

**EFFECTO DEL TIEMPO, TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO Y TAMIZADO DEL
SUELO SOBRE ALGUNAS POBLACIONES MICROBIANAS**

DIANA LUCÍA VARGAS GUTIÉRREZ

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

BOGOTÁ, D.C.

MAYO 2010

**EFFECTO DEL TIEMPO, TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO Y TAMIZADO
DEL SUELO SOBRE ALGUNAS POBLACIONES MICROBIANAS**

DIANA LUCÍA VARGAS GUTIÉRREZ

APROBADO

Ingrid Schuler, Ph.D.

Decana Académica
Facultad de Ciencias

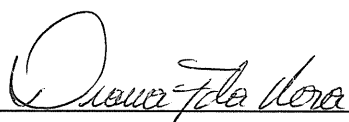
Janeth Arias, M.Sc.

Directora Carrera de
Microbiología Industrial

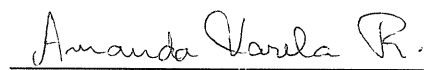
**EFFECTO DEL TIEMPO, TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO Y TAMIZADO DEL
SUELO SOBRE ALGUNAS POBLACIONES MICROBIANAS.**

DIANA LUCÍA VARGAS GUTIÉRREZ

APROBADO



Diana Fernanda Vera
Biologa M. Sc.
DIRECTORA



Amanda Varela Ph. D.
CODIRECTORA

Gerardo Moreno
Ingeniero agrónomo
JURADO

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia. ”

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Geográfico Agustín Codazzi por darme la oportunidad de desarrollar el trabajo de grado, y por todo el apoyo financiero.

A los miembros del Laboratorio Nacional de Suelos del Instituto Geográfico Agustín Codazzi por la colaboración brindada durante el desarrollo del proyecto.

A la Doctora Diana Fernanda Vera por todo su apoyo, su comprensión, y sabiduría a la hora de dirigir el proyecto.

A la Doctora Amanda Varela por su conocimiento y colaboración.

TABLA DE CONTENIDO

1.INTRODUCCIÓN	12
2.JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
3.MARCO TEÓRICO	14
3.1 El suelo	14
3.2 Microorganismos del suelo	15
3.3 Métodos Directos	17
4, OBJETIVOS	18
4.1Objetivo General	18
4.2Objetivos Específicos.....	18
5. METODOLOGÍA	19
5.1Localización y muestreo del suelo	19
5.2Procesamiento de las muestras.....	19
5.2.1. Equivalente peso seco.....	23
5.2.2 Recuento de bacterias mesófilas aerobias	23
5.2.3 Recuento de hongos mesófilos aerobios	24
5.2.4 Recuento de bacterias celulolíticas aerobias.....	24
5.2.5 Recuento de microorganismos amonificantes	24
5.3 Análisis estadístico.....	25
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
7. CONCLUSIONES.....	37

8. RECOMENDACIONES	38
9. BIBLIOGRAFÍA	39
10. ANEXOS	46

INDICES DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros evaluados del análisis físico de las dos muestras colectadas ...	20
Tabla2. Parámetros evaluados del análisis químico de las dos muestras colectadas ..	21
Tabla 3. Tratamientos de las dos muestras de suelo.....	22
Tabla 4. Análisis químico de las dos muestras de suelo.....	26
Tabla 5. Análisis físico de las dos muestras de suelo.....	26

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metodología del tratamiento previo	22
Figura 2. Metodología general	23
Figura 3. Efecto de los cuatro tratamientos a través del tiempo sobre la densidad de bacterias para Fusagasugá	28
Figura 4. Efecto de los cuatro tratamientos a través del tiempo sobre la densidad de bacterias para Villavicencio.....	28
Figura 5. Efecto de los cuatro tratamientos a través del tiempo sobre la densidad de hongos para Fusagasugá.....	29
Figura 6. Efecto de los cuatro tratamientos a través del tiempo sobre la densidad de hongos para Villavicencio.....	29
Figura 7. Efecto de los cuatro tratamientos a través del tiempo sobre la densidad de celulolíticos para Fusagasugá.....	30
Figura 8. Efecto de los cuatro tratamientos a través del tiempo sobre la densidad de celulolíticos para Villavicencio.....	30
Figura 9. Efecto de los cuatro tratamientos a través del tiempo sobre la densidad de amonificantes para Fusagasugá	33
Figura 10. Efecto de los 4cuatrotratamientos a través del tiempo sobre la densidad de amonificantes para Villavicencio.....	33
Figura 11. Análisis de componentes principales de los tratamientossobre todas las poblaciones microbianas	36

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Tablas de recuento de las poblaciones de bacterias, hongos, bacterias celulolíticas y microorganismos amonificantes de las dos muestras de suelo.

Anexo 2. Imágenes crecimiento de bacterias, hongos, microorganismos celulolíticos y amonificantes.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del tiempo, la temperatura de almacenamiento y el tamizado del suelo sobre algunas poblaciones microbianas. Para ello se realizaron dos muestreos uno en Fusagasugá y otro en Villavicencio. Cada una de las muestras fue dividida en dos, una parte fue cribada en un tamiz de 2 mm y la otra fue procesada sin realizar ningún tipo de manipulación adicional, tanto las muestras tamizadas y sin tamizar se dividieron nuevamente y se almacenaron durante 45 días, una porción a temperatura ambiente (20°C) y la restante a temperatura de refrigeración (4°C). Obteniendo así cuatro tratamientos: TTA (tamizado, temperatura ambiente (20°C)), TTR (tamizado temperatura de refrigeración(4°C)), STTA (sin tamizar, temperatura ambiente (20°C)), STTR (sin tamizar, temperatura de refrigeración(4°C)). A los 8, 15, 30 y 45 días se realizó la siembra y cuantificación de bacterias, hongos, bacterias celulolíticos y amonificantes para los cuatro tratamientos. El suelo proveniente de Fusagasugá presentó mayor porcentaje de materia orgánica y mejor capacidad de intercambio catiónico. Al evaluar el efecto de los cuatro tratamientos sobre la densidad de los grupos funcionales no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, y se observó que la densidad no tuvo un crecimiento constante sino que durante el tiempo evaluado unos días aumentó y otros disminuyó.

1. INTRODUCCIÓN

El suelo es un sistema complejo y heterogéneo de formas vivientes y no vivientes (1), es el único medio que contiene una gran diversidad de organismos con diferentes tipos fisiológicos y morfológicos dentro de ellos podemos encontrar bacterias, levaduras, hongos, cianobacterias, algas, protozoos que constituyen la biomasa microbiana (2).

Estos organismos son de gran importancia para el suelo y su funcionamiento, ya que intervienen en el establecimiento de los ciclos biogeoquímicos así como en la formación de la estructura de los mismos (3), además son esenciales ya que se consideran un buen indicador de la calidad del suelo (4).

Gran variedad de métodos han sido desarrollados para estudiar las poblaciones microbianas tanto métodos cualitativos como cuantitativos en el suelo. Para evaluar estas poblaciones en el ecosistema se analizan muestras representativas, basándose principalmente en el número de individuos, poblaciones específicas o actividades metabólicas. (5)

Para el manejo de las muestras, según la NTC 4113-6 se recomienda que sean procesadas inmediatamente después del muestreo, si esto no se puede llevar a cabo y se tiene que recurrir al almacenamiento, estas condiciones son fundamentales para medir las propiedades biológicas, ya que en la muestra de suelo se genera un nuevo ambiente en la medida que cambian sus condiciones (6). La temperatura, el contenido de agua, la disponibilidad de oxígeno, la acidez, el contenido de especies minerales y el tiempo de almacenamiento que influyen en la actividad de la microbiota en el suelo (7).

Las muestras deben pasarse a través de un tamiz de 2 mm para retirar la grava y partes vegetales de mayor tamaño. Al realizar este procedimiento se facilita el intercambio aeróbico del suelo. Deben almacenarse a 4°C con acceso de aire libre, para lo cual es adecuada una bolsa plástica. El tiempo de almacenamiento no debe superar los 3 meses.

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el suelo habitan gran cantidad de microorganismos que cumplen un papel fundamental, ya que son los principales actores de los procesos biogeoquímicos, están involucrados en la transformación de los sustratos, forman parte de la reserva nutricional y energética del suelo, además de ser un componente lábil de la materia orgánica (8), por eso sirven como un indicador de la calidad general del suelo (3), definiendo esta como la capacidad continua del suelo para funcionar como sistema vital dentro del ecosistema para sostener la productividad biológica (9).

El suelo se ve influenciado por parámetros del ambiente como la temperatura, creando variedad de hábitats para los microorganismos (10) y en algunas ocasiones causando efectos en los mismos, por eso la biomasa microbiana al igual que el monitoreo y descripción de las comunidades microbianas son requerimientos básicos para entender los procesos microbiológicas.

Por lo tanto, al momento de realizar estudios microbiológicos a una muestra de suelo es indispensable proveer las condiciones adecuadas previamente a su procesamiento y garantizar que las actividades de preparación de la muestra previamente a su análisis tengan la menor incidencia en los parámetros microbianos a evaluar.

Por otro lado, es una necesidad para el Laboratorio Nacional de Suelos del Instituto Geográfico Agustín Codazzi, llevar a cabo un proceso de validación de métodos analíticos para la acreditación con base en la norma ISO 17025:2005, y como parte de las pruebas iniciales, se ha establecido evaluar la incidencia de parámetros como el tiempo, la temperatura de almacenamiento y el tamizado previo de las muestras de suelo, sobre la población microbiana, ya que al ser una entidad rectora de orden nacional en el análisis de suelos debe dar las pautas y normas para que los demás laboratorios puedan aplicar estos parámetros.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 El suelo

El suelo corresponde a la parte más externa de la corteza terrestre, resultante del proceso de meteorización de las rocas subyacentes (11). Es un sistema de interacción entre tres fases, una fase sólida, constituida por materia mineral cuyo tipo y composición esta dado por las características de las rocas del subsuelo, así como de los procesos edáficos que hayan tenido lugar en su formación, y por materia orgánica, procedente de la actividad de los distintos organismos vivos del suelo y su composición y cantidad es variable, principalmente en función del tipo de cubierta vegetal, una fase líquida, y una fase gaseosa o atmósfera del suelo (12). La porción inorgánica es muy importante por su influencia en la disponibilidad de nutrientes, aireación, retención de agua, entre otros. El resto del volumen del suelo está constituido por espacios porosos, que a su vez están ocupados por agua y los gases que constituyen la atmósfera edáfica. La porosidad (cantidad y tamaño de los poros) depende de la textura, la cual está determinada por la cantidad de arena, limo y arcilla, la estructura y el contenido en materia orgánica (13). Todos estos factores determinan a su vez el movimiento y capacidad de retención de agua del suelo y la composición gaseosa de su atmósfera enriquecida con dióxido de carbono y empobrecida en oxígeno, como resultado de la respiración aeróbica de raíces de plantas, animales y microorganismos. Pero cuando se dan condiciones de anaerobiosis aparecen otros gases como óxido nitroso, nitrógeno gaseoso y metano, resultantes de actividad respiratoria anaeróbica bacteriana. El contenido en agua como la composición de la atmósfera del suelo fluctúan ampliamente (13).

La temperatura del suelo está relacionada con la temperatura del aire atmosférico adyacente a las capas próximas al suelo, está sometida a cambios estacionales y diarios. Se acepta que a 50 centímetros de profundidad la temperatura del suelo es equivalente a la del aire atmosférico más 1 grado centígrado (14). De igual forma se ve

influenciada por el ángulo de incidencia de los rayos solares, la cobertura del suelo, el color, el contenido de agua, y la profundidad (15).

La temperatura es un factor físico que interviene en diferentes reacciones físicas y químicas del suelo, se relaciona con las actividades funcionales de las raíces de las plantas como la absorción y translocación de agua, afecta la difusión de los nutrientes en el suelo, influye en la descomposición de la materia orgánica, entre otros.(16)

Al momento de trabajar con un hábitat como el suelo, las condiciones de almacenamiento tienen influencia en los procesos bioquímicos de los organismos y son por lo tanto, vitales al medir las propiedades biológicas ya que se disturba el suelo y se genera un nuevo ambiente, creándose nuevos límites a la densidad y actividad de los microorganismos (6).

En un laboratorio, las prácticas de preparación del suelo como el secado al aire pueden provocar la disminución o cese de la actividad microbiana (17); igualmente el tiempo de almacenamiento puede conducir a una reducción de microorganismos proporcional a su duración (6). Las formas de almacenamiento más comunes son congelamiento y por conservación en frío, lo que de igual forma puede presentar un efecto en la composición de la comunidad microbiana (6). En algunos estudios como el realizado por Pesaro *et al.* (1993) recomiendan almacenar el suelo a 4°C para más de tres meses o a -22°C sin exceder un año. Por su parte Foster (2003) afirma que las muestras deben ser almacenadas preferiblemente entre 2 y 4 °C por el menor tiempo posible hasta que sea examinado.

3.2 Microorganismos del suelo

El suelo alberga una gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas, estas últimas agrupadas según su tamaño como macrofauna, mesofauna y microfauna (15). Es un ambiente muy apropiado para el desarrollo de los microorganismos tanto eucariotas donde se encuentran algas, hongos y protozoos, como procariotas

constituido por bacterias y Archea, que son organismos unicelulares, numerosos en el suelo (19).

Todos estos organismos interaccionan entre sí de forma muy variada y compleja, además contribuyen a las características propias del suelo por su papel en la transformación de las fases sólida, líquida y gaseosa (13). Los microorganismos desempeñan funciones de gran importancia en relación con procesos de edafogénesis; fertilidad de las plantas y protección frente a patógenos; degradación de compuestos xenobióticos; ciclos biogeoquímicos de elementos como el carbono, el nitrógeno, oxígeno, el azufre, el fósforo, el hierro y otros metales; entre otros (20).

Como parte importante del ciclo del carbono se encuentran microorganismos como algas, hongos y bacterias anaerobias y aerobias,(21,22) capaces de degradar la celulosa , por medio de un sistema de enzimas llamado celulasas, las cuales rompen las moléculas insolubles de celulosa formando mono o disacáridos que son transportados dentro de la célula(23).Para evidenciar la formación de estos microorganismos en el laboratorio de manera semicuantitativa se utiliza el medio cultivo que carboximetil celulosa, una vez este sea revelado con rojo congo se podrá observar halos hidrólisis (24).

Por su parte para el ciclo del nitrógeno existen microorganismos capaces de convertir el nitrógeno orgánico en amonio o amoniaco, este proceso recibe el nombre de amonificación. Se puede evidenciar la presencia de estos microorganismos utilizando el reactivo de Nessler (25,5).

Los organismos del suelo no se distribuyen al azar sino que siguen patrones espaciales de agregación, a escalas diferentes. Esta estructuración obedece al efecto causado por diferentes factores de control y es totalmente dinámica. Para poder romper estas agregaciones se aconseja realizar una homogenización del suelo por medio de tamizado, contribuyendo a que los organismos se distribuyan al azar (26). Estas agregaciones son factores determinantes para el espacio de la microbiota del suelo (27). La resistencia de los agregados evoluciona a través de las interacciones con los

microorganismos, las raíces de las plantas, las hifas de los hongos, polisacáridos y materiales húmicos (28).

Para poder entender la estructura y función de los ecosistemas se requiere más que un simple reconocimiento de las interacciones entre las poblaciones, se necesita la información cuantitativa sobre el número de organismos, biomasa de la población, tasas de actividad y de crecimiento y de muerte, y tasa de transferencia de oxígeno(5) Para ello se utilizan una serie de métodos que son cruciales para el establecimiento de la ecología microbiana como una disciplina científica y para entender la microbiología de los microorganismos (5).

3.3 Métodos directos

Para determinar el número de organismos se utilizan métodos directos. Los métodos directos son aquellos que se realizan por observación, entre los cuales se encuentra el método de recuento al microscopio, donde los microorganismos pueden contarse mediante la observación directa al microscopio. Para los microorganismos de tamaño relativamente grande, como protozoos, algas y hongos es más ventajoso realizar el recuento directo mediante cámaras de recuento. Dentro de los métodos viables se encuentran el recuento en placa y el recuento de número más probable (NMP); estos requieren la separación de los microorganismos en unidades reproductoras individuales. El método de recuento en placa en agar, emplea varios medios de cultivo y condiciones de incubación (26). Para la siembra puede esparcirse una dilución de la muestra sobre el agar. El método de NMP emplea análisis estadístico y diluciones sucesivas de la muestra (29).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Evaluar los efectos del tiempo, la temperatura de almacenamiento y el tamizado del suelo sobre las poblaciones microbianas de bacterias, hongos, amonificantes y celulolíticos mesófilos aerobios.

4.2 Objetivos específicos

- Efectuar la caracterización físico-química de las dos muestras de suelo seleccionadas en el estudio.
- Estimar la viabilidad de las poblaciones microbianas de bacterias, hongos, amonificantes y celulolíticos mesófilos aerobios de las dos muestras de suelo antes y después del sometimiento a las condiciones de tiempo y temperatura de almacenamiento y tamizado.
- Estandarizar las condiciones de tiempo y temperatura de almacenamiento y tamizado de las dos muestras de suelo para ser implementadas por el Laboratorio Nacional de Suelos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Suelos del Instituto Agustín Codazzi de Bogotá, D.C.

5.1 Localización y muestreo de suelo

Se obtuvieron dos muestras de suelo. Una de estas se tomó en el Departamento de Cundinamarca, municipio de Fusagasugá, en la Reserva Natural de San Rafael, cuya ubicación geográfica es (4°18'39.35"N; 74°23'00.42"O); se tomó una sola muestra, en superficie inclinada, con una profundidad de 30 cm, en el mes de Febrero de 2010. La otra muestra se tomó en el Departamento del Meta, municipio de Villavicencio, vereda Barcelona, en la finca Bellavista, cuya ubicación geográfica es (4°04'04.50"N; 73°35'50.28"O), de igual forma se tomó una sola muestra en una superficie plana, con una profundidad de 30 cm, en el mes de marzo del 2010.

5.2 Procesamiento de las muestras

Las dos muestras se subdividieron en dos, una submuestra, fue homogenizada previamente y cribada sobre un tamiz de 2 mm de poro con cumplimiento de la normatividad ASTM antes de proceder con el análisis. La otra submuestra fue procesada sin realizar ningún tipo de manipulación adicional. Estos procedimientos se llevaron a cabo dos días después de los respectivos muestreos, posteriormente se realizó la siembra en superficie en agar nutritivo, para el recuento de bacterias, agar PDA para hongos y agar CMC para celulolíticos realizando duplicados para las dos diluciones empleadas y se efectuó el análisis de amonificantes por la técnica de Número Más Probable (NMP) con cinco réplicas por 3 diluciones. A partir de este momento se sometieron las muestras a 4 tratamientos (tabla 3) y para cada tiempo de almacenamiento (8, 15, 30 y 45 días) se realizaba la siembra y posterior recuento de bacterias, hongos, microorganismos celulolíticos y amonificantes mesófilos aerobios. Las dos muestras colectadas fueron procesadas para el análisis de las siguientes propiedades físicas y químicas:

Tabla 1. Parámetros evaluados del análisis físico para las dos muestras colectadas

Análisis físico
Humedad (%)
Densidad real (g/cm ³)
Densidad aparente (g/cm ³)
Porcentaje de arcilla (%)
Porcentaje de limo (%)
Porcentaje de arena (%)
Clase textural

Tabla 2. Parámetros evaluados para el análisis químico de las dos muestras colectadas.

Análisis químico
pH
Acidez intercambiable
Porcentaje de saturación de acidez intercambiable (S.A.I)
Materia orgánica (3-5%)
Capacidad de intercambio catiónico – CIC (meq/100g)
Ca (meq/100g)
Mg (meq/100g)
K(0,2-0,4 (meq/100g)
Na (meq/100g)
Fosforo disponible (ppm)

Tabla 3. Tratamientos de las dos muestras de suelo.

TRATAMIENTOS DE LAS MUESTRAS	
TTA	Muestra tamizada, almacenada a 20° C
STTA	Muestra sin tamizar, almacenada a 20°C
TTR	Muestra tamizada, almacenada a temperatura de 4°C
STTR	Muestra sin tamizar, almacenada a temperatura de 4°C

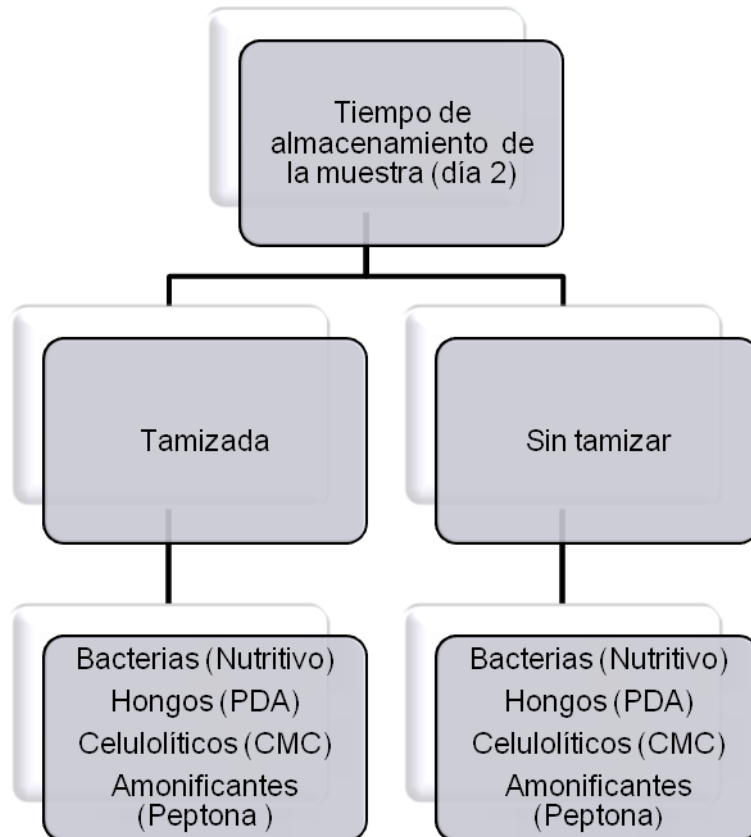


Figura 1. Metodología del tratamiento previo.

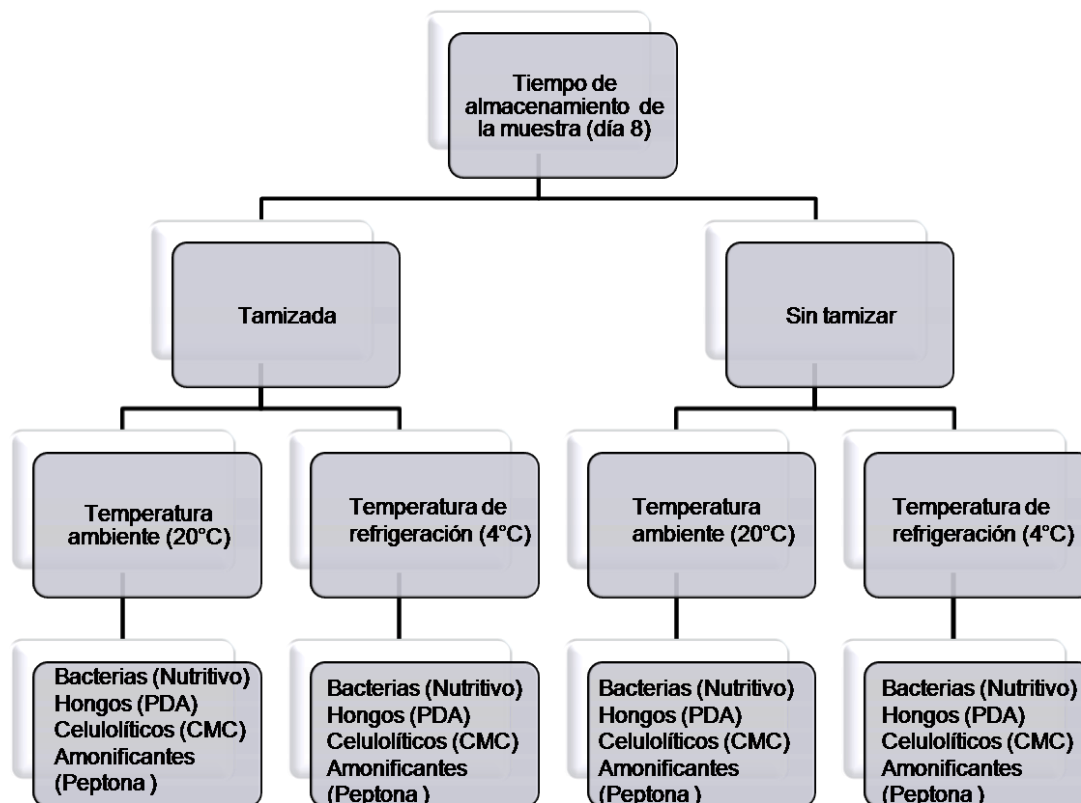


Figura 2. Metodología general usada en el trabajo.

5.2.1 Equivalente de peso seco

Previamente a la siembra de los microorganismos se calculó el equivalente en peso seco de suelo. Se pesaron 10 g del suelo de muestra en una cápsula metálica y se introdujo la muestra en un horno durante 24 horas a 105°C; posteriormente se tomaron las lecturas del peso. A partir de este valor se estableció el peso de suelo fresco que fue requerido para obtener un equivalente de 10 g de suelo seco. Se prepararon las suspensiones en 90 ml de solución salina al 0.85%, y se agitaron durante una hora a 300 rpm para luego realizar las respectivas siembras (30).

5.2.2 Recuento de bacterias mesófilos aerobias

Para cada tratamiento primero se estimaron y luego se ajustaron las diluciones, se inoculó por duplicado, para dos diluciones, en superficie 0,1 ml sobre agar nutritivo (AN), y se incubaron a 30°C durante 24 a 48 horas. Se realizó el conteo de las colonias

formadas en la totalidad de la caja para cada dilución que tuviera entre 30 y 300 colonias y siguiendo los parámetros de cuantificación definidos por el Instituto geográfico Agustín Codazzi.

5.2.3 Recuento de hongos mesófilos aerobios

Para cada tratamiento primero se estimaron y luego se ajustaron las diluciones, se inoculó por duplicado, a partir de dos diluciones, en superficie 0,1 ml sobre agar papa dextrosa (PDA), y se incubaron a 30°C durante 3-5 días. Se realizó el conteo de las colonias formadas en la totalidad de la caja para cada dilución que tuviera entre 30 y 300 colonias siguiendo los parámetros de cuantificación definidos por el Instituto geográfico Agustín Codazzi.

5.2.4. Recuento de bacterias celulolíticas aerobias

Para cada tratamiento primero se estimaron y luego se ajustaron las diluciones, se inoculó por duplicado, a partir de dos diluciones, en superficie 0,1 ml, sobre agar carboximetilcelulosa (CMC), y se incubaron durante 3-5 días a 30°C. Para la prueba de celulólisis se cubrió la superficie del medio de cultivo caja con una solución rojo congo al 0.05% durante 30 minutos, posteriormente se agregó NaCl, dejándolo actuar durante 5 minutos y posteriormente ácido acético durante 5 segundos. Se realizó el conteo de colonias que presentaron actividad enzimática en aquellas cajas que contenían entre 30 y 300 colonias siguiendo los parámetros de cuantificación definidos por el Instituto geográfico Agustín Codazzi.

5.2.5 Recuento de microorganismo amonificantes

Para cada tratamiento primero se estimaron y luego se ajustaron las diluciones, se inoculó 1 ml al caldo base (peptona bacteriológica 2 g/L) dispuesto en tubos de ensayo, realizando 3 diluciones y 5 réplicas por cada una; se incubaron a 30°C durante 24 horas. Se hizo evidente la presencia de amonio por medio del reactivo de Nessler, agregando aproximadamente 60 µL del mismo y permitiendo el desarrollo de color. Se utilizó un tubo sin inóculo como blanco. Se calculó el número de microorganismos

utilizando la tabla de Mc Grady para establecer NMP/ g suelo siguiendo los parámetros de cuantificación definidos por el Instituto geográfico Agustín Codazzi.

5.3 Análisis estadístico

Dado que los datos se encuentran expresados en términos de conteo se usó la función matemática de logaritmo en base 10 para el procesamiento estadístico. Se utilizó la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas y posteriormente se usó un ANOVA de tres vías para determinar el efecto de los tratamientos realizados.

Por último se hizo un análisis de componentes principales para determinar cuál de las variables ocasiona mayor variabilidad en los datos, para ello se utilizó el programa estadístico MSVP. Los datos de este análisis están dados por la fórmula para calcular colonias a partir de múltiples diluciones. Para aquellos datos del recuento que fueron reportados como mayor o menor a, se les quitaron estos símbolos para efectos de un mejor análisis estadístico.

$$N = \frac{\sum \text{colonias}}{V(n_1 + 0.1 * n_2) * d}$$

N=número de microorganismos por gramo

V=volumen del inóculo

N1=numero de cajas retenidas en la primera dilución

N2=numero de cajas retenidas en la segunda dilución

d= factor de dilución

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el estudio realizado a cada muestra de suelo recolectada se le efectuó un análisis físico-químico, mostrando a continuación los resultados:

Tabla 4. Análisis químico de las dos muestras de suelo.

	Muestra de Fusagasugá	Muestra de Villavicencio
pH	4,7	4,7
Acidez intercambiable	5,3	2,4
S.A.I (%)	65,9	67,5
Materia orgánica (%)	4,6	1,6
CIC (meq/100 g)	55,2	13,3
Ca (meq/100 g)	1,9	0,67
Mg (meq/100 g)	0,41	0,28
K (meq/100 g)	0,26	0,15
Na (meq/100 g)	0,13	0,06
P disponible (ppm)	25,5	11

CIC: Capacidad de intercambio catiónico, S.A.I %: Porcentaje de saturación de acidez intercambiable.

Tabla 5. Análisis físico de las dos muestras de suelo.

	Muestra de Fusagasugá	Muestra de Villavicencio
Humedad (%)	14,72	7,31
Densidad real (g/cm ³)	2,39	2,58
Densidad aparente (g/cm ³)	2,58	1,42
Arena (%)	36,9	18,7
Limo (%)	46,8	44,7
Arcilla (%)	16,3	36,6
Clase textural	Franco	Franco-arcilla

La muestra de suelo proveniente de Fusagasugá posee mayor porcentaje de materia orgánica, esta es de gran importancia ya que cumple con diferentes papeles como la regulación de los procesos de los ciclos biogeoquímicos, contribuye a la asimilación de nutrientes, mejora la capacidad de intercambio catiónico y es el centro de la actividad biológica del suelo (31); posee mayor porcentaje de capacidad de intercambio catiónico, es decir que este suelo tiene mayor capacidad para absorber iones de la fase acuosa constituyendo una reserva de nutrientes (32); es un suelo franco de textura fina que presenta una elevada capacidad de retención del agua (Tabla 5) (12).

Mientras que la muestra de suelo proveniente de Villavicencio posee menor porcentaje de materia orgánica, menor capacidad de intercambio catiónico, y se caracteriza por ser un suelo franco-arcilloso.

A continuación se observan los resultados de los 4 tratamientos sobre la densidad de bacterias, hongos, microorganismos celulolíticos y microorganismos amonificantes durante los 45 días de almacenamiento de las muestras de suelo de Fusagasugá y Villavicencio.

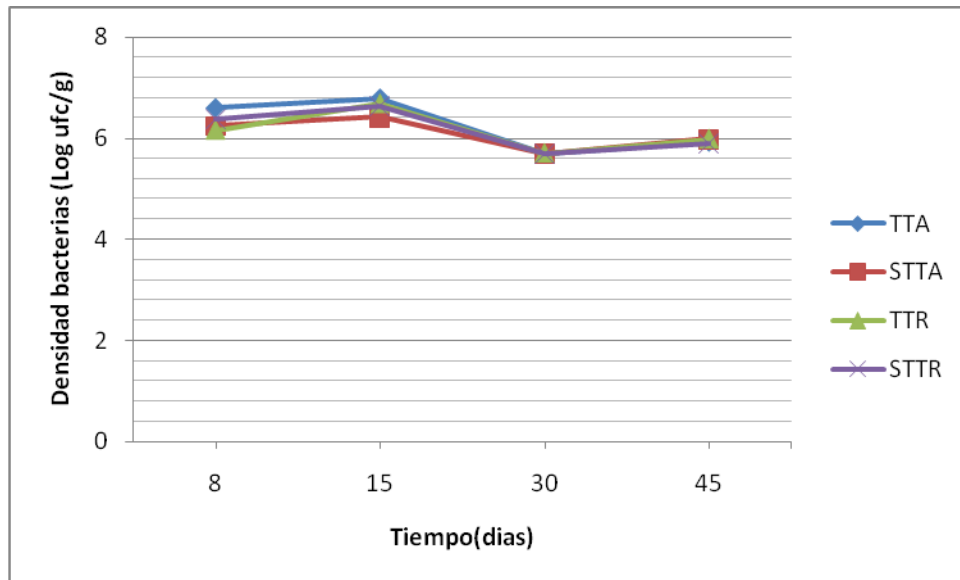


Figura 3. Efecto de los cuatro tratamientos a través del tiempo sobre la densidad de bacterias para Fusagasugá.

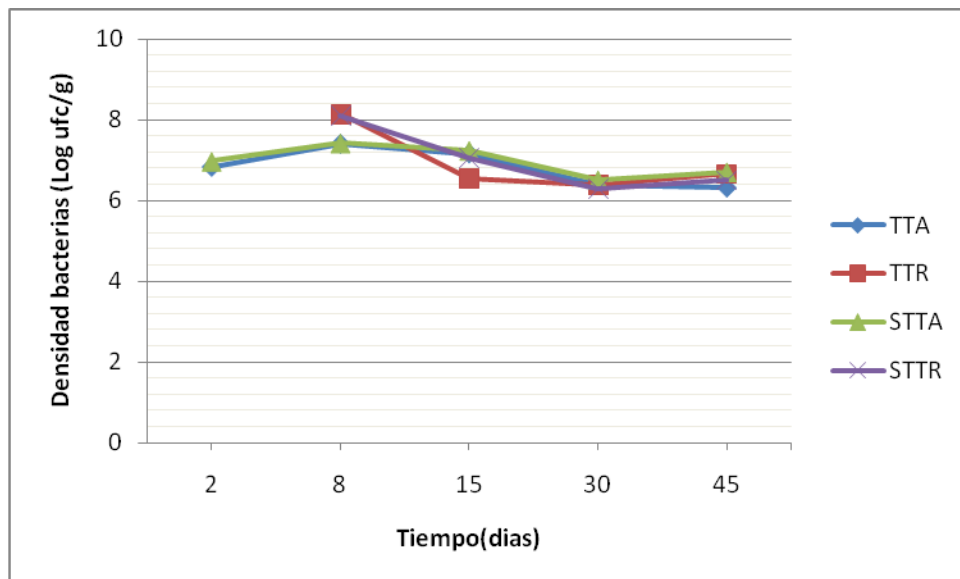


Figura 4. Efecto de los cuatro tratamientos a través del tiempo sobre la densidad de bacterias para Villavicencio.

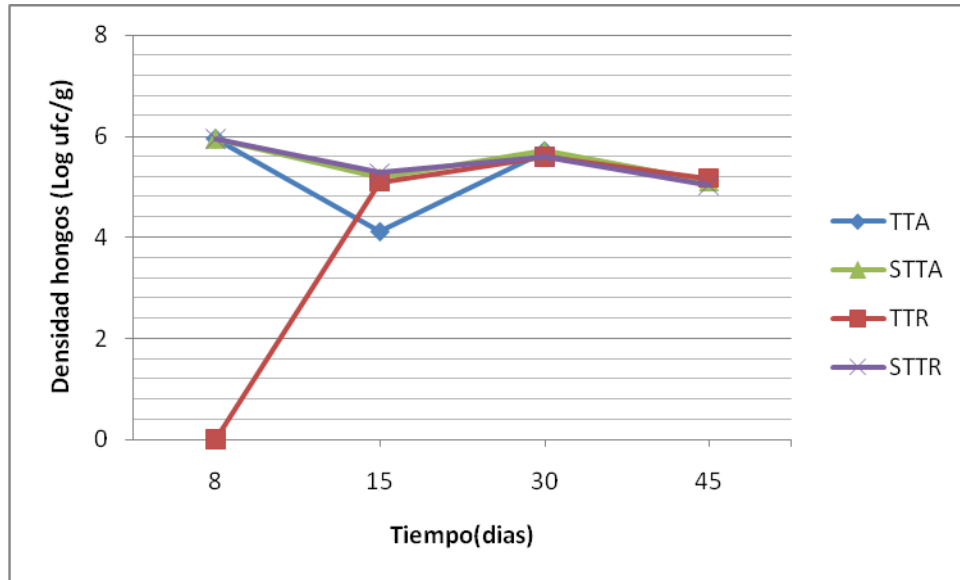


Figura 5. Efecto de los cuatro tratamientos a través del tiempo sobre la densidad de hongos para Fusagasugá.

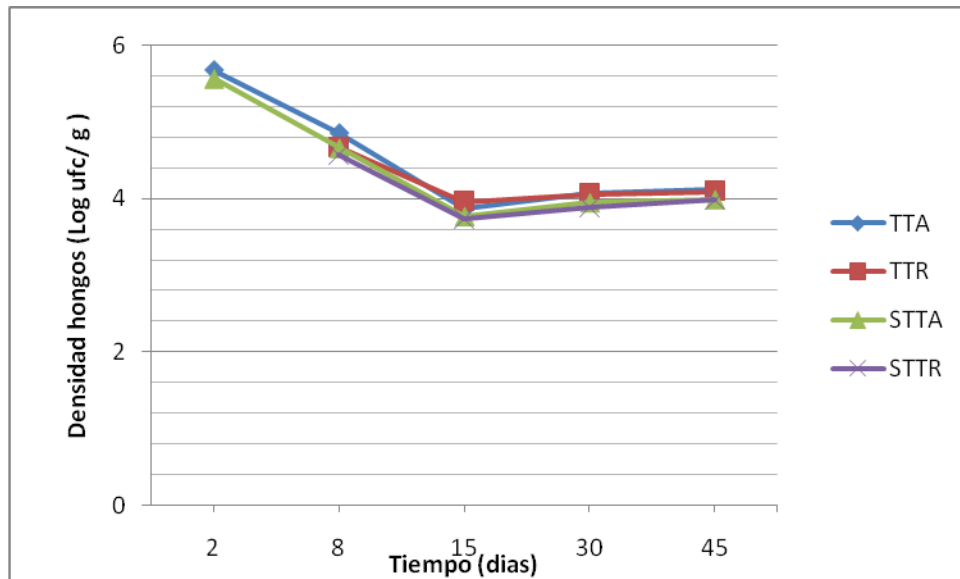


Figura 6. Efecto de los cuatro tratamientos a través del tiempo sobre la densidad de hongos para Villavicencio.

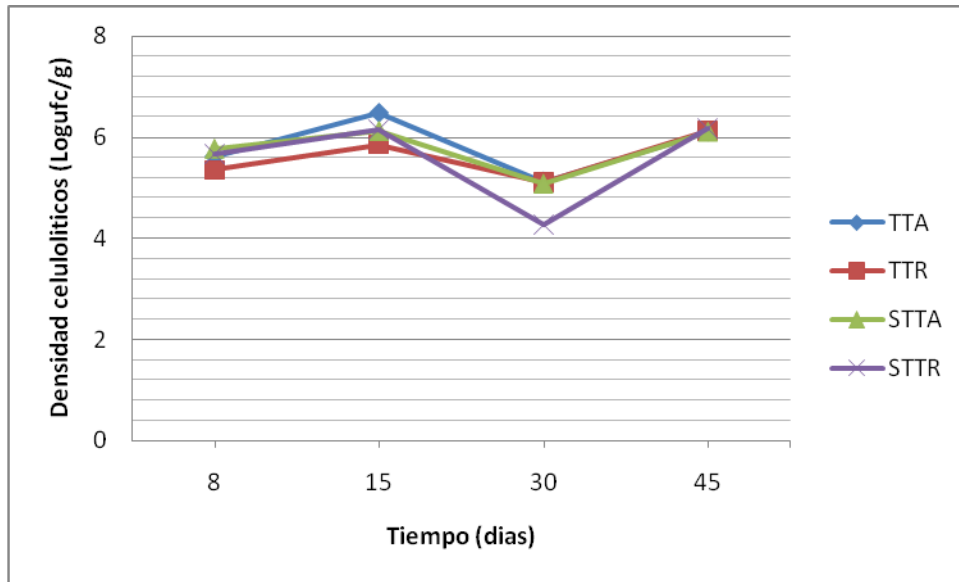


Figura 7. Efecto de los cuatro tratamientos a través del tiempo sobre la densidad de celulolíticos para Fusagasugá.

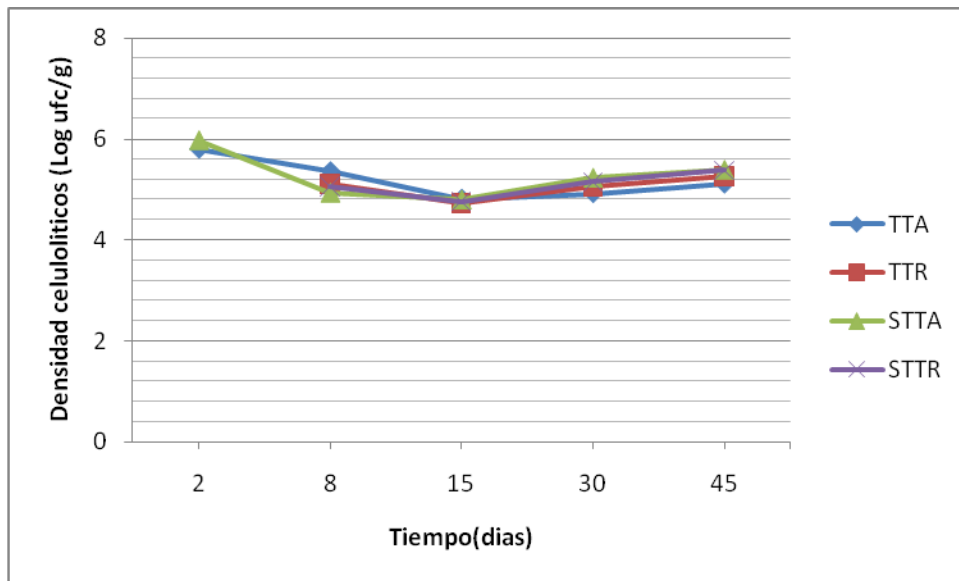


Figura 8. Efecto de los cuatro tratamientos a través del tiempo sobre la densidad de celulolíticos para Villavicencio.

En general se observó una mayor densidad de bacterias que de hongos. Esto debido a que las bacterias son los microorganismos más abundantes, su población puede llegar hasta cien millones de células por gramo de suelo, mientras que los hongos son los siguientes microorganismos más numerosos del suelo, estimando su población de un millón hasta diez millones de individuos por gramo de suelo (33).

En cuanto al efecto de los tratamientos no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro tratamientos ($P > 0,05$). Esto quiere decir que no hay un tratamiento que afecte más que otro si no que los cuatro tratamientos tiene igual incidencia sobre la densidad de los grupos funcionales.

En la mayoría de los casos (Figuras 3 – 8) no se observó una densidad constante de bacterias, hongos y microorganismos celulolíticos a través del tiempo, sino que en algunos días disminuyó y en otros aumentó la densidad de los microorganismos.

En estudios referentes como el realizado por Riepert *et al.* (2002), por ejemplo, reporta que el crecimiento de microorganismos es diferente en el almacenamiento del suelo ya que se evidencia un bajo nivel de biomasa después de tres semanas de almacenamiento a 20 °C.

Durante los primeros días se observó un ligero aumento en la densidad de los microorganismos hasta de dos órdenes de magnitud (Figuras 3, 4, 7, 10), lo cual pudo deberse a que las muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas, estas son de gran utilidad ya que son permeables para CO₂ y oxígeno y evitan que la muestra se seque (1), y han sido utilizadas en estudios como el de Fernando *et al.* (2001) donde también almacenaron las muestras en bolsas plásticas. Por su parte Rila *et al.* (2003) reporta que el oxígeno fue consumido después de 6 meses para un almacenamiento a temperatura de 20°C. Otra razón puede ser porque algunos microorganismos resistentes al almacenamiento (35), como las bacterias tienen preferencia por varios sustratos y desarrollan estrategias de supervivencia para los cambios en el ambiente, como la capacidad para crecer a bajas concentraciones de sustratos y la posibilidad de volverse temporalmente inactivas (36,5).

Otros estudios como el de Ramos *et al.* (2008) han reportado que tanto a 20°C como a 4°C el recuento de bacterias es muy similar, al igual que el recuento de hongos para ambas temperaturas. En el estudio se obtuvo un recuento de 91×10^5 UFC/g para bacterias a una temperatura de 8°C y de 99×10^5 UFC/g a 21°C, y para hongos de 54×10^3 y 65×10^3 UFC/g a las mismas temperaturas, respectivamente.

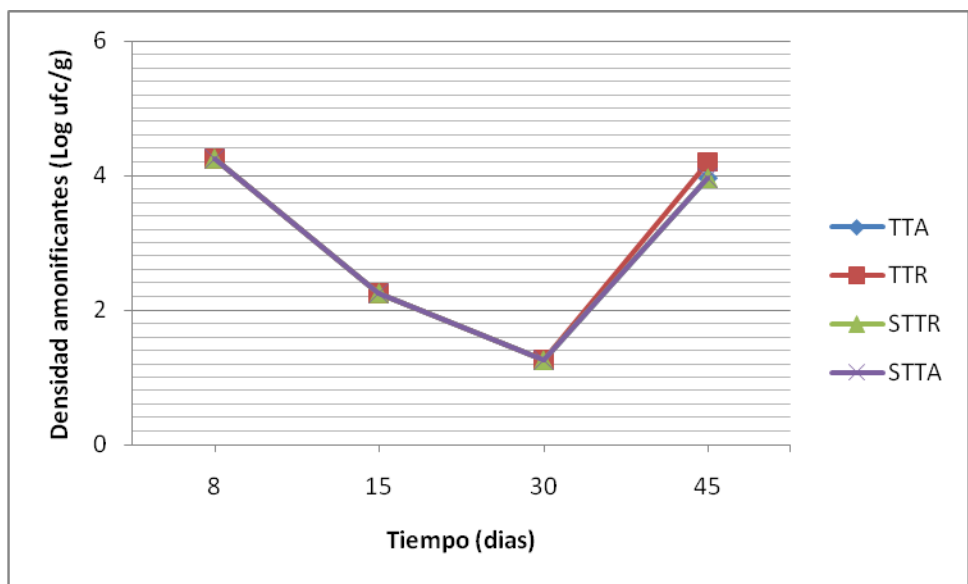


Figura 9. Efecto de los cuatro tratamientos a través del tiempo sobre la población de amonificantes para Fusagasugá.

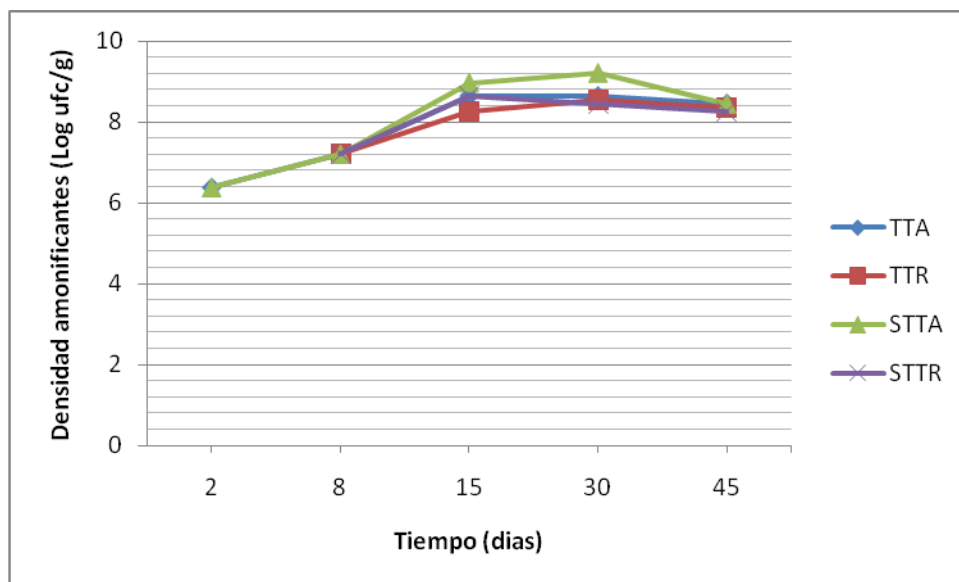


Figura 10. Efecto de los 4 cuatro tratamientos a través del tiempo sobre la población de amonificantes para Villavicencio.

En la figura 9 se observó que los microorganismos amonificantes disminuyeron en densidad hasta el día 30, pero luego se presentó un aumento, y en la figura 10 se observó desde el primer día un incremento de los microorganismos, esto puede deberse a que los microorganismos amonificantes son descomponedores y por tanto transforman compuestos orgánicos y liberan amoníaco.

Para los microorganismos amonificantes tampoco existieron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro tratamientos ($P > 0,05$).

En la muestra de Villavicencio para bacterias, hongos, y microorganismos celulolíticos se pudo evidenciar que a través del tiempo hubo una disminución de las poblaciones microbianas más notable que en la muestra de Fusagasugá, esto se debe a que esta muestra contiene menor porcentaje de carbono orgánico y por lo tanto se ve más afectada por el almacenamiento (35). En cambio la muestra de Fusagasugá al poseer más porcentaje de carbono orgánico, por ende posee mayor porcentaje de materia orgánica, la cual es un componente importante del suelo, ya que regula los procesos químicos que allí ocurren, contribuye a la asimilación de nutrientes (12).

La mayoría de los estudios consultados recomienda almacenar las muestras de suelo en refrigeración (4°C), ya que usualmente tiene un menor efecto en los microorganismos del suelo (37, 38, 39 ,40). Por ejemplo en el estudio realizado por Cernohlavkova *et al.* (2009), evaluaron el efecto de la temperatura a 4°C y la temperatura a 20°C y el tiempo de almacenamiento durante 32 semanas sobre la biomasa microbiana, obteniendo diferencias en la biomasa incluso después de 2 semanas, en donde el almacenamiento a 4 °C fue el que tuvo menos efectos en la biomasa. Pero en otros estudios donde evalúan la actividad enzimática reportan que el suelo puede ser almacenado tanto a 4°C como 20°C sin verse una influencia significativa en la actividad enzimática (34).

Wallenius *et al.* (2010) también recomienda la temperatura de refrigeración a 4°C, pero dice que otro método usado para preservar las muestras es almacenarlas a 20°C.

Por otra parte refiriéndonos ahora al parámetro del tamizado se puede evidenciar que en el día 2, para todas las poblaciones las cuales sólo fueron tamizadas y otras sin tamizar se evidencia un alto porcentaje de microorganismos.

En la mayoría de estudios tamizan la muestra de suelo por un tamiz de 2 mm (41, 38, 29, 7, 40), ya que el tamizado limita la interferencia de raíces y unifica las partículas del suelo (41), facilita el intercambio gaseoso entre las partículas y por lo tanto se recomienda para mantener la naturaleza aeróbica del suelo (42). La ruptura de los agregados del suelo libera la materia orgánica causando un aumento en la actividad microbiana (25). Debeh *et al.* (2001) reporta que la ruptura física puede ser importante para la mineralización del carbono. Por eso en la metodología empleada para este trabajo se tamizaron las muestras pero no se presentó un efecto importante sobre las poblaciones microbianas ya que no hubo diferencias con los otros tratamientos.

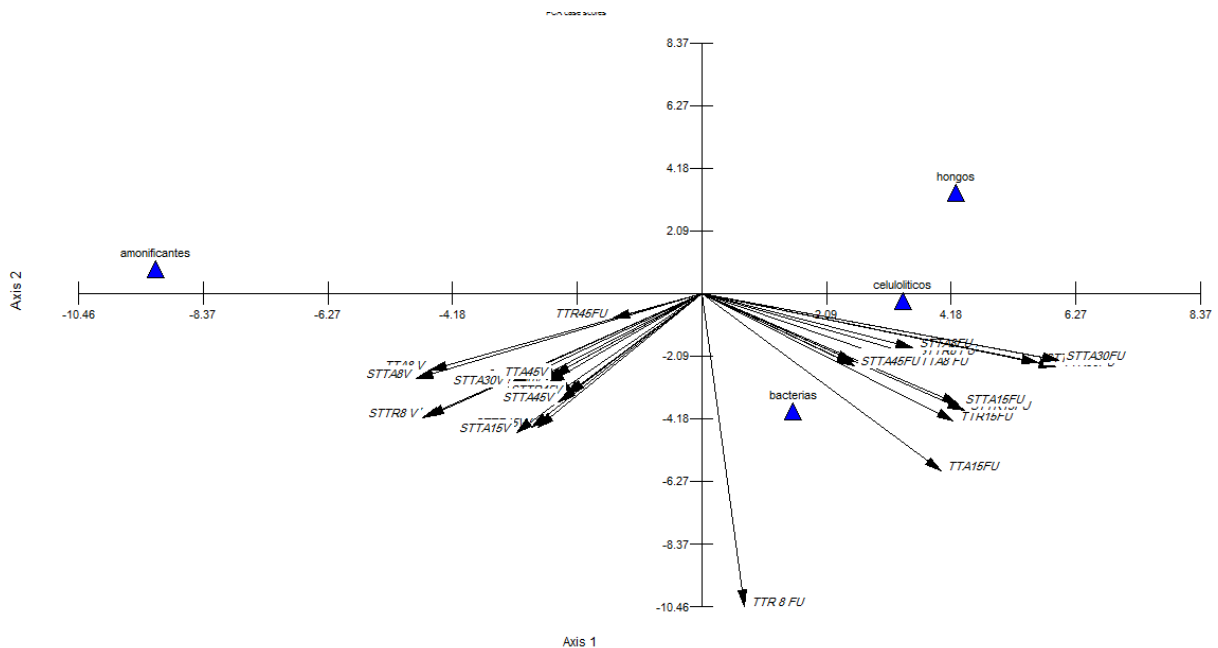


Figura 11. Análisis de componentes principales de los cuatro tratamientos sobre todas las poblaciones microbianas.

Según el análisis de componentes principales (figura 11) se observa que al lado derecho del eje central se encuentran todos los tratamientos de la muestra de Fusagasugá y al lado izquierdo todos los tratamientos de la muestra de Villavicencio. En los tratamientos con la muestra de Fusagasugá hubo una mayor incidencia sobre bacterias y celulolíticos, seguido de los hongos. También se observa que las incidencias se dan por el tipo de suelo. En los tratamientos de la muestra de Villavicencio, la mayor incidencia la tienen los organismos amonificantes.

7. CONCLUSIONES

- Las poblaciones microbianas evaluadas no se vieron afectadas por el tiempo, la temperatura de almacenamiento y el tamizado de las muestras de suelo puesto que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.
- La muestra de suelo proveniente de Fusagasugá presentó mejores características fisicoquímicas que la muestra de suelo proveniente de Villavicencio.
- En todas las poblaciones evaluadas la población inicial fue mayor que la población final estimando que la viabilidad de estas poblaciones fue disminuyendo a través de los 45 días de análisis.
- Se necesitan realizar más estudios referentes al tema, con mayor precisión y empleando mejores técnicas para que se pueda llevar a cabo una estandarización de las condiciones de tiempo, temperatura y tamizado para que puedan ser implementadas por el Laboratorio Nacional de suelos.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar el estudio durante un mayor periodo de tiempo para que se puedan evaluar mejor los efectos de las variables.
- Aplicar otras técnicas de conteo de colonias como microscopia de epifluorescencia para facilitar el trabajo y obtener una mayor precisión.
- Estudiar diversos tipos de suelos para observar cómo es el comportamiento de las variables de tiempo, temperatura y tamizado sobre las poblaciones microbianas.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Weaver R.W. *Methods of soil analysis*. Soil Science society of America, Wisconsin, USA.1994, 1,10 p.
2. Bolter M, Bloem J, Meiners K, Moller R. Enumeration and biovolume determination of microbial cells –a methodological review and recommendations for applications in ecological research. *Biology fertilization soil* 2002; **36**,249–259
3. Ramos E, Zúñiga D. Efecto de la humedad, temperatura y ph del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecología Aplicada* 2008; **7**, 123-130
4. Bastita F, Moreno J,Hernandez T, Garcia C. Microbiological degradation index of soils in a semiarid climate. *Soil Biology & Biochemistry* 2006;**38**, 3463–3473
5. Atlas R, Bartha R. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. 2nd Edición. Prentice Hall S.A, Madrid, España. 2005, 217,236, 244p
6. Daglio G, Sterren M, BenintendeS. Soil sample storage: its effect on microbial biomass quantification. *Agriscientia* 2005; **22** (2): 63-68.
7. Rila J, Dott W, Eisentraeger A. Long-Time Respiration of Contaminated Soil Samples during Laboratory Storage under Different Conditions. *Soil and Sediment Contamination* 2003; **12**(4):481-496
8. Gil M, Ramírez A, García E. Efecto de la temperatura de almacenamiento del suelo sobre la población edáfica de *Nocardia asteroides* y *Nocardia brasiliensis*. *Revista de la Facultad de Farmacia* 2006; **48** (2).

9. Kaschuk G, Alberton O, Hungria M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. *Soil Biology & Biochemistry* 2010;**42**, 1–13.
10. Baker L, Langenheder S, Nicol A, Ricketts D, Killham D, Campbell C, Prosser J. Environmental and spatial characterisation of bacterial community composition in soil to inform sampling strategies. *Soil Biology & Biochemistry* 2009;**41**, 2292–2298**42**
11. Delgado R, Castro L, Cabrera E, Mújica M, Caniche S, Navarro L, Noguera I. Relación entre propiedades físicas del suelo y algunas características del sistema radical del maíz, cultivado en un suelo fluventic haplustoll de textura franco-arenosa de Maracay, Venezuela. *Agronomía Tropical* 2008 ;**58**(3): 245-255.
12. Navarro S, Navarro G. *Química Agrícola*. Segunda Edición. Mundi-Prensa. Madrid, España. 2000, 55, 102 p.
13. Nogales B. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente* 2005; **14**(2).
14. Nuñez Solís, J. *Fundamentos de edafología*. Segunda Edición. Editorial EUNED. San Jose, Costa Rica. 2000, 24 Pg.
15. Thomson L.M, Trohe F.R. *Los suelos y su fertilidad*. Cuarta Edición. Editorial Reverte. Barcelona, España. 2002, 94 Pg.

16. Tenge A, Kaihura F, Lal R, Singh B. Diurnal soil temperature fluctuation for different erosion classes of a oxisol at Mlingano, Tanzania. *Soil & Tillage Research* 1998;**49**, 211-217
17. De Nobili M, Contin M, Brookes P. Microbial biomass dynamics in recently air-dried and rewetted soils compared to others stored air-dry for up to 103 years. *Soil Biology & Biochemistry* 2006;**38**, 2871–2881
18. Gregorich E, Carter M, Doran J, Pankhurst C, Dwyer L. Biological attributes of soil quality. *Developments / Soil Science* 1997; **25**, 81-113
19. Porta J, Lopez M, Roquero C. *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. Tercera Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 2003, 445. Pg
20. Tzeneva v, Salles J, Naumova N, Vos W, Kuikman P, Dolfing J, Smidt. Effect of soil sample preservation, compared to the effect of other environmental variables, on bacterial and eukaryotic diversity. *Research in Microbiology* 2009; **160** , 89-98.
21. Klemm D, Schumann D, Urhardt U, Marsh S. Bacterial synthesized cellulose- artificial blood vessel for microsurgery. *Program of Polymer Science* 2001; **26**, 1561-1603
22. Hou P, Li Y, Wu B, Yan Z, Yan B, Gao P. Cellulolytic complex exists in cellulolytic myxobacterium *Sorangium*. *Enzyme and Microbial Technology* 2006;**38**, 273–278

23. Chew I, Obbard J, Stanforth R. Microbial cellulose decomposition in soils from a rifle range contaminated with heavy metals. *Environmental Pollution* 2001;**111**, 367±375
24. Hendricks C, Doyle J, Hugley B. A New Solid Medium for Enumerating Cellulose-Utilizing Bacteria in Soil. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 1995;**61**(5): 2016–2019
25. Burger M, Jackson L. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in relation to ammonification and nitrification rates in organic and conventional cropping systems. *Soil Biology & Biochemistry* 2003; **35**, 29–36
26. Deneff K, Six J, Bossuyt H, Frey S, Elliot E, Merckx R, Pastian K. Influence of dry-wet cycles on the interrelationship between aggregate, particulate organic matter and microbial community dynamics. *Soil Biology & Biochemistry* 2001;**33**, 1599-1611
27. Sessitsch A, Weilharter A, Gerzabek M, Kirchmann H, Kandeler E. Population Structures in Soil Particle Size Fractions of a Long-Term Fertilizer Field Experiment. *Applied and environmental microbiology* 2001;**67**(9): 4215–4224
28. B, Grundmann G, Monrozier L. From the micro-scale to the habitat: Assessment of soil bacterial community structure as shown by soil structure directed sampling. *Soil Biology & Biochemistry* 2009;**41**, 29–36
29. Foster J. Soil sampling, handling, storage and analysis. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry* 1995; 49-121

30. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. *Métodos analíticos del laboratorio de suelos*. Sexta Edición. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Bogotá, D.C, Colombia. 2006, 590,596, 602. Pg
31. Fassbender H, Bornemisza E. *Química de suelos con énfasis en América Latina*. Editorial IICA. San Jose, Costa Rica. 1994, 49 p.
32. Henriquex M, Perez J, Gasco J, Rodriguez O. 2005 Determinación de la capacidad de intercambio cationico en arena y caolín usando acetato de amonio, acetato de sodio y cloruro de amonio. *Bioagro* 2005;**17**(1): 59-62.
33. Sylvia D, Fuhrmann J, Hartel P, Zuberer D. *Principles and applications of soil microbiology*. Editorial Prentice Hall, Inc. Estados Unidos, New Jersey. 1999, pg 7.
34. DeForest J. The influence of time, storage temperature, and substrate age on potential soil enzyme activity in acidic forest soils using MUB-linked substrates and L-DOPA. *Soil Biology & Biochemistry* 2009; **41**, 1180–1186
35. Gonzalez-Quiñones V, Banning N, Jimenez R, Murphy D. Influence of cold storage on soil microbial community level physiological profiles and implications for soil quality monitoring. *Soil Biology & Biochemistry* 2009;**41**, 1574–1576
36. Goberna M, Insam H, Pascual J, Sanchez J. Storage effects on the community level physiological profiles of Mediterranean forest soils *Soil Biology & Biochemistry* 2005;**37**, 173–178
37. Arnold J, Corre M, Veldkamp E. Cold storage and laboratory incubation of intact soil cores do not reflect in-situ nitrogen cycling rates of tropical forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* 2008; **40**, 2480–2483

38. Stevens T. Optimization of media for enumeration aerobic heterotrophic bacteria from the subsurface. *Journal of Microbiological Methods* 1995; **21**, 293-303.
39. Lee J, Daniels B, Eberiel D, Farrell R. Polymer Mineralization in Soils: Effects of Cold Storage on Microbial Populations and Biodegradation Potential. *Journal of Polymers and the Environment*, 2000; **8**(2):81-89
40. Pesaro M, Widmer F, Nicollier G, Zeyer J. Effects of freeze–thaw stress during soil storage on microbial communities and methidathion degradation. *Soil Biology & Biochemistry* 2003;**35** , 1049–1061
41. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC4113-6. Gestión ambiental. Calidad del suelo. Muestreo. Guía para la recolección, manejo y almacenamiento de suelo para la evaluación de procesos microbianos aeróbicos en el laboratorio. Bogotá, Colombia. 2007, 3-4 p.
42. Lauber C, Zhou N, Gordon J, Knight R, Fierer N . Effect storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples. *Federation of European Microbiological Science* 2009; **307**, 80–86
43. Scow K. Soil Microbial Communities and Carbon Flow in Agroecosystems. *Ecology in Agriculture* 1997; 367-413
44. Cernohlavkova J, Jarkovsky J , Porova M, Hofman J. Variability of soil microbial properties: Effects of sampling, handling and storage. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2009;**72**,(2102–2108

45. Fernando A, Almeida J, Santos J. Comparative evaluation of European methods for sampling and sample preparation of soils the Portuguese contribution. *The Science of the Total Environment* 2001;**264** , 181-186
46. Riepert F, Felgentreu D. Relevance of soil storage to biomass development, N-mineralisation and microbial activity using the higher plant growth test, ISO 11269-2, for testing of contaminated soils. *Applied Soil Ecology* 2002;**20**, 57–68

ANEXOS

Anexo 1. Tablas de recuento de las poblaciones de bacterias, hongos, bacterias celulolíticas y microorganismos amonificantes.

Tabla 6. Réplicas del recuento de bacterias para cada tratamiento durante 45 días para la muestra de Fusagasuga

DENSIDAD BACTERIAS (ufc/g)								
MUESTRA FUSAGASUGÁ								
TRATAMIENTO	DÍA 8		DÍA 15		DÍA 30		DÍA 45	
TTA	29x10 ⁵	19x10 ⁶	40x10 ⁴	11x10 ⁵	79x10 ⁴	20x10 ⁵		
	31x10 ⁵	85x10 ⁵	66x10 ⁵	60x10 ⁵	52x10 ⁴	60x10 ⁴	79x10 ⁴	22x10 ⁵
STTA	20x10 ⁵	38x10 ⁵	25x10 ⁵	30x10 ⁵	44x10 ⁴	60x10 ⁴	85x10 ⁴	22x10 ⁵
	12x10 ⁵	24x10 ⁵	25x10 ⁵	50x10 ⁵	54x10 ⁴	50x10 ⁴	82x10 ⁴	23x10 ⁵
TTR	16x10 ⁵	27x10 ⁵	49x10 ⁵	13x10 ⁶	56x10 ⁴	30x10 ⁴	95x10 ⁴	22x10 ⁵
	96x10 ⁴	40x10 ⁵	40x10 ⁴	60x10 ⁵	45x10 ⁴	70x10 ⁴	80x10 ⁴	18x10 ⁵
STTR	15x10 ⁵	25x10 ⁵	50x10 ⁵	60x10 ⁵	49x10 ⁴	30x10 ⁴	72x10 ⁴	20x10 ⁵
	15x10 ⁴	20x10 ⁶	36x10 ⁴	50x10 ⁵	50x10 ⁴	60x10 ⁴	71x10 ⁴	16x10 ⁵

Tabla7. Réplicas del recuento de bacterias para cada tratamiento durante 45 días para la muestra de Villavicencio

DENSIDAD BACTERIAS (ufc/g)										
MUESTRA VILLAVICENCIO										
TRATAMIENTO	DÍA 0		DÍA 8		DÍA 15		DÍA 30		DÍA 45	
TTA	73x10 ⁵	90x10 ⁵	21x10 ⁵	12x10 ⁷	39x10 ⁶	21x10 ⁵	65x10 ⁵	22x10 ⁵	44x10 ⁵	
	62x10 ⁵	70x10 ⁵	16x10 ⁵	60x10 ⁸	65x10 ⁵	52x10 ⁶	21x10 ⁵	61x10 ⁵	16x10 ⁵	41x10 ⁵
STTA	97x10 ⁵	12x10 ⁶	11x10 ⁶	14x10 ⁷	57x10 ⁵	18x10 ⁷	94x10 ⁴	17x10 ⁶	31x10 ⁵	26x10 ⁶
	86x10 ⁵	80x10 ⁵	20x10 ⁶	13x10 ⁷	68x10 ⁵	73x10 ⁶	10x10 ⁵	70x10 ⁵	28x10 ⁵	13x10 ⁶
TTR	-	-	10x10 ⁶	14x10 ⁸	43x10 ⁵	50x10 ⁵	79x10 ⁴	18x10 ⁶	26x10 ⁵	26x10 ⁶
			60x10 ⁵	15x10 ⁸	28x10 ⁵	20x10 ⁵	14x10 ⁵	12x10 ⁶	26x10 ⁵	31x10 ⁶
STTR	-	-	70x10 ⁵	13x10 ⁸	38x10 ⁵	13x10 ⁷	29x10 ⁵	11x10 ⁶	17x10 ⁵	26x10 ⁶
			70x10 ⁵	12x10 ⁹	47x10 ⁵	36x10 ⁶	24x10 ⁵	42x10 ⁵	16x10 ⁵	11x10 ⁶

Tabla 8. Réplicas del recuento de hongos para cada tratamiento durante 45 días para la muestra de Fusagasuga

DENSIDAD HONGOS (UFC/g)								
Muestra FUSAGASUGÁ								
TRATAMIENTO	DÍA 8		DÍA 15		DÍA 30		DÍA 45	
TTA	10×10^5	$< 10 \times 10^6$	13×10^4	50×10^4	94×10^2	50×10^3		
	10×10^5	$< 10 \times 10^6$	26×10^4	50×10^4	10×10^4	10×10^4	78×10^2	63×10^3
STTA	10×10^5	$< 10 \times 10^6$	12×10^4	50×10^4	14×10^4	10×10^4	79×10^2	32×10^3
	10×10^5	$< 10 \times 10^6$	90×10^3	70×10^4	11×10^4	10×10^4	67×10^2	36×10^3
TTR	$< 10 \times 10^5$	$< 10 \times 10^6$	80×10^3	20×10^4	14×10^4	20×10^4	90×10^2	40×10^3
	$< 10 \times 10^5$	$< 10 \times 10^6$	90×10^3	10×10^4	80×10^3	10×10^4	91×10^2	53×10^3
STTR	10×10^5	$< 10 \times 10^6$	16×10^4	40×10^4	$< 10 \times 10^3$	30×10^4	80×10^2	31×10^3
	10×10^5	$< 10 \times 10^6$	12×10^4	10×10^5	$< 10 \times 10^3$	10×10^4	71×10^2	29×10^3

Tabla 9. Réplicas del recuento de hongos para cada tratamiento durante 45 días para la muestra de Villavicencio.

DENSIDAD HONGOS (UFC/g)										
Muestra VILLAVICENCIO										
TRATAMIENTO	DÍA 0		DÍA 8		DÍA 15		DÍA 30		DÍA 45	
TTA (ufc/g)	36x10 ⁴	21x10 ⁵	38x10 ³	32x10 ⁴	34x10 ³	57x10 ²	57x10 ³	94x10 ²	50x10 ³	
	29x10 ⁴	18x10 ⁵	58x10 ³	29x10 ⁴	39x10 ²	32x10 ³	84x10 ²	60x10 ³	78x10 ²	63x10 ³
STTA (ufc/g)	21x10 ⁴	18x10 ⁵	37x10 ³	17x10 ⁴	28x10 ²	31x10 ³	58x10 ²	35x10 ³	79x10 ²	36x10 ³
	24x10 ⁴	22x10 ⁵	30x10 ³	16x10 ⁴	41x10 ²	27x10 ³	61x10 ²	39x10 ³	69x10 ²	32x10 ³
TTR (ufc/g)	-	-	55x10 ³	13x10 ⁴	60x10 ²	41x10 ³	78x10 ²	42x10 ³	90x10 ²	40x10 ³
			15x10 ³	19x10 ⁴	57x10 ²	42x10 ³	60x10 ¹	65x10 ³	91x10 ²	53x10 ³
STTR (ufc/g)	-	-	26x10 ³	18x10 ⁴	43x10 ²	17x10 ³	61x10 ²	24x10 ³	80x10 ²	31x10 ³
			18x10 ³	19x10 ⁴	42x10 ²	18x10 ³	56x10 ²	29x10 ³	71x10 ²	29x10 ³

Tabla 10. Réplicas del recuento de celulolíticos para cada tratamiento durante 45 días para la muestra de Fusagasuga.

DENSIDAD CELULOLITICOS (UFC/g)								
Muestra FUSAGASUGA								
TRATAMIENTO	DÍA 8		DÍA 15		DÍA 30		DÍA 45	
TTA (ufc/g)	31x10 ⁵	70x10 ⁵	44x10 ⁴	20x10 ⁴	11x10 ⁵	45x10 ⁵		
	42x10 ⁵	20x10 ⁵	26x10 ⁵	50x10 ⁵	66x10 ⁴	20x10 ⁴	11x10 ⁵	20x10 ⁵
STTA (ufc/g)	14x10 ⁵	40x10 ⁵	18x10 ⁵	20x10 ⁵	33x10 ⁴	18x10 ⁵	79x10 ⁴	28x10 ⁵
	14x10 ⁵	90x10 ⁵	70x10 ⁴	20x10 ⁵	52x10 ⁴	18x10 ⁵	12x10 ⁵	33x10 ⁵
TTR (ufc/g)	90x10 ⁴	40x10 ⁵	40x10 ⁴	30x10 ⁵	33x10 ⁴	10x10 ⁴	11x10 ⁵	18x10 ⁵
	17x10 ⁵	10x10 ⁵	60x10 ⁴	30x10 ⁵	32x10 ⁴	10x10 ⁴	14x10 ⁵	61x10 ⁵
STTR (ufc/g)	26x10 ⁵	40x10 ⁵	30x10 ⁴	40x10 ⁵	44x10 ³	10x10 ⁴	79x10 ⁴	60x10 ⁵
	41x10 ⁵	60x10 ⁵	21x10 ⁵	30x10 ⁵	36x10 ³	60x10 ⁴	15x10 ⁵	17x10 ⁵

Tabla 11. Réplicas del recuento de celulolíticos para cada tratamiento durante 45 días para la muestra de Villavicencio.

DENSIDAD CELULOLITICOS (UFC/g)										
Muestra VILLAVICENCIO										
TRATAMIENTO	DÍA 0		DÍA 8		DÍA 15		DÍA 30		DÍA 45	
TTA	20x10 ⁴	30x10 ⁵	22x10 ⁴	12x10 ⁵	17x10 ⁴	50x10 ³	37x10 ⁴	95x10 ³	35x10 ⁴	
	60x10 ⁴	30x10 ⁵	90x10 ³	80x10 ⁴	58x10 ³	16x10 ⁴	62x10 ³	32x10 ⁴	12x10 ⁴	34x10 ⁴
STTA	70x10 ⁴	20x10 ⁵	50x10 ³	20x10 ⁴	49x10 ³	24x10 ⁴	80x10 ⁴	52x10 ⁴	19x10 ⁴	10x10 ⁵
	60x10 ⁴	60x10 ⁵	20x10 ³	10x10 ⁵	39x10 ³	26x10 ⁴	18x10 ⁵	68x10 ⁴	18x10 ⁴	82x10 ⁴
TTR	-	-	10x10 ⁴	50x10 ⁴	35x10 ³	22x10 ⁴	89x10 ³	54x10 ⁴	13x10 ⁴	49x10 ⁴
			70x10 ³	70x10 ⁴	45x10 ³	17x10 ⁴	55x10 ³	58x10 ⁴	17x10 ⁴	62x10 ⁴
STTR	-	-	70x10 ³	30x10 ⁴	28x10 ³	27x10 ⁴	63x10 ³	66x10 ⁴	17x10 ⁴	94x10 ⁴
			11x10 ⁴	40x10 ⁴	45x10 ³	27x10 ⁴	49x10 ³	79x10 ⁴	16x10 ⁴	10x10 ⁵

Tabla 12. Réplicas del recuento de amonificantes mediante NMP, para cada tratamiento durante 45 días para la muestra de Fusagasugá.

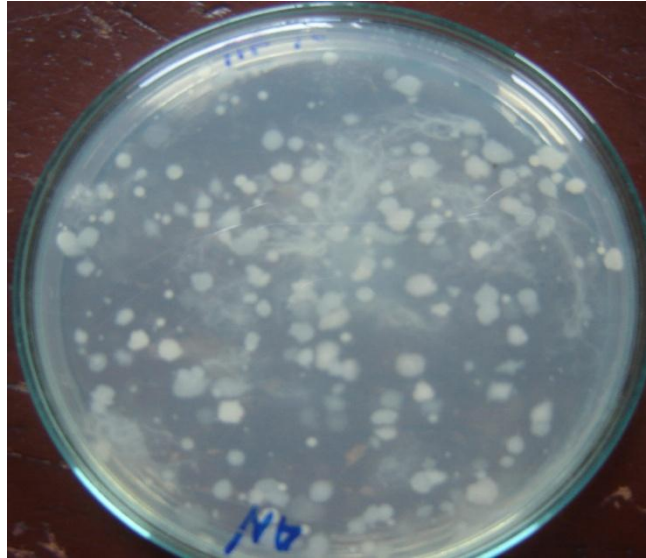
DENSIDAD AMONIFICANTES (#cél/g)				
Muestra FUSAGASUGÁ				
TRATAMIENTO	DÍA 8	DÍA 15	DÍA 30	DÍA 45
TTA	$<18 \times 10^1$	$<18 \times 10^{-2}$	92×10^1	
STTA	$<18 \times 10^1$	$<18 \times 10^0$	$<18 \times 10^2$	92×10^1
TTR	$<18 \times 10^1$	$<18 \times 10^0$	$<18 \times 10^2$	$>16 \times 10^6$
STTR	$<18 \times 10^1$	$<18 \times 10^0$	$<18 \times 10^2$	92×10^1

Tabla 13. Réplicas del recuento de amonificantes mediante NMP, para cada tratamiento durante 45 días para la muestra de Villavicencio.

DENSIDAD AMONIFICANTES (#cél/g)					
MUESTRA VILLAVICENCIO					
TRATAMIENTO	DÍA 0	DÍA 8	DÍA 15	DÍA 30	DÍA 45
TTA	24×10^4	$>16 \times 10^9$	43×10^6	43×10^6	28×10^6
STTA	24×10^4	$>16 \times 10^9$	92×10^6	16×10^7	28×10^6
TTR	-	$>16 \times 10^9$	18×10^6	35×10^6	22×10^6
STTR	-	$>16 \times 10^9$	43×10^6	28×10^6	18×10^6

Anexo 2. Imágenes crecimiento de bacterias, hongos, microorganismos celulolíticos y amonificantes.

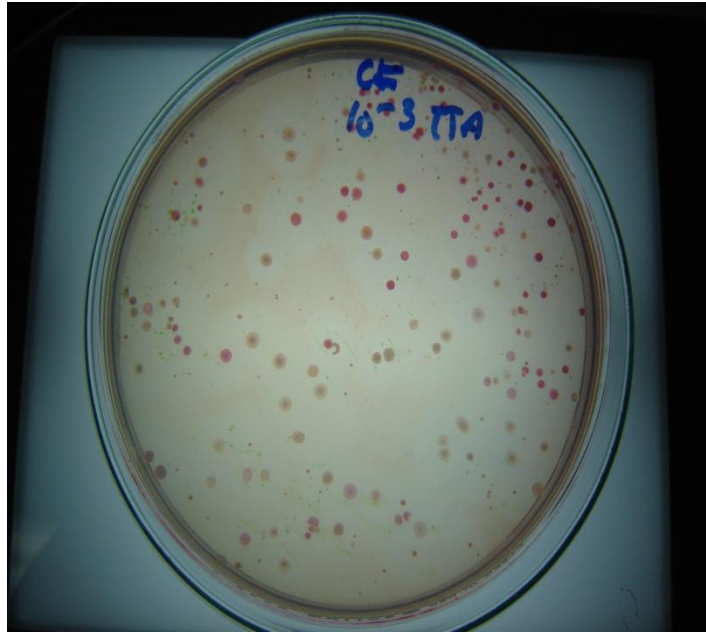
Bacterias



Hongos



Celulíticos



Amonificantes

