



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS TERMÓFILAS
CELULOLÍTICAS OBTENIDAS DEL COMPOSTEO DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE
RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

ABIGAIL AVILA ANDRADE



ASESORES DE TESIS:

DRA. GEHOVANA GONZÁLEZ BLANCO

DR. RICARDO BERISTIAN CARDOSO

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

JUNIO 2023

Índice

Dedicatoria	i
Agradecimientos	i
Índice	i
Resumen.....	iv
1. Introducción.....	1
1.1. Residuos sólidos urbanos.....	1
2. Marco conceptual	3
2.1. Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU).....	3
2.2. Compostaje	3
2.3. Biopila de compostaje.....	3
2.4. Fases del compostaje	4
2.5. Factores claves el proceso de compostaje	4
2.6. Microorganismos en el proceso de composteo.....	5
2.7. Microorganismos celulolíticos	7
2.8. Aislamiento e identificación de bacterias celulolíticas	8
2.8.1. Aislamiento de microorganismos	8
2.8.2. Siembra y medios de cultivo.	9
2.8.3. Técnicas de aislamiento	10
2.9. Caracterización de microorganismos.....	11
2.9.1. Morfología macroscópica	11
2.9.2. Morfología microscópica	12
2.9.3. Tinción de microorganismos	13
2.9.3.1. Tinción de Gram	13
2.9.4. Pruebas bioquímicas	14
2.9.5. Secuenciación del gen ARN 16s	15
3. Antecedentes	17
4. Importancia del problema	19
5. Planteamiento del problema	19
6. Objetivos.	20

6.1.	Objetivo general.....	20
6.2.	Objetivos particulares	20
7.	Diseño de la investigación.....	20
7.1.	Implementación del sistema de compostaje	20
7.1.1.	Diseño de la biopila	21
7.1.2.	Recolección y muestreo de residuos orgánicos.....	21
7.1.3.	Establecimiento del proceso de compostaje	22
7.1.4.	Monitoreo de temperatura, pH y humedad	22
7.1.5.	Caracterización fisicoquímica de la composta en fase mesófila y termófila	23
7.1.6.	Evaluación de la calidad de composta en fase de maduración	23
7.1.6.1.	Determinación de pH y conductividad eléctrica.....	23
7.1.6.2.	Especificaciones microbiológicas	23
7.1.6.3.	Presencia de metales pesados	23
7.1.6.4.	Índice de germinación.....	24
7.2.	Aislamiento, caracterización e identificación bacteriana	24
7.2.1.	Aislamiento bacteriano	24
7.2.2.	Caracterización morfológica macroscópica, microscópica.....	25
7.2.3.	Pruebas bioquímicas	25
7.2.4.	Identificación molecular	25
7.2.4.1.	Extracción de ADN.....	25
7.2.4.2.	Amplificación y purificación del gen ARN r 16S	26
7.2.4.3.	Análisis de las secuencias.....	26
7.3.	Determinación de la actividad celulolítica cinética	26
7.3.1.	Identificación de la actividad celulolítica	26
7.3.2.	Evaluación de la cinética bacteriana	27
8.	Métodos analíticos.....	27
8.1.	Determinación de alcalinidad por volumetría	27
8.2.	Determinación de acidez por volumetría	27
8.3.	Determinación de la dureza por volumetría.....	28
8.4.	Análisis de compuestos nitrogenados.	28
8.5.	Determinación de fosfatos.....	29
8.6.	Demanda química de oxígeno soluble (DQOs)	29
9.	Resultados y discusión	29

9.1.	Implementación del sistema de composteo.....	29
9.1.1.	Monitoreo de la biopila de composteo	29
9.1.2.	Caracterización fisicoquímica de la composta en fase mesófila y termófila.	33
9.1.3.	Evaluación de la calidad de composta en fase de maduración	34
9.2.	Aislamiento e identificación bacteriana	37
9.2.1.	Caracterización de morfología macroscópica y microscópica	37
9.2.2.	Caracterización bioquímica	38
9.2.3.	Caracterización molecular	39
9.3.	Determinación de la actividad celulolítica cinética	41
9.3.1.	Identificación de la actividad celulolítica	41
9.3.2.	Evaluación de la cinética bacteriana	42
10.	Conclusiones	44
11.	Referencias.....	44
12.	Anexos	50

Resumen

Una de las formas de valorizar la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU) es mediante el compostaje, proceso biológico aerobio en el que un consorcio microbiano lleva a cabo la hidrólisis y degradación de la materia orgánica. El proceso de compostaje presenta 4 fases: mesófila, termófila, de enfriamiento y maduración. La fase termófila es la de mayor interés por la presencia de microorganismos con capacidades hidrolíticas sobre compuestos complejos como la hemicelulosa y celulosa, que les confieren un potencial de aplicación biotecnológico, por lo que el objetivo de este trabajo fue aislar, caracterizar e identificar bacterias celulíticas termófilas del proceso de compostaje. El estudio se realizó en 3 etapas: la primera etapa consistió en la implementación de una biopila cerrada, donde se colocaron 2.925 kg de tierra negra y 5.85 kg de FORSU. La biopila fue monitoreada diariamente en términos pH, humedad y temperatura; y se caracterizó fisicoquímicamente en el estado estacionario de la fase mesófila, termófila y de maduración para determinar la calidad del compost. Se realizó el cultivo, aislamiento, caracterización e identificación de microorganismos termófilos del sistema de compostaje, a través de cultivos y aislamiento en medio de carboximetilcelulosa (CMC) al 0.1%. La caracterización se realizó mediante determinación morfológica, microscópica, pruebas bioquímicas e identificación molecular del gen ARN r 16S. Por último, se determinó la actividad cinética celulolítica de las cepas identificadas, a través de cultivos en lote en caldo de cultivo CMC al 0.1% en condiciones de termófila. Los resultados evidenciaron que el proceso de compostaje presentó las 4 fases en un periodo de 19 semanas, alcanzando una temperatura máxima de $46^{\circ}\text{C} \pm 0.4$, una humedad promedio de $69.2\% \pm 0.46$ y valores de pH de neutro a alcalinos ($7.1 - 8.6 \pm 0.13$). La caracterización fisicoquímica arrojó que se obtuvo una composta de calidad "tipo I" que corresponde a la de mejor calidad de acuerdo con la norma mexicana NMX-AA-180-SCFI-2018. Se aislaron dos cepas bacterianas con morfologías distintas (cepa P11, con morfología puntiforme y la cepa I12 con morfología irregular) pero ambas bacilares Gram (+) y con capacidad metabólica igual, ya que dieron positivo a las mismas pruebas bioquímicas (TSI, MIO, SIM, consumo de glucosa, sacarosa, manitol; no consumen lactosa y no producen indol ni ácido sulfhídrico). Las secuencias genéticas de cada cepa que se obtuvieron a través de amplificación del gen ARNr 16s fueron comparadas en la base de datos GenBank, el análisis de las secuencias arrojó una similitud del 97.80 % con *Bacillus sp* para la cepa P11, mientras que para la cepa I12 se obtuvo una similitud del 100 % con *Bacillus licheniformis*. Con respecto a la actividad celulolítica se obtuvo que cepa P11 identificada como *Bacillus sp* presentó halos de hidrólisis con un diámetro de $12 \text{ mm} \pm 1.4$, un tiempo de duplicación (*td*) de 9.61h y con una tasa específica de crecimiento de (μ) de 0.0721 h^{-1} , mientras que la cepa I12 identificada como *B. licheniformis* presentó un halos hidrólisis de $21.5 \text{ mm} \pm 0.7$, un *td* de 8.85 h y una μ 0.0783 h^{-1} .

1. Introducción.

1.1. Residuos sólidos urbanos.

Como consecuencia del crecimiento poblacional, de los patrones de consumo, del crecimiento económico y el desarrollo urbano (García & Piloza, 2023), la generación de residuos sólidos urbanos (RSU) se ha vuelto alarmante. Lo que ha generado la necesidad de sistemas de gestión integral de residuos sólidos urbanos (GIRSU) de forma global, sin embargo, los países menos desarrollados sufren una inapropiada gestión (Torrente-Velásquez *et al.*, 2020), lo que provoca un impacto negativo en el medio ambiente y en la salud.

En México, la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR, 2003) define a los RSU, como todos aquellos generados en las casas habitación como resultado de la eliminación de los productos que se consumen, tales como los residuos de comida, cáscaras de frutas y restos de verduras (tallos, hojas, etc.), empaques, así como todos aquellos residuos que provienen de establecimientos o del aseo de vías públicas, siempre que esta Ley no los considere como residuos de otra índole.

El Diagnóstico Básico para la Gestión Integral de los Residuos (DBGIR) publicado en marzo del 2020, por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, 2020), clasifica a los RSU, en tres grandes categorías: 1) residuos susceptibles a aprovechamiento como el cartón, fibras sintéticas, latas, PET, vidrio, entre otros, que en general representan a la fracción inorgánica de residuos sólidos urbanos (FIRSU); 2) la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU), que corresponde a los residuos provenientes de la poda de jardines y residuos orgánicos generados en los domicilios como restos o desperdicios de comida, cáscaras de frutas y restos de verdura; y 3) finalmente la categoría denominada como “otros” para hacer referencia a residuos que no entran en ninguna de las dos clasificaciones anteriores (p. ej. material de construcción, residuos sanitarios como pañales desechables, loza, cerámica, trapo y otros). Bajo esta clasificación, el DBGIR reportó en el año 2020, que a nivel nacional se tuvo una generación estimada de RSU de aproximadamente 44 millones de toneladas anuales (120,128 t/día), de los cuales 31.55% correspondieron a la FIRSU, el 46.42% a la FORSU y 22.46% a la clasificación de “otros”. Así en términos de porcentajes, es evidente que la FORSU, es el residuo de mayor generación y representa un potencial problema, debido a que su disposición final se realiza frecuentemente en tiraderos o sitios a cielo abierto (SEMARNAT, 2019).

La FORSU en tiraderos a cielo abierto es considerada una fuente de contaminación atmosférica, de cuerpos de agua y de suelos, ya que durante los procesos naturales de putrefacción o degradación, se emiten gases de efecto invernadero como metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂); se generan lixiviados que pueden arrastrar o infiltrar metales pesados como consecuencia de su interacción con residuos inorgánicos (Nain y Kumar, 2020); se despiden malos olores y se favorece la proliferación de plagas que se vuelven focos de infección y vectores de enfermedades (Monzambe *et al.*, 2019). En este sentido, Llorens *et al.* (2007) indicaron que es imperativo la aplicación de técnicas de valorización o aprovechamiento de la FORSU con la finalidad de reducir su vertimiento en los sitios de disposición final.

El aprovechamiento o valorización de los residuos son el conjunto de acciones cuyo objetivo es recuperar el valor económico mediante la reutilización, rediseño, reciclado, remanufactura y recuperación de materiales o generación de energía (LPGGIR, 2003 b). La valorización de la FORSU se puede realizar por medio de diferentes métodos como: digestión anaerobia, vermicomposteo y composteo.

El composteo es considerado un buen método de valorización de FORSU debido a que puede reducir en un 25% el peso original del total de los residuos, con la producción de material para mejoramiento de suelos, mejorar la productividad de la tierra al ser considerado un fertilizante natural que no contamina con químicos que pueden ser dañinos a corto o largo plazo, corrector de la estructura del suelo, protector contra la erosión, sustrato de cultivo (Avellaneda, 2019; Velasco y Volke, 2002) y promotor de crecimiento microbiano benéfico para el suelo (García de la Fuente *et al.*, 2011).

La pila de compostaje constituye un ecosistema complejo, donde coexisten microorganismos mesófilos y termófilos. En este consorcio microbiano las bacterias constituyen entre el 80 al 90% y tienen la capacidad de obtener nutrientes y degradar las fibras vegetales compuestas por polímeros como la celulosa (Vargas-García *et al.*, 2010). La degradación de celulosa hace atractiva a estas bacterias para industrias como: la papelera, alimentaria, textil y de biocombustibles (Venegas, 2021), que utilizan estos microorganismos o sus componentes enzimáticos.

2. Marco conceptual

2.1. Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU)

La generación de FORSU a nivel nacional asciende a 57 000 t/día, de los cuales el 71.2% son residuos alimentarios, el 23.3% residuos de jardinería y el 5.5% se distribuye en cuero, hueso, fibra dura vegetal y madera (SEMARNAT, 2020). Estos residuos contienen hidratos de carbono polímeros lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina), así como polímeros aromáticos de origen vegetal (Buenrostro-Delgado et al., 2015). Estos polímeros son considerados recalcitrantes e inciden en el tiempo requerido para la biodegradación y estabilización de la FORSU en los sitios de confinamiento (González et al., 2011). La biodegradación de los polímeros lignocelulósicos es atribuida a bacterias y hongos, principalmente (García et al. 2005). Sin embargo, su degradación parcial a humos ocurre cuando otros compuestos de más fácil biodegradación han sido consumidos (García et al., 2005).

2.2. Compostaje

El compostaje es considerado un proceso biológico aerobio de degradación, en el que consorcios microbianos transforman moléculas orgánicas (sólidas) en CO₂, H₂O y un sólido estable (compost) rico en compuestos orgánicos (substancias húmicas, macro y micronutrientes). De acuerdo con Barrón (2013) el proceso de compostaje de la FORSU se puede llevar a cabo de dos maneras: 1) humificando compuestos orgánicos complejos que se encuentran en la FORSU obteniendo como productos compuestos estables y 2) mineralizando las macromoléculas (proteínas, carbohidratos simples, compuestos y lípidos) hasta obtener CO₂, agua y energía en forma de calor.

2.3. Biopila de compostaje

Los sistemas de composteo se pueden clasificar de forma general en: 1) sistemas de compostaje abiertos, donde la materia orgánica se degrada al aire libre y 2) sistemas de compostaje cerrado, donde la degradación se da dentro de un sistema con instalaciones para el suministro de aire y recolección de lixiviado (Galea, 2013).

La biopila, es un sistema de compostaje que puede ser de tipo abierto (los residuos se disponen en el suelo) o cerrado (los residuos se disponen en un contenedor). Este último sistema, se considera como una práctica de biorremediación cerrada *ex situ* en ambiente no saturado (Benavides *et al.*, 2006) y tiene la ventaja frente al sistema abierto de mantener la temperatura, evitar el ingreso de agua de lluvia, disminución de humedad por evaporación y el desprendimiento de malos olores originados por la volatilización de compuestos orgánicos (Velasco y Sepúlveda, 2003).

Para el correcto funcionamiento de una biopila cerrada, esta debe contar con un sistema de aeración para el suministro de oxígeno necesario para el metabolismo de los microorganismos sobre los compuestos orgánicos (Brown y Cartwright, 1990), la aireación del sistema puede llevarse a cabo por inyección de aire con tuberías o por volteo; a su vez la biopila debe contar con un sistema de recolección de lixiviados para evitar el exceso de humedad (Iturbe-Arguilles *et al.*, 2002).

2.4. Fases del compostaje

El proceso de compostaje se divide en cuatro etapas: mesófila, termófila, enfriamiento y maduración. Cada etapa se caracteriza en función de la temperatura como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de las etapas del proceso de compostaje en función de la temperatura,

Etapa	Descripción del proceso
Mesófila (20-40 °C)	Se desarrollan familias de hongos, mohos, levaduras y bacterias mesófilos, que se metabolizan los compuestos solubles como hidratos de carbono de cadena corta, almidón y proteínas (Barrena, 2006). Producen ácidos orgánicos que hacen descender el pH (Meena <i>et al.</i> , 2011). La multiplicación de los microorganismos provoca un incremento progresivo de la temperatura.
Termófila (40-60 °C)	Familias de actinomicetos y bacterias formadoras de esporas (Negro <i>et al.</i> , 2000) degradan ceras, hemicelulosa, celulosa (Álvarez, 2017) y lignina de forma parcial (Negro <i>et al.</i> , 2000). En esta etapa se garantiza la “higienización” y eliminación de patógenos y larvas, como consecuencia del incremento de temperatura (Álvarez, 2010).
Enfriamiento (40-20°C)	El agotamiento de los nutrientes provoca la muerte de los microorganismos termófilos y el eventual descenso de la temperatura. Se desarrollan nuevamente las bacterias y hongos mesófilos que se inactivaron durante la fase termofílica y comienzan a degradar la celulosa y lignina residuales (Negro <i>et al.</i> , 2000).
Maduración (Temperatura ambiente)	El proceso se estabiliza y polimeriza el compost, descende la actividad bacteriana y se elimina la fitotoxicidad (Rodríguez, 2011).

2.5. Factores claves el proceso de compostaje

Existen factores ambientales y nutricionales clave para la obtención de un compost de buena calidad. Por lo que diversos estudios han establecido rangos sobre diversos parámetros ambientales y nutricionales (Tabla 2) para garantizar el buen funcionamiento del proceso. Los principales factores ambientales son la estructura y tamaño de los residuos, aireación, humedad y pH; mientras

que los factores nutricionales se enfocan principalmente en las concentraciones de carbono y nitrógeno que presentan los residuos a tratar (Córdoba, 2006).

Tabla 2. Factores claves en el proceso de compostaje.

Parámetro	Descripción	Rango óptimo	Referencia
Factores ambientales			
Estructura y tamaño de los residuos	La disminución del tamaño de partícula aumenta la superficie de contacto, por lo que mejora la actividad microbiana y el proceso de degradación de los residuos.	20 mm a 10 mm	OPS, 1999
Aireación	La aireación del sistema de compostaje es fundamental siendo un sistema aerobio, ya que el suministro de aire garantiza la incorporación del oxígeno y la eliminación del anhídrido carbónico producido durante el proceso.	5 y 15% en volumen	Cuadros, 2008
Humedad	La humedad es necesaria para la actividad microbiana, ya que permite y mejora el transporte de nutrientes, así como de los productos de desecho de las reacciones metabólicas.	50 y 70 %	Cuadros, 2008
pH	A lo largo del proceso de compostaje el pH presenta variaciones en su valor debido a los productos de reacciones metabólicas y a la sucesión de actividad de los microorganismos.	5.5 a 9	Salazar, 2016
Factores nutricionales			
Carbono/Nitrógeno	En este proceso la fuente de carbono actúa tanto como fuente de energía como estructural para los microorganismos y es el principal componente nutricional. Sin embargo, aunque la fuente de nitrógeno se requiere en concentraciones bajas, es indispensable para el crecimiento y funcionamiento celular.	30/1	Córdoba, 2006

2.6. Microorganismos en el proceso de composteo.

En el proceso de compostaje presenta un microbiota de bacterias, hongos y actinomicetos, que se encuentran de forma natural en los residuos alimenticios, suelo, hojas, poda, entre otros (Barrón, 2013). Las comunidades pueden variar a lo largo del proceso en función de la evolución de la temperatura, disponibilidad de nutrientes, concentración de oxígeno, contenido de agua, pH y acumulación o presencia de antibióticos (Laich, 2011). De forma general en la Tabla 3, se enlistan los diversos géneros microbianos predominantes o que han sido aislados en las diversas fases del composteo.

Tabla 3. Ejemplo de bacterias, hongos y actinomicetos presentes en las fases del proceso de compostaje.

M.O/Fase	Bacterias	Hongos	Actinomicetos	Referencias
Mesofilia	Géneros de la familia: <i>Alcaligenaceae, Alteromonadaceae, Bacillaceae, Clostridiaceae, Comamonadaceae, Corynebacteriaceae, Enterobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Cellulomonadaceae Flexibacteraceae, Microbacteriaceae Micrococcaceae, Nitrosomonadaceae, Moraxellaceae, Neisseriaceae, Nocardiopsaceae, Phyllobacteriaceae, Paenibacillaceae, Pseudomonadaceae, Rhodobacteraceae, Pseudonocardiaceae, Staphylococcaceae.</i>	<i>Aspergillus, Trichoderma, Mucor, Penicillium, Rhizopus, Backusella, Ulocladium, Cladosporium, Acremonium, Scopulariopsi, Geotrichum, Fusarium.</i>	Predominan géneros de la familia: <i>Nocardiaceae.</i>	Tiquia <i>et al.</i> , 2002; Laich, 2011.
Termofilia	Predominan especies de género <i>Bacillus</i> como: <i>B. subtilis, B. amyloliquefaciens, B. pumilus B. licheniformis, B. circulans, B. flexus.</i> También se pueden encontrar otros géneros como: <i>Bacteriodes sp., Cellvibrio gilvus, Cellulomonas biazotea, Eubacterium cellulosolvens, Geobacillus sp., Microbispora bispora, Paenibacillus curdlanolyticus, Pseudomonas cellulosa, Salinivibrio sp. y Rhodothermus marinus.</i>	No se ha reportado actividad.	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans, Microbacterium sediminis, Ascomycota, Streptomyces albogriseolus y S. thermovulgaris.</i>	Lynd <i>et al.</i> , 2002.
Enfriamiento	<i>Agrobacterium, Flavobacterium, Arthrobacter, Bacillus, Micrococcus, Achromobacter, Thiobacillus, Alcaligenes, Pseudomonas.</i>	<i>Aspergillus y Rhizopus, Penicillium, Mucor, Geotrichum, Trichoderma, Cladosporium, Backusella, Fusarium, Ulocladium, Acremonium y Scopulariopsi.</i>	<i>Nocardiaceae y Streptomyces.</i>	Laich, 2011

Las bacterias que se establecen en la biopila en la fase mesofílica tienen la capacidad de hidrolizar compuestos simples y forma esporas o cápsulas para inactivarse cuando la temperatura de la biopila aumenta (Laich, 2011). En la fase termófila, encontramos bacterias heterotróficas que degradan compuestos orgánicos (carbohidratos, ácidos orgánicos, polisacáridos, proteínas, lípidos, alcoholes), reducen el azufre inorgánico y algunos géneros destacan por su capacidad celulolítica (Lynd *et al.*, 2002). En la fase de enfriamiento del composteo, predomina las bacterias mesófilas que favorecen la descomposición de los compuestos orgánicos residuales, la oxidación y mineralización de compuestos nitrogenados inorgánico y azufrados produciendo nitratos y sulfatos, respectivamente. Estas bacterias también provocan la formación de humus, a través de la polimerización de compuestos orgánicos simples y la fijación del nitrógeno atmosférico, la mineralización del hierro, manganeso y fósforo; también realizan la degradación de compuestos orgánicos tóxicos (pesticidas)

y la disminución de la cantidad de metales pesados por la formación de sales insolubles (Laich, 2011).

