R y Alfaro, M. 2006. Acidez de los suelos y efectos del encalado. *Boletín INIA N° 151*, 17.

Cardona, N., Salazar, M., Jiménez, F. 2012. Actividad alelopática y antibacteriana de fracciones polares F1-C, F1-D y F1-F obtenidas de *Henriettella trachyphylla* Triana (Melastomataceae). Trabajo de grado, Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnología.

Danon, M., Franke-Whittle, I. H., Insam, H., Chen, Y., Hadar, Y. 2008. Molecular analysis of bacterial community succession during prolonged compost curing. *FEMS Microbiology Ecology*, 65 (1): 133–144

De Vries F y Shade A. 2013. Controls on soil microbial community stability under climate change. *Frontiers in Microbiology*, 4:265.

Echeverria, M. C., Cardelli, R., Bedini, S., Colombini, A., Incrocci, L., Castagna, A., Nuti, M. 2012. Microbially-enhanced composting of wet olive husks. *Bioresource technology*, 104: 509-517.

Escudero, E., Daza, O., Torres, J. 2012. Caracterización de actinobacterias raras, degradadoras de lignocelulosa: Demostración de actividad lacasa en dos aislados de *Tsukamurella* sp y *Cellulosimicrobium* sp *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2): 70-80.

Federici, E., Pepi, M., Esposito, A., Scargetta, S., Fidati, L., Gasperini, S., Altieri, R. 2011. Two-phase olive mill waste composting: Community dynamics and functional role of the resident microbiota. *Bioresource Technology*, 102: 10965–10972

Froni, L. 1999. Procesos microbianos. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto Argentina, 21: 294-295.

García de la Fuente, R., Cuesta, G., Sanchís-Jiménez, E., Botella, S., Abad, M., Fomes, F. 2011. Bacteria involved in sulfur amendment oxidation and acidification processes of alkaline 'alperujo' compost. *Bioresource Technology*, 102: 1481–1488.

Gardes, M y Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2): 113-118.

Gershuny, G. 2004. Compost, vermicompost, and compost tea: Feeding the soil on the organic farm. Cap.7, pp 48. Chelsea Green Publishing.

Gopalakrishnan, S., Vadlamudi, S., Bandikinda, P., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Rupela, O., Varshney, R. K. 2014. Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiological research*, 169(1): 40-48.

Hachicha, R., Hachicha, S., Trabelsi, I., Woodward, S., & Mechichi, T. 2009. Evolution of the fatty fraction during co-composting of olive oil industry wastes with animal manure: Maturity assessment of the end product. *Chemosphere*, 75(10): 1382-1386.

- Hassen, A., Belguith, K., Jedidi, N., Cherif, A., Cherif, M., Boudabous, A. 2001. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. *Bioresource technology*, 80(3): 217-225.
- Hoffmeister, D., Germani, J.C., Van Der Sand, S. 2005. Characterization of bacterial population during composting of municipal solid waste. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33(3): 283-290.
- Huo, Z., Zhang, N., Xu, Z., Li, S., Zhang, Q., Qiu, M., Shen, Q. R. 2012. Optimization of survival and spore formation of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 during bioorganic fertilizer storage. *Bioresource technology*, 108: 190-195.
- Iida, K. I., Ueda, Y., Kawamura, Y., Ezaki, T., Takade, A., Yoshida, S. I., Amako, K. 2005. *Paenibacillus motobuensis* sp. nov., isolated from a composting machine utilizing soil from Motobu-town, Okinawa, Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(5): 1811-1816.
- Jurado, M., López, M. J., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M. C., López-González, J. A., Moreno, J. 2014. Exploiting composting biodiversity: Study of the persistent and biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting. *Bioresource technology*, 162: 283-293.
- Kim, J. J., Kanaya, E., Weon, H. Y., Koga, Y., Takano, K., Dunfield, P. F., Kanaya, S. 2012. *Flavobacterium compostarboris* sp. nov., isolated from leaf-and-branch compost, and emended descriptions of *Flavobacterium hercynium*, *Flavobacterium resistens* and *Flavobacterium johnsoniae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(8): 2018-2024.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., Fomey, L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11): 4516-4522.
- López-González, J. A., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M. C., López, M. J., Jurado, M. M., Moreno, J. 2015. Dynamics of bacterial microbiota during lignocellulosic waste composting: studies upon its structure, functionality and biodiversity. *Bioresource technology*, 175: 406-416.
- Marsh, T., Saxman, P., Cole, J., Tiedje, J. 2000. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Program, a Web-Based Research Tool for Microbial Community Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8): 3616-3620.
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W. 2008. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology*, 10(6): 1571-1581.
- Mokrane, S., Bouras, N., Sabaou, N., Mathieu, F. 2013. Actinomycetes from saline and non-saline soils of Saharan palm groves: Taxonomy, ecology and antagonistic properties. *African Journal of Microbiology Research*, 7(20): 2167-2178.
- Moreno, J y Moral, R. 2007. Compostaje. Ediciones Mundi-Prensa, Bloque 2, Capítulo 7: 168-169; Capítulo 5: 114-129.

Novinscak, A., DeCoste, N. J., Surette, C., & Fillion, M. 2009. Characterization of bacterial and fungal communities in composted biosolids over a 2 year period using denaturing gradient gel electrophoresis. *Canadian Journal of Microbiology*, 55: 375–387.

Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Kavroulakis, N., & Papadopoulou, K. K. 2006. Ecophysiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline two-phase olive mill wastes. *Research in Microbiology*, 157: 376–385.

Ntougias, S., Bourtzis, K., Tsiamis, G. 2013. The microbiology of olive mill waste. *BioMed Research International*, Vol. 2013.

O’Ryan, J. 2007. El compostaje y su utilización en agricultura. *Manuales FIA de apoyo a la formación de Recursos Humanos para la Innovación Agraria*, Fundación para Innovación Agraria, Universidad de las Américas.

Petri, R., Podgorsek, L., & Imhoff, J. F. 2001. Phylogeny and distribution of the *soxB* gene among thiosulfate-oxidizing bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 197: 171-178.

Puhl, A. A., Selinger, L. B., McAllister, T. A., Inglis, G. D. 2009. *Actinomadura keratinilytica* sp. nov., a keratin-degrading actinobacterium isolated from bovine manure compost. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(4): 828-834.

Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K., Swings, J. 2003. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *Journal of Applied Microbiology*, 94; 127–137

Rojas, C y Sierra, C. 2003. La material orgánica y su efecto en las características fisicoquímicas y biológicas del suelo. *Serie actas INIA*, No. 23.

Romo-Sánchez, S., Alves-Baffi, M., Arévalo-Villena, M., Úbeda-Iranzo, J., Briones-Pérez, A. . 2010. Yeast biodiversity from oleic ecosystems: Study of their biotechnological properties. *Food Microbiology*, 27(4): 487-492.

Schütte, U., Abdo, Z., Bent, S. J., Shyu, C., Williams, C. J., Pierson, J. D., Forney, L. J. 2008. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 365–380

Segarra, G., Santpere, G., Elena, G., Trillas, I. 2013. Enhanced *Botrytis cinerea* resistance of *Arabidopsis* plants grown in compost may be explained by increased expression of defense-related genes, as revealed by microarray analysis. *Public Library of Science One*, 8(2): e56075.

Semple, K.T., Reid, B. J., Fermor, T. R. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution*, 112(2): 269-83.

- Stach, J., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Goodfellow, M., Bull, A. T. 2003. New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology*, 5(10): 828–841
- Steger, K., Sjögren, Å. M., Jarvis, Å., Jansson, J. K., Sundh, I. 2007. Development of compost maturity and Actinobacteria populations during full-scale composting of organic household waste. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 487–498.
- Steger, K., Jarvis, Å., Vasara, T., Romantschuk, M., & Sundh, I. 2007. Effects of differing temperature management on development of Actinobacteria populations during composting. *Research in Microbiology*, 158(7): 617-624.
- Suárez, J. 2012. Compostaje del coproducto (digestato) que se genera en la digestión metanogénica del alperujo (residuo de olivo). Memoria de título, Facultad de ciencias agrónomicas, Universidad de Chile.
- Taibi, Z., Saoudi, B., Boudelaa, M., Trigui, H., Belghith, H., Gargouri, A., Ladjama, A. 2012. Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. strain Cpt20 isolated from poultry compost. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166(3): 663-679.
- Takaku, H., Kodaira, S., Kimoto, A., Nashimoto, M., Takagi, M. 2006. Microbial communities in the garbage composting with rice hull as an amendment revealed by culture-dependent and -independent approaches. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101: 42–50.
- Tian, W., Sun, Q., Xu, D., Zhang, Z., Chen, D., Li, C., Shen, B. 2012. Succession of bacterial communities during composting process as detected by 16S rRNA clone libraries analysis. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 78: 58-66
- Tiquia, S.M. 2005. Microbiological parameters as indicators of compost maturity. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 816–828
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., & Itävaara, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, 72(2): 169-183.
- Varnero, M.T., Rojas, C., Orellana, R.. 2007. Índices de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*, 7(1): 28-37.
- Varnero, M.T., Faundez, P., Santibañez, C., Alvarado, P., Mora, M. 2004. Evaluación de lodo fresco y compostado como materia prima para la elaboración de sustratos. Simposio de la Ciencia del Suelo "Residuos Orgánicos y su uso en Sistemas Agroforestales"; 5-6 agosto 2004, Temuco, Chile.
- Vaz-Moreira, I., Faria, C., Nobre, M. F., Schumann, P., Nunes, O. C., Manaia, C. M. 2007. *Paenibacillus humicus* sp. nov., isolated from poultry litter compost. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(10): 2267-2271.

- Vivas, A., Moreno, B., Garcia-Rodriguez, S., Benítez, E. 2008. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresource Technology*, 100: 1319-1326.
- Watve, M., Tickoo, R., Jog, M. M., Bhole, B. D. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiol*, 176(5): 386–390.
- Weisburg, W.G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. 1990. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697-703.
- Tian, W., Sun, Q., Xu, D., Zhang, Z., Chen, D., Li, C., Shen, B. 2013. Succession of bacterial communities during composting process as detected by 16S rRNA clone libraries analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78: 58-66.
- Zhang, J., Zeng, G., Chen, Y., Yu, M., Yu, Z., Li, H., Huang, H. 2010. Effects of physico-chemical parameters on the bacterial and fungal communities during agricultural waste composting. *Bioresource Technology*, 102: 2950–2956.
- Zhang, X., Zhong, Y., Yang, S., Zhang, W., Xu, M., Ma, A., Liu, W. 2014. Diversity and dynamics of the microbial community on decomposing wheat straw during mushroom compost production. *Bioresource technology*, 170: 183-195.
- Zhuang, W.Q., Tay, J.H., Maszenan, A.M., Krumholz, L.R., Tay, S.L. 2003. Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. *Letters in Applied Microbiology*, 36(4): 251–7.

ANEXOS

Anexo 1: Parámetros fisicoquímicos:

Tabla 7. Resumen de valores promedios de parámetros fisicoquímicos determinados en el compostaje.

N° de muestra	Días de compostaje	Etapas ***	Temperatura (°C)*	Humedad (%)*	Conductividad (dS/m)*	pH*	C/N*
T0**	0	-	62	67,2	2,60	6,36	51,2
T1	4	Termofílica I	68 ± 1,07	26,7 ± 5,03	2,89 ± 0,19	5,72 ± 0,26	51,5 ± 0,59
T2	15	Termofílica I	69,4 ± 1,45	30,6 ± 4,86	3,31 ± 0,10	6,46 ± 0,11	42,2 ± 2,64
T3	40	Termofílica II	60 ± 2,60	30,8 ± 4,71	1,28 ± 0,28	6,46 ± 0,17	33,3 ± 1,18
T4	55	Termofílica II	54,3 ± 0,98	36,6 ± 31,3	1,58 ± 0,24	6,09 ± 0,23	27 ± 0,49
T5	80	Termofílica II	55,1 ± 0,98	38,9 ± 2,07	1,02 ± 0,06	6,7	16,3 ± 0,37
T6	114	Termofílica II	42,2 ± 7,5	23,9 ± 3,54	0,68 ± 0,04	6,7 ± 0,06	19 ± 2,05
T7	153	Enfriamiento	15,3 ± 1,68	42,7 ± 8,84	0,57 ± 0,06	6,43 ± 0,02	18 ± 1,10

(*) Promedios de los parámetros fisicoquímicos entre las 3 réplicas (pilas) con desviación estándar.

(**) Pila de origen o alperujo fresco.

(***) Según lo indicado en Figura 7.

Tabla 8. Porcentaje de humedad para cada pila a lo largo de las fechas de muestreo.

Fechas de muestreo	Pilas			Promedio	Desviación estándar
	Pila 1	Pila 2	Pila 3		
30 dic (alperujo) (*)	67,23				
06-ene	22,9	24,8	32,4	26,7	5,03
17-ene	27,2	28,5	36,2	30,6	4,86
13-feb	31,7	25,7	35	30,8	4,71
28-feb	42	54,8	54,6	50,5	7,33
25-mar	37,2	41,2	38,3	38,9	2,07
28-abr	27,9	21,1	22,8	23,9	3,54
12-jun	52,9	37,8	37,4	42,7	8,84
(**) Desp. CO ₂	50,8	52,4	65,5	8,07	50,8

* Fuente de origen, por lo que se considera una pila única.

** Registro de humedad cuantitativa de muestras usadas para el experimento de desprendimiento de CO₂

Tabla 9: Valores de porcentajes de nitrógeno total en los distintos tiempos de muestreos establecidos (*)

Fecha de muestreo	Tiempo de compostaje (días)	%N total
30 dic (alperujo)	0	0,94
06-ene	4	0,96
17-ene	15	1,15
13-feb	40	1,39
28-feb	55	1,62
25-mar	80	2,53
28-abr	114	2,16
12-jun	153	2,38

* Único muestreo (mezcla de 3 pilas)

Tabla 10. Valores de porcentajes promedio de carbono orgánico para las distintas pilas y tiempos de muestreo.

Fecha de muestreo	Tiempo de compostaje (días)	%C Org Pila 1	Desviación %C Org Pila 1	%C Org Pila 2	Desviación estándar %C Org Pila 2	%C Org Pila 3	Desviación estándar %C Org Pila 3
30 dic (alperujo)	0	48,1	1,7				
06-ene	4	49,1	1,6	49,1	1	50,1	9,2
17-ene	15	45,4	3,5	48,8	0,9	51,4	5,1
13-feb	40	48,1	0,9	45	0,9	45,6	1,4
28-feb	55	44,5	3,7	43,6	1,1	42,9	1,1
25-mar	80	41,1	4,2	40,2	1,3	42,1	1,4
28-abr	114	43,7	1,3	35,9	3,3	43,4	1,3
12-jun	153	40,5	2	45,7	0,7	42,2	3,2

Anexo 2: Determinación del índice de madurez

Datos para cálculo de índices de germinación: Muestreo: 13 Junio, 2014. Para las siguientes tablas: R: Rabanito, L: Lechuga., CR: Control rabanito, CL: Control lechuga. a, b, c: Replicas. %GR: Porcentaje de germinación relativo. DE: Desviación estándar. %Egr: Porcentaje de largo de radícula relativo real (sin ajuste a 100%), %Eg: Porcentaje de largo de radícula ajustado, IG: Índice de germinación.

Tabla 11. Registros para el cálculo de los índices de germinación en cada especie indicadora con uso de sustrato de Pila 1.

			Largo de radícula (cm)														
a *	Germinadas	%GR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Promedio	DE	%Egr	IG	%Eg
	9 de 10	100	0,5	0,7	3,3	4,5	1	2,5	4	6			2,8	2	84,1	75,6	84
	10 de 10	100	0,5	1,5	5,7	1,3	3	1,5	3,7	3	4	7	3,1	2,1	104	100	100
	9 de 10	90	0,5	4	0,5	5	6	5	3	2,5			3,3	2,1	109	90	100
	8 de 9	90	3,5	4,4	3,7	3,5	4	2,5	3,8	1			3,3	1,1	163	90	100
	9 de 9	100	4,5	3	3,5	3	4	3,5	1	2,5	4,2		3,2	1,1	173	100	100

* Lb problemas experimentales.

Tabla 12. Registros para el cálculo de los índices de germinación en cada especie indicadora con uso de sustrato de Pila 2.

			Largo de radícula (cm)														
a	Germinadas	%GR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Promedio	DE	(*)%Egr	IG	%Eg
	9 de 10	100	4	6	1	2,7	3	0,5	5	4,5	3,5		3,4	1,8	100	90	100
	10 de 10	100	3,7	5,2	1	4	2,5	3,5	4,5	2	3,5	3	3,3	1,2	110	100	100
	9 de 10	90	0,3	3,5	2,5	6	2,5	3	2,5	3	2,5		2,9	1,5	94	83,7	93
	8 de 8	100	3,8	2	2	2,3	2,5	1,5	1,8	0,5			2,1	0,9	101	100	100
	10 de 10	100	1,3	2	2,5	1	2,5	4	4,5	4	3,5	4	2,9	1,2	120	100	100
	8 de 9	90	0,3	1	2,5	1,5	4,5	3,5	4	4			2,7	1,6	142	90	100

Tabla 13. Registros para el cálculo de los índices de germinación en cada especie indicadora con uso de sustrato de Pila 3.

			Largo de radícula (cm)														
ra	Germinadas	%GR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Promedio	DE	(*)%Egr	IG	%Eg
	10 de 10	100	5,8	3	3	4	2,5	5	4,5	2,5	2,8	7	4	1,5	120	100	100
	9 de 10	90	0,5	1	2	3	2,8	3	3	5,5			2,6	1,5	86,7	77,4	86
	9 de 10	90	0,3	2	1,5	1,5	2	1,7	1	4,3	7		2,4	2	77,6	69,3	77
	10 de 10	100	2,5	2	1,5	2,5	2,5	1,5	2	4	3	4	2,6	0,9	126	100	100
	9 de 10	90	0,5	4	4	1,5	3,5	3,5	3,5	4,3	3		3,1	1,3	126	90	100
	9 de 10	90	0,2	0,5	1	2,7	1,7	3	4,5	3,7	3,8		2,3	1,6	125	90	100

Tabla 14. Registros para el cálculo de los índices de germinación en cada especie indicadora sin uso de sustrato.

		Largo de radícula											
uestra	Germinadas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Promedio	DE
DRa	9 de 10	1	3,8	2,5	2,3	2,5	4,5	4,5	3	6		3,3	1,5
DRb	10 de 10	1	0,5	1,5	6	1	4,5	3	3,5	3	6	3	2
DRc	10 de 10	1,5	5,5	2,5	3	4,5	3,5	1	3	3	3	3,1	1,3
CLa	9 de 9	2	2	0,5	3	1,5	2	2	2	3,2		2	0,8
CLb	10 de 10	2,5	1,5	2	2,5	3	2,5	2,5	2,5	3	2,5	2,5	0,4
CLc	10 de 10	2,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,5	2,3	3,5	1,5	2,5	1,9	0,8

Anexo 3: Identificación de TRFs.

Tabla 15. Asignación de TRFs a OTUs según marcador molecular.

Región de TRFs	Región amplificada (*)	Denominación TRFs fúngicos	Longitud (bp) de los TRFs	Región amplificada (*)	Denominación TRFs bacterianos	Longitud de TRF (bp)	Región amplificada (*)	Denominación TRFs actinobacterias
	<i>ITS1-ITS4</i>	H-56	43	<i>RNAr 16S</i>	B-43	134	<i>ACT</i>	A-134
	<i>ITS1-ITS4</i>	H-77	56	<i>RNAr 16S</i>	B-56	216	<i>ACT</i>	A-216
	<i>ITS1-ITS4</i>	H-90	77	<i>RNAr 16S</i>	B-77	239	<i>ACT</i>	A-239
	<i>ITS1-ITS4</i>	H-139	90	<i>RNAr 16S</i>	B-90	264	<i>ACT</i>	A-264
	<i>ITS1-ITS4</i>	H-170	153	<i>RNAr 16S</i>	B-153	441	<i>ACT</i>	A-441
	<i>ITS1-ITS4</i>	H-201	170	<i>RNAr 16S</i>	B-170			
	<i>ITS1-ITS4</i>	H-209	201	<i>RNAr 16S</i>	B-201			
	<i>ITS1-ITS4</i>	H-227	209	<i>RNAr 16S</i>	B-209			
	<i>ITS1-ITS4</i>	H-236	236	<i>RNAr 16S</i>	B-236			
	<i>ITS1-ITS4</i>	H-306	337	<i>RNAr 16S</i>	B-337			
	<i>ITS1-ITS4</i>	H-324	373	<i>RNAr 16S</i>	B-373			
	<i>ITS1-ITS4</i>	H-451	451	<i>RNAr 16S</i>	B-451			
	<i>ITS1-ITS4</i>	H-1098						

* Según partidor utilizado (Tabla 1).

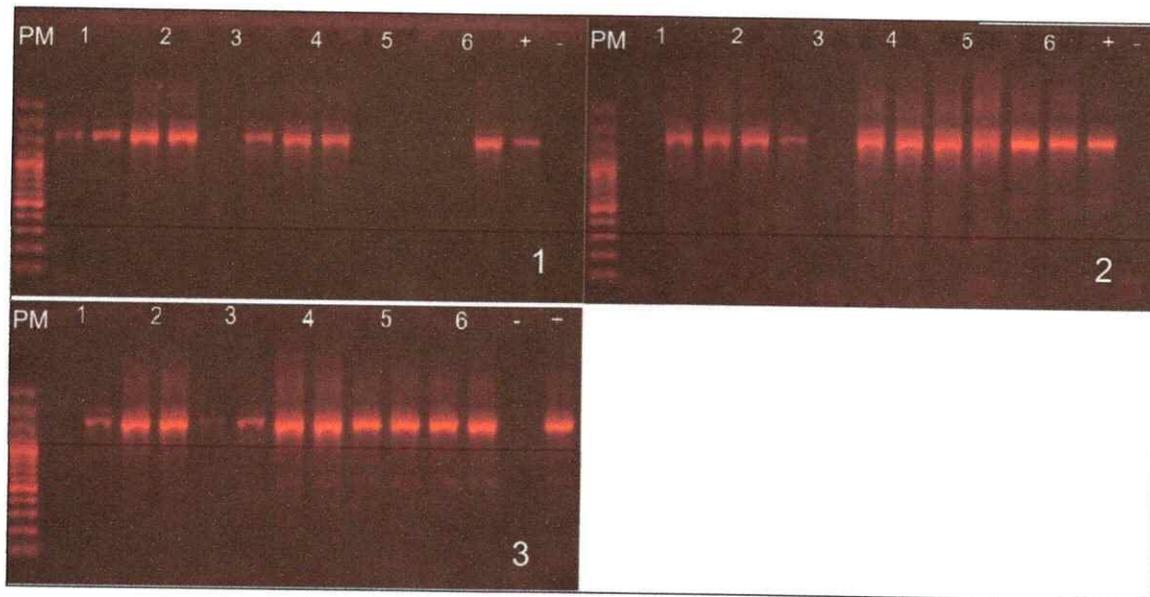


Figura 15. Electroforesis en gels de agarosa de los amplicones correspondientes a los marcadores moleculares específicos para el grupo bacteriano (marcador *RNAr 16S*). 1-6: Duplicado para cada tiempo de muestreo (T1-T6). 1, 2, 3: Pila. PM: Marcador de peso molecular; 100-3000 bp. El tamaño de los productos de amplificación se estima en 1500 bp.

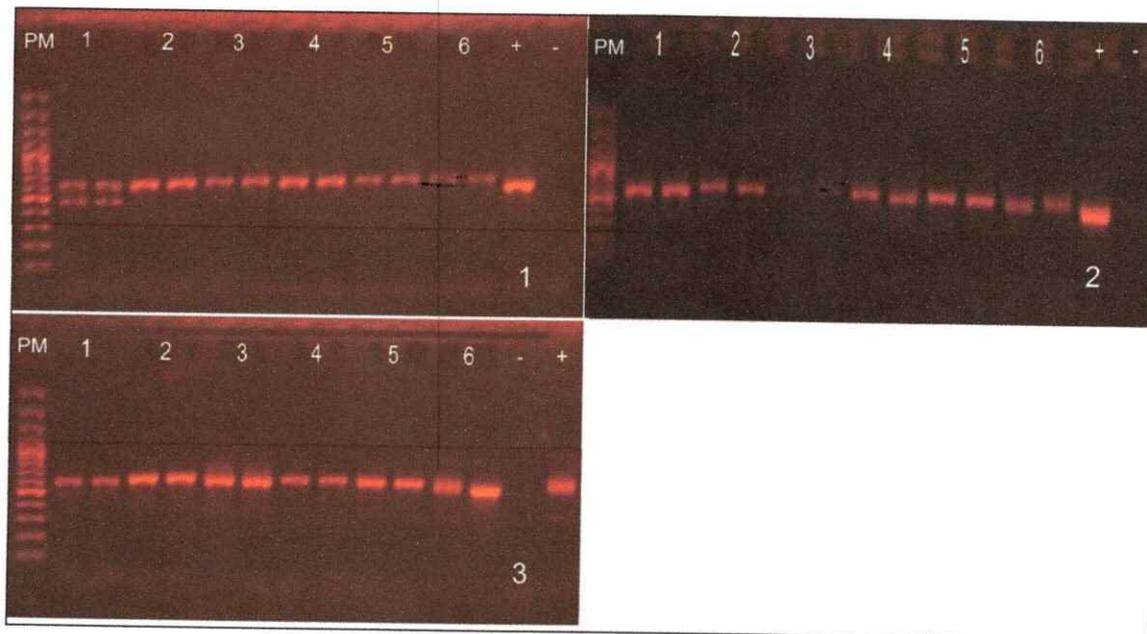


Figura 16. Electroforesis en gels de agarosa de los amplicones correspondientes a los marcadores moleculares específicos para el grupo fúngico (marcador *ITS1-ITS4*). 1-6: Duplicado para cada tiempo de muestreo (T1-T6). 1, 2, 3: Pila. PM: Marcador de peso molecular; 100-3000 bp. El tamaño de los productos de amplificación se estima entre 500 y 600 bp.

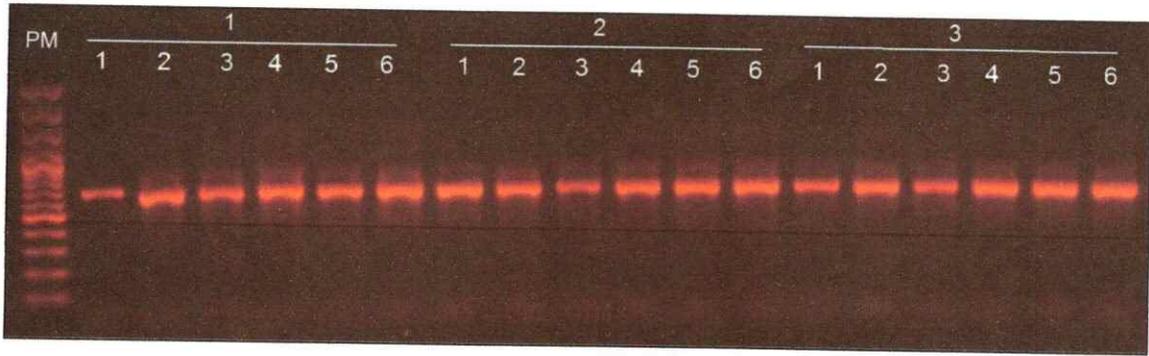


Figura 17. Electroforesis en geles de agarosa de los amplicones correspondientes a los marcadores moleculares específicos para el grupo actinobacteria (marcador *ACT*). 1-6: Tiempo de muestreo (T1-T6). 1, 2, 3: Pila. No se adjunta control positivo (señal muy tenue). PM: Marcador de peso molecular; 100-3000 bp. El tamaño de los productos de amplificación se estima en 700 bp.