

Caracterización enzimática de bacterias aisladas de un compostaje doméstico con potencial aplicación en el aprovechamiento de residuos orgánicos

Silvia Daniela Toloza Sandoval

Trabajo de Grado para Optar al Título de Bióloga

Director

William Fernando Hidalgo Bucheli

Doctor en Química

Codirector

Inés Hernández Celi

Máster en Ciencias Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

A mi familia, por creer en mí, por todo su amor y por apoyarme en cada decisión.

Agradecimientos

A mi director William Fernando Hidalgo Bucheli por confiar en mí, por adentrarme en el mundo de la investigación y por enseñarme a valorar cada resultado. Agradezco su dedicación, su tiempo y sus palabras correctas en los momentos difíciles.

A mi Codirectora Inés Hernández Celi, gracias infinitas por ser mi polo a tierra, por animarme siempre, por su carisma, por su sonrisa y por enseñarme a encontrar soluciones. Gracias por compartir conmigo su experiencia y sabiduría. Gracias por ayudarme a crecer como persona y como estudiante. Siempre la recordaré con cariño y gratitud.

Al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología, por toda su colaboración y por brindarme un espacio en sus instalaciones.

A la Vicerrectoría Académica por valorar y financiar nuestro proyecto.

A mis padres, a mis hermanos: Dallana, Martín y Lizeth, gracias por enriquecer mi vida con sus enseñanzas y por ser una fuente constante de sabiduría y amor.

A Isa, por compartir conmigo cada emoción.

A Juan, por acompañarme en cada momento y por ser mi principal motivador.

Y a Dios, por permitirme vivir este maravilloso proceso.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción.....	11
1. Objetivos	14
1.1 Objetivo General	14
1.2 Objetivos Específicos	14
2. Marco teórico.....	15
2.1 Compostaje doméstico	15
2.2 Aplicaciones del compostaje.....	15
2.3 Microorganismos en el compostaje.....	16
2.3.1 Actinobacterias.....	16
2.3.2 Hidrólisis enzimática de biomoléculas.....	16
2.3.2.1 Almidón.....	17
2.3.2.2 Pectina.....	17
2.3.2.3 Celulosa.....	18
2.3.2.4 Lignina.....	18
2.4 Estado del arte	19
3. Materiales y métodos	21
3.1 Diseño del sistema de compostaje.....	21
3.2 Aislamiento de microorganismos.....	21
3.3 Evaluación semicuantitativa de la actividad enzimática	22
3.3.1 Ajuste de la población bacteriana.....	22
3.3.2 Actividad amilolítica	22

3.3.3 Actividad celulolítica	22
3.3.4 Actividad pectinolítica	23
3.3.5 Actividad ligninolítica.....	23
3.3.6 Selección de bacterias con mayor potencial.....	24
3.4 Pruebas de sinergismo y antagonismo	24
3.5 Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática.....	25
3.5.1 Concentración de proteínas	26
3.5.2 Concentración de glucosa.....	26
3.5.3 Monitoreo de la degradación de almidón y celulosa.....	27
3.5.3.1 Determinación de la actividad de la enzima amilasa y celulasa.	27
3.5.4 Monitoreo de la degradación de pectina	27
3.5.4.1 Determinación de la actividad de la enzima pectinasa.....	28
3.5.5 Monitoreo de la oxidación de guayacol	28
3.5.5.1 Determinación de la actividad de la enzima lignina peroxidasa.	28
4. Resultados	29
4.1 Análisis de parámetros fisicoquímicos durante y después del compostaje.....	29
4.1.1 Temperatura	29
.....	29
4.1.2 Parámetros fisicoquímicos del compost maduro.....	29
4.2 Aislamiento de microorganismos.....	30
4.3 Evaluación semicuantitativa de la actividad enzimática	32
4.4 Pruebas de sinergismo y antagonismo	34
4.5 Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática.....	35

4.5.1 Monitoreo de la degradación de almidón con el aislado M2C5.....	35
4.5.2 Monitoreo de la degradación de celulosa con el aislado M2C3.....	36
4.5.2 Monitoreo de la degradación de pectina con el aislado M3C4	37
4.5.2 Monitoreo de la oxidación de guayacol con el aislado M2C3	38
5. Discusión	39
5.1 Parámetros fisicoquímicos durante y después del compostaje.....	39
5.2 Aislamiento y evaluación semicuantitativa de la actividad enzimática	40
5.3 Sinergismo y antagonismo entre las bacterias más eficientes	42
5.4 Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática con los aislados que evidenciaron actividad sinérgica.	42
6. Conclusión.....	44

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Características fisicoquímicas obtenidos tras culminar el proceso de compostaje	29
Tabla 2. Características morfológicas de las bacterias aisladas en los tres muestreos.....	31
Tabla 3. Pruebas de sinergismo y antagonismo entre los aislados M1C1, M2C1, M2C3, M3C4 y M2C5.....	34

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Esquema metodológico para determinar actividad enzimática	23
Figura 2. Metodología empleada para evaluar la interacción entre los aislados más eficientes ...	24
Figura 3. Cambios de la temperatura durante el proceso del compostaje	29
Figura 4. Diámetro de los halos de degradación formados por los aislados evaluados en cada muestreo.	32
Figura 5. Halos de degradación formados por los aislados más eficientes	34
Figura 6. Actividad sinérgica y antagónica de las bacterias M1C1, M2C1, M2C3, M3C4 y M2C5	35
Figura 7. Concentración de azúcares reductores producto de la degradación de almidón durante 120 h de fermentación	36
Figura 8. Concentración de azúcares reductores producto de la degradación de celulosa durante 120 h de fermentación	37
Figura 9. Degradación de pectina durante 120 h de fermentación.....	38
Figura 10. Producción de tetraguayacol durante 120 h de fermentación	39

Resumen

Título: Caracterización enzimática de bacterias aisladas de un compostaje doméstico con potencial aplicación en el aprovechamiento de residuos orgánicos*

Autor: Silvia Daniela Toloza Sandoval**

Palabras Clave: Celulosa, lignina, Pectina, Almidón, hidrólisis enzimática, compost, microorganismos

Descripción: La explosión demográfica en Colombia ha dado lugar a un mayor volumen de residuos orgánicos de origen doméstico que son depositados masivamente en rellenos sanitarios, donde se producen gases de efecto invernadero y lixiviados que afectan negativamente los ecosistemas. Además, debido a las toneladas que reciben al año y a su inadecuada gestión, aproximadamente el 31% de estos rellenos sanitarios se encuentran en sus últimos años de vida útil, lo que hace un llamado a la búsqueda de estrategias que se fundamenten en el aprovechamiento de biorresiduos y en la protección del medio ambiente. Por tal motivo, estudiar la degradación de materia orgánica que ocurre en el compostaje doméstico es una opción viable, ya que en este actúan microorganismos, fundamentalmente bacterias, que secretan enzimas capaces de modificar los materiales orgánicos hasta formar un biofertilizante. En este contexto, esta investigación tuvo como objetivo aislar, caracterizar e identificar bacterias procedentes de un compostaje doméstico, con miras hacia el aprovechamiento de los residuos orgánicos. Para llevarlo a cabo, inicialmente se construyó un sistema de compostaje doméstico controlado, a partir del cual se aislaron bacterias mediante tres muestreos realizados cada 30 días. Posteriormente, se evaluó la actividad pectinolítica, celulolítica, amilolítica y ligninolítica mediante la ejecución de pruebas semicuantitativas y se seleccionaron los aislamientos más eficientes en cada actividad. Con estos aislados, se realizaron pruebas de sinergismo y antagonismo encaminadas hacia la formación de un consorcio microbiano. Por último, con los microorganismos que interactuaron sinérgicamente, se procedió a cuantificar la actividad enzimática pectinasa, celulasa, amilasa y peroxidasa, mediante pruebas espectrofotométricas. Como resultado, se hallaron en total 15 aislados bacterianos, tres de ellos: M2C3, M3C4, y M2C5, evidenciaron las mayores actividades en la degradación de celulosa y lignina, pectina y almidón, respectivamente. Estos mismos aislados demostraron actividades sinérgicas entre sí, por lo que podrían ser utilizados para formar consorcios bacterianos implicados en la optimización del compostaje.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Biología. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Título. Doctor en Química. Codirector: Inés Hernández Celi. Máster en Ciencias Biomédicas.

Abstract

Title: Enzymatic characterization of bacteria isolated from home composting with potential application in organic waste utilization *

Author(s): Silvia Daniela Toloza Sandoval**

Key Words: Cellulose, lignin, Pectin, starch, enzymatic hydrolysis, compost, microorganisms

Description: The population explosion in Colombia has resulted in a greater volume of organic waste of domestic origin that is massively deposited in sanitary landfills, where greenhouse gases and leachates are produced that negatively affect ecosystems. In addition, due to the tons received per year and their inadequate management, approximately 31% of these landfills are in their last years of useful life, which calls for the search for strategies based on the use of bio-waste and environmental protection. For this reason, studying the degradation of organic matter that occurs in domestic composting is a viable option, since microorganisms act in this process, mainly bacteria, which secrete enzymes capable of modifying organic materials to form a biofertilizer. In this context, the objective of this research was to isolate, characterize and identify bacteria from home composting, with a view to the utilization of organic waste. To do so, a controlled home composting system was initially constructed, from which bacteria were isolated by means of three samples taken every 30 days. Subsequently, pectinolytic, cellulolytic, amylolytic and ligninolytic activity was evaluated by means of semi-quantitative tests and the most efficient isolates in each activity were selected. With these isolates, synergism and antagonism tests aimed at the formation of a microbial consortium were carried out. Finally, with the microorganisms that interacted synergistically, pectinase, cellulase, amylase and peroxidase enzymatic activity was quantified by spectrophotometric tests. As a result, a total of 15 bacterial isolates were found, three of them: M2C3, M3C4, and M2C5, showed the highest activities in the degradation of cellulose and lignin, pectin and starch, respectively. These same isolates showed synergistic activities with each other, so they could be used to form bacterial consortia involved in the optimization of composting.

* Degree Work

**Faculty of Sciences. School of Biology. Biology. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Doctor in Chemistry. Co-director: Inés Hernández Celi. Master in Biomedical Sciences.

Introducción

El continuo aumento de los desechos sólidos supone un problema de contaminación con impacto social, ambiental y económico (Superintendencia de Servicios Públicos Domiciliarios [SSPD], 2021). A nivel mundial, se generan 2100 millones de toneladas de residuos sólidos al año y se estima que la cantidad aumentará en un 70%, pues se alcanzarán los 3500 millones de toneladas al año en el 2050 (Kaza *et al.*, 2018).

En muchos países los residuos orgánicos representan un porcentaje considerable, en China e India el 50% de los residuos sólidos corresponde a materia orgánica, mientras que en Suiza, los residuos orgánicos representan el 30% (Kaza *et al.*, 2018). En el caso de Colombia, de las 13.8 millones de toneladas de residuos sólidos que se producen al año, el 61.5% corresponden a residuos orgánicos (Consejo Nacional de Política Económica y Social [CONPES], 2016).

Es importante destacar que más de la mitad de los residuos orgánicos se depositan en rellenos sanitarios, donde se descomponen y, al reaccionar con compuestos inorgánicos, producen gases de efecto invernadero que contribuyen al incremento de la temperatura promedio de la atmósfera (Aristizábal *et al.*, 2015) Adicionalmente, dado que en estos vertederos se generan lixiviados que se depositan en suelos y por percolación llegan a aguas subterráneas potables, su acumulación afecta directamente la salud humana. De hecho, también se ha evidenciado un incremento de moscas, roedores e insectos que funcionan como vectores de enfermedades como malaria y dengue (Guerra, 2014).

Por otro lado, La Superintendencia de Servicios Públicos Domiciliarios (2021) informó que, de los 266 vertederos sanitarios del país, el 31% se encuentran vencidos o en sus últimos años de vida útil: 18 sitios cuentan con vigencia vencida; 30 tienen una vida útil entre 0 y 3 años; y 34 entre 0 y 6 años. Dentro de estos destacan rellenos sanitarios regionales que reciben los residuos

de los municipios aledaños. Por ejemplo, Doña Juana, en Bogotá, tiene una vigencia de 2 años aproximadamente, mientras que La pradera, en Antioquía, cuenta con alrededor de 3 años de vida útil (SSPD, 2021). En Santander, los residuos generados en el área metropolitana de Bucaramanga han sido destinados al Carrasco, vertedero que posee una licencia vencida y el cual se ha declarado cinco veces en estado de emergencia sanitaria, siendo la última en el año 2020, donde se estableció como fecha límite el 22 de octubre de 2022. No obstante, continuará funcionando durante 24 meses más (Decreto 0153 de la Alcaldía de Bucaramanga, 2022), pese al daño ambiental y social ocasionado.

Con lo anterior, se reconoce que la extensión de la vigencia de los vertederos no debe ser considerada como una posible solución, pues la acumulación de residuos orgánicos afecta cada vez más los ecosistemas. En su lugar, se evidencia la necesidad de estrategias que promuevan el manejo adecuado de los biorresiduos y que interioricen los principios enmarcados en la economía circular (Sulewski *et al.*, 2021). Una de las alternativas que se han propuesto como método de eliminación y valorización de los residuos orgánicos es el compostaje, mediante el cual se transforma aeróbicamente la materia orgánica en productos que pueden ser usados como abono natural (Sánchez *et al.*, 2017).

El compostaje doméstico se ha efectuado en gran medida en países desarrollados como el Reino Unido, en donde el 40% de los hogares que poseen huertas lo llevan a cabo (Sulewski *et al.*, 2021). En contraste, en Colombia no es muy frecuente, pues se prioriza el vertido en rellenos sanitarios y en vertederos ilegales a cielo abierto (Kaza *et al.*, 2018). Esto ocurre a pesar de que la implementación del compostaje supone una opción viable que puede ser realizada por personas del común, que les permite deshacerse de los residuos orgánicos que generan en sus actividades cotidianas, mientras obtienen un material que funciona como biofertilizante y que reemplaza el uso

de fertilizantes químicos al mejorar la textura, estructura, aireación y capacidad de retención de agua de los suelos (Unidad Administrativa Especial de Servicios Públicos [UAESP], 2018).

Dicho procedimiento es llevado a cabo por microorganismos como hongos y bacterias, estas últimas destacan debido a su abundancia durante el compostaje y a su versatilidad metabólica (Ma *et al.*, 2020). De hecho, se han realizado investigaciones en las que se aprovecha el potencial enzimático de estirpes bacterianas aisladas de un compost, para mejorar la degradación de materia orgánica y acelerar el compostaje. Por ejemplo, Oviedo-Ocaña *et al.* (2022) concluye en su estudio que la adición de microorganismos de los géneros *Brevibacillus* y *Paenibacillus* disminuyó el tiempo de compostaje en 13 días y contribuyó a obtener un producto más estable.

Por lo anterior, el microbioma del compostaje merece especial atención, pues su estudio permitirá comprender y optimizar dicho proceso, lo que contribuiría a contrarrestar los impactos negativos generados por la acumulación de residuos orgánicos (Gao *et al.*, 2021). Por tal motivo, en la presente investigación se llevó a cabo el aislamiento y caracterización enzimática de bacterias presentes en un compostaje doméstico, para explorar su potencial biológico en procesos de degradación de materia orgánica, en busca de contribuir en la producción de compostas de manera más eficiente y proponer alternativas de mitigación frente al creciente problema de los residuos orgánicos. Para la ejecución del proyecto, se pretendió responder el siguiente interrogante: ¿es posible emplear aislados del microbioma de un compostaje para biopolímeros constituyentes de la materia orgánica?

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad enzimática de las bacterias procedentes de un compostaje doméstico para degradar materia orgánica.

1.2 Objetivos Específicos

Obtener aislados bacterianos a partir de un compostaje doméstico controlado.

Seleccionar las bacterias con mayor capacidad degradativa amilolítica, celulolítica, ligninolítica y pectinolítica.

Determinar sinergismo y antagonismo entre los aislados más eficientes

Evaluar la actividad biológica de los microorganismos de interés para degradar lignina, pectina, celulosa y almidón a escala de laboratorio.

2. Marco teórico

2.1 Compostaje doméstico

El compostaje doméstico es un procedimiento mediado por microorganismos en el que se transforman aeróbicamente los residuos orgánicos generados en el hogar, en un producto que puede ser usado como abono natural (Sánchez *et al.*, 2017).