Los hongos filamentosos participan en el proceso de compostaje con la degradación aerobia de compuesto lignocelulósicos. Debido a su capacidad metabólica y mecánica se utilizan para el desarrollo de biofertilizantes, biopesticidas y acondicionadores biológicos (Laich, 2011).

Los actinomicetos, son microorganismos Gram positivos, aerobios y quimioorganotrofos, se encuentran ampliamente distribuidos en suelos con pH neutro o poco alcalino. Presentan capacidad enzimática para hidrolizar sustancias orgánicas complejas (Tiquia, 2002), como compuestos aromáticos, esteroides y fenoles, entre otros, mediante quitinasas, glucanasas y peroxidasas por mencionar algunas (Barrón, 2013).

2.7. Microorganismos celulolíticos

En la naturaleza la hidrólisis de la celulosa es posible mediante el metabolismo de microorganismos aerobios y anaerobios, mesófilos y termófilos (Ryckeboer *et al.*, 2003). Estos microorganismos presentan un complejo enzimático extra o intracelular conocido como celulasas que hidrolizan los enlaces β -1,4 glucosídicos presentes en la celulosa (Henrissat *et al.*, 1991). Dicha hidrólisis se realiza en diferentes sitios de la cadena de la celulosa, por tres enzimas (Figura 1).

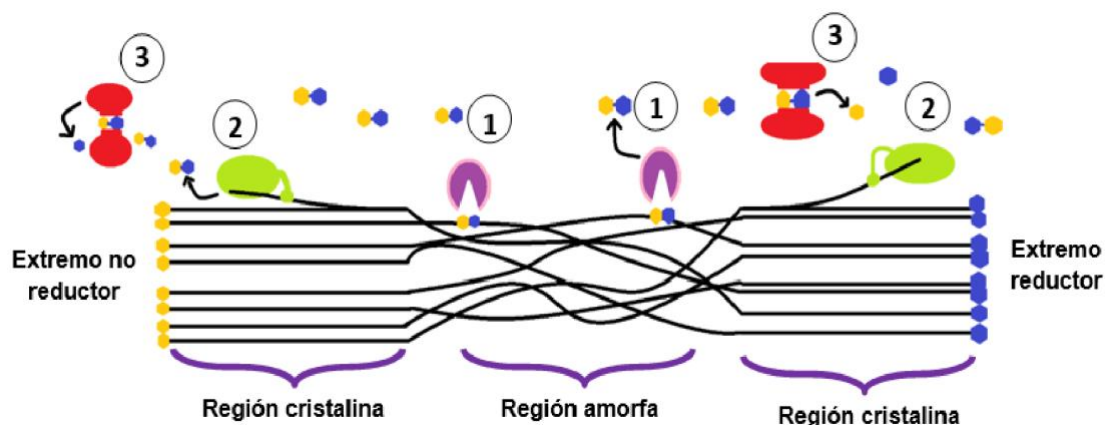


Figura 1. Sitios de acción de las celulasas en la microfibrilla de celulosa.

① Endocelulasas, carboximetilcelulolasa (CMCasas) o endoglucanasas, actúa rompiendo los sitios amorfos de la celulosa formando azúcares reductores; ② las exocelulasas o exoglucanasas, actúan en los extremos reductores y no reductores de la celulosa convirtiéndola en celobiosa y ③ β -glucosidasas se encarga de romper los productos liberados por las endo y exoglucanasa obteniendo glucosa (Sadhu y Maiti, 2013).

Las celulasas pueden presentarse como sistemas celulolíticos complejos o no complejos (Juturu y Wu, 2014). Los sistemas complejos o celulosomas, son producidos por microorganismos anaerobios, mientras que los sistemas no complejos, están presentes en algunas bacterias aerobias Gram (+), como celulasas solubles que actúan de manera independiente (Madigan, 2012).

Juturu y Wu (2014) reportan que las celulasas bacterianas son de especial interés debido a que presentan actividad en un amplio rango de temperatura (25- 105°C) y pH (4.5 a 10). En la Tabla 4 (BREBA, 2016), se muestran algunos valores de pH y temperatura reportados como óptimos para géneros que presentan celulasas bacterianas (BRENDA, 2016) y que se han aislado en ambientes naturales, tales como aguas termales (Bronnenmeier *et al.*, 1995), suelo forestal (Zhu *et al.*, 2010) y suelo de manglar (Behera *et al.*, 2014).

Tabla 4. pH y temperatura óptima para la actividad de los diferentes tipos de celulasas producidas por bacterias aisladas de diversos ambientes naturales.

Celulasas	Bacteria	pH	Temperatura(°C)
	<i>Bacillus sp.</i>	10.0	50
Endocelulasas	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	5.8	25
	<i>Bacillus subtilis</i>	6.0	60
Exocelulasas	<i>Clostridium stercorarium</i>	6.0	65
(reductor)	<i>Ruminococcus albus</i>	6.8	37
	<i>Thermotoga marítima</i>	7.5	95
Exocelulasas	<i>Bacillus circulans</i>	4.5	40
(no reductor)	<i>Bacillus sp.</i>	8.0	55
	<i>Bacillus subtilis</i>	4.5	37
	<i>Thermotoga marítima</i>	7.0	105
β- glucosidasa	<i>Thermotoga marítima</i>	3.0	100
	<i>Bacillus halodurans</i>	10.0	45
	<i>Ruminococcus albus</i>	6.5	30

2.8. Aislamiento e identificación de bacterias celulolíticas

2.8.1. Aislamiento de microorganismos

De forma natural, la mayoría de los microorganismos se encuentran integrados en poblaciones mixtas. Por lo que es necesario separarlos unos de otros para conocer sus propiedades y alcances bajo condiciones de laboratorio.

Un cultivo axénico o puro es aquel que contiene únicamente un sólo tipo de microorganismo, libre de otras especies o contaminantes. El cultivo axénico generalmente se logra por cultivos sucesivos en un ambiente previamente estéril y bajo condiciones ambientales que favorezcan el crecimiento del microorganismo de interés o bien cuando procede de una sola célula (Carrasco *et al.*, 2020).

2.8.2. Siembra y medios de cultivo.

La obtención de cultivos axénicos a partir de una población microbiana mixta se realiza a través de técnicas de aislamiento. Existen diferentes métodos de siembra y medios de cultivo para aislar al microorganismo de interés en función de sus requerimientos de crecimiento (atmósfera, temperatura y nutrición). En la tabla 5 se presentan algunas técnicas de siembra, así como una breve clasificación de los medios de cultivo según su composición y estado físico (Bou *et al.*, 2011).

Técnica de siembra		Clasificación según su composición	Clasificación según su estado físico
Siembra en placa	Se utiliza para contar y aislar microorganismos.	Básico Son ricos en macro y micro nutrientes necesarios para crecimiento de la gran mayoría de las bacterias. Se utilizan en la siembra primaria de las muestras.	Sólido: Consisten en una base de agar, polímero de origen vegetal que forma un gel al enfriarse, mantiene una alta humedad y contiene los elementos nutricionales necesarios.
Tubo con agar inclinado	Cultivo de microorganismos aerobios o anaerobios facultativos y almacenamiento de cultivos por cortos períodos de tiempo a temperaturas de 4°C.	Enriquecido Permite obtener bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales.	
Tubo con agar sin inclinar	Conservar microorganismos anaerobios facultativos y saber si el microorganismo es o no móvil mediante la observación de crecimiento alrededor de la zona donde se hizo la picadura.	Selectivo Fomentan el crecimiento de algunas bacterias y evitan el de otras. Son de gran utilidad para el aislamiento bacteriano a partir de una población bacteriana mixta.	Semi sólido: Tienen un menor porcentaje de agar, por lo que no solidifican totalmente a la temperatura ambiente.
Tubos o Erlenmeyer	Obtención de población microbiana grande.	Diferencial Son medios que distinguen entre distintos grupos bacterianos en función casi siempre del color de sus colonias.	Líquido: Las sustancias nutritivas se encuentran disueltas, provocando un mayor crecimiento microbiano

2.8.3. Técnicas de aislamiento

Las técnicas de aislamiento se basan en la inmovilización de las células microbianas en la superficie de los medios de cultivo, donde se reproducirá y formará un cumulo de celular microbiano, que dan origen a las colonias celulares, las cuales son visibles al ojo humano y presentan diferencias en su color, forma, grosor, etc., según el microorganismo cultivado (UMH, 2021). De forma general el aislamiento de estas colonias celulares se realiza a través del aza bacteriológica, dispersando la colina por estriado (simple o cruzado) sobre agar en la placa (medio sólido), otra técnica es la de mezclado donde la separación de las bacterias se realiza por la dispersión de los microorganismos en el medio líquido (Tabla 6).

Tabla 6. Técnicas de aislamiento microbiano

Técnica		Descripción
General	Agotamiento de aza	El aza bacteriológica, debe ser pasada sobre la flama antes de ser utilizada. Una vez fría se toma la colonia y se siembra por estría en placa.
	Depósito y posterior quemado	También se utiliza el aza bacteriológica, la muestra se extiende por estría sobre un área pequeña de la superficie de la placa con agar. Esta acción se repite de forma consecutiva por otras zonas de la placa tocando ligeramente la muestra sembrada anteriormente.
	Dilución	Se utiliza caldo nutritivo o solución fisiológica para resuspender la muestra a aislar y se realizan diluciones seriadas, posteriormente, se toma una muestra de cada una de las diluciones y se estría en placas previamente etiquetadas con la dilución correspondiente. Si la dilución es la adecuada se podrán obtener colonias aisladas.
	Extensión en superficie con espátula de Drigalski	Igual que la técnica anterior, se hace uso de diluciones seriadas de la muestra, pero la resiembra se hace depositando un 0.1 ml del caldo o solución en una placa y se extiende toda la superficie con una espátula de Drigalski previamente esterilizada.
	Vaciado en placa	Se coloca en la placa medio de cultivo fundido con temperatura no mayor a 40°C y se añade un volumen pequeño de muestra, se cierra la placa y se mezcla suavemente con movimientos rotatorios sobre una superficie plana para lograr una distribución homogénea de los microorganismos.
Mezcla	Método especial	Se utiliza cuando el microorganismo posee características específicas, como resistencia al calor, crecimiento a pH ácido, crecimiento en anaerobiosis, etc.

2.9. Caracterización de microorganismos

La caracterización de los microorganismos una vez aislados, permite identificar atributos únicos. Los métodos de identificación de forma general se pueden dividir en: 1) fenotípicos: morfología macroscópica, microscópicas y pruebas bioquímicas y 2) genotípicos: secuenciación del gen ARNr 16s.

2.9.1. Morfología macroscópica

Los microorganismos al reproducirse con óptimos parámetros de crecimiento en medio sólido se agrupan dando origen a las colonias. Las colonias son la forma macroscópica de visualizar la morfología que constituye una agrupación de bacterias crecidas en un lapso que típicamente va de 24 a 48 horas de cultivo (Pírez y Mota, 2006), aunque es importante señalar que el tiempo de cultivo depende del tiempo de duplicación (td) de género microbiano. En la figura 2. se muestra las variantes de cada característica que se reportan al describir la morfología de una colonia bacteriana.

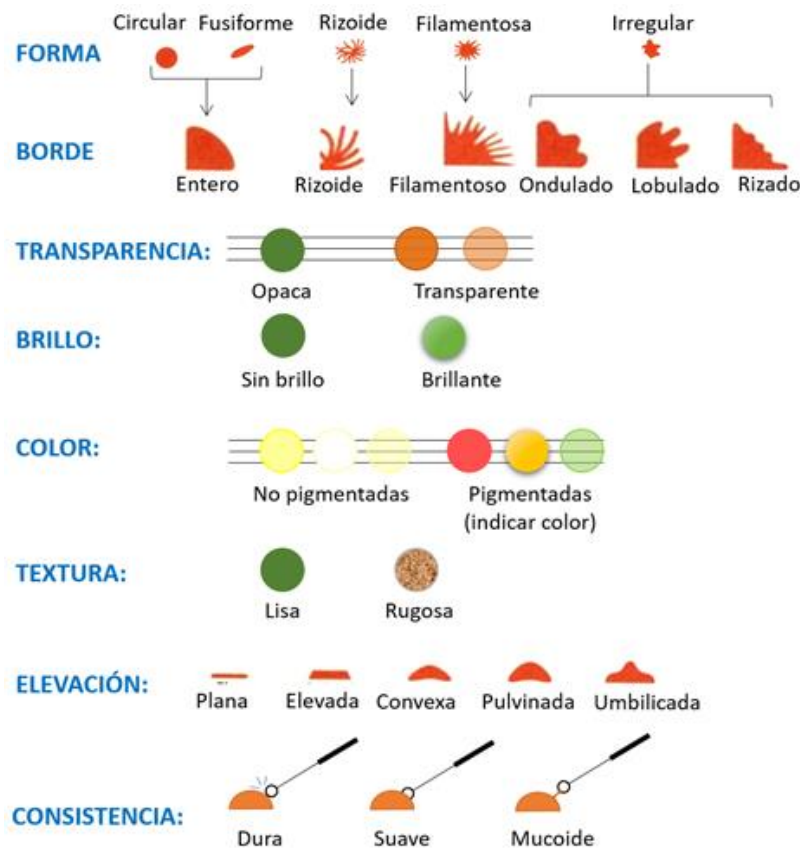


Figura 2. Características morfológicas coloniales de Ana Laura Guillen Nepita, 12 octubre,2020.

2.9.2. Morfología microscópica

Los microorganismos aislados pueden ser observados a través de un microscopio (Vargas y Kuno, 2014). En el caso de las bacterias estas pueden presentar tres formas básicas: esféricas denominadas cocos; alargadas, también llamadas bacilos o bacilares; y finalmente las formas curvadas o de espiral, espirilos, espiroquetas, comas o vibriones (Aliaga, 2011).

Los cocos son tamaño y suelen medir entre los 0,8 a 1,0 μ (Díaz, 2009). Pueden presentarse en forma de individual, en pares, o agrupaciones. (Fig. 3 a-f). Las bacterias que presenta en forma de bacilo se distinguen por presentar formas de bastón, ser largos y delgados o pequeños y gruesos, también pueden presentar variaciones en sus extremos pudiendo ser rectos, afilados o redondeados (Aliaga, 2011) (Fig. 3 g-j). Los espirilos o formas curvadas presentan una o más curvaturas o formas de hélices en su estructura celular (Da Silva, 2013) (Fig. 3 k-n).

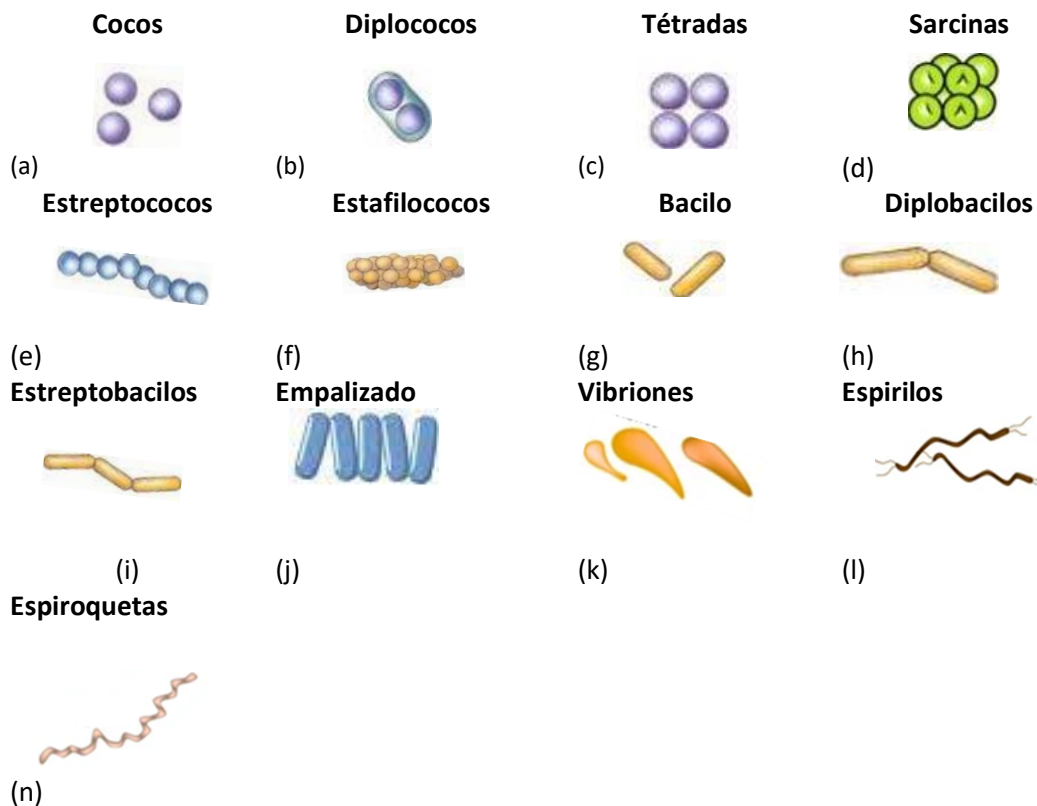


Figura 3. Agrupaciones de cocos, bacilos y espirilos. (a) Forma cuasi-esférica y agrupaciones homogéneas; (b) Después de su división permanece en pares; (c) Se dividen en dos direcciones perpendiculares formando una agrupación en una disposición cuadrada; (d) Se dividen en tres direcciones perpendiculares formando una agrupación cubica; (e) Se dividen en un solo plano formando una secuencia; (f) Es una agrupación irregular de cocos; (g) Forma de bastón; (h) Bacilos agrupados en pares; (i) Cadena de 4 o más bacilos; (j) Bacilos agrupado lado a lado; (k) Espirilos cortos con forma de coma; (l) Presentan forma helicoidal; (n) Presenta forma helicoidal con cuerpo flexible.

2.9.3. Tinción de microorganismos

La observación de los microorganismos al microscopio óptico se puede hacer preparando un frotis cual consiste en la extensión de la muestra sobre un portaobjetos (Pírez y Mota, 2006) en fresco o fijado por calor directo o agentes químicos. En ambos casos es necesario aplicar coloraciones de contraste para diferenciar las células (Moreno y Albarracín, 2012). En la Tabla 7, se muestran algunos tipos de tinciones y su función.

Tabla 7. Tipos de tinciones y sus funciones (Moreno y Albarracín, 2012).

Tinción simple	Tinción diferencial	Tinción especializada
Solo se utiliza un colorante, el cual debe ser básico con carga positiva para que se una a la pared y citoplasma celular. Los colorantes básicos más utilizados son: Azul de metileno, violeta cristal, verde malaquita y fucsina básica.	Permite clasificar a la bacteria según la estructura y composición química de la pared celular. La tinción de Gram diferencia entre positivas y negativas. La tinción de Ziehl-Neelsen, identifica bacterias ácido-alcohol resistentes.	Permite identificar ciertas estructuras presentes en los microorganismos como capsula endosporas, flagelos o inclusiones de almidón o polifosfatos

2.9.3.1. Tinción de Gram

La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial que permite clasificar a las bacterias en: Gram positivas y se distinguen por presentan una coloración azul-violeta y Gram negativas, que presentan una coloración rojiza. Esta diferencia se debe a la estructura de su pared celular (Figura 4). Las bacterias Gram positivas presentan una pared compuesta de peptidoglucanos y polímeros que la hacen impermeables y resistentes a la decoloración, mientras que las bacterias Gram negativas tiene una capa delgada de peptidoglucanos y una bicapa de lipoproteínas que se pueden retirar con la decoloración (Rodríguez y Arenas, 2018).

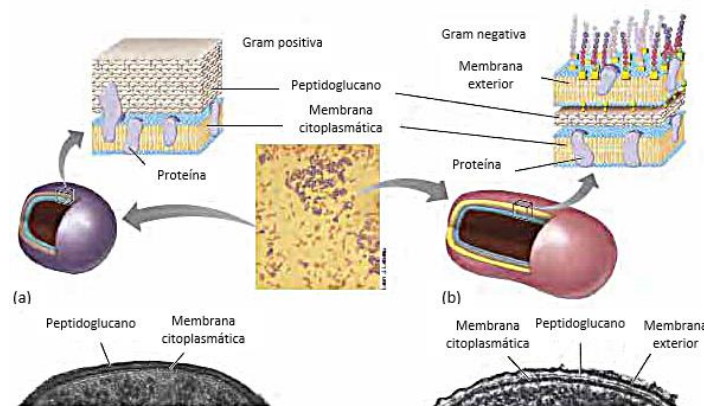


Figura 4. Representación esquemática de las paredes celulares Gram positivas y Gram negativas. Imagen de la tinción de Gram en el centro muestra células de (a) *Staphylococcus aureus*, de color violeta (Gram +) y (b) *Escherichia coli*, de color rosa, (Gram -). Recuperado de Madigan *et al.*, 2004, pp 44.

2.9.4. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas son pruebas que permiten la identificación de procesos metabólicos o la presencia o ausencia de enzimas específicas, a través de pruebas relativamente rápidas. La evaluación del metabolismo se realiza usando medios de identificación que contienen un sustrato definido y se evalúa si hubo o no crecimiento previa incubación de 18 a 48h. Las pruebas enzimáticas son más rápidas (segundos hasta unas pocas horas) ya que se evalúa la presencia de enzimas constitutivas (Bou *et al.*, 2011). En la Tabla 8, se resumen las pruebas bioquímicas más convencionales (Bou *et al.*, 2011).

Tabla 8. Pruebas bioquímicas

Prueba bioquímica	Determinación
Metabolismo de carbohidratos	Se utiliza para saber si el microorganismo metaboliza carbohidratos (lactosa, fructosa, sacarosa, manitol, glucosa, etc.). En el medio se encuentra un indicador (rojo de fenol) que cambia de color si el microorganismo metaboliza el sustrato.
Agar TSI (Agar triple azúcar hierro)	Se aplica para saber si el microorganismo es capaz de fermentar la glucosa, sacarosa y lactosa, y liberar ácido sulfhídrico (H ₂ S).
Voges-Proskauer	Establece si se lleva a cabo la fermentación ácido mixta o bien produce acetil metil carbinol.
Citrato de Simmons	Se utiliza para establecer si el microorganismo es capaz de emplear el citrato como única fuente de carbono.
Metabolismo de nitratos	Determinar si el microorganismo es capaz de reducir los nitratos a nitritos
Agar Hierro Lisina	Permite establecer si el microorganismo posee la lisina descarboxilasa o desaminasa y si liberar H ₂ S.
Caldo urea	Se aplica para determinar si el microorganismo posee la enzima ureasa- utiliza, esto se realiza adicionando urea como fuente de N en el cultivo.
Medio SIM (Reducción de sulfatos, Indol y Movilidad)	Determina si el microorganismo produce H ₂ S, producción de indol por presencia de triptofanasa y evolución de la movilidad
Medio MIO (Medio Movilidad, Indol, Ornitina)	Evalúa la movilidad, producción de indol por triptofanasa y metabolismo de la ornitina por la presencia de ornitind Descarboxilasa,
Prueba catalasa	La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias, así que nos permite establecer su forma de respiración.
Prueba de oxidasa	Esta prueba se utiliza para establecer la presencia oxidasas en citocromo c.
Gelatinasa-Hidrólisis de gelatina	Nos permite determinar la capacidad de un microorganismo para producir enzimas proteolíticas.
Hemolisis en agar sangre	Determina el grado de hemólisis causada por las bacterias en crecimiento

2.9.5. Secuenciación del gen ARN 16s

Una de las herramientas más utilizadas para la identificación bacteriana a nivel taxonómico es la secuenciación genética del ARNr 16s, ya que este gen está altamente conservado en las bacterias y funciona como un marcador “housekeeping”. La secuenciación de este gen nos permite obtener de manera rápida la identificación y filogenia de las bacterias al contrastarse con otras secuencias disponibles en base de datos (Bou *et al.*, 2011). En la tabla 9 se presentan las etapas de la identificación molecular de las bacterias (Carrasco *et al.*, 2020).

Tabla 9. Etapas de la identificación molecular de bacterias.

Etapas	Determinación
Cultivo microbiano puro	Se debe garantizar que todo el ADN extraído proviene de un solo tipo de microorganismo con la finalidad de no tener fragmentos de genes de diferentes microorganismos.
Extracción de ácido nucleico	Se realiza una lisis celular para extraer al ADN de la bacteria, posteriormente se separa y purifican los ácidos nucleicos del resto de componentes celulares. Actualmente existen kits comerciales con protocolos estandarizados y específicos para cada tipo de microorganismo.
Amplificación de secuencias nucleotídicas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	La reacción en cadena de la polimerasa permite amplificar (copiar) una región de ADN delimitada <i>primers</i> o cebadores en ambos sentidos (forward y reverse), mediante la acción de la enzima ADN polimerasa que utiliza dNTPs para sintetizar ADN a partir de la hebra molde proveniente del ADN anteriormente extraído.
Electroforesis de los productos de PCR	Esta técnica nos permite separar partículas en función de su carga eléctrica y tamaño. En este caso se utiliza para evaluar mediante tamaño y claridad de las bandas, la integridad y tamaño del ADN extraído, así como la correcta amplificación de la región deseada.
Secuenciación de genes	Se trata de determinar el orden de las bases nucleotídicas (citosina C adenina A, timina T, guanina G) de la secuencia del gen que se amplifico mediante PCR, esta secuencia corresponderá a la afiliación taxonómica del microorganismo estudiado; la secuenciación se debe de realizar en ambas direcciones con cebadores forward y reverse
Análisis bioinformático de secuencias nucleotídicas secuenciadas	Se realiza la depuración y alineamiento de la secuencia, posteriormente se compara con otras secuencias ya identificadas disponibles en bases de datos a través de distintos programas computacionales.

2.10. Cinéticas microbianas

2.10.1. Crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano se define como un incremento en el número de células por fisión binaria o bipartición (Madigan *et al.*, 2009). En un cultivo en lote o discontinuo, el ciclo celular se representa a través de una curva de crecimiento (Doran., 1998; Bikandi, 2014), que presenta 4 fases (Figura 5). La primera fase, es la de adaptación o latencia (lag), donde las células se adaptan al nuevo ambiente sintetizando enzimas involucradas en el metabolismo de los nutrientes presentes en el medio de cultivo y el crecimiento es imperceptible (Doran., 1998; Apella y Araujo, 2005). La segunda fase, es la fase de aceleración o exponencial, las células comienzan a dividirse a una velocidad de crecimiento es constante, el crecimiento alcanza su máxima velocidad y se hace más lento debido al agotamiento de los nutrientes o la formación de productos inhibidores (Doran, 1998), la población total es casi uniforme con respecto a su composición química y actividad metabólica (Apella y Araujo, 2005). En la tercera fase, denominada estacionaria, la velocidad de crecimiento cesa como consecuencia del agotamiento de nutrientes y acumulación de productos inhibidores. La última fase nombrada de muerte, las células pierden su viabilidad por falta de nutrientes y comienza una lisis celular (Doran, 1998; Apella y Araujo, 2005).

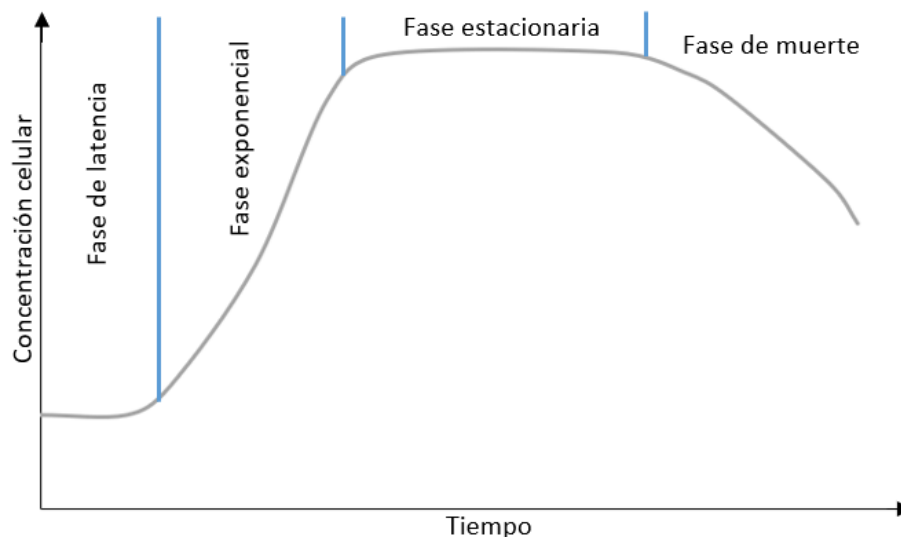


Figura 5. Curva de crecimiento microbiano

2.10.2. Ecuación de Monod

El crecimiento microbiano puede ser cuantificado mediante el modelo matemático de Monod que describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento (μ) y el uso del nutriente limitante

(S). La ecuación de Monod se usa ampliamente debido a su simplicidad y ajuste razonable de datos experimentales (Meraz *et al.*, 2022). La ecuación depende solo de dos parámetros que representan la tasa de crecimiento específica máxima (μ_{max}) y la constante de saturación (K_s), y se puede escribir como sigue:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

Donde, S y X denotan concentraciones de sustrato y biomasa, respectivamente. Los parámetros μ_{max} y K_s se utilizan comúnmente para la interpretación de mecanismos cinéticos a partir de datos experimentales (Meraz *et al.*, 2022; Duarte 1996).

Los valores de los parámetros μ_{max} y K_s se pueden obtener a partir de la linealización de la ecuación de Monod (1), dando como resultado la ecuación (2), la cual tiene la forma de la ecuación de una recta (3). Así para poder estimar la pendiente m , se requiere conocer $\frac{1}{\mu(S)}$ y $\frac{1}{S}$ y la ordenada al origen b , haciendo uso de la metodología de regresión lineal y se puede conocer los parámetros μ_{max} y K_s (Miño *et al.*, 2019).

$$\frac{1}{\mu(S)} = \frac{K_s}{\mu_{max}} * \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{max}} \quad (2)$$

$$y = mx + b \quad (3)$$

En el caso de las curvas de crecimiento microbiano se suelen aplicar logaritmos neperianos a los valores de concentración de los microorganismos en el cultivo en la fase de crecimiento exponencial para tener una relación lineal entre las abscisas y ordenadas (Bikandi, 2014) y obtener la pendiente ($m = \mu$) para calcular el tiempo de duplicación, ecuación (4), el cual se refiere al tiempo necesario para que la población de un microorganismo se duplique (Apella y Araujo, 2005).

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (4)$$

3. Antecedentes

Los parámetros de operación de los sistemas de compostaje suelen controlar parámetros como el pH, humedad y temperatura para establecer el control del proceso. Los intervalos de pH óptimos se reportan entre 6.5 y 9.3, mientras que los de humedad van entre 50 a 70% (Guillén, 2022). Durante la etapa de mesofilia la temperatura ideal reportada es de 35°C, mientras que en la fase termófila a más de 60°C (Tixie & Ruiz, 2018; Jiménez, 2015). Con respecto al tiempo de compostaje se reportan

periodos de duración entre 87 a 224 días, mientras que los rendimientos del proceso van entre 40 al 54% (Guillén, 2022; Jiménez, 2015; Tixie y Ruiz (2018).

Con respecto al aislamiento e identificación de bacterias celulolíticas, se han utilizado diferentes procedimientos, destacando el uso del medio selectivo de carboximetilcelulosa (CMC) y la técnica de identificación positiva con Rojo de Congo, ya que permiten evidenciar la hidrólisis de los polisacáridos, mediante zonas de aclaramiento alrededor de la colonia (Zhang *et al.*, 2006). El aislamiento e identificación de bacterias celulolíticas en el proceso de compostaje se ha llevado a cabo tanto en la fase mesófila como termófila, ya sea utilizando solo un tipo de residuo o desechos orgánicos pre-formulados (Tabla 10). No obstante, en estos estudios sólo se realiza un método de identificación y con excepción de Rodríguez y Llenque (2016) que realizan la descripción de la cinética microbiana celulítica mesófila, los demás autores no reportan la descripción cinética de los microorganismos aislados.

Tabla 10. Aislamiento e identificación de bacterias

Referencia	Origen	Temp. de trabajo	Métodos de identificación	MO. obtenidos	Actividad Celulolítica	Descripción de la cinética microbiana
Rodríguez y Llenque, 2016	Compost de residuos orgánicos	Mesófila	Bioquímica	<i>Paenibacillus sp</i> , <i>Bacillus firmus</i> y <i>Bacillus sp</i>	El tamaño de los halos netos de hidrólisis fue de 9 mm a 17 mm.	Se reporta para cada microorganismo obtenido una fase logarítmica media de crecimiento a las 6 horas en caldo carboximetilcelulosa 0.7 %
Bohórquez y Pérez, 2007	Compostaje de residuos de cultivo de crisantemo	Mesófila	Bioquímica	<i>Bacillus sp</i>	Cinco cepas mostraron un aclaramiento difundido por todo el agar, tres cepas tuvieron un halo de hidrólisis con un diámetro	NR

					de 0.2 mm a 0.35 mm.	
Anguiano. 2019	Muestras de composta	Mesofilia	Secuenciación de ARN 16s	Bacillus pumilus. Stenotropho monas		NR
Siu, 2017	Compostaje de residuos de café	Termofilia	Secuenciación de ARN 16s	Bacillus subtilis		NR

NR: no reportado

4. Importancia del problema

En nuestro país los problemas derivados del manejo de los RSU y en particular de la FORSU se originan por la carente separación selectiva (es decir, a la separación de los RSU en orgánicos e inorgánicos) de los residuos. De acuerdo con el censo publicado en el 2019 por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía del 100% de los RSU colectados a nivel nacional, el 88% correspondió a recolección no selectiva y el 12% a recolección selectiva (INEGI, 2019). Y sólo el 7% del total de los residuos son tratados mediante compostaje o biodigestión (CCA, 2017; SEMARNAT, 2020).

En los últimos años se han incrementado el número de técnicas para el aprovechamiento de los residuos orgánicos, entre las más usadas está el proceso de compostaje, cuyo producto final se usa como abono orgánico para la mejora de suelos agrícolas (Richard, 2004; Wei *et al.*, 2017).

Con este método el volumen de FORSU producido puede disminuir de un 40 a un 60%. Aunado a esto durante el proceso de compostaje se desarrollan una gran variedad de bacterias aerobias termófilas que secretan enzimas hidrolíticas que degradan celulosa (Nivedita *et al.*, 2013). Actualmente a nivel industrial las enzimas hidrolíticas (amilasas y celulasas), son las más utilizadas y ocupan más del 15% del mercado mundial (Sajith *et al.*, 2016). Con un mercado valorado en USD 10.000 millones en 2019 (Escudero, 2022) y un crecimiento anual de 4.7% (Lopes, *et al.* 2018).

5. Planteamiento del problema

El uso industrial de las enzimas hidrolíticas ha generado la necesidad de obtener celulasas comerciales que puedan actuar efectivamente a diferentes pH y rangos de temperatura (Torrez Monroy *et al.*, 2010). Por tanto, se vuelve importante el aislamiento y caracterización de bacterias capaces de producir enzimas resistentes con características termoestables y capaces de sobre vivir a un amplio rango de pH. Es así como el compostaje es una buena una herramienta biotecnológica para la transformación de los residuos sólidos orgánicos en productos agrícolas apropiados (Baffi *et*

al., 2007) y la obtención de bacterias con capacidad hidrolítica como las enzimas celulolíticas que tienen amplio potencial industrial.

6. Objetivos.

6.1. Objetivo general.

Aislar bacterias termófilas celulolíticas a partir del composteo de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.

6.2. Objetivos particulares

- Establecer y monitorear un sistema de biopila de composteo alimentado con la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos.
- Obtener, cultivar y caracterizar bacterias obtenidas de la biopila de composta en la fase termófila.
- Aislar y caracterizar a las bacterias que demuestren capacidad celulolítica termófilas, por identificación morfológica macroscópica y microscópica, pruebas bioquímicas e identificación molecular (ARNr 16s).
- Determinar la actividad celulolítica y tasas de crecimiento microbiano en medio de carboximetilcelulosa.

7. Diseño de la investigación

Se realizó una investigación experimental a nivel de laboratorio. Para lograr los objetivos propuestos en este trabajo, la investigación se desarrolló en tres fases globales:

- I. Implementación del sistema de compostaje, que consistió en la recolección y muestreo de residuos orgánicos, establecimiento de la biopila estática, monitoreo de la temperatura, pH y humedad, caracterización fisicoquímica de la composta en fase mesófila y termófila y determinación de la calidad de la composta en fase de maduración;
- II. Aislamiento e identificación morfológica macroscópica, microscópica y molecular y caracterización bioquímica;
- III. Determinación de la actividad cinética celulolítica

7.1. Implementación del sistema de compostaje

7.1.1. Diseño de la biopila

Se diseñó una biopila de compostaje con dimensiones de 32 cm ancho, 53 cm de largo y 26.5 de profundidad con tapa hermética. El sistema se implementó con un doble fondo de acrílico con orificios para permitir el escurrimiento y recolección de lixiviados. (Figura 6 a y b).

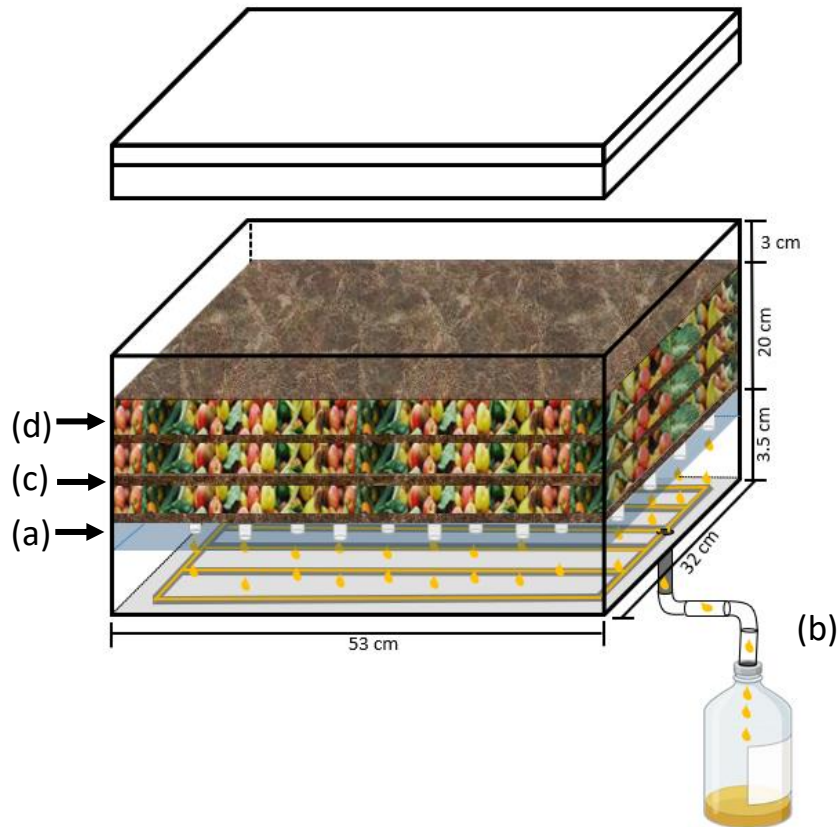


Figura 6. Biopila de compostaje: (a) doble fondo con orificios, (b) sistema de recolección de lixiviado, (c) capa de tierra, (d) capa de residuo.

7.1.2. Recolección y muestreo de residuos orgánicos

Se realizó la recolección de FORSU generada en 36 viviendas unifamiliares. La recolección se hizo en bolsas de polietileno durante 3 días. Los residuos recolectados fueron muestreados por el método de cuarteo, el cual consiste en realizar una distribución homogénea de los residuos sobre una superficie plana de 4 x 4 m, dividida en secciones para obtener una muestra homogénea y representativa (NMX-AA-15-1985). Posteriormente los residuos se trasladaron al Instituto Interamericano de Tecnología y Ciencias del Agua (IITCA) donde se registró el peso de la muestra total generada, se realizó

una separación de residuos de origen animal (huesos) y se redujo el tamaño de partícula mediante paleo, posteriormente el residuo se dispuso en la biopila de compostaje como se establece a continuación.

7.1.3. Establecimiento del proceso de compostaje

A partir del volumen total de la caja se calculó la cantidad de tierra negra y residuos orgánicos para el proceso de compostaje, se trabajó con un volumen del 80% para poder realizar la aireación manual, se trabajó con 3 capas de tierra y residuos, comenzando con 0.975 kg de tierra negra (5% del volumen de trabajo), seguido de 1.95 kg de FORSU (10% del volumen de trabajo) (Figura 6 c y d) hasta completar las 3 capas de cada componente. Una vez colocadas las capas se homogenizo y se dejó asentar por 3 días.

7.1.4. Monitoreo de temperatura, pH y humedad

Se realizó medición de la temperatura, pH y humedad cada 24 horas en el mismo horario por 133 días. La aireación del sistema se realizó por volteo del residuo con una pala de plástico posterior a la medición de los parámetros (temperatura, pH, humedad). Para llevar a cabo la medición se dividió la superficie de la biopila en 5 puntos de medición. En cada cuadrante y en el centro de la biopila se midió cada parámetro, obteniendo 5 valores que se promediaron para tener el valor final (Figura 7). La temperatura y pH se midió con un medidor de suelo electrónico 4 en 1 (4 in 1 Soil Survey Instrument) (Figura 8) y el porcentaje de humedad con un sensor Tempo Disc™ Bluetooth Sensor de temperatura, humedad y punto de rocío.

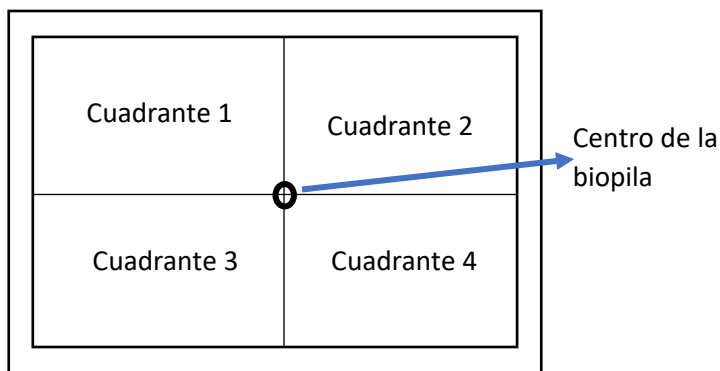


Figura 7. División de la biopila en cuadrantes



Figura 8. Medición de temperatura

7.1.5. Caracterización fisicoquímica de la composta en fase mesófila y termófila

Una vez establecida la biopila se tomó una muestra por duplicado de 5 gr de composta en fase mesófila y termófila para el análisis de pH, nitritos, nitratos, amonio, alcalinidad, acidez, dureza, fosfatos y demanda química de oxígeno soluble (DQOs) (los métodos de los análisis mencionados se describen en la sección de métodos analíticos de este documento).

7.1.6. Evaluación de la calidad de composta en fase de maduración

Al término del proceso de compostaje se determinó la calidad del compost en función del valor de pH, conductividad eléctrica, índice de germinación microbiológicos, la presencia de metales pesados e índice de germinación (Ver anexo 5, tabla 3 y 4). Los resultados obtenidos fueron comparados con las especificaciones para composta terminada descrita en la norma NMX-AA-180-SCFI-2018 (Ver anexo 5, tabla 3).

7.1.6.1. Determinación de pH y conductividad eléctrica

Para la medición de pH, se siguió el método potenciométrico descrito en la norma NMX-AA-025-198. Se utilizaron 10 g de composta y se le adicionaron 90 mL de agua destilada, se homogenizó por 10 minutos en parrilla con agitación, después se dejó reposar la mezcla por 30 minutos y pasado el tiempo se determinó el pH y la conductividad con un potenciómetro Hach (Multiparameter meters sension56).

7.1.6.2. Especificaciones microbiológicas

La calidad microbiológica se evaluó en función de la presencia de coliformes fecales y *Escherichia coli* presentes en un gramo de compost (en base seca), se utilizó el método de número más probable en tubos múltiples (NMX-AA-042-SCFI-2015, ver anexo 6). Los resultados se compararon con las especificaciones de la NMX-AA-180-SCFI-2018, que establece el tipo de compost obtenida en función de la carga microbiana contenida (Ver anexo 5, tabla 5).

7.1.6.3. Presencia de metales pesados

La medición de metales pesados se llevó a cabo de manera externa en el laboratorio de Geoquímica Ambiental en el centro de geociencias campus UNAM-Juriquilla, donde la muestra fue sometida a un proceso de digestión ácida y medida por espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado por inducción (Thermo iCAP 6500 Duo View), así como por Absorción Atómica (Perkin Elmer Analyst 300) con flama y sistema de inyección de flujo FIAS 10. Los resultados fueron comparados con la norma NMX-AA-SCFI-2018, que establece las concentraciones máximas de elementos traza de metales pesados en mg/L en base seca (Ver anexo 5, tabla 4).

7.1.6.4. Índice de germinación

El índice de germinación se determinó usando el compost obtenido y semillas de *Raphanus sativus* (rábano), con la finalidad de determinar su fitotoxicidad. Para llevar a cabo la prueba se tomó una muestra de 5 gr de compost y se colocaron en 50 ml de agua destilada, se llevó una agitación por 10 minutos y se dejó reposar 30 min., para obtener un “extracto de compost”. Un disco de algodón fue humedecido en el extracto de compost y colocado en un vaso un recipiente de transparente, se colocaron 10 semillas de rábano y se taparon con otro disco de algodón humedecido con extracto, el recipiente fue tapado con papel aluminio para evitar la pérdida de humedad y se mantuvo a temperatura ambiente por 10 días. A la par se colocaron semillas control bajo las mismas condiciones, pero con discos de algodón humedecidos con agua destilada.

Se evaluó la germinación considerando como semilla germinada aquella que presentará una longitud de radícula mayor a 1mm y se midió la longitud radicular utilizando papel milimétrico. El porcentaje de germinación fue determinado utilizando las siguientes formulas (Zucconi *et al.*, 1981). Porcentaje de la germinación relativo de semillas (GRS):

$$GRS (\%) = \frac{\textit{Promedio de semilla germinadas en extracto de compost}}{\textit{Promedio de semillas germinadas control}} * 100$$

Crecimiento relativo de la radícula (CRR):

$$CRR(\%) = \frac{\textit{Longitud promedio de la radícula con extracto de compost}}{\textit{Longitud promedio de la radícula control}} * 100$$

Índice de Germinación

$$IG = \frac{GRS * CRR}{100}$$

7.2. Aislamiento, caracterización e identificación bacteriana

7.2.1. Aislamiento bacteriano

Se tomaron 5 g de la composta en fase termófila y se colocaron en 45 ml de caldo nutritivo estéril el cual se incubó por 24 horas a 50°C para realizar la activación de los microorganismos. Posteriormente se realizó la siembra de 1 ml del consorcio microbiano en placas de agar nutritivo mediante la técnica de vaciado en placa, este se llevó a incubar por 48 horas a 50°C. De las diferentes morfologías observadas se realizó una resiembra utilizando la técnica de estriado en placa de agar nutritivo para poder hacer la caracterización morfológica de las colonias y en placa de agar carboximetilcelulosa (CMC) para aislar las bacterias con capacidad celulolítica, estas placas se incubaron por 48 horas a 50°C (Lynd *et al.*, 2002).

7.2.2. Caracterización morfológica macroscópica, microscópica.

La caracterización morfológica macroscópica de los cultivos se hizo con base en lo descrito en el Manual Bergey's (Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria), que proporciona descripciones actualizadas los taxones procarióticos (Rainey, 2015). La morfología microscópica se realizó por frotis y la observación se realizó con un microscopio óptico Nikon Eclipse E200, de forma complementaria se realizó la identificación celular por tinción de Gram (Madigan *et al.*, 2004).

7.2.3. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se realizaron en el laboratorio de Bacteriología del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados en Salud Animal, donde las cepas aisladas y jóvenes, es decir con menos de 72 horas de crecimiento. Se sembraron en agar sangre, Mack Conkey y TSA y se incubó por 24 horas a 37°C para asegurar la pureza de las cepas. Una vez crecidas las cepas se realizaron las pruebas bioquímicas: triple azúcar hierro, citrato, urea, motilidad-indol-ornitina (MIO), reducción de sulfatos-indol-movilidad (SIM), reducción de nitratos, sacarosa, glucosa, manitol, lactosa, licuación de la gelatina, hemólisis de eritrocito bovino y crecimiento en NaCl 7.5%, los resultados fueron consultados en el libro de Diagnostico Microbiológico de Elmer W. Koneman (Koneman, 1997).

7.2.4. Identificación molecular

La identificación molecular se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología y Microbiología Ambiental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma.

Se realizó una resiembra en medio CMC con 0.1% de carboximetilcelulosa de las cepas que presentaron actividad celulolítica y se incubaron por 24 horas a 50°C, transcurrido el tiempo se tomó una colonia por técnica de asada y se inóculo en 10 ml caldo CMC al 0.1% de carboximetilcelulosa, se incubó a 50 °C por 24 horas. Pasado el tiempo de cultivo se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} a la 10^{-4}) y se tomó 1 ml de la dilución 10^{-4} y se sembró en agar CMC con 0.1% de carboximetilcelulosa por extensión de varilla, se incubó a 50°C por 24 horas y se confirmó el aislamiento por tinción de Gram. Se realizó un cultivo de las cepas aisladas confirmadas en 15 ml de caldo CMC con 0.1% de carboximetilcelulosa, se incubó a 50°C por 48 horas

7.2.4.1. Extracción de ADN

Se realizó extracción de ADN bacteriano utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification kit A1120, siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo I). La obtención de ADN de alto peso

molecular (2000 pb) se observó por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, tenido en solución de Bromuro de Etidio (5 µg/mL) y usando como marcador de peso molecular de 100 a 3000 pb (Anexo II).

7.2.4.2. Amplificación y purificación del gen ARN r 16S

Para la amplificación y purificación del gen ARNr 16S, se realizó una dilución 10^{-1} del ADN genómico obtenido y se llevó a cabo la amplificación por PCR del gen (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012) utilizando los *primers* 24F y 1492 R (Anexo 3). El producto de la amplificación se observó por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% teñido en solución de Bromuro de Etidio (5 µg/mL) y con el marcador de tamaño molecular de 100 a 3000 pb (Anexo 2).

Las amplificaciones se confirmaron por electroforesis, después se realizó una purificación utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (Promega; Ref: A9281), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 4) y se cuantificaron en gel de agarosa al 1% (Anexo 2).

Una vez amplificado y purificado los genes 16S rRNA, se enviaron a secuenciar las muestras la empresa coreana MACROGEN Inc. La empresa realizó una secuenciación tipo Sanger en ambos sentidos de la cadena.

7.2.4.3. Análisis de las secuencias

Una vez que se obtuvieron las secuencias se trabajó en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, con la finalidad de obtener las secuencias consenso las cuales fueron comparadas utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI, GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012).

7.3. Determinación de la actividad celulolítica cinética

7.3.1. Identificación de la actividad celulolítica

De las placas de CMC con crecimiento se realizó una resiembra por punción en agar CMC, la cuales se incubaron por 24 horas a 50°C y se le adicionó Rojo Congo al 1%(p/v). Se dejó actuar el colorante por quince minutos, se retiró el exceso y se adiciono una solución de NaCl 0.1 M por 15 min, transcurrido el tiempo se retiró el exceso de solución y se dejó reposar por 24 horas en refrigeración (4°C) para realizar la observación de halos de hidrólisis formados en los cultivos (Rodríguez y Llenque, 2016).

7.3.2. Evaluación de la cinética bacteriana

Los cultivos que presentaron halos de hidrólisis de celulosa se sembraron por asada en botellas serológicas con 50 ml caldo CMC al 0.1% de carboximetilcelulosa, a 50°C por 48 horas, con la finalidad de obtener cepas activadas. Para la realización de las cinéticas se utilizaron como unidad experimental botellas serológicas con un volumen nominal de 120 ml, las cuales fueron adicionadas con 60 ml de caldo CMC al 0.1% e inoculadas con 10 ml de la cepa previamente activada en caldo CMC para obtener un volumen de operación de 70 ml. Las unidades experimentales fueron incubadas a 50°C y se evaluaron a las 3, 6, 9, 15, 20, 30, 40, 45 y 48 horas de cultivo. El crecimiento celular se midió de manera indirecta por espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm, utilizando como blanco el medio de cultivo sin inocular.

Se construyó la curva de crecimiento microbiano y se realizó la regresión lineal de la fase exponencial para obtener el valor de la pendiente de la ecuación de al recto (μ) y se determinó el tiempo de duplicación.

8. Métodos analíticos

8.1. Determinación de alcalinidad por volumetría

La alcalinidad de una muestra en solución se debe a la presencia de los iones hidróxido (OH^-), carbonato (CO_3^{2-}) y bicarbonato (HCO_3^-) y su capacidad para neutralizar ácidos. La medida de la alcalinidad se efectúa con una solución valorada de un ácido estándar en presencia de dos indicadores (fenolftaleína y naranja de metilo) (APHA, 1992).

Para determinada la alcalinidad, se utilizó una solución de H_2SO_4 valorada a 0.0199 N. Se usaron 10 mL de la muestra se le agregaron 3 gotas de fenolftaleína y 3 gotas de naranja de metilo, y se tituló con la solución de H_2SO_4 hasta obtener un vire del indicador a color amarillo. Se calculó la cantidad de utilizado para establecer la alcalinidad de las muestras siguiendo la norma MX-AA-036-SCFI-2001 (ver anexo 7).

8.2. Determinación de acidez por volumetría

La acidez de una muestra, nos indica su capacidad amortiguadora para resistir un cambio de pH cuando reacciona con una base fuerte, se determina mediante titulación con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) y se expresa en términos de carbonato de calcio (CaCO_3). La acidez de una muestra está asociada a la presencia de ácidos orgánicos débiles, ácidos minerales fuertes (ácido sulfúrico y clorhídrico) y sales metálicas (hierro, aluminio y manganeso) (APHA, 1992).

La determinación de acidez, se realizó una titulación con NaOH a un pH de 8.3, para ello se tomaron 10 mL de muestra, se le agregaron 3 gotas de fenolftaleína y se tituló hasta obtener un cambio en la coloración de la muestra (de amarillo a canela). La acidez se calculó siguiendo la fórmula descrita en la metodología en la norma NMX-AA-036-SCFI-2001 (ver Anexo 7).

8.3. Determinación de la dureza por volumetría

El método está basado en la formación de complejos entre los iones de calcio y magnesio con la sal de sódica del ácido etilendiaminotetraacético. El método consiste en una valoración empleando un indicador visual de punto final, el negro de ferrocromo T, que es de color rojo en la presencia de calcio y magnesio y vira a azul cuando estos no están en el medio o se han acomplejados (APHA, 1992; NMX-AA-072-SCFI-1981).

Para realizar la determinación, se tomaron 10 mL de muestra, se le agregaron 0.2 ml de solución amortiguadora (NH_4OH), se le agregó una pizca eriocromo negro T (indicador) y se tituló con EDTA hasta obtener una coloración azul. La dureza se calculó considerando el gasto de las soluciones en la titulación de acuerdo con la NMX-AA-072-SCFI-1981 (ver anexo 7).

8.4. Análisis de compuestos nitrogenados.

El análisis de nitrato (NO_3^-) se realizó utilizando un Kit HACH Nitrate 8039, el principio de este análisis consiste en la reducción del nitrato de la muestra a nitrito por acción del cadmio metálico. El ion nitrito reacciona con el ácido sulfanílico presente en el medio para formar una sal de diazonio. La sal se acopla con ácido gentsílico para formar una solución de color ámbar, que se detecta por espectrofotometría UV-Vis a 500 nm (Thermo Scientific, GENESYS 10 S).

La determinación de nitrito (NO_2^-), fue realizada mediante el Nitrite 8507, donde el nitrito de la muestra reacciona con el ácido sulfanílico para formar una sal de diazonio intermedia. Este se acopla con ácido cromotrópico para producir un complejo de color rosa directamente proporcional a la cantidad de nitrito presente. La determinación de la concentración se realiza por espectrofotometría UV-Vis a 507nm (Thermo Scientific, GENESYS 10 S).

La cuantificación del ion amonio (NH_4^+) se llevó a cabo mediante un electrodo selectivo de amonio (Phoenix Electrode Company, USA) que utiliza una membrana hidrófoba permeable al gas amoniaco (NH_3). Para provocar el cambio de especiación de NH_4^+ a NH_3 , es necesario someter a la muestra a un proceso de alcalinización con NaOH 10 N y realizar una medición directa con el electrodo.

8.5. Determinación de fosfatos

La medición de fosfato se realizó utilizando el método de ácido ascórbico mediante el kit HACH 8048, cuyo principio se basa en la reacción del ortofosfato con el molibdato en un medio ácido para producir un complejo mixto de fosfato/molibdato. El ácido ascórbico reduce el complejo, originando un intenso color azul de molibdeno. La determinación de la concentración se realiza por espectrofotometría UV-Vis a 880 nm (Thermo Scientific, GENESYS 10 S).

8.6. Demanda química de oxígeno soluble (DQOs)

La prueba de demanda química de oxígeno (DQO) de dicromato mide el equivalente de oxígeno de la cantidad de materia orgánica oxidable por dicromato de potasio en una solución de ácido sulfúrico al 50 % (Rueda y Casayán, 2015). Así la concentración de materia orgánica soluble o en la fase acuosa del sistema se determinó por el método de reflujo cerrado utilizando viales con reactivo para DQO de la marca HACH® método 8000. La concentración fue determinada por espectrofotometría utilizando el equipo HACH-UV-vis Dr 6000 a una longitud de onda de 600 nm para concentraciones de 150 a 1 000 mg/L siguiendo la metodología establecida en los métodos estándar (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [APHA], 1998).

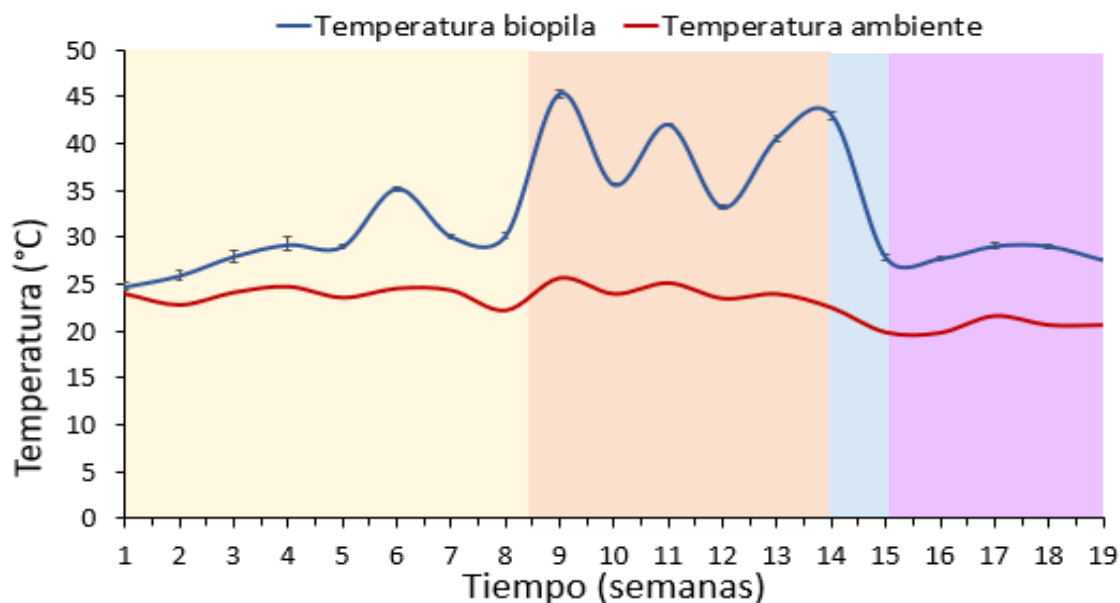
9. Resultados y discusión

9.1. Implementación del sistema de composteo

9.1.1. Monitoreo de la biopila de composteo

El monitoreo de la biopila se realizó durante 19 semanas, en la gráfica 1 se observa el perfil de temperatura ambiental (línea roja) y la temperatura del sistema (línea azul) a lo largo de todo el proceso. En esta gráfica podemos observar que la temperatura ambiente (obtenida del sistema nacional de monitoreo ambiental) durante todo el proceso de compostaje se mantuvo sin grandes variaciones, siendo la temperatura mínima de 19.8°C y la máxima de 25°C y un valor promedio de 23°C ± 1.8. En la biopila, la fase mesófila tuvo una duración de 8 semanas y media con una temperatura promedio de 29 °C ± 0.42, cinco grados por arriba de la temperatura ambiente promedio; mientras que la fase termófila duró poco más de seis semanas con una temperatura promedio de 43°C ± 0.25 y 19°C por arriba de la temperatura ambiente, la fase de enfriamiento se presentó entre la semana catorce y quince con un descenso en la temperatura de 43°C ± 0.4 a 27.9°C ± 0.3 y la fase de

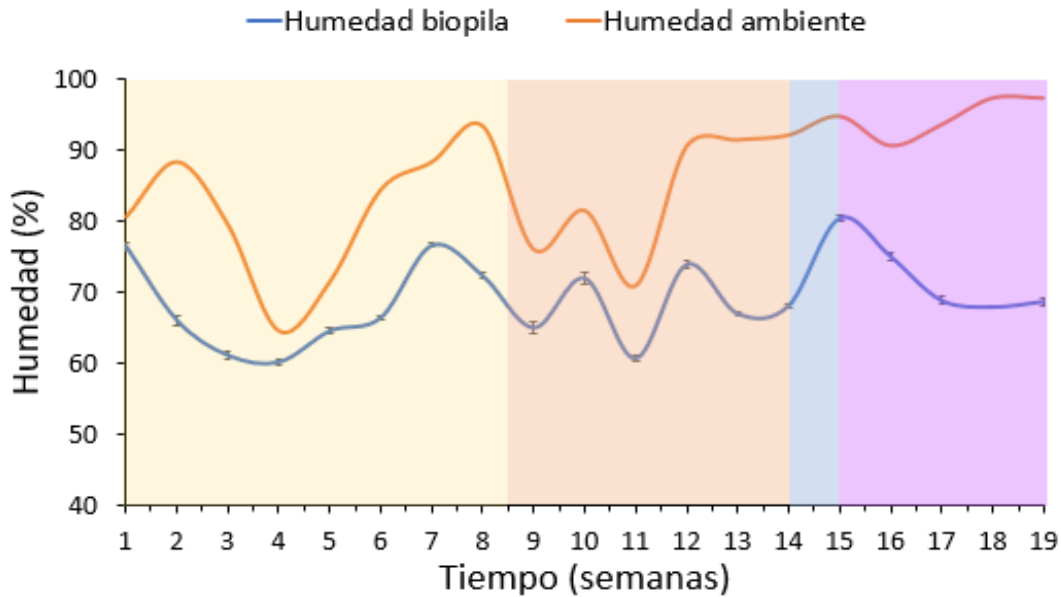
maduración tuvo una duración de cuatro semanas con una temperatura promedio de $28^{\circ}\text{C} \pm 0.21$.



Gráfica 1. Perfil de Temperatura de la biopila.

Mesofilia, Termofilia, Enfriamiento, Maduración.

En la Gráfica 2, se muestra el porcentaje de humedad ambiental (línea azul) y el porcentaje de humedad que presentó la biopila (línea roja) a lo largo del proceso de compostaje. En la gráfica se puede observar que el porcentaje de humedad ambiental presentó variaciones a lo largo del proceso, con un valor mínimo de $64.4\% \pm 5.9$ en la semana 4 y un valor máximo de $97.4\% \pm 4.4$ de humedad en la semana 18. El porcentaje de humedad de la biopila, presentó valores entre el 60.1 ± 0.3 y $80.4\% \pm 0.5$ y el perfil está correlacionado con la humedad ambiental. Sin embargo, en la fase mesófila y termófila del proceso la humedad promedio fue de $67.9\% \pm 0.42$ y $67.8\% \pm 0.51$ respectivamente, aunque se puede observar que en las semanas 7, 10 y 12 la humedad fue superior al 70%. En la fase de enfriamiento el porcentaje de humedad promedio fue de $80\% \pm 0.5$ y en la fase de maduración la humedad se mantuvo en un promedio de $72.2\% \pm 0.46$.



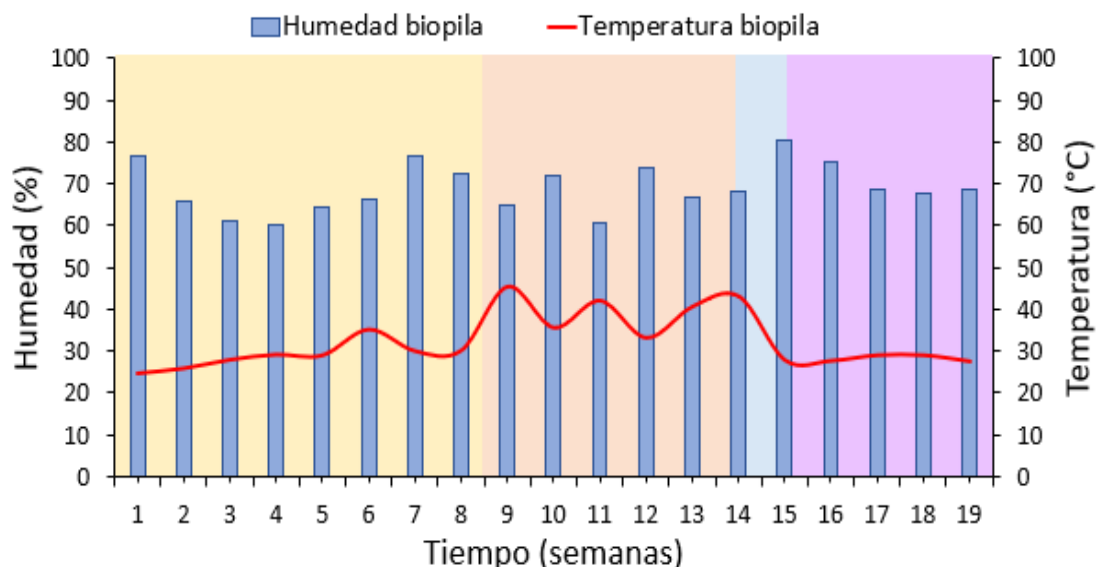
Grafica 2. Perfil de Humedad de la biopila.

Mesofilia, Termofilia, Enfriamiento, Maduración.

En la gráfica 3, se muestra la relación entre el perfil de temperatura y de humedad de la biopila, y se puede observar que la temperatura desciende cuando el porcentaje de humedad es mayor al 70% (Semanas 7, 8, 10, 12 y 15).

De acuerdo con Márquez *et al.* (2008), la temperatura y humedad son los principales factores que afectan el proceso de compostaje y se encuentran relacionados entre sí, ya que el agua desempeña un papel fundamental en la fisiología de las células microbiana, ya que actúa como medio de transporte de las sustancias solubles y productos de desecho. En este sentido, Madejón *et al.*, (2002), reporta que la humedad presente en los materiales a compostar es una variable crítica para la optimización del proceso, porque pequeñas variaciones en el medio provocan cambios en la temperatura. Así el porcentaje de humedad óptimo reportado para sistemas de compostaje se encuentra entre el 50 al 70%; valores inferiores al 50% se han asociado con baja actividad microbiana, mientras que valores superiores al 70% provoca saturación de los intersticios presentes

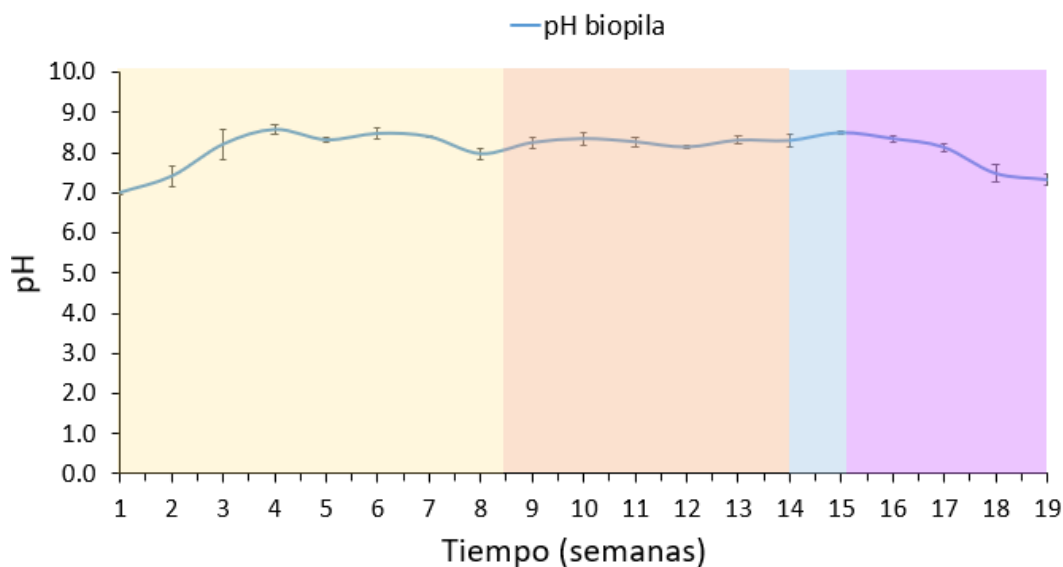
en la composta, reducción del oxígeno, condiciones de anaerobiosis y disminución en la temperatura (Márquez *et al.*, 2008).



Grafica 3. Relación entre temperatura y humedad de la biopila

Mesofilia, Termofilia, Enfriamiento, Maduración.

El pH fue otro de los parámetros evaluados durante el monitoreo debido a que es un indicador de la actividad microbiana durante el proceso (Turan, 2008). En la Grafica 4 se presenta el perfil del comportamiento del pH a lo largo de la operación de biopila. Podemos observar que durante todo el proceso presentó valores de pH neutro y alcalinos ($7.1 - 8.6 \pm 0.13$). El rango de pH observado coincide con lo informado por Jiménez (2015), quien reportó rangos de pH de entre 6.50 y 8.85 a lo largo del proceso de compostaje de residuos sólidos orgánicos de mercado, residuos de poda de árboles y residuos de poda de palma ornamental (*Phoenix canariensis*) en pilas abiertas con volteo manual. Por otra parte, Tixie y Ruiz (2018), reportan un rango de pH entre 6.8 y 9.3 en una pila alimentada con 100% con residuos orgánicos municipales. No obstante, existe controversia entre los resultados debido a que la literatura también establece que en la fase mesófila del compostaje el pH tiende encontrarse en valores de pH ácidos (4.5- 5.5) por la hidrólisis de los compuestos orgánicos (Córdoba, 2006). Sin embargo, Hachicha *et al.* (2009), atribuye los valores de pH alcalino a la descomposición de compuestos con nitrógeno como las proteínas presentes en el material orgánico.



Grafica 4. Perfil de pH de la biopila.

Mesofilia, Termofilia, Enfriamiento, Maduración.

9.1.2. Caracterización fisicoquímica de la composta en fase mesófila y termófila.

En este apartado se presenta una tabla comparativa de las características fisicoquímicas de la composta durante la fase mesófila y termófila (Tabla 11).

Tabla 11. Caracterización fisicoquímica de la composta

Parámetro	Unidades	Fase mesófila	Fase termófila
Acidez	CaCO ₃ mg/L	19.8 ± 0	9.9 ± 0
Alcalinidad	CaCO ₃ mg/L	67.7 ± 0	84.6 ± 7
Dureza	CaCO ₃ mg/L	70 ± 7.1	145.1 ± 7.1
Fosfato	mg/L	3 ± 0.01	3.6 ± 0.5
Amonio	mg/L	0.545 ± 0.02	0.26 ± 0.03
Nitrito	mg/L	0.0415 ± 0.04	0.37 ± 0.03
Nitrato	mg/L	2 ± 0.14	12.95 ± 0.07
DQOs	mg/L	2450 ± 7.1	1830 ± 14.1

En la tabla 11, podemos observar que los valores de acidez fueron menores en la fase termófila, mientras que su alcalinidad fue superior. Estos resultados coinciden con el perfil de pH durante el monitoreo de la biopila, en el cual la acidez disminuye y la alcalinidad aumenta conforme avanza el

proceso como consecuencia de la degradación de compuestos orgánicos y nitrogenados presentes en el material orgánico (Tixie y Ruiz, 2018).

Con respecto a la dureza, se observó un incremento de la fase mesófila a la termófila, de poco más del doble en la concentración. Este aumento pudo estar asociado con la presencia de sales de magnesio y calcio que se atribuyen a la degradación de la materia orgánica rica en clorofila (vegetales verdes y hortalizas) y las cáscaras de huevo presentes en los residuos (Spaccini y Piccolo., 2008). En el caso del fosfato no se observó un cambio en la concentración de la fase mesófila a la termófila .

Con respecto a los compuestos nitrogenados, se puede observar que, en la fase mesófila, la concentración de amonio fue del doble que en la fase termófila (0.26 ± 0.03 mg/L). Esto se ha relacionado con la actividad proteolítica que dan lugar a la liberación de amonio y proteínas solubles en las etapas iniciales del compostaje (Guardia *et al.*, 2010). Mientras que, en términos de la concentración de nitrito y nitrato, observamos un incremento en la fase de termófila. Estos resultados han sido asociados con la actividad metabólica nitrificante que da lugar a la oxidación del amonio a nitrato (Guardia *et al.*, 2010). Por otro lado, Soto *et al.* (2014), reporta que la composta se puede considerar madura si tiene una relación $N-NH_4^+ / N-NO_3^+$ no superior a 0.16, considerando los valores de amonio y nitrato obtenidos, la composta en este trabajo tiene una relación de 0.02 al finalizar la fase termófila.

Finalmente, en términos de la DQOs podemos observar una disminución del 18.5% en su concentración al término de la fase termófila. Este decremento nos indica la estabilización de la materia orgánica durante el proceso de compostaje (Mohedo, 2002). Si bien no fue posible determinar el carbono orgánico total, la determinación de la DQO soluble de la composta proporciona un control rápido para determinar el grado de estabilización, ya que, de acuerdo con Soto *et al.* (2014), una composta puede considerarse estable si la DQO de su extracto acuoso es inferior a 700 mg/L.

9.1.3. Evaluación de la calidad de composta en fase de maduración

Al final del proceso se obtuvo $2.741 \text{ kg} \pm 0.008$ de composta estable por lo tanto el rendimiento fue de $69\% \pm 0.09$. La calidad de la composta se determinó en la fase de maduración en función del pH, conductividad, temperatura y fitotoxicidad. Los resultados fueron contratados con lo establecido en la norma mexicana NMX-AA-180-SCFI-2018, que indica los rangos que debe cumplir un compost terminado para establecer su calidad, siendo la composta tipo I, la de mayor calidad y el tipo 3 la de menor calidad (Ver Tabla 14)

Tabla 14. Especificaciones por tipo de composta

Parámetro	Tipo de composta			
	I	II	III	Este trabajo
pH		6.7 – 8.5		7.095
Conductividad eléctrica (dS/m)	0.5 - ≤ 4	4 - ≤ 8	8 - ≤ 12	1.3
Temperatura medida a una profundidad ≥ 50 cm		25°C – 35°C	36°C-50°C	28°C
Fitotoxicidad (Índice de Germinación, IG)	IG ≥ 90 %	IG ≥ 85 a 90 %	IG ≥ 80 a 85 %	95%,

Nota: Cálculos de índice de germinación en anexo 10

De acuerdo con los parámetros fisicoquímicos evaluados, la composta obtenida sería de tipo I, sin embargo, es importante señalar que la normatividad considera otros parámetros los cuales no fueron medidos en este trabajo como: porcentaje de materia orgánica, relación C/N, micronutrientes y granulometría (ver anexos 5, tabla 3).

La calidad microbiológica de la composta se evaluó en función de la presencia de *Coliformes fecales* y *Escherichia Coli*. Los resultados se presentan en la Tabla 14 y se contrastan con lo establecido en la norma NMX-AA-180-SCFI-2018, que establece los valores máximos permisibles de patógenos para garantizar la seguridad de un compost.

Tabla 14. Especificaciones microbiológicas

Microorganismos	Valores máximos permisible NMX-AA-180-2018	Valores obtenidos en este trabajo
Coliformes fecales	<1000 NMP/g	604 NMP/g
<i>Escherichia coli</i>	<1000 NMP/g	604.5 NMP/g

Los valores obtenidos en este trabajo estuvieron por debajo de los establecido en la norma, lo que nos indican que la composta es higiénica y óptima para su uso y que paso por el proceso oxidativo

y la fase de estabilización (debido a que se llevaron a cabo dentro de los límites de los factores clave para la producción de composta), por lo tanto, esta se encuentra prácticamente exenta de microorganismos patógenos (Barrón, 2013).

Otro factor a considerar es el origen de los residuos (fracción orgánica de residuos sólidos urbanos), que al ser de carácter domiciliario, la carga microbiana patógena es menor, en comparación con otras biomásas (como los lodos depurados del tratamiento de aguas residuales), por lo tanto, es más fácil eliminarlos con las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso (Bustamante *et al.*, 2008)

Otro de los parámetros que regula la norma mexicana es la presencia de metales pesados, ya que pueden resultar tóxicos para las plantas (Méndez *et al.*, 2009). El nivel de peligrosidad de estos metales va ligado a su toxicidad y persistencia. Los metales pesados que considera la normatividad son el Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn. En la Tabla 15, se muestra una comparación de la concentración de metales pesados que presentó la composta en mg/kg masa seca y los rangos establecidos por la norma.

Los resultados indican que la composta en función de la concentración de los metales, salvo la concentración de As, se puede considerar de tipo I. La elevada concentración de As en la composta obtenido pudo estar asociado a la tierra utilizada en la biopila, ya que el As puede tener origen natural (como erosión de rocas y minerales que contengan As) o antropogénico (actividades de minería y fundición, uso de conservantes de la madera y aditivos alimenticios para ganado...etc.) (Garelick *et al.*, 2008). A su vez, algunos fertilizantes pueden suponer un aporte de arsénico al suelo (He *et al.*, 2005), al igual que los residuos urbanos que derivan en la obtención de lodos de depuradora y composta, que son usados ocasionalmente como enmiendas orgánicas de suelos.

Tabla 15 Concentraciones máximas de metales pesados según el tipo de composta

Metales pesados (mg/kg masa seca)	Composta obtenida	NMX-AA-180-SCFI-2018		
		Tipo1	Tipo2	Tipo3
As	1.7	0.1	0.7	2
Cd	0.6	0.7	1	2
Cr	10	70	70	250
Cu	31.8	70	150	300
Ni	12.8	21	60	90
Pb	22.8	45	120	150
Zn	109.6	200	500	500

También la presencia de algunos metales podría estar relacionada a la mezcla de la fracción orgánica de residuos urbanos con residuos inorgánicos o de manejo especial como: las pilas usadas (presencia de Cd, Ni y Cr), recipientes metálicos, pinturas, tintes, marcaje de cartones, o aditivos de polimerización usados en los plásticos (Mohedo, 2002). En general podríamos decir que la mayoría de estos metales proceden de la actividad industrial ya sea directa, o indirectamente.

9.2. Aislamiento e identificación bacteriana

9.2.1. Caracterización de morfología macroscópica y microscópica

Del muestreo realizado durante la fase termófila del proceso se obtuvieron dos morfologías coloniales distintas, las cuales fueron resembradas por estría cruzada a 50 °C, con la finalidad de verificar su característica termoestable y su morfología. Las cepas termoestables presentaron una morfología colonia puntiforme con borde completos, elevados suaves, brillantes y de consistencia dura (P11) y la cepa (I12) presentó morfología colonial irregular con bordes convexos, filamentosos, suaves, brillantes y de consistencia dura (Fig. 9).

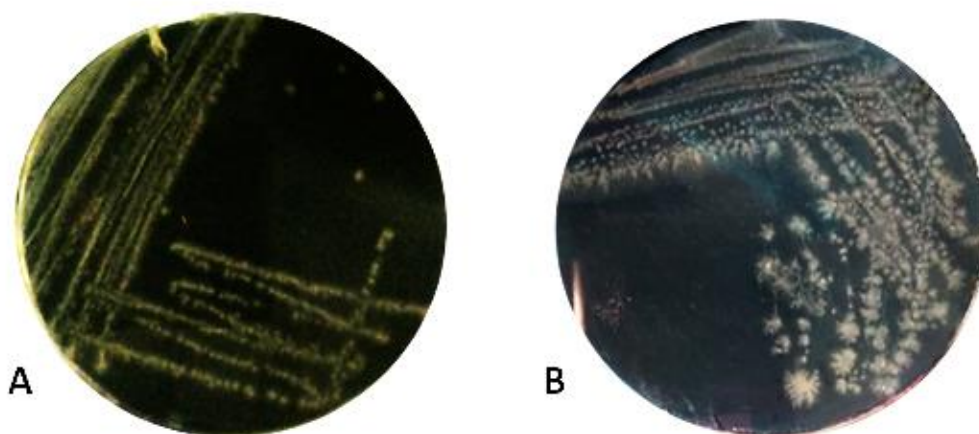


Figura 9. (A) Cepa P11, (B) Cepa I12

A partir de las colonias crecidas de las cepas I12 y P11 en placas de agar CMC al 0.1%, se realizaron frotis, los cuales fueron analizados con tinción Gram y observados por microscopía óptica bajo objetivo de 100X (ECLIPSE E200, Nikon); ambas cepas presentaron formas bacilares con tinción Gram positivas (Figura 10), los resultados coinciden con lo reportado por diversos autores como: Rodríguez y Llenque (2016), quienes reportaron que a partir de composta de residuos frescos en fase mesófila, aislaron tres bacteria celulolíticas, una con morfología colonial irregular, pequeña, seca, plana y opaca y 2 con morfología irregular, pequeña, cremosa y plana, además las 3 colonias presentaron morfología microscópica bacilar Gram positiva; Jaramillo *et al.* (2003), reportaron el

aislamiento de nueve cepas bacterianas con morfología bacilar Gram positivas y con capacidad celulolítica cuando se tomaron muestras de la fase termófila de composta de residuos orgánicos del sector urbano y rural; y Bohórquez y Pérez (2007), que a partir del compostaje de materia orgánica en fase mesófila, encontraron seis cepas bacterianas bacilares Gram positivas con capacidades celulolíticas.

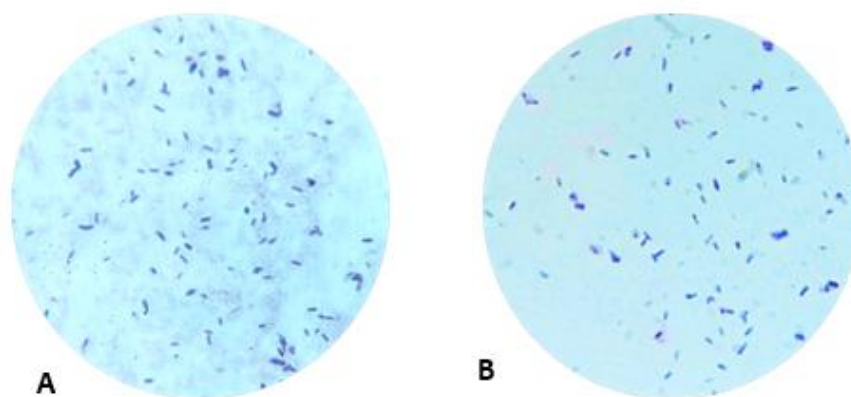


Figura 10. (A) Ceba P11, (B) Ceba I12

9.2.2. Caracterización bioquímica

Con la finalidad de establecer más características metabólicas de las cepas aisladas se realizaron las pruebas bioquímicas, los resultados se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12. Pruebas bioquímicas

Prueba Bioquímica	Ceba I12	Ceba P11
*Glucosa, sacarosa y lactosa	+	+
*Producción de gas	+	+
*Producción de ácido sulfhídrico	-	-
**Movilidad	+	+
**Indol	-	-
**Ornitina	-	-
***Reducción de sulfato	-	-
***Indol	-	-
***Movilidad	+	+
Urea	-	-
Citrato	-	-
Caldo nitroso (reducción de nitrato)	+	+
Glucosa	+	+
Manitol	+	+
Sacarosa	+	+
Lactosa	-	-

Crecimiento en NaCl 7.5%	+	+
Licuefacción de gelatina	+	+
Hemolisis de eritrocitos bovinos	Hemólisis alfa	Hemólisis alfa

*Prueba TSI, ** Prueba MIO, ***Prueba SIM
Nota: Evidencia fotográfica en anexo 8

El perfil bioquímico de ambas cepas (I12 y P11), indicó su capacidad para asimilar la glucosa, sacarosa y manitol como fuente de carbono, la producción de gas y reducción de nitratos. También mostraron movilidad y crecimiento en solución de NaCl al 7.5%(p/v), así como la capacidad proteolítica sobre la gelatina y hemólisis alfa en eritrocitos bovinos. Con base en el perfil bioquímico y la morfología macro y microscópica, ambas cepas fueron identificadas como del género *Bacillus*, teniendo como referencia los cuadros de identificación y clasificación de género y especie propuesta en el Manual de Bergey's (Vos, *et al.*, 2011), y de Diagnóstico Microbiológico (Bergey, 2009; Koneman, 1997; Mac Faddin, 2003). Sin embargo, para tener una mayor especificidad en la identificación de ambas cepas se realizó un análisis molecular.

9.2.3. Caracterización molecular

La identificación a nivel de género o especie de los aislados obtenidos (Fig. 12 A) se realizó mediante la amplificación por PCR la región del gen 16s del rDNA (Fig. 12 B). Para ambas cepas bacterianas se logró amplificar un producto PCR de entre 1400 y 1500 pares de bases, los cuales fueron purificados (Fig. 12 C) y enviados a secuenciar en ambos sentidos a la empresa MACROGEN Inc. en Corea.

Las secuencias genéticas de cada cepa (Fig. 13) fueron comparadas en la base de datos GenBank. El análisis de las secuencias arrojó que una similitud del 97.80 % con *Bacillus sp* para la cepa P11, mientras que para la cepa I12 se obtuvo una similitud del 100 % con *Bacillus licheniformis* (Fig. 14).

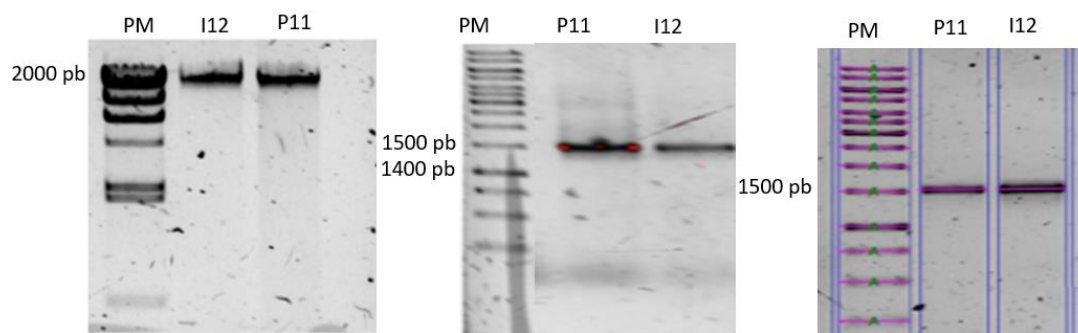
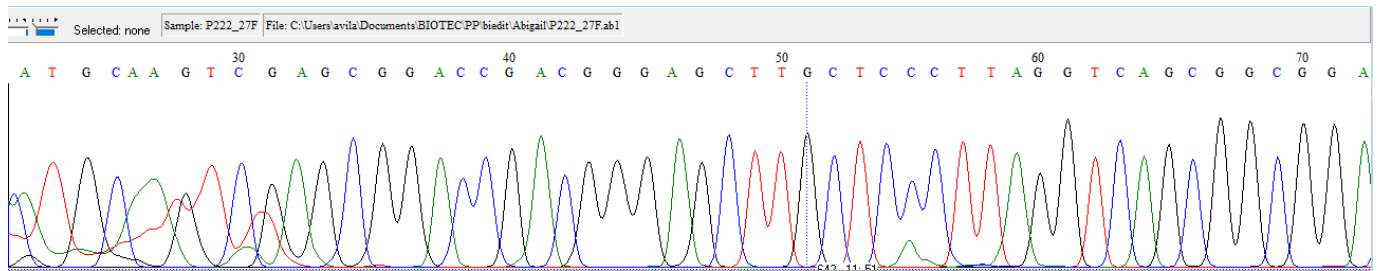


Figura 12. Gel de electroforesis: (A) extracción de ADN bacteriano, (B) amplificación gen ARNr 16s, (C) purificación de amplificación

Cepa P11



I12

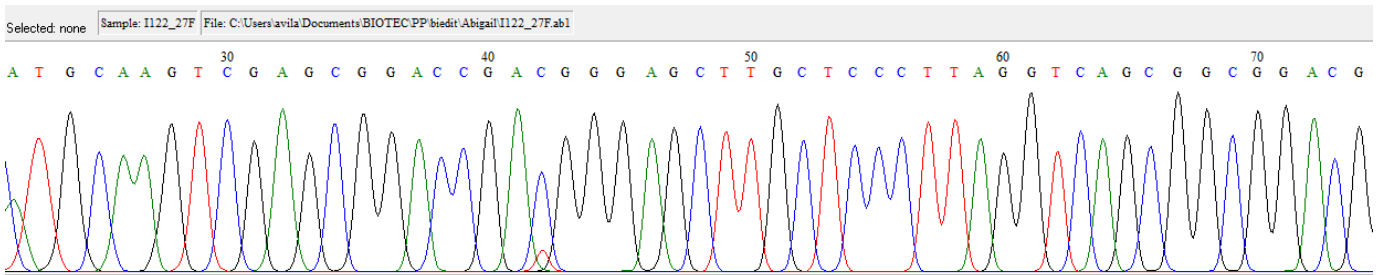


Figura 13. Electroferograma de la secuenciación del gel ARNr 16S.

Cepa P11

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus sp. D-I-3_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus sp. D-I-3	2351	2351	100%	0.0	97.80%	1449	KF663059.1

Cepa I12

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus licheniformis strain MPE22_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus licheniformis	2590	2590	100%	0.0	100.00%	1426	MT487672.1

Figura 14. Comparación de las secuencias obtenidas en la base de datos GenBank

Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Bhattacharya (2014), quien indica que, dentro del consorcio microbiano presente en la fase termófila del proceso de compostaje, está en mayor proporción las bacterias del género *Bacillus* (*B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*). Su presencia ha sido asociada a la producción de celulasas termoestables (30-80 °C) (Acharya y Chaudhary, 2012), su capacidad metabólica en un amplio rango de pH (4-9) y su tolerancia altos porcentajes de salinidad (2.5-15%) (Li, 2012). El género *Bacillus* tiene un papel de suma importancia en la degradación de compuestos complejos como la celulosa (Bhattacharya, 2014). Fracchia *et al.* (2006), consideran que los microorganismos del género *Bacillus* tiene un amplio uso a nivel industrial debido a su facilidad de cultivo, capacidad celulolítica y secreción de proteínas de forma

extracelular, además no son considerados patógenos dándoles un nivel de seguridad para la salud. Debido a estas características diversas especies de este género han sido aisladas de diferentes de residuos de biomasa lignocelulósica en proceso de degradación (Ventorino *et al.*, 2015), residuos de la industria del papel (Rawat, 2012), y sistemas de compostaje de residuos de cocina, jardín y desechos sólidos municipales (Ryckeboer *et al.*, 2003).

Específicamente para el caso de *Bacillus licheniformis*, Sivakumar *et al.*, (2016) reportaron el aislamiento en agar CMC al 1% de 11 bacterias, a partir de 25 muestras de composta en fase termófila, con un diámetro de halo de hidrólisis de celulosa mayor o igual a 10 mm de los cuales 8 fueron identificados como *Bacillus licheniformis* mediante la secuenciación de ARNr 16S. Mientras que *Bacillus* sp ha sido aislado de composta de residuo orgánico (Rodríguez y Llenque, 2016) y de residuo de cultivo de crisantemo (Bohórquez y Pérez, 2007), pero en fase mesófila, por lo que es interesante haberlo aislado en fase termofílica en este trabajo.

En general el género *Bacillus* y especies como *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, entre otras han sido reconocidas como microorganismos con potencial biotecnológico (Aulitto *et al.*, 2017). Ya que estas bacterias biosintetizar enzimas celulolíticas que les confiere la capacidad de descomponer la biomasa celulósica de residuos orgánicos en azúcares fermentables para la producción de biocombustibles y productos químicos a partir de recursos renovables (Juturu y Wu, 2014).

9.3. Determinación de la actividad celulolítica cinética

9.3.1. Identificación de la actividad celulolítica

Una vez identificadas las cepas bacterianas se procedió a realizar la prueba de confirmación de actividad celulolítica, con la cual se evalúa cualitativamente la hidrólisis de celulosa a través del revelado de zonas de aclaramiento utilizando Rojo Congo al 1% (p/v). Se obtuvieron halos de hidrólisis con un diámetro de $12 \text{ mm} \pm 1.4$ y $21.5 \text{ mm} \pm 0.7$ para la cepa *Bacillus* sp P11 y *Bacillus licheniformis* I12 respectivamente (Figura 11). Los diámetros de hidrólisis obtenidos en este estudio coinciden con el trabajo de Rodríguez y Llenque (2016), quienes reportaron diámetros de 12, 15 y 17 mm para cepas celulolíticas. Mientras que Jaramillo *et al.* (2003), reportaron que de nueve cepas aisladas solo tres presentaron actividad celulolítica con diámetros de hidrólisis de 25mm y 0.5mm. Por otro lado, Bohórquez y Pérez (2007); reportaron diámetros de halos de hidrólisis de 0.2 hasta 0.35 mm. Mientras que Siu-Rodas *et al.* (2017). reportaron halos de hidrólisis con diámetros de 15, 18 y 20 mm para cepas celulolíticas aisladas a partir de la fase termófila de composta de residuos de café.

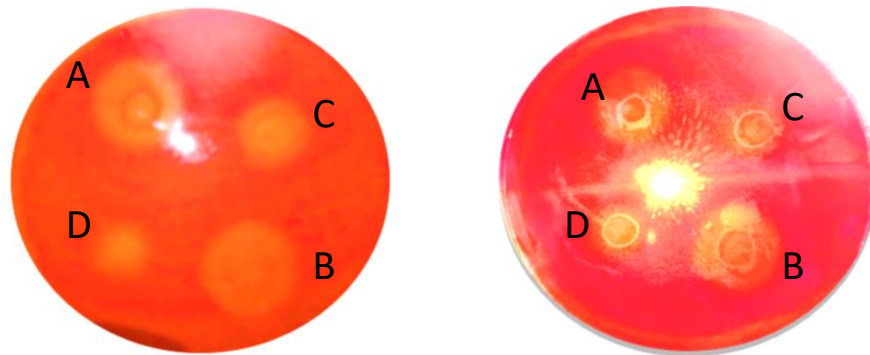
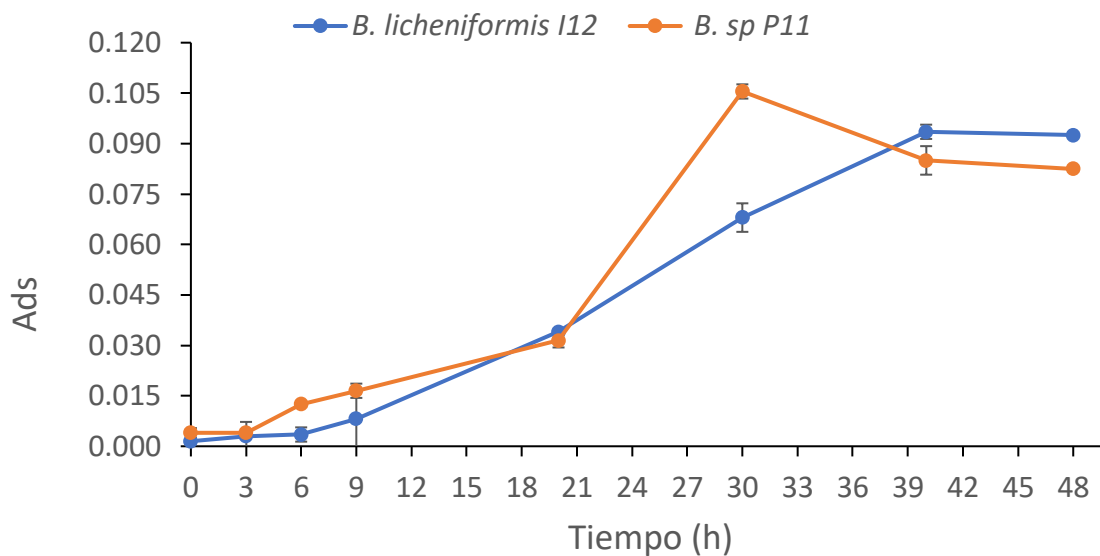


Figura 11. Halos de hidrolisis A y B: Cepa P11, C y D: Cepa I12

9.3.2. Evaluación de la cinética bacteriana

Se realizó la cinética de crecimiento *in vitro* de las dos cepas bacterianas en medio de cultivo líquido con CMC al 0.1% como única fuente de carbono. En la gráfica 4, podemos observar que el de crecimiento de la cepa *B. sp* P11 presentó una fase estacionaria de 6 horas, seguida de una fase exponencial de 29 horas (de las 6 a las 35 horas) y finalmente una fase de decaimiento de 13 horas. La curva de crecimiento de la cepa *B. Licheniformis* I12, mostró una fase lag durante las 3 primeras horas de incubación, posteriormente se presentó una fase exponencial hasta las 40 horas, para después entrar en estado estacionario. Da Silva *et al.*, (2021) reportaron para un cultivo de *B. licheniformis* una fase lag de 14 horas al utilizar CMC al 0.5% y una fase lag de 16 y 17 horas al utilizar glucosa y glucosa + caseína respectivamente, los resultados nos indicaron que a pesar de que la glucosa es una molécula con estructura más sencilla que la CMC, *B. licheniformis* tiene la capacidad metabólica para generar la maquinaria enzimática para asimilación de celulosa, y esto podría atribuirse al origen de aislamiento de la cepa. Por otra parte, Sivakumar *et al.* (2016) reportaron una fase lag de 2 horas para tres cepas de *B. Licheniformis* cultivadas en CMC al 1% p/v, sin embargo, el tiempo de duración de la fase exponencial fue diferente para cada cepa (4, 6 y 8 horas respectivamente) y con diferencia en el tiempo de actividad máxima de la celulasa de cada cepa, indicando una correlación entre el crecimiento celular y la actividad de la celulasa.



Grafica 4. Curva de crecimiento celular de la cepa *B. licheniformis* P11 y *B. sp* I12

A partir del perfil exponencial de cada cultivo se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ) mediante el análisis logarítmico, una vez determinadas se calculó el tiempo de duplicación (t_d) de cada cultivo. En este trabajo el t_d y la velocidad específica para la cepa *B. sp* P11 fue de 9.61h y con una μ de 0.0721 h^{-1} , mientras que para la cepa *B. licheniformis* I12 fue de 8.85 h y 0.0783 h^{-1} , respectivamente. En la tabla 13, se presentan los parámetros cinéticos obtenidos en este trabajo y los reportados por otros autores. Se puede observar que los tiempos de duplicación en este trabajo se encuentran entre los valores reportados, sin embargo, la comparación es cuestionable ya que las condiciones de cultivo (en referencia a la fuente de carbono) no son equiparables. No obstante, nos permite establecer que el tiempo de duplicación depende de la especie, la concentración del sustrato y de la complejidad estructural de la fuente de carbono. Por ejemplo, Da Silva *et al.* (2021) reportaron un tiempo de duplicación de 11.5 h al utilizar como fuente de carbono CMC al 0.5%, sin embargo, al utilizar un medio con Glucosa y Caseína, el tiempo de duplicación se reduce a 6.3 h. Mientras que O'Hair *et al.* (2020) reportaron un tiempo de duplicación de 0.43 horas (26 min) al utilizar glucosa al 6%.

Tabla 13. Tiempo de duplicación de *Bacillus sp* y *Bacillus licheniformis*

Referencia	Cepa	Fuente de carbono	μ (h ⁻¹)	Tiempo de duplicación (h)	R ²
Este trabajo	<i>B. sp</i> P11	CMC 0.1% p/v	0.0721	9.61	0.9953
	<i>B. licheniformis</i> I12	CMC 0.1% p/v	0.0783	8.85	0.9234
Da Silva et al., 2021	<i>B. licheniformis</i> BCLLNf-01	CMC 0.5% p/v	0.06	11.5	-
		Glucosa 1% p/v	0.11	6.3	-
		Glucosa 1% + Caseína 1% p/v	0.11	6.3	-
O' Hair et al., 2020	<i>B. licheniformis</i> YNP5-TSU	Glucosa 6% p/v	-	0.433	-

10. Conclusiones

- El proceso de compostaje en biopila cerrada y con volteo manual permitió observar 4 fases típicas del proceso en 133 días.
- De acuerdo con la normatividad mexicana se obtuvo una composta de calidad “tipo I.”
- Se aislaron dos cepas morfológicas diferentes, pero con una actividad metabólica igual de acuerdo con las pruebas bioquímicas.
- La técnica de identificación genotípica permitió establecer que las cepas aisladas fueron de *B. licheniformis* y *B. sp*.
- La actividad celulolítica y cinética del cultivo evidencian la capacidad hidrolítica de ambas cepas
- *B. sp* presentó una velocidad específica de 0.0721 h⁻¹ y td de 9.61 h, mientras que *B. licheniformis* presentó una velocidad específica de 0.0945 h⁻¹ y td de 7.33 h.
- *B. licheniformis* presentó mayor diámetro de hidrólisis, una velocidad específica mayor y tiempo de duplicación menor que *B. sp*.

11. Referencias

- 1 Acharya S and Chaudhary A. (2012). Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS21 and *Bacillus sp.* MVS3 isolated from Indian hot spring. *Braz Arch Biol Technol* 55: 497-503.
- 2 Aguirre-Garrido, J. F., Montiel-Lugo, D., Hernández-Rodríguez, C., Torrescortes, G., Millán, V., Toro, N., Martínez-Abarca, F., & Ramírez-Saad, H. C. (2012). Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semiarid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101, 891-904.
- 3 Aliaga, M. E. (2011). Morfología y estructura de las bacterias. Parte I.
- 4 Apella, M. C., & Araujo, P. Z. (2005). Microbiología de agua. Conceptos básicos. Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua, 33-50.
- 5 APHA. (1998) “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”. 20th Edition. USA. American Press Health Association
- 6 Aulitto, M., Fusco, S., Bartolucci, S., Franzén, C. J., y Contursi, P. (2017). *Bacillus coagulans* MA-13: a promising thermophilic and cellulolytic strain for the production of lactic acid from lignocellulosic hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels*.10(1): 210.

- 7 Alvarenga, P., Mourinha, C., Farto, M., Santos, T., Palma, P., Sengo, J., ... & Cunha-Queda, C. (2015). Sewage sludge, compost and other representative organic wastes as agricultural soil amendments: Benefits versus limiting factors.
- 8 Álvarez, José. Manual de Compostaje para Agricultura Ecológica. Andalucía - España: Editorial Carrascal, 2017, pp. 12-69.
- 9 Avellaneda Enriquez, F. X. E. (2019). Protocolo para la producción de compost de residuos sólidos orgánicos del mercado de la ciudad de Lambayeque en el año 2018.
- 10 Baffi, C., M. T. Dell'Abate, A. Nassisi, S. Silva, A. Benedetti, P. L. Genevini, & F. Adani. (2007). Determination of biological stability in compost: A comparison of methodologies. *Soil Biol. Biochem.* 39: 1284-1293
- 11 Barrena, R. (2006). Compostaje de residuos sólidos orgánicos. Aplicación de técnicas respirométricas en el seguimiento del proceso. Memoria de Tesis. Universitat Autònoma de Barcelona-Escola Universitària Politècnica del Medi Ambient.
- 12 Banerjee S, Palit R, Sengupta C, Standing, D. 2010. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. Isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of crop science* 4(6):378-383.
- 13 Barrón Santos, F. J. (2013). Optimización del proceso de composta producida a partir de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos que se generan en la Ciudad de México
- 14 Behera BC, Parida S, Dutta SK, Thatoi HN. Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from mangrove soil of Mahanadi River Delta and their cellulase production ability. *Am J Microbiol Res.* 2014;2(1): 41–46.
- 15 Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A. L., Jaimes, D. C., Gutiérrez, S. M., Miranda, J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4 (5), 82-90
- 16 Bhattacharya A, Pletschke BI. (2014) Thermophilic Bacilli and their enzymes in composting. In: Maheshwari DK, editor. *Compost-ing for sustainable agriculture, sustainable development and biodiversity*, vol. 3. Springer; 2014. p. 103---24.
- 17 Bikandi, J. (2014). Cinética de la fase exponencial de la curva de crecimiento microbiano. Departamento de inmunología, microbiología y parasitología. Universidad del País Vasco
- 18 Bohórquez, D. M. G., & Pérez, L. I. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*).
- 19 Doran, P. M. Principios de ingeniería de los bioprocesos. 1998. Zaragoza, España: Acribia SA 468p.
- 20 Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(8), 601-608.
- 21 BRENDA (Braunschweig Enzyme Database). 2016. The comprehensive Enzyme Information System <https://www.brenda-enzymes.org/>
- 22 Bronnenmeier K, Kern A, Liebl W, Staudenbauer WL. 1995. Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. *Appl. Environ. Microbiol* 61: 1399-1407
- 23 Brown R.A. y Cartwright R.T. (1990). *Biotreat Sludges and Soils. Hydrocarbon Processing.* 68(10): 93-97
- 24 Buenrostro-Delgado, O., Israde-Alcántara, I., & López-Granados, E. M. (2022). Influencia del suelo como material de cobertura y contenido de compuestos lignocelulósicos en la biodegradación de residuos sólidos urbanos en rellenos clausurados: Influência do material de cobertura do solo y do conteúdo de compostos lignocelulósicos na biodegradação de resíduos sólidos urbanos em aterros sanitários fechados. *STUDIES IN ENGINEERING AND EXACT SCIENCES*, 3(1), 232–242. <https://doi.org/10.54021/seesv3n1-018>.
- 25 Carrasco F., Jorge, Millas O., Paz, Santelices S., Cecilia y Castro F., Jean Franco (2020) Identificación de microorganismos [en línea]. Chillan: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 428. p. 157-182. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/67169> (Consultado: 23 enero 2023).
- 26 CCA. 2017. Caracterización y gestión de los residuos orgánicos en América del Norte, informe sintético. Comisión para la Cooperación Ambiental, Montreal. 52 pp.

- 27 Chen, D. M., Bodirsky, B. L., Krueger, T., Mishra, A., y Popp, A. (2020). The world's growing municipal solid waste: Trends and impacts. *Environmental Research Letters*, 15(7), 074021. doi: <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab8659>
- 28 Córdoba C. 2006. Estudio de factibilidad técnico-económica para instalar una planta de compostaje, utilizando desechos vegetales urbanos. [Documento en línea]. Chile: Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile. [Consultado el 09 de junio de 2012]. Formato PDF. Disponibilidad libre: <http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2006/cordova_c/sources/cordova_c.pdf>
- 29 Cuadros S. 2008. Compostaje y Biometanización. [Documento en línea]. [Consultado el 08 de junio de 2012]. Formato PDF. Disponibilidad libre: <http://www.eoi.es/savia/pubman/item/eoi:45609:2/component/eoi:45607/D_Compost>
- 30 Da Silva, V. L. (2013) Morfología e citología da célula bacteriana. URL Disponible en: <http://www.ufjf.br/microbiologia/files/2013/05/Morfologia-e-Citologiad-a-c%3A%A9lula-bacteriana3.pdf>
- 31 Diagnóstico básico para la gestión integral de los residuos. México. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/554385/DBGIR-15-mayo-2020.pdf>
- 32 Díaz, G. (2009). Fundamentos y Técnicas de Análisis Microbiológicos: Morfología y Estructura Bacteriana. Madrid (España), 6-9.
- 33 Duarte Torres, A. (1996). Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod. *Ingeniería e investigación*, (33), 123-138.
- 34 Escudero Agudelo, J. (2022). Estudio del potencial biotecnológico de actinobacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila con actividad celulolítica (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León)
- 35 Fracchia, L., Dohrmann, A. B., Martinotti, M. G., y Tebbe, C. C. (2006). Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71(6): 942.
- 36 Galea Camacho, Z. (2013). Ensayo de producción y caracterización de compost a partir de residuos de guacamole, poda y gallinaza.
- 37 García, L.E.B., Pilozo, D.M.S. (2023). Evaluación del manejo de los residuos sólidos en la comuna Joa del cantón Jipijapa. *Domino de las Ciencias*, 9(3), 638-654.
- 38 García de la Fuente, R., Cuesta, G., Sanchís-Jiménez, E., Botella, S., Abad, M., Fornes, F. (2011). Bacteria involved in sulfur amendment oxidation and acidification processes of alkaline 'alperujo' compost, *Bioresource Technology*, 102:1481–1488
- 39 García, Y. G., Reynoso, O. G., & Arellano, J. N. (2005). Potencial del bagazo de agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. *e-Gnosis*, (3),
- 40 Garelick, H; Jones, H; Dybowska, A; Valsami-Jones, E. (2008). "Arsenic pollution sources". In: Garelick H, Jones H, editors. *Arsenic pollution and remediation: an international perspective*. New York: Springer, pp. 17–60.
- 41 González C, Buenrostro O, Márquez L, Hernández C, Moreno E, Robles F. 2011. Effect of Solid Wastes Composition and Confinement Time on Methane Production in a Dump. *Journal of Environmental Protection*. 2: 1310-1316. ISSN Print: 2152-2197; ISSN Online: 2152-2219.
- 42 Guardia, A.D., Mallard, P., Teglia, C., Marin, A., Le Pape, C., Launay, M., Benoist, J.C., Petiot, C., 2010. Comparison of five organic wastes regarding their behaviour during composting: part 2, nitrogen dynamic. *Waste Manage. (Oxford)* 30, 415–425.
- 43 Guillén Arcos, M. (2022). Evaluación de dos procesos biológicos (composteo y vermicomposteo) para el tratamiento de residuos orgánicos.
- 44 Hachicha R., Hachicha S., Trabelsi I., Woodward S. and Mechicha T. (2009). Evolution on the fatty fraction during co-composting of olive oil industry wastes with animal manure: Maturity assessment of the end product. *Chemosphere* 75, 1382-1386.
- 45 He, Z.L.; Yang, X.E.; Stoffella, P.J. (2005). "Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19, pp. 125-140.
- 46 Henrissat, B (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on aminoacid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309–316.

- 47 Iturbe-Argüelles, R., Flores-Torres, C., Chávez-López, C., & Roldán-Martín, A. (2002). Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología III*, 1, 25-35.
- 48 Jaramillo, M., Ruiz, O. S., del Socorro Yepes, M., y Montoya, O. I. (2003). Aislamiento de cepas nativas microbianas con actividad celulolítica óe un proceso de compostaje. *Gestión y Ambiente*, 6(2), 109-116.
- 49 Jiménez Chuva Silvio Olmedo. (2015). Elaboración de compost a partir de residuos sólidos orgánicos generados en el Mercado Mayorista del Cantón Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba.
- 50 Juturu V y Wu JC (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renew Sust. Energ. Rev.* 33:188-203
- 51 Koneman, E. W. (1997). Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. Ed. médica panamericana.
- 52 Laich, F. (2011). El papel de los microorganismos en el proceso de compostaje. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. ICIA, 2011, 1-7.
- 53 Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos-LGPGIR. (2003). México: DOF Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT]. (mayo, 2020).
- 54 Llorens M. D. C. E., Torres M. L., Arrechea A. P., Navarro R. M., y Colomina A. F. (2007). La fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos como fuente potencial de producción de biogás. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas.*, 38(1), 33-37
- 55 Lopes, A. D. M., Ferreira Filho, E. X., & Moreira, L. R. S. (2018). An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. *Journal of applied microbiology*, 125(3), 632-645
- 56 Lynd L, Weimer P, Van Zyl W, Pretorius I. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002; 3: 506–577.
- 57 Mac Faddin, J. (2003). Pruebas bioquímicas para la Identificación de bacterias de Importancia Clínica. 3era Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires-Argentina.
- 58 Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2004). Brock. Biología de los microorganismos.
- 59 Madejón, E., Díaz, M.J., López, R., Cabrera, F. (2001) Co-componsting og sugarbeet vinasse: Influence of the organic matter nature of the bulking agents used. *Biores. Technol.*, 76: 275 – 278
- 60 Márquez, M., Martínez, M. & Franco, M., 2003.- Aislamiento de *Trichoderma* sp. y actinomicetes a partir de suelos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y evaluación de su capacidad antagonica in vitro sobre *Fusarium oxysporum*. *Revista Agronomía Colombiana*, XIX (1-2): 81-88.
- 61 Meena, A. L., Karwal, M., Dutta, D., & Mishra, R. P. (2021). Composting: phases and factors responsible for efficient and improved composting. *Agriculture and Food: e-Newsletter*, 1, 85-90.
- 62 Meraz, M., Sanchez-Vazquez, V., & Martinez-Martinez, F. A (2022) Systematic derivation of the Monod equation for multi-substrate conditions. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. 21, No. 2(2022) Bio2798.
- 63 Miño Valdés, J. E., González Suárez, E., & Pérez Navarro, O. (2019). Contribución de la Ingeniería de las reacciones químicas al desarrollo de nuevos procesos industriales
- 64 Mohedo, Juan. (2002). Estudio de la estabilidad durante el compostaje de residuos municipales [En línea] (Tesis posgrado) (Doctor en Química). Córdoba-España: Universidad de Córdoba, Departamento de Ingeniería Química, 2002
- 65 Monzambe, G. M., Mpofu, K., y Daniyan, I. A. (2019). Statistical analysis of determinant factors and framework development for the optimal and sustainable design of municipal solid waste management systems in the context of industry 4.0. *Procedia CIRP*, 84, 245-250. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procir.2019.04.182>
- 66 Moreno, J., & Albarracín, V. (2012). Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca Biol [Internet]*; 5 (5): 79–93.
- 67 Nain, P., & Kumar, A. (2020). Initial metal contents and leaching rate constants of metals leached from end-of-life solar photovoltaic waste: An integrative literature review and analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119, 109592. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109592>
- 68 Negro, M.J., Villa, F., Aibar, J., Alarcon, R., Ciria, P., 2000. Produccion y gestion del compost. Informaciones tecnicas del departamento de agricultura de la direccion general de tecnologia agraria. Gobierno de Aragon. Nr. 88, Zaragoza.

- 69 NMX-AA-015-1985 Protección al ambiente - Contaminación del suelo - Residuos sólidos municipales - Muestreo - Método de cuarteo
- 70 NMX-AA-025-1984 Protección al ambiente - Contaminación del suelo - Residuos sólidos - Determinación del PH - Método potenciométrico
- 71 NMX-AA-036-SCFI-2001. Análisis de agua - determinación de acidez y alcalinidad en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba.
- 72 NMX-AA-042-SCFI-2015 ANÁLISIS DE AGUA - ENUMERACIÓN DE ORGANISMOS COLIFORMES TOTALES, ORGANISMOS COLIFORMES FECALES (TERMOTOLERANTES) Y *Escherichia coli* MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE EN TUBOS MÚLTIPLES
- 73 NMX-AA-180-SCFI-2018 QUE ESTABLECE LOS MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO AEROBIO DE LA FRACCIÓN ORGÁNICA DE LOS RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS Y DE MANEJO ESPECIAL, ASÍ COMO LA INFORMACIÓN COMERCIAL Y DE SUS PARÁMETROS DE CALIDAD DE LOS PRODUCTOS FINALES
- 74 O’Hair, J., Jin, Q., Yu, D., Poe, N., Li, H., Thapa, S., ... & Huang, H. (2020). Thermophilic and alkaliphilic *Bacillus licheniformis* YNP5-TSU as an ideal candidate for 2, 3-butanediol production. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(30), 11244-11252
- 75 Organización Panamericana de la Salud. (1999). Manual para la Elaboración de Compost - Bases Conceptuales y Procedimientos. [Documento en línea]. [Consultado el 23 de septiembre de 2022]. Formato PDF. Disponibilidad libre: <http://www.bvsde.paho.org/bvsars/fulltext/compost.pdf>
- 76 Pírez, M., & Mota, M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. *Temas de bacteriología y virología médica*, 23-42.
- 77 Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B., & Dedysh, S. (2015). *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria* (Vol. 410). W. B. Whitman (Ed.). Hoboken, NJ:
- 78 Rawat R, Tewari L. (2012) Purification and characterization of an aci-dothermophilic cellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain LFS3. *Extremophiles*.16:637---44.,
- 79 Richard, T.L. 2004. Compost. pp. 294–301. En: Hillel D. (Ed.). *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Academic Press. New York, USA. 2200 pp.
- 80 Rodríguez, P. A., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología cosmética, médica y quirúrgica*, 16(2), 166-167.
- 81 Rodríguez Silva, L. A., y Llenque Díaz, L. (2016). Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos. *REBIOL*, 36(1), 19-28. Recuperado a partir de <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/1310>
- 82 Ryckeboer J, Mergaert J, Coosemans J, Deprins K, Swings J. (2003) Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *J Appl Microbiol*. 94:127---37
- 83 Sadhu S, Maiti TK. Cellulase production by bacteria: A review. *Brit Microbiol Res J*. 2013;3(3):235–258
- 84 Sajith, S., Priji, P., Sreedevi, S., & Benjamin, S. (2016). An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 6(1).
- 85 Salazar Arce, T. (2016). Actividad microbiana en el proceso de compostaje aerobio de residuos sólidos orgánicos
- 86 Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2019) “Tiraderos a cielo abierto dañan ambiente y salud humana” <https://www.gob.mx/semarnat/es/articulos/tiraderos-a-cielo-abierto-danan-ambiente-y-salud-humana?idiom=es>
- 87 Siu-Rodas, Y., de los Angeles Calixto-Romo, M., Guillén-Navarro, K., Sánchez, J. E., Zamora-Briseno, J. A., & Amaya-Delgado, L. (2018). *Bacillus subtilis* with endocellulase and exocellulase activities isolated in the thermophilic phase from composting with coffee residues. *Revista argentina de microbiología*, 50(3), 234-243.
- 88 Sivakumar, N., Al Zadjali, A., Al Bahry, S., Elshafie, A., & Eltayeb, E. A. (2016). Isolation and characterization of cellulolytic *Bacillus licheniformis* from compost. *African Journal of Biotechnology*, 15(43), 2434-2446.
- 89 Spaccini, R., & Piccolo, A. (2008). Spectroscopic characterization of compost at different maturity stages. *CLEAN—Soil, Air, Water*, 36(2), 152-157 Tisalema, S., Hechavarría, J., Vega, G., y Calero, M. (2021). Ecological waste planning. Case study: Comprehensive waste management plan at the Simón Bolívar Air

- Base, Guayaquil, Ecuador. *Advances in Intelligent Systems and Computing AISC*, 1269. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-58282-1_39
- 90 Soto, M., Vázquez, M. A., & Sen, R. Análisis químicos y microbiológicos de muestras de compost doméstico y comunitario. *Grupo Enxeñaría Química e Ambiental*, 1-5.
- 91 Tiquia, S. M. (2002). Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 764-775.
- 92 Tixe Paucar, M. V., y Ruiz Tandazo, B. J. (2018). Efecto del porcentaje de poda sobre el proceso de compostaje de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) del Relleno Sanitario de Porlón (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).
- 93 Torrente-Velásquez, J. M., Chifari, R., Ripa, M., y Giampietro, M. (2020). Robust information for effective municipal solid waste policies: Identifying behaviour of waste generation across spatial levels of organization. *Waste Management*, 103, 208-217. doi: 10.1016/j.wasman.2019.12.032
- 94 Torrez Monroy, G. P., Terrazas Siles, E., y Cabero, T. (2010) Producción de enzimas celulolíticas a partir de la cepa fúngica IB-105 y aplicación biotecnológica sobre productos de impacto industrial textil y agrícola (Doctoral dissertation, Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Carrera de Bioquímica, Tesina de grado para obtener el grado de Licenciatura
- 95 Universidad Miguel Hernández (2021). Prácticas Microbiología: Técnicas de Aislamiento y Recuento. <https://docenciamicrobiologia.umh.es/es/indice-de-practicas/3-tecnicas-de-aislamiento-y-recuento/>
- 96 Vargas-García, M. C., Suárez-Estrella, F., López, M. J. y Moreno, J. (2010). Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. *Waste Management*. 30, p. 771- 778
- 97 Vargas Flores, T., & Kuno Vargas, A. (2014). Morfología Bacteriana. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 49, 2594.
- 98 Velasco, J. A., & Sepúlveda, T. L. V. (2003). El composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. *Gaceta Ecológica*, (66), 41-53.
- 99 Venegas Montañez, R. M. (2021). Diseño de un proceso de producción de enzimas celulolíticas a partir de bagazo de caña de azúcar.
- 100 Ventorino V, Aliberti A, Faraco V, Robertillo A, Giacobbe S, Ercol-ini D, Amore A, Fagnano M, Pepe O. (2015) Exploring the microbiotadynamics related to vegetable biomass degradation and studyof lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnolo-gical application. *Sci Rep.*; 5:8161.
- 101 Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., ... & Whitman, W. B. (Eds.). (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (Vol. 3)*. Springer Science & Business Media.
- 102 Wei, Y., J. Li, D. Shi, G. Liu, Y. Zhao y T. Shimaoka. 2017. Environmental challenges impeding the composting of biodegradable municipal solid waste: A critical review. *Resources, Conservation and Recycling* 122: 51-65.
- 103 Zhang Y, Wei, Y., J. Li, D. Shi, G. Liu, Y. Zhao y T. Shimaoka. 2017. Environmental challenges impeding the composting of biodegradable municipal solid waste: A critical review. *Resources, Conservation and Recycling* 122: 51-65. Himmel M y Mielenz J. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biothecnology Advances*; 24: 452-481.
- 104 Zhu, Ch., Xu, Z., Song, R. (2011). The endoglucanase from *Bacillus subtilis* BEC-1 bears halo-tolerant, acidophilic and dithiothreitol-stimulated enzyme activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2863-2871.

12. Anexos

Anexo 1: Extracción de ADN genómico de bacterias Gram positivas.

1. Se colocó 1 ml del cultivo de 24 horas de la cepa muestra en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
2. Se centrifugó a 14000 x g durante 2 minutos para sedimentar las células bacterianas y se decantó el sobrenadante.
3. Se resuspendió el sobre nadante con 480 μ L de EDTA a 50 mM y se agregó 16 μ L de lisozima.
4. Se incubó la muestra a 37°C durante 45 minutos, se centrifugo a 14000 x g por 2 minutos y se decantó el sobrenadante.
5. Se agregó 600 μ L de solución de lisis de núcleos y se mezcló con la micropipeta para resuspender las células, se incubó a 80°C durante 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
6. Se agregó 3 μ L de solución de RNasa al lisado celular, se cerró el tubo y se invirtió 5 veces para mezclarlo, se incubó a 37°C durante 30 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente
7. Se agregó 200 μ L de solución de precipitado de proteínas, se mezcló a alta velocidad en el vortex por durante 20 segundos y se incubó en hielo por 5 min.
8. Se centrifugó a 14000x g durante 3 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml con 600 μ L de isopropanol
9. Se mezcló el tubo suavemente por inversión y se centrifugo a 14001 x g por 2 minutos
10. Con cuidado se retiró el sobrenadante y se dejó escurrir el tubo sobre papel adsorbente y se añadió 600 μ L de etanol al 70% a temperatura ambiente y se mezcló suavemente por inversión
11. Se centrifugo a 14000 x g por 2 minutos y se aspiró con cuidado el etanol
12. Se deajo secar le sedimento al aire libre por 10 a 15 min y se le agregó 100 μ L de solución rehidratante de ADN y se incubo a 65°C por 1 hora
13. Cada muestra de ADN se etiqueto y se guardó a 4°C

Anexo 2: Electroforesis

La integridad del ADN extraído se determinó mediante la separación de los fragmentos en geles de agarosa al 1%, de igual forma se determinó la integridad y concentración para secuencias de los productos de PCR (Aguirre-Garrido et al., 2012).

A continuación, se presenta la metodología para la electroforesis

1. Se prepararon 35 mL de gel de agarosa al 1% p/v (agarosa / buffer TAE 1X).
2. Se calentó la mezcla en horno de microondas hasta disolver la agarosa.
3. Se colocó la agarosa líquida en la cámara de electroforesis con la charola de geles y peine para hacer los pozos y se dejó solidificar durante 20 min.
4. Se retiró el peine y se le adicionó buffer TAE 1X.
5. Se cargaron 3 µL de marcador de tamaño molecular. Los marcadores de tamaño molecular utilizados fueron DNA de fago λ digerido con EcoRI (en el caso de visualizar DNA de alto peso molecular) y marcador de 100 a 3,000 pb (Axygen, IDPIDO185432), en el caso de analizar productos de PCR (gen 16S rRNA).
6. Se cargaron 5 µL en cada uno de los pozos (2 µL de buffer de carga de ADN + 3 µL de cada una de las muestras)
7. El gel se corrió a 100 volts durante 30 min.
8. Se colocó el gel en buffer de tinción de bromuro de etidio con una concentración de 0.5 µg/mL, durante 15 min.
9. 10. Se reveló el gel en un transiluminador KODAK EDAS 290 con lámpara UV y se guardó la fotografía con el software K1D.

Para la cuantificación de DNA en gel siguió la siguiente metodología

1. Se seleccionó el área de la fotografía del gel con el software K1D correspondiente a los carriles donde corrieron las muestras durante la electroforesis.
3. Se le indicó al programa que detectara los carriles y las bandas de DNA corridas y se delimitó el contorno y el pico máximo de intensidad de las bandas.
6. Se registraron la intensidad neta y el área de cada banda.
7. Se calculó la concentración de DNA contenida en cada banda con la siguiente ecuación:

$$X = \frac{A * B}{C}$$

Dónde X es la concentración de DNA contenida en la banda, A es el producto de la intensidad neta y el área de la banda problema, B es la concentración conocida de una banda del marcador que tiene un tamaño comparable con la banda problema, y C es el producto de la intensidad neta y el área de una banda del marcador.

Anexo 3: Amplificación del gen ARNr 16s

Las muestras se procesaron de la siguiente manera:

1. Se preparó la mezcla de reacción (Tabla 1), se mezcló bien y se colocó en un tubo para PCR.

Reactivo	μL (1x)
Master Mix	12.5
Primer 27F	1
Primer 1492R	1
Agua	9.5

2. Se agregó 1 μL de la dilución de DNA genómico de la muestra para tener un volumen final de reacción de 25 μL y se centrifugó 30 segundos.
3. Se colocaron los tubos en el termociclador con las condiciones necesarias para la amplificación especificadas en la tabla 2

Paso	Tiempo (min)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	
Desnaturalización inicial	5	94	
Desnaturalización	0.5	94	35 ciclos
Alineamiento	0.5	52	
Elongación	0.5	72	
Elongación final	1	72	
Conservación	∞	4	

Las secuencias de los primers utilizados para la amplificación del gen 16S rRNA son:

27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

1492R 5'-GGTACCTGTTACGACTT-3'

Anexo 4: Purificación kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up

Metodología de purificación de productos de PCR con el kit de purificación Wizard de PROMEGA:

1. Se homogenizó el tubo con la reacción de PCR del gen ARN r 16S de cada muestra, se agregaron 5 volúmenes de la reacción de PCR en el Spin Bind y se mezcló con la micropipeta.
2. Se transfirió la mezcla a la unidad de filtración Spin Filter y se centrifugó 30 segundos a 14,000 rpm. Se removió la canastilla y se descartó el líquido por decantación.
3. Se volvió a colocar la canastilla y se adicionaron 300 μ L de buffer Spin Clean al filtro, se centrifugó 30 segundos a 14,000 rpm y se removió la canastilla para descartar el líquido por decantación.
10. Se volvió a colocar la canastilla y se centrifugó 1 minuto a 14,000 rpm.
11. Se transfirió la canastilla con el filtro a un microtubo de 1.5 mL nuevo y se agregaron 50 μ L de buffer de elución (Tris 10 mM) en el centro de la membrana de filtración.
12. Se centrifugó 1 minuto a 14,000 rpm y se retiró la canastilla del tubo con el producto de PCR purificado.
13. Se almacenó el producto de PCR a -20°C .

Anexo 5

Tabla 3. Especificaciones por tipo de composta terminada

Parámetro	Tipo de composta		
	I	II	III
pH	6.7 – 8.5		
Conductividad eléctrica (deciSiemens/metro dS/m)	0.5 dS/m - ≤ 4 dS/m	4 dS/m - ≤ 8 dS/m	8 dS/m - ≤ 12 dS/m
Materia orgánica (% MS)	≥ 50 %	30 % - 50 %	20 % - 30 %
Carbono orgánico total	Mínimo 10 % Debe indicarse en la etiqueta el resultado del último análisis realizado		
Nitrógeno total (% MS)	3 %	2 %	1 %
Relación C/N	15 - < 20	20 ≤ 25	
Macronutrientes primarios (Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K) en (% MS)	De 1 % a 3 % en cualquiera de ellos y su suma ≤ 7 %: debe portar la leyenda "Composta - mejorador de suelo orgánico". Si cualquiera excede 3 % o la suma es mayor a 7 % debe portar la leyenda "Fertilizante orgánico" y se debe indicar las cantidades para cada macronutriente.		
Granulometría	≤ 10 mm	10 mm ≤ 30 mm	
Fitotoxicidad (Índice de Germinación, IG)	IG > 90 %	IG 85 % a 90 %	IG 80 % a 85 %
Temperatura medida a una profundidad ≥ 50 cm	25 °C – 35 °C		36 °C – 50 °C

Tabla 4. Elementos traza, concentraciones máximas en mg/kg en base seca

Nivel – Tipo	As	Cd	Cr total	Cr hexavalente	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Nivel 1 – Tipo I	0.1	0.7	70	0.5	70	0.4	25	45	200
Nivel 2 – Tipo II	0.7	1	70	0.5	150	0.7	60	120	500
Nivel 3 – Tipo III	2.0	2	250	0.5	300	1.5	90	150	500

NOTA: As=Arsénico; Cd= Cadmio; Cr total= Cromo Total; Cr hexavalente= Cromo Hexavalente, Cu=Cobre; Hg=Mercurio; Ni=Níquel; Pb=Plomo; y Zn=Zinc.

Tabla 5. Especificaciones microbiológicas

Microorganismos	Valor máximo permisible
Coliformes fecales	< 1000 NMP/g (en base seca)
<i>Escherichia coli</i>	≤ 1000 NMP por g en base seca
<i>Salmonella sp.</i>	Ausente NMP en 25 g (en base seca)
Huevos de Helmintos viables	1 en 4 g (en base seca)

Anexo 6

Metodología de número más probable en tubos múltiples (NMX-AA-042-SCFI-2015)

Los medios utilizados para cada prueba y microorganismos se especifican en la siguiente tabla:

Pruebas presuntivas para coliformes totales y *E. coli*

1. Se prepararon 15 tubos con 10 ml de medio Caldo lactosado doblemente concentrado con campanas de Durham y se esterilizaron en autoclave a 120°C y 15 psi por 15 minutos.
2. Se tomaron 10 g de composta y colocaron en 90 ml de agua destilada, se colocó en agitación por 10 min y se dejó reposar 30 minutos, a partir de esta muestra se preparó una dilución 1:100.
3. Se inocularon los 15 tubos con la dilución preparada de la siguiente forma:
 - 5 tubos con 10 ml de muestra.
 - 5 con 1 ml de muestra.
 - 5 con 0.1 ml de muestra.
4. Se incubaron a 35°C por 24 horas ± 3 horas (44.5°C por 24 horas ± 3 horas *E. coli*).
5. Se determino si el tubo era positivo si presentaba turbidez en el medio y acumulación de gas en la campana de Durham.

Prueba confirmativa para coliformes totales y *E. coli*

1. Se preparó la misma cantidad de tubos positivos en la prueba presuntiva con 10 ml de caldo lactosado bilis verde brillante y tubos Durham.
2. Se inoculo cada uno de los tubos con 1 ml de los tubos presuntivos y se incubaron a 37°C por 24 horas ± 3 horas. (44.5°C para por 24 horas ± 3 horas *E. coli*).
3. Se determino si el tubo era positivo al presentarse acumulación de gas en el tubo Durham.

Nota: A falta de reactivo de Kovac para la confirmación de *E. Coli* se realizó la resiembra de los tubos positivos en la prueba confirmativa en medio selectivo E.M.B (Eosina y Azul de metileno), se tomó como positivo el tubo confirmativo si en el medio selectivo presentaba crecimiento.

Anexo 7

Alcalinidad

La alcalinidad total se determinó siguiendo la formula establecida en la norma mexicana NMX-AA-036-SCFI-2001.

$$CaCO_3 = \frac{(A * B)(50)(1000)}{C}$$

Donde,

CaCO₃ = Es la alcalinidad total (mg/L)

A: Volumen de H₂SO₄ utilizado al vire de la fenolftaleína.

B: Normalidad de la solución de H₂SO₄.

C: Volumen de la muestra en mL.

50: factor de conversión eq/L a mg CaCO₃.

1000: factor de conversión mL a L.

Acidez

La acidez total se determinó siguiendo la formula establecida en la norma mexicana NMX-AA-036-SCFI-2001.

$$CaCO_3 = \frac{(A * B)(50)(1000)}{C}$$

Donde,

CaCO₃ = Es acidez total (mg/L)

A: Volumen de NaOH utilizado al vire de la fenolftaleína.

B: Normalidad de la solución de NaOH.

C: Volumen de la muestra en mL.

50: factor de conversión eq/L a mg CaCO₃.

1000: factor de conversión mL a L.

Dureza

La dureza total se determinó siguiendo la formula establecida en la norma mexicana NMX-AA-072-SCFI-1981

$$CaCO_3 = \frac{(A * B)(1000)}{C}$$

Donde,

CaCO₃ = Es dureza total (mg/L)

A: Volumen de EDTA utilizado al vire.

B: mg de CaCO₃ equivalente a 1 ml de EDTA.

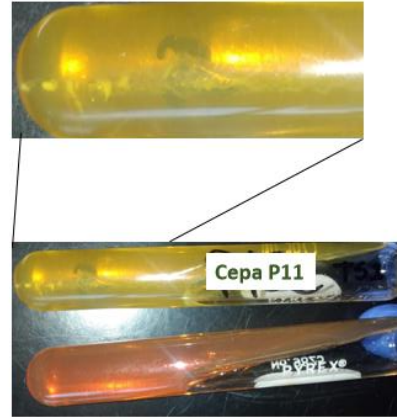
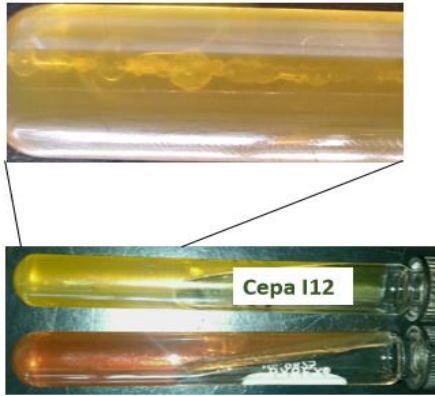
C: Volumen de la muestra en mL.

1000: factor de conversión mL a L.

Anexo 8

Imágenes de Pruebas bioquímicas

TSI (Triple-Azúcar-Hierro)



Citrato



MIO (Motilidad-Indol-Ornitina)



SIM (Sulfuro-Indol-Movilidad)



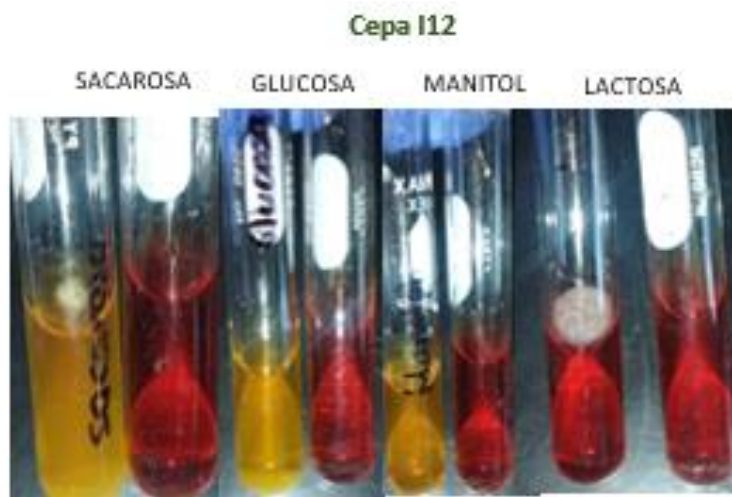
Ureasa



Reducción de nitratos



Glucosa, manitol, sacarosa, lactosa





NaCl 7.5%

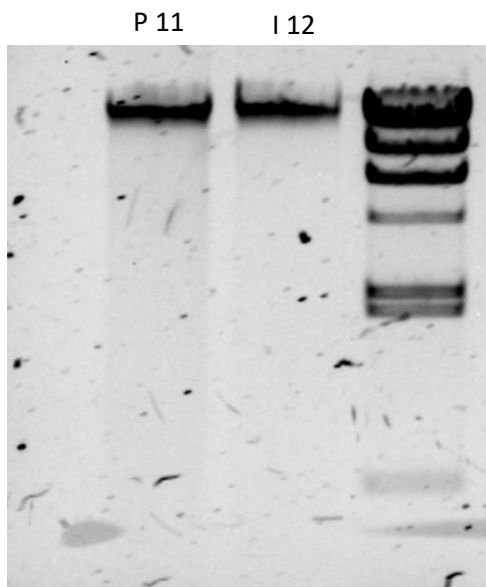


Licuação de Gelatina



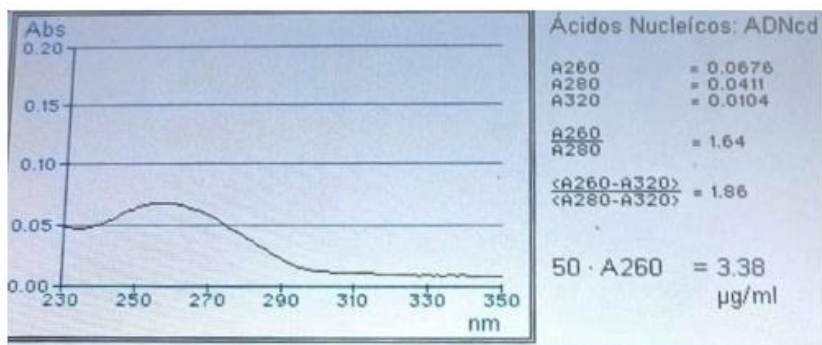
Anexo 9

Electroforesis de extracción de ADN bacteriano

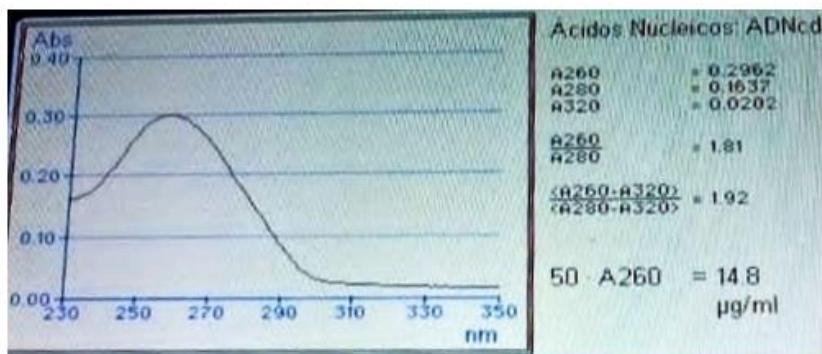


Grafica de pureza de ADN

Cepa I1.22

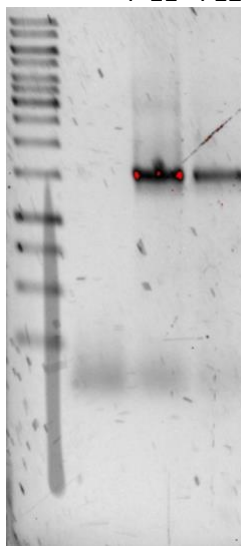


Cepa P2.22



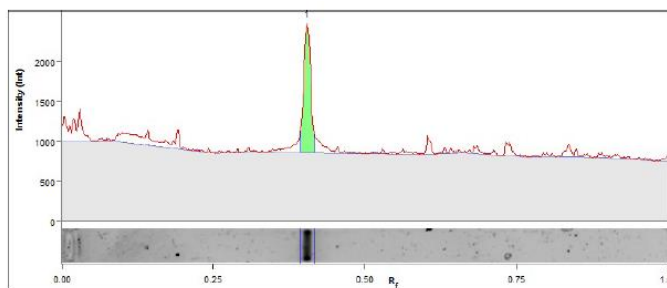
Electroforesis para productos PCR

P 11 | I 12



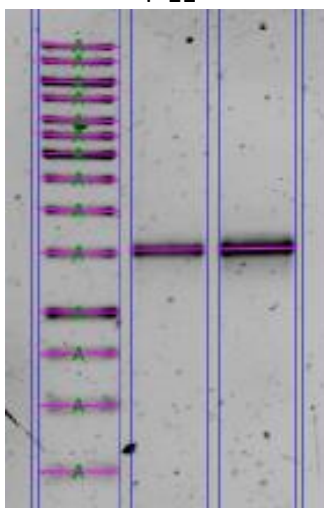
Cuantificación de concentración de productos de PCR purificados

P 11

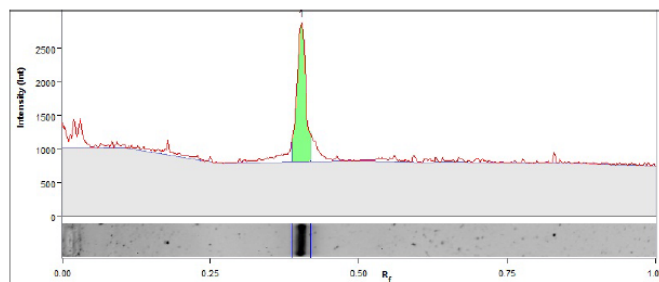


Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (ng)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0.405	1,292,715	78.9	N/A	100.0	33.0

P 11 | I 12



I 12



Band No.	Band Label	Mol. Wt. (KDa)	Relative Front	Volume (Int)	Abs. Quant. (ng)	Rel. Quant.	Band %	Lane %
1		N/A	0.404	2,228,700	142.2	N/A	100.0	48.0

Anexo 10

Cálculo de índice de germinación

$$GRS (\%) = \frac{10}{10} * 100$$

$$GRS (\%) = 100$$

En la Tabla 6 se muestra la longitud de radícula de las plantas

	Longitud de la radícula (cm)										Promedio
EC	3	1	2.5	1.5	1.5	1.5	3	2.5	3	3	22.5
Control	2	2	1.5	2.5	2.5	3	3	2.5	2	2	23.5

Nota: EC extracto de composta

$$CRR(\%) = \frac{22.5}{23.5} * 100$$

$$CRR(\%) = 95$$

$$IG = \frac{100 * 95}{100}$$

$$IG = 95\%$$