Esta práctica se ha extendido por todo el mundo. En Suecia, entre 2011 y 2014 se estimó que el 16% de los residuos alimentarios eran destinados al compostaje doméstico (Ermolaev *et al.*, 2014). Además, en Reino Unido aproximadamente el 40% de los hogares que poseen huertas efectúan dicho procedimiento. De manera similar, en los Países bajos se calcula que entre el 5 y el 10% de las residencias lo llevan a cabo (Sulewski *et al.*, 2021).

En Colombia, a pesar de ser una práctica poco frecuente (UAESP, 2018), en el municipio San Francisco de Sales (Cundinamarca) desde el 2017 se ha implementado el compostaje para el aprovechamiento del 10% de los residuos orgánicos del municipio; generados en fruveros y restaurantes (Comité Técnico Interinstitucional De Educación Ambiental, 2020).

2.2 Aplicaciones del compostaje

El compost mejora la fertilidad de los suelos y favorece el crecimiento de las plantas. Además, contrarresta los efectos de la erosión al aumentar la capacidad del suelo de retener agua y repone los nutrientes que se perdieron en dicho fenómeno (Gonawala & Jardosh, 2018). Adicionalmente, los microorganismos que se encuentran en las compostas contribuyen a la remoción de metales pesados a través de la adsorción biológica, la precipitación extracelular y la mineralización (Zhou *et al.*, 2020).

2.3 Microorganismos en el compostaje

Durante el compostaje se pueden observar ácaros, hormigas y escarabajos, organismos que descomponen físicamente los residuos orgánicos, rompiendo los materiales en trozos más pequeños que continúan siendo visibles. No obstante, los microorganismos, tales como hongos, protozoos y bacterias juegan un rol más relevante en la formación del compost, debido a su capacidad de transformar químicamente la materia orgánica en moléculas más simples (Sánchez *et al.*, 2017).

2.3.1 Actinobacterias

En la degradación de materia orgánica actúan tanto hongos como bacterias; sin embargo, estas últimas destacan porque no presentan limitaciones en su actividad durante ninguna etapa del compostaje (Wei *et al.*, 2012). Dentro de estos microorganismos, dominan las actinobacterias, un grupo de bacterias Gram positivas que presentan morfología filamentosa, similar al micelio de un hongo y que se caracterizan por ser responsables del olor del suelo (Parada *et al.*, 2017). Estos microorganismos soportan diferentes rangos de pH y temperatura, por lo que se encuentran activas en todas las fases del compostaje (Sánchez *et al.*, 2017). Algunas de las especies que se hallan con más frecuencia son *Actinobifida chromogena*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Micromonospora carbonacea*, *Streptomyces spp.*, entre otras (Sánchez *et al.*, 2017).

2.3.2 Hidrólisis enzimática de biomoléculas

Teniendo en cuenta que las bacterias degradan material orgánico mediante la síntesis de enzimas hidrolíticas extracelulares, a continuación, se mencionan las macromoléculas que constituyen más del 50% de la materia orgánica total (Bernal *et al.*, 2017) y las enzimas implicadas en su degradación.

2.3.2.1 Almidón. Es un homopolisacárido compuesto de glucosa que cumple un rol fundamental en la reserva de carbohidratos en las plantas. Su estructura consta de dos fracciones: La amilosa (10-30%), un polímero lineal de bajo peso molecular ($1.03 - 4.89 \times 10^5$ Da) compuesto de monómeros de glucosa unidos mediante enlaces α -1,4 glucósidos, y la amilopectina (70-80%), cuyo peso molecular es más alto ($7.08 - 9.88 \times 10^7$ Da) y posee ramificaciones debido los enlaces α -1,6 glucosídicos a partir de los cuales se unen los monómeros (Cornejo *et al.*, 2018).

En la degradación del almidón intervienen tres tipos de enzimas que se diferencian entre sí de acuerdo con la manera en la que actúan sobre los enlaces glucosídicos. La α -amilasa (EC 3.2.1.1), una enzima dependiente de calcio ataca los enlaces internos de la amilosa y la amilopectina para generar maltosa, maltotriosa y dextrina límite. Por otro lado, la β -amilasa (EC 3.2.1.2) actúa sobre el penúltimo enlace α -1,4 de los extremos no reductores de la amilosa y libera principalmente maltosa y dextrina límite. Adicionalmente, la γ -amilasa (EC 3.2.1.3) hidroliza los últimos enlaces α -1,4 y α -1,6 de la amilosa y la amilopectina para producir glucosa (Tiwari *et al.*, 2015).

2.3.2.2 Pectina. Es un heteropolisacárido que se encuentra en la pared celular y en la savia de la mayoría de angiospermas, confiriéndoles integridad estructural, resistencia y flexibilidad (Nasrollahzadeh *et al.*, 2021). Está compuesta principalmente por cadenas de alrededor de 300-1000 unidades de ácido galacturónico esterificado con grupos metilo unidos entre sí a partir de enlaces α -1,4 glucósidos. También posee ramnosa, galactosa, arabinosa y xilosa en las cadenas laterales, por lo que se considera un polímero ramificado (Mohnen, 2008).

En la hidrólisis de este polímero participan múltiples enzimas con diferentes especificidades. Por ejemplo, las poligalacturonasas, que a su vez se dividen en endopoligalacturonasa (EC 3.2.1.15) y la exopoligalacturonasa (EC 3.2.1.67), las cuales hidrolizan

la cadena lineal de ácido poligalacturónico en las posiciones internas y externas para reducir la longitud del dicho polímero. El segundo grupo lo conforman las pectinesterasas (EC 3.1.1.11), que catalizan la ruptura de los ésteres metilados para producir ácido péctico y metanol. Finalmente, las pectín liasas (EC 4.2.2.10) catalizan la ruptura de los enlaces α -1,4 glucósidos mediante β -eliminación, generando monómeros de ácido galacturónico con un enlace insaturado entre los carbonos cuatro y cinco (Abbott & Boraston, 2008).

2.3.2.3 Celulosa. Es el polisacárido más abundante del planeta, constituyendo más del 50% de los carbohidratos presentes en la pared celular de la mayoría de plantas (Chang *et al.*, 2009). Está conformado por monómeros de glucosa, unidos entre sí a partir de enlaces β -1,4-glucosídicos (Ortiz, 2014). Este homopolisacárido es degradado en su totalidad debido a la acción de tres enzimas celulolíticas sintetizadas por microorganismos: la endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4), que escinde la cadena en posiciones internas y aleatorias, la celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), una exocelulasa que corta progresivamente los extremos de la celulosa, liberando celobiosa y la β -glucosidasa (EC 3.2.1.21), cuya función es romper los enlaces de la celobiosa para obtener azúcares libres (Wu *et al.*, 2022).

2.3.2.4 Lignina. Es un polímero aromático que conforma alrededor del 30% de los tejidos leñosos de las plantas, proporcionándoles rigidez, impermeabilidad y protección (Ortiz, 2014). Está conformado por grupos fenólicos, tales como guayacilo, siringilo e hidroxifenilo (Lee *et al.*, 2019). Además, es insoluble en agua y es ópticamente inactivo, lo que dificulta su degradación (Ortiz, 2014), la cual, a pesar de que se ha documentado esencialmente en hongos, estudios actuales resaltan el rol de las bacterias en este proceso. Dentro de estas últimas, destacan actinobacterias como *Enterobacter lignolyticus*, *Streptomyces viridosporus*, *S. paucinobilis* y *Rhodococcus jostii* debido a su capacidad de producir enzimas extracelulares, siendo la más estudiada la lacasa (EC

1.10.3.2), lignina peroxidasa (EC 1.11.1.14) y manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13) (Janusz *et al.*, 2017)

La lacasa es una proteína que contiene átomos de cobre en su centro activo y utiliza oxígeno molecular para oxidar moléculas fenólicas (Gedikli *et al.*, 2010), mientras que las peroxidases pertenecen al grupo de las hemoproteínas debido a la presencia de ferriprotoporfirina IX como grupo prostético y catalizan la oxidación de sustratos fenólicos mediante la reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Mika & Lüthje, 2003)

2.4 Estado del arte

Tras el aumento de los residuos sólidos depositados masivamente en los vertederos y los efectos nocivos a la salud que la acumulación de estos ocasionaba, en India, en el año 1933, Robert Howard (1933) propuso el compostaje como una estrategia encaminada al aprovechamiento de los residuos orgánicos. Desde entonces, su estudio ha venido aumentando, pues solo en el año 2021, según las métricas de Scopus, se publicaron aproximadamente 90 artículos científicos enfocados en el rol de las bacterias durante dicho proceso. A continuación, se mencionan algunos de los recientes estudios.

Y. Wang *et al.* (2020) centraron su estudio en identificar las bacterias que con mayor frecuencia se aislaban de compostas. Para ello, estudiaron el microbioma de 116 muestras de compost recolectadas en diferentes provincias de China y, mediante la secuenciación del gen bacteriano ARNr 16S, determinaron que más de 90% de los géneros hallados pertenecían a los filos Firmicutes y Actinobacteria.

Adicionalmente, en la investigación de S. Wang *et al.* (2021), se tuvo en cuenta que la biomasa lignocelulósica es muy resistente a la degradación enzimática y se propuso la adición del anión radical sulfato (SO₄⁻²), generado por activación térmica del persulfato (>50 °C), como

promotor de este proceso. En el estudio, los resultados mostraron que en las compostas en las que se añadió dicho compuesto, la tasa de degradación de lignocelulosa incrementó en un 3% y la de formación de sustancias húmicas en un 6%, mejorando su calidad.

Por otra parte, se planteó la posibilidad de añadir microorganismos para acelerar el proceso de compostaje. Un ejemplo de ello es el trabajo llevado a cabo por Gao *et al.* (2021), en el que se halló que una dosis de 0.9% de un inoculante bacteriano mejoró la degradación del material orgánico y la humificación. Además, se encontró que dichas bacterias inhibieron la proliferación de organismos anaerobios que realizan fermentación orgánica y respiración de nitratos, lo que condujo a una disminución de entre el 11% y el 54% de las emisiones de gases de efecto invernadero. Asimismo, en la investigación de Zhao *et al.* (2022), se determinó que la adición de bacterias de los géneros *Brevibacillus* y *Paenibacillus* prolongó la fase termófila 2.8 veces e incrementó la degradación de lignocelulosa 1.2 veces

Por otro lado, Ortega-Torres *et al.* (2021) propusieron la adición directa de enzimas, en lugar de bacterias, dado que se ha encontrado que los microorganismos cultivados en el laboratorio exhiben poca adaptación a las condiciones ambientales cuando el compost es aplicado como abono. Por tal motivo, añadieron fosfatasas y fitasas de *Pseudomonas aeruginosa* a un compost de estiércol de vaca, con las que se evidenció un aumento de fósforo del 94.8%, en comparación con las compostas sin dichas enzimas, y un incremento del 20% con las tratadas con cultivo bacteriano.

En todos los reportes anteriormente expuestos, se evidencia la importancia que tienen los microorganismos en el compostaje, así como su potencial biotecnológico en el desarrollo, aplicación y aprovechamiento de los residuos derivados de procesos agroindustriales y domésticos, lo que aporta a la búsqueda de alternativas que contribuyan a mitigar el impacto negativo generado

por la acumulación de basuras y su consecuente contaminación en el ambiente, para que al mismo tiempo, puedan enfocarse en el interés dirigido hacia una economía sostenible para la sociedad.

3. Materiales y métodos

3.1 Diseño del sistema de compostaje

Tomando en cuenta las instrucciones que plantea Román *et al.* (2013) en el Manual de Compostaje del Agricultor, se seleccionó un recipiente de polipropileno de 100 L (73 cm x 60 cm x 56 cm), en el que se adicionaron 8.5 Kg de materia orgánica distribuidos con los siguientes porcentajes con el propósito de mantener una proporción de C:N ideal (30:1) : residuos de frutas y verduras (29%), hojas secas de *Tabebuia rosea* (35%), hojas verdes de *Tabebuia rosea* (12%), restos de césped fresco (12%) y restos de césped seco (12% y una solución de melaza 5% (v/v). Los materiales se fragmentaron en trozos de 10-15 cm aproximadamente. Además, durante 120 días de compostaje se realizaron volteos y se tomaron medidas de temperatura cada 20 días. Finalmente, al compost resultante se le realizó un análisis fisicoquímico en el Laboratorio Químico de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander.

3.2 Aislamiento de microorganismos

Se realizaron 3 muestreos correspondientes al día 30, 60 y 90 del compostaje (Chadna *et al.*, 2013). En cada uno se tomaron 5 submuestras de 6 g en distintos lugares de la pila de compostaje y se mezclaron hasta obtener una muestra homogénea de 30 g, la cual se adicionó a 270 mL de agua peptonada 0.01% (p/v). Luego, se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-3} y se sembraron las dos últimas por triplicado en un medio de cultivo con cáscara de mazorca de cacao (celulosa (8.7–12.8%), lignina (14–28%) y pectina (6–12.6%) (Campos *et al.*, 2018)); 4 g/L de almidón soluble; 1 g/L de glucosa; 0.2 g/L de extracto de levadura; 1.4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2 g/L de KH_2PO_4 ; 0.3 g/L de MgSO_4 ; 0.4 de CaCl_2 ; 1.25 g/L de CuSO_4 ; 15 g/L de sales de Wenber; 15

g/L de agar-agar y 1 mL de nistatina. Posteriormente, las cajas se incubaron a 30 °C y después de 72 h se transfirieron las unidades formadoras de colonias (UFC), diferenciadas por morfotipos, a otras placas para obtener colonias axénicas.

3.3 Evaluación semicuantitativa de la actividad enzimática

3.3.1 Ajuste de la población bacteriana

Previo a los ensayos semicuantitativos, se ajustó la población bacteriana utilizando como estándar de turbidez la escala de McFarland N° 1 (3.0×10^8 UFC) (McFarland, 1907).

3.3.2 Actividad amilolítica

Se adicionaron 10 µL del inóculo (sección 3.3.1) correspondiente a cada aislado en medios con almidón (0.06 g/L peptona, 0.5 g/L de $MgSO_4$, 0.5 g/L de KCl, 15 g/L de agar-agar, y 10 g/L almidón, pH 7.0). Posteriormente, se incubaron a 30° C y después de 72 h las placas se trataron con Lugol 1% (*p/v*). Finalmente, se observó si se formaba un halo de hidrólisis alrededor de cada colonia y se calculó la relación entre el diámetro del halo y el diámetro de la colonia (Ver Figura 1) (Castelblanco *et al.*, 2020).

3.3.3 Actividad celulolítica

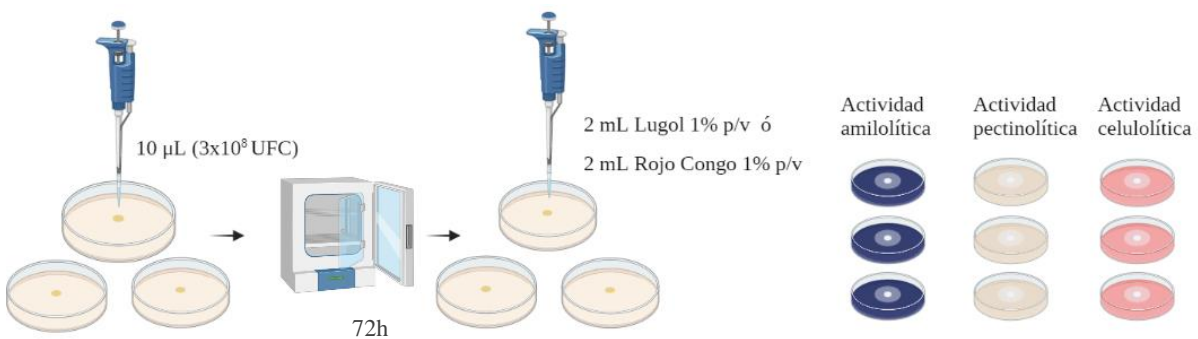
Siguiendo la metodología empleada por Paillié (2012), se sembraron 10 µL de inóculo (sección 3.3.1) correspondiente a cada aislado en medios para organismos celulolíticos (1 g/L de NH_4Cl , 1 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 g/L KH_2PO_4 , 0.4 g/L de $CaCl_2$, 0.1g/L de $MgSO_4 + 7H_2O$, 15 g/L agar-agar, 0.5 g/L de glucosa y 10 g/L de carboximetilcelulosa, pH 7.0). Los medios se incubaron a 30 °C y después de 72 h se adicionó Rojo Congo 0.1% (*p/v*) sobre las colonias, cuyo excedente se retiró luego de 15 minutos al agregar 2 mL de NaCl 0.1 M. Posteriormente, las cajas se llevaron a la nevera y se incubaron durante 24 h. Finalmente, se calculó el diámetro del halo en los aislados que hidrolizaron la carboximetilcelulosa (Ver Figura 1).

3.3.4 Actividad pectinolítica

Se tomaron 10 μL del del inóculo (sección 3.3.1) correspondiente a cada aislado y se adicionaron en medios con pectina (3 g/L de KH_2PO_4 , 6 g/L de Na_2HPO_4 , 2 g/L de NH_4Cl , 5 g/L de NaCl , 0.1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/L de agar-agar, 0.5 g/L de glucosa y 2 g/L de pectina, pH 7.0). Luego de 72 h de incubación, se adicionaron 2 mL de Lugol (*p/v*) sobre las colonias y se midió el halo traslúcido como producto de la hidrólisis de pectina, como se ilustra en la Figura 1 (Kabir & Tasmin, 2019)

Figura 1

Esquema metodológico para determinar actividad enzimática



Nota. Para relevar el halo producto de la degradación de almidón y pectina se usó Lugol 1% (*p/v*), mientras que para la actividad celulolítica se empleó Rojo Congo 0.1% (*p/v*).

3.3.5 Actividad ligninolítica

Se adicionaron 10 μL del inóculo (sección 3.3.1) correspondiente a cada aislado en medios de cultivo con guayacol (1 g/L de KH_2PO_4 , 0.5 g/L de K_2HPO_4 , 0.4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 g de KNO_3 , 0.15 g/L de MgCl_2 , 0.025 g/L de CaCl_2 , 0.002 g/L de FeCl_3 , 15 g/L de agar-agar, 0.5 g/L de glucosa y guayacol al 0.06% (*p/v*), pH 7.0). Luego de 5 días de incubación a 30 $^\circ\text{C}$, se midió el halo color rojizo producto de la oxidación del guayacol (Paillié, 2012).

3.3.6 Selección de bacterias con mayor potencial

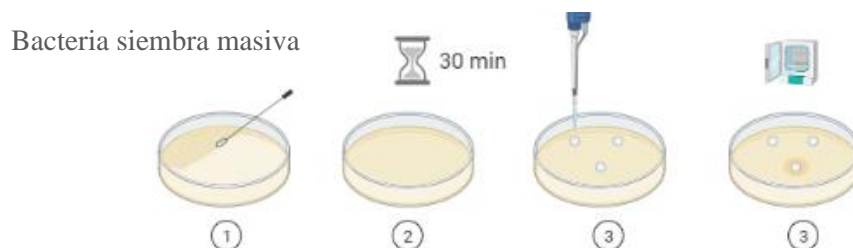
Se utilizaron tres réplicas en cada una de las pruebas de degradación. Los datos fueron sometidos a pruebas de hipótesis de homogeneidad de varianza y distribución normal, con un nivel de confianza del 95%. Posteriormente, se efectuaron análisis de una vía (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre las medias obtenidas para cada uno de los aislados que realizaron una misma actividad. Finalmente, se determinó el aislado más eficiente tanto en la degradación de almidón, como en la de pectina, celulosa y lignina.

3.4 Pruebas de sinergismo y antagonismo

En primer lugar, se seleccionaron los cuatro aislados que evidenciaron halos con mayor diámetro en cada una de las actividades y se realizó un patrón 1.0 MacFarland. Posteriormente, como se ilustra en la Figura 2, se efectuó una siembra en superficie de cada uno en Agar nutritivo, empleando un hisopo estéril para extender uniformemente la suspensión microbiana en la caja Petri. Luego de 30 min, se inocularon gotas de 10 μ L de los aislados restantes sobre discos de papel filtro que se ubicaron sobre la superficie del aislado previamente sembrado. Finalmente, las cajas se incubaron durante 48 h a 30 °C y se registró la formación de un halo traslúcido alrededor de la colonia producto del antagonismo microbiano (Ismail *et al.*, 2016).

Figura 2

Metodología empleada para evaluar la interacción entre los aislados más eficientes



Nota. Las siembras se realizaron por triplicado con cada uno de los aislados seleccionados.

3.5 Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática

Con el propósito monitorear la degradación de cada una de las biomoléculas evaluadas en este estudio a lo largo de 120h y de determinar la actividad enzimática de cada uno de los aislados, se prepararon medios líquidos con almidón soluble (0.06 g/L peptona, 0.5 g/L de MgSO₄, 0.5 g/L de KCl y 10 g/L almidón, pH 7.0), alfa-celulosa (1 g/L de NH₄Cl, 1 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0.1 g/L KH₂PO₄, 0.4 g/L de CaCl₂, 0.1g/L de MgSO₄ + 7H₂O y 10 g/L de alfa-celulosa, pH 7.0), pectina (3 g/L de KH₂PO₄, 6 g/L de Na₂HPO₄, 2 g/L de NH₄Cl, 5 g/L de NaCl, 0.1 g/L de MgSO₄ · 7H₂O y 2 g/L de pectina, pH 7.0) y guayacol (1 g/L de KH₂PO₄, 0.5 g/L de K₂HPO₄, 0.4 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0.2 g de KNO₃, 0.15 g/L de MgCl₂, 0.025 g/L de CaCl₂, 0.002 g/L de FeCl₃ y guayacol al 0.06% (*p/v*), pH 7.0) como principales fuentes de carbono. Adicionalmente, se preparó una suspensión de cada aislado equivalente en turbidez a 1.0 de la escala McFarland y se adicionaron 6 mL de esta última a 114 mL de tres medios de cultivos con las condiciones descritas a continuación:

- 1) la fuente de carbono de estudio: almidón, celulosa, pectina y lignina.
- 2) la fuente de carbono de estudio más glucosa 0.5 g/L
- 3) glucosa 0.5 g/L como única fuente de carbono

Se realizaron tres réplicas técnicas y biológicas de cada experimento y se tomó como blanco medio de cultivo con las mismas condiciones de cada tratamiento y sin microorganismo. Para realizar los ensayos descritos a continuación, los cultivos se incubaron en agitación (150 rpm) a 30 °C y cada 24 h durante 120h se tomaron muestras de 2 mL que se centrifugaron a 8000 rpm durante 8 minutos.

3.5.1 Concentración de proteínas

Se realizó el ensayo de Bradford (Noble & Baile, 2009) para cuantificar proteínas totales producidas en los tres ensayos. Para esto, primero se elaboró una curva de calibración con soluciones patrón de albúmina, con concentraciones de 0.1 – 1.0 g/L. Después, se tomaron 5 μ L del sobrenadante de cada medio centrifugado, incluyendo el blanco, los cuales se mezclaron con 250 μ L de reactivo Bradford. Luego de 2 min, se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de microplacas Thermo Scientific.

Los datos obtenidos en esta sección se usaron para realizar el cálculo de la actividad enzimática. Para ello, se tomó como punto de referencia el tiempo (h) en los que se registró mayor concentración de proteínas tanto en los ensayos amilolíticos, como en los celulóliticos, pectinolíticos y ligninolíticos. En cada caso, el sobrenadante libre de células obtenido después de la centrifugación se utilizó como fuente de enzima cruda y se empleó como blanco el sustrato y solución buffer fosfato.

3.5.2 Concentración de glucosa

Se midió la concentración de glucosa en los tres tratamientos descritos anteriormente. Para ello, se empleó el Kit de Glucosa Oxidasa/Peroxidasa de Biosystems y el protocolo proporcionado por el mismo proveedor (Biosystems, 2011).

Se adicionaron 5 μ L del sobrenadante de cada medio de cultivo en tubos Eppendorf y se mezclaron con 500 μ L del reactivo A (Fosfatos 100 mmol/L, fenol 5 mmol/L, glucosa oxidasa > 10 U/mL, peroxidasa > 1 U/mL, 4-aminoantipirina 0,4 mmol/L, pH 7,5). Se utilizó como blanco el reactivo A y como patrón una solución de Glucosa/Urea/Creatinina incluida en el Kit. Después de 10 minutos, se leyó la absorbancia del patrón y de las muestras a 500 nm frente al blanco.

3.5.3 Monitoreo de la degradación de almidón y celulosa

Se empleó el método del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) descrito por Burgos (2018) para cuantificar la concentración de azúcares reductores producto de la degradación de almidón y celulosa. Para ello, inicialmente se construyó una curva de calibración con las siguientes concentraciones de glucosa: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 g/L. Posteriormente, cada 24 h se tomaron 167 μ L del sobrenadante de los medios de cultivo recién centrifugados y se mezclaron con 167 μ L de reactivo DNS en tubos de ensayo recubiertos con papel aluminio. Estos se calentaron en un recipiente con agua a 92 °C durante 5 minutos y se detuvo la reacción al colocar los tubos en agua fría en el transcurso de 1 minuto. Posteriormente, se adicionaron 1666 μ L de agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm en el lector de microplacas Thermo Scientific.

3.5.3.1 Determinación de la actividad de la enzima amilasa y celulasa. Se tomaron 100 μ L de la enzima cruda y se mezclaron con 900 μ L de almidón soluble 1% (p/v) disuelto en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.2). Después de 10 minutos de incubación a 30 °C se tomaron 167 μ L de la muestra a los que se le adicionó 167 μ L de DNS. Los tubos se colocaron en agua hirviendo y luego se enfriaron. Finalmente, se adicionaron 1666 μ L de agua y se leyó la absorbancia a 540 nm. La unidad de enzima se definió como la cantidad de amilasa necesaria para catalizar la formación de azúcares reductores, que es equivalente a 1 μ mol de glucosa por minuto en las condiciones de ensayo (Luang-In *et al.*, 2019).

Este procedimiento se repitió nuevamente para calcular la actividad enzimática de la celulosa. En este caso, se utilizó como sustrato alfa-celulosa 1%.

3.5.4 Monitoreo de la degradación de pectina

Se utilizó como indicador Lugol 1% (p/v) para determinar la cantidad de pectina presente en las muestras antes y después de adicionar los microorganismos. Para llevarlo a cabo, primero se

elaboró una curva de calibración con concentraciones de pectina de 0.1 a 2 g/L. Luego, cada 24 h, a 1 mL del sobrenadante de los medios de cultivo se les adicionó 50 μ L de Lugol 1% (p/v). Se dejó actuar por 2 min y se realizó la lectura de la absorbancia a 680 nm en el lector de microplacas Thermo Scientific.

3.5.4.1 Determinación de la actividad de la enzima pectinasa. Se tomaron 100 μ L de la enzima cruda y se mezclaron con 900 μ L de pectina 1% (p/v) disuelta en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.2). Las muestras se incubaron a 50°C durante 30 min y se midió la desaparición del sustrato utilizando 50 μ L de Lugol 1% (p/v). La unidad enzimática se definió como la cantidad de pectinasa necesaria para catalizar 1 μ mol de ácido galacturónico en un minuto (Flores *et al.*, 2013).

3.5.5 Monitoreo de la oxidación de guayacol

Se midió la oxidación del guayacol a partir de la formación del tetraguayacol, cuya longitud de onda de máxima absorción es 470 nm. Para ello, se tomaron muestras de 1 mL del sobrenadante del medio de cultivo cada 24 horas, y se determinó su absorbancia utilizando un espectrofotómetro con una celda de 1 cm. La concentración de tetraguayacol se calculó a partir de los datos de absorbancia, el ancho de la celda y el coeficiente de extinción (ϵ) de 26600 (470 nm) $M^{-1} cm^{-1}$ reportado en la literatura (Koduri y Tien, 1995).

3.5.5.1 Determinación de la actividad de la enzima lignina peroxidasa. Se mezclaron 7.5 mL de sustrato (7 mL de agua destilada, 0.3 mL de peróxido de hidrógeno 0.02% y 0.2 mL de guayacol 0.02%) con 7.5 mL de enzima (6 mL de buffer acetato y 1.5 mL del sobrenadante). La reacción se dejó actuar durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 470 nm en el espectrofotómetro utilizando una celda de 1 cm. La unidad enzimática se midió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de tetraguayacol (Rosa *et al.*, 2020).

4. Resultados

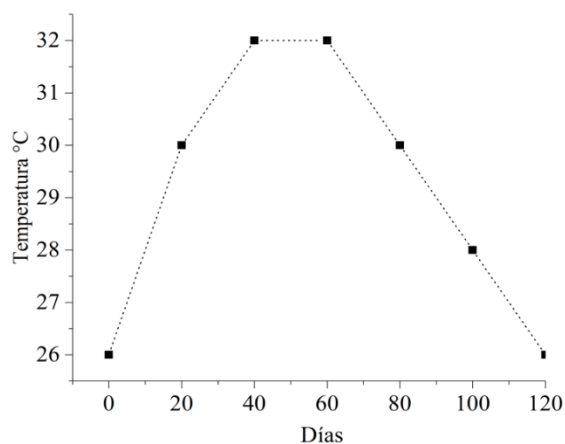
4.1 Análisis de parámetros fisicoquímicos durante y después del compostaje

4.1.1 Temperatura

Se registraron valores de temperatura cada 20 días. Se observó un aumento en los primeros 60 días y luego hubo un descenso hasta alcanzar nuevamente la temperatura ambiente.

Figura 3

Cambios de la temperatura durante el proceso del compostaje



4.1.2 Parámetros fisicoquímicos del compost maduro

Después de 120 días de compostaje, se realizó un análisis fisicoquímico donde se determinaron los valores expuestos en la Tabla 1. Dichos datos fueron comparados con valores de referencia reportados en la literatura y se encontró que la mayoría está dentro del rango permitido.

Tabla 1

Características fisicoquímicas obtenidos tras culminar el proceso de compostaje

Parámetro	Resultado	Valores óptimos
pH (Unidades de pH)	6.69	6.5 – 8.5 (Martínez <i>et al.</i> , 2013)
Relación C/N	11.6	10 – 15 (Martínez <i>et al.</i> , 2013)

Densidad (g/cm ³)	0.539	< 0.7 g/cm ³ (Martínez <i>et al.</i> , 2013)
Nitrógeno Total (% N)	3.365	1-5 % (Alurralde <i>et al.</i> , 2021)
Fósforo (% P ₂ O ₅)	0.673	0.4 – 1.2 (Alurralde <i>et al.</i> , 2021)
Potasio Total (% K ₂ O)	0.224	0.18 – 3 (Alurralde <i>et al.</i> , 2021)
Sodio (% Na)	0.022	0.02-4.10 (Alurralde <i>et al.</i> , 2021)
Calcio Total (% CaO)	0.753	1.5 – 3.5 (Sullivan <i>et al.</i> , 2018)
Magnesio Total (% MgO)	0.14	0.25-0.7 (Sullivan <i>et al.</i> , 2018)
Humedad (%)	43.49	35-50 (Sullivan <i>et al.</i> , 2018)
Azufre Total (% S)	0.147	0.25-0.8 (Sullivan <i>et al.</i> , 2018)
Cenizas (%)	2.4	< 6 (Sullivan <i>et al.</i> , 2018)
Carbono Orgánico Total Oxidable (% C)	38.99	> 15 (Sullivan <i>et al.</i> , 2018)
Cobre Total (% Cu)	0.003	0.015 (Huaman, 2020)
Zinc Total (% Zn)	0.031	0.03 (Huaman, 2020)
Hierro Total (% Fe)	0.049	0.015 (Huaman, 2020)
Manganeso Total (% Mn)	0.005	0.000291 (Huaman 2020)

Nota. Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio Químico de Consultas Industriales de la Universidad Industrial de Santander.

4.2 Aislamiento de microorganismos

Se realizaron tres muestreos que corresponden a las iniciales M1, M2 y M3 respectivamente, en cada uno se obtuvieron cinco aislados enunciados por la sigla C, diferenciados por las características morfológicas y bioquímicas planteados en la Tabla 2.

Tabla 2*Características morfológicas de las bacterias aisladas en los tres muestreos*

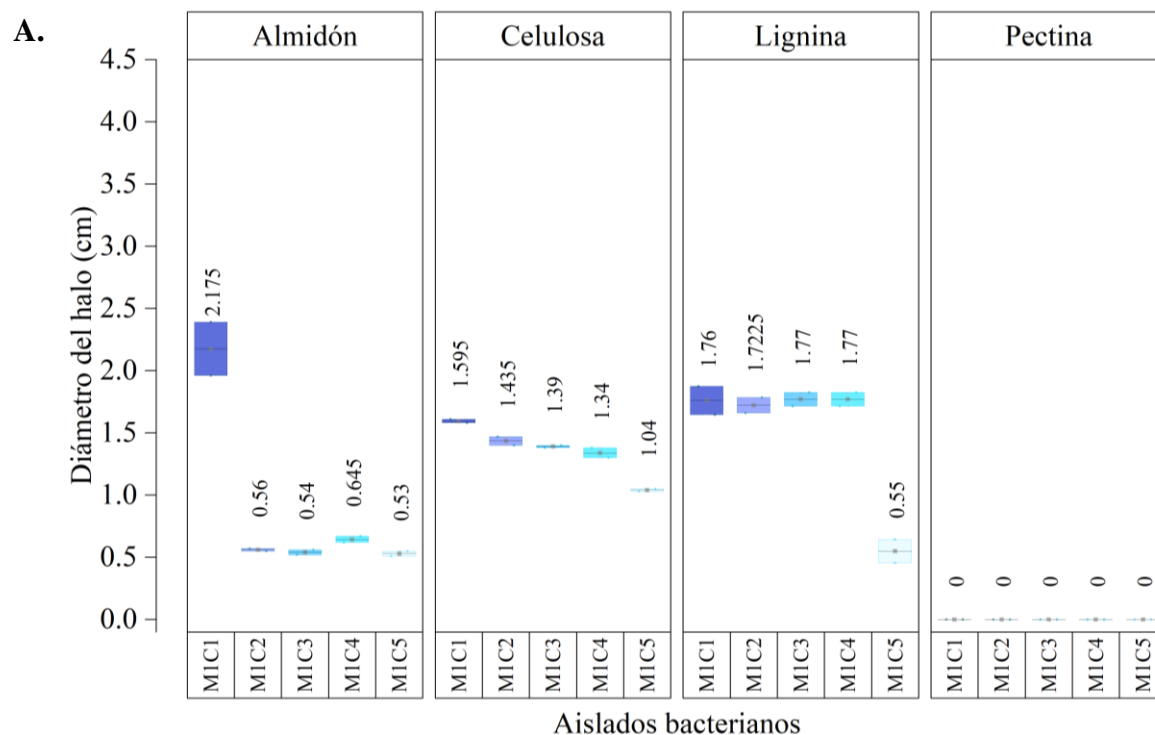
Aislado	Forma	Margen	Elevación	Textura	Color	Gram	Morfología celular
M1C1	Puntiforme	Entero	Plana	Mucoide	Beige	-	Bacilo
M1C2	Circular	Entero	Convexa	Mucoide	Beige	-	Bacilo
M1C3	Circular	Ondulado	Plana	Viscosa	Blanco	-	Bacilo
M1C4	Irregular	Entero	Convexa	Quebradiza	Marrón	-	Bacilo
M1C5	Irregular	Entero	Umbonada	Fluida	Beige oscuro	-	Bacilo
M2C1	Circular	Entero	Plana	Quebradiza	Beige	+	Bacilo
M2C2	Irregular	Entero	Plana	Quebradiza	Marrón	-	Bacilo
M2C3	Irregular	Ondulado	Plana	Fluida	Beige Claro	-	Bacilo
M2C4	Circular	Entero	Plana	Mucoide	Marrón	+	Bacilo
M2C5	Circular	Entero	Umbonada	Viscosa	Beige	-	Bacilo
M3C1	Circular	Entero	Plana	Cremosa	Beige claro	+	Bacilo
M3C2	Irregular	Ondulado	Convexa	Viscosa	Marrón	-	Bacilo
M3C3	Puntiforme	Entero	Plana	Quebradiza	Beige	-	Bacilo
M3C4	Circular	Entero	Umbonada	Viscosa	Beige	-	Bacilo
M3C5	Circular	Entero	Plana	Mucoide	Beige	+	Bacilo

4.3 Evaluación semicuantitativa de la actividad enzimática

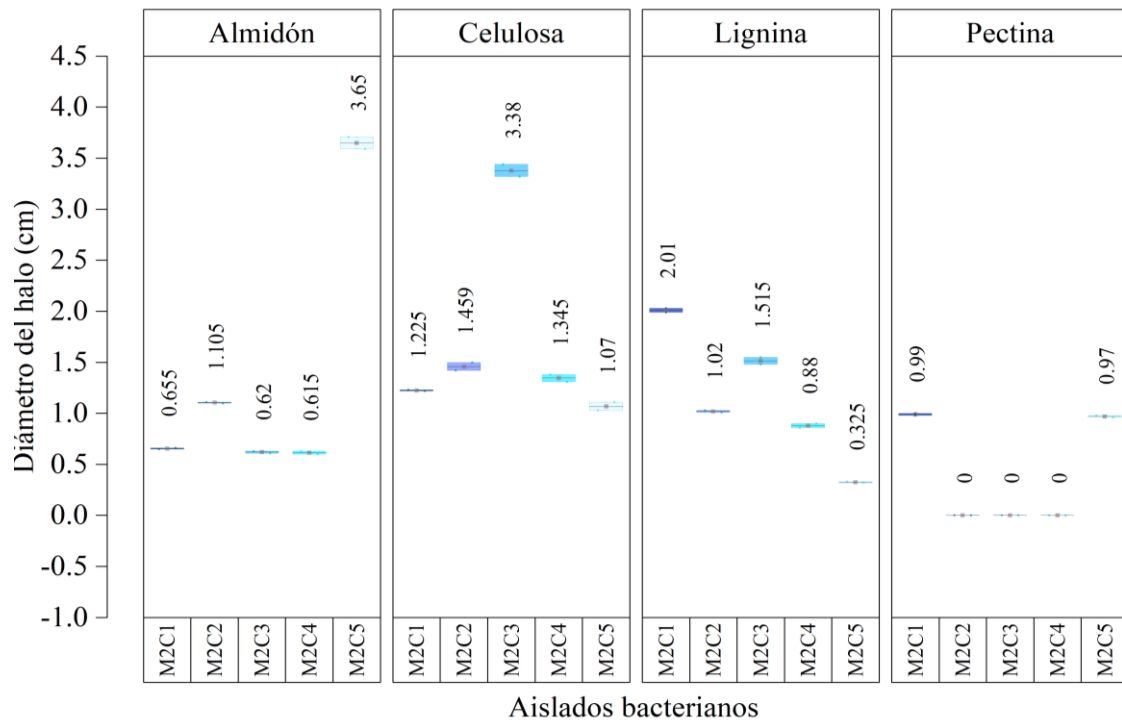
En el primer muestreo todos los microorganismos aislados formaron halos de hidrólisis como indicativo de la degradación de almidón, celulosa y lignina. Sin embargo, no se evidenció actividad pectinolítica (Ver Figura 4.A). Por otra parte, en el muestreo 2 (Ver Figura 4.B) se encontraron valores para todas las actividades y los halos de hidrólisis tuvieron mayor diámetro con respecto a los hallados en el primer y último muestreo (Ver Figura 4.C). Dentro de estos valores destacan los halos de degradación de celulosa (M2C3) y almidón (M2C5), cuyos diámetros oscilaron entre 4 cm aproximadamente (Ver Figura 5). Durante el tercer muestreo, se pudo observar que M3C4 presentó los halos de hidrólisis de pectina con mayor diámetro de todos los aislados evaluados en este estudio.

Figura 4

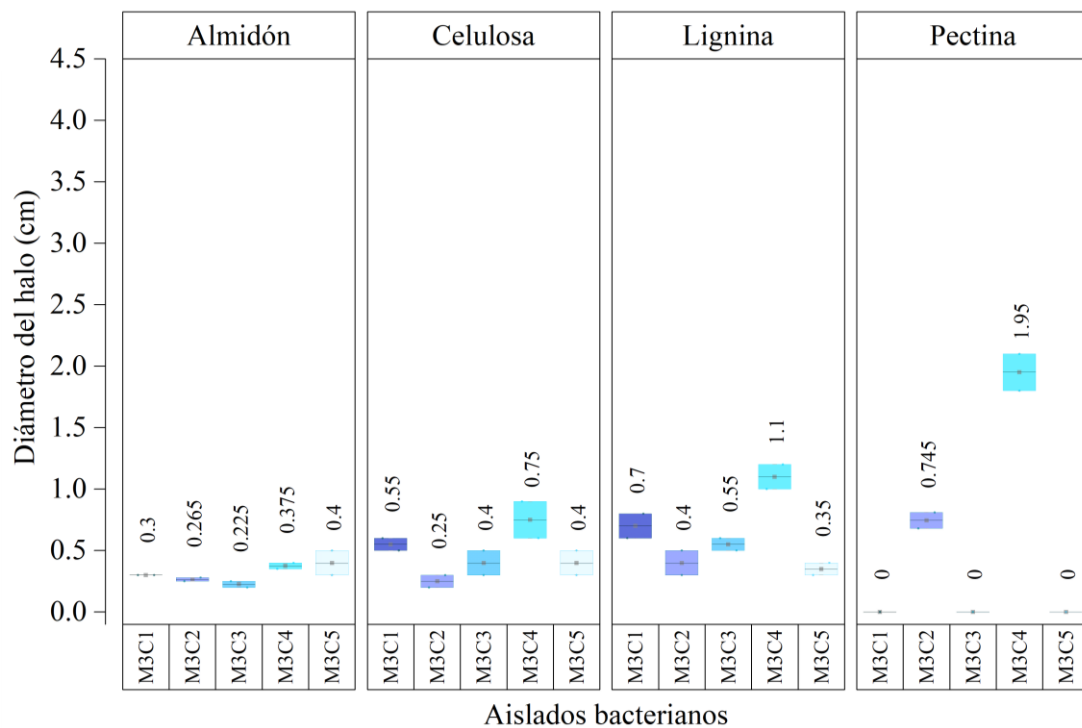
Diámetro de los halos de degradación formados por los aislados evaluados en cada muestreo.



B.



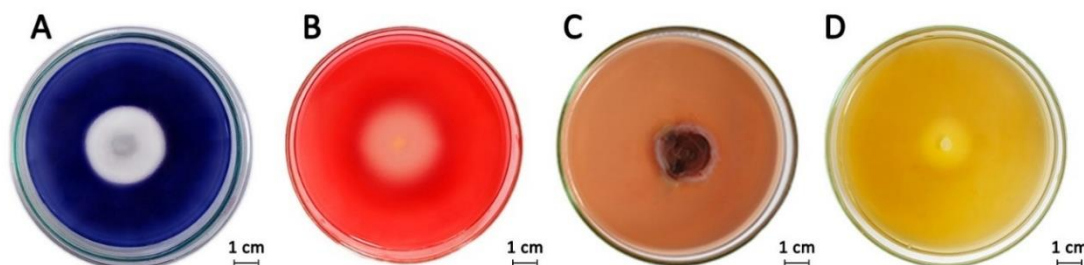
C.



Nota. En A) se exponen los diámetros de los halos calculados en el muestreo 1, en B) los del muestreo 2 y en C) los del muestreo 3.

Figura 5

Halos de degradación formados por los aislados más eficientes



Nota. En A) se presenta en aislado M2C5, que demostró mejor capacidad para degradar almidón. En B) M2C3 en la degradación de celulosa, en C) M2C1 en la oxidación del guayacol y en D) M3C4 en la degradación de pectina.

4.4 Pruebas de sinergismo y antagonismo

Para las pruebas de sinergismo y antagonismo se seleccionaron los aislados que degradaron en mayor proporción lignina (M2C1), celulosa (M2C3), pectina, (M3C4) y almidón (M2C5). Asimismo, se incluyó el aislado M1C1 debido a que, en promedio, fue el que presentó una mayor capacidad de degradación de todas las biomoléculas mencionadas anteriormente.

Se encontró que las bacterias M2C3, M3C4 y M2C5 interactuaron en sinergia entre sí y, a su vez, fueron inhibidas por la presencia de M1C1 y M2C1 (Ver Tabla 3 y Figura 6).

Tabla 3

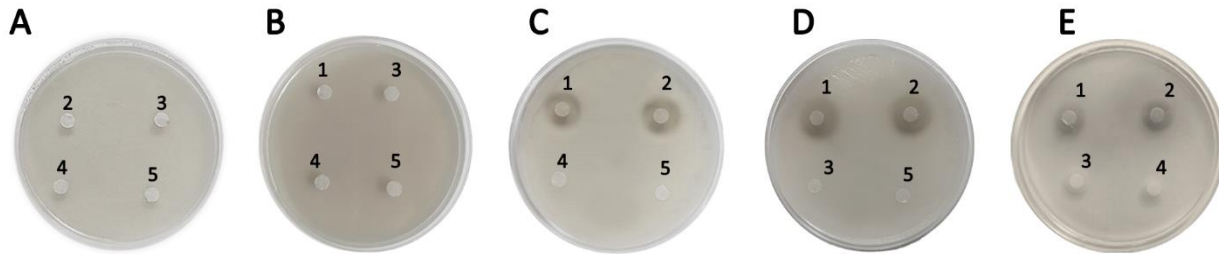
Pruebas de sinergismo y antagonismo entre los aislados M1C1, M2C1, M2C3, M3C4 y M2C5.

Aislado bacteriano	M1C1	M2C1	M2C3	M3C4	M2C5
M1C1*		+	+	+	+
M2C1*	+		+	+	+
M2C3*	-	-		+	+
M3C4*	-	-	+		+
M2C5*	-	-	+	+	

Nota. (+) con inhibición, (-) sin inhibición. Los aislados etiquetados con asterisco (*) representan el césped bacteriano.

Figura 6

Actividad sinérgica y antagónica de las bacterias M1C1, M2C1, M2C3, M3C4 y M2C5



Nota. En A) se presenta el aislado M1C1 como el césped bacteriano. En B) M2C1, en C) M2C3, en D) M3C4 y en E) M2C5. Los números denotan las bacterias sembradas sobre el césped:

1 (M1C1), 2 (M2C1), 3 (M2C3), 4 (M3C4), 5 (M2C5).

4.5 Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática

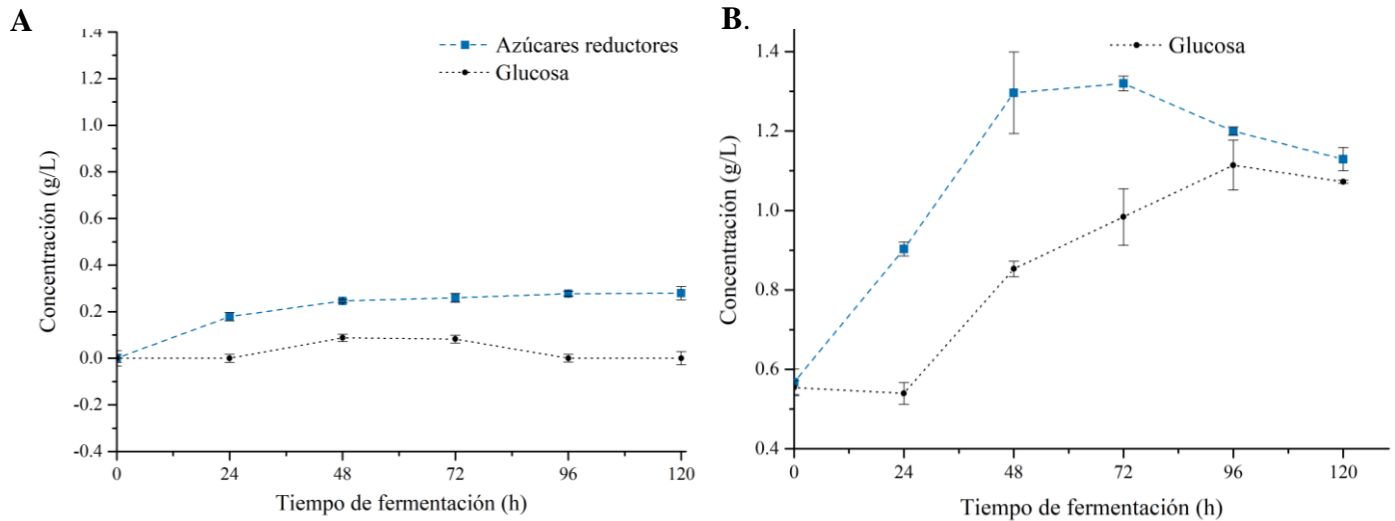
La cuantificación de la actividad enzimática se llevó a cabo con los aislados que evidenciaron mejores resultados en las pruebas semicuantitativas y que interactuaron sinérgicamente.

4.5.1 Monitoreo de la degradación de almidón con el aislado M2C5

En la Figura 7 se observa que la producción máxima de azúcares reductores fue de 0.279 ± 0.028 g/L en el medio que contenía almidón como única fuente de carbono, mientras que en el medio que contenía almidón y glucosa se alcanzó una concentración de 1.129 ± 0.013 g/L. Por otro lado, en los medios que contenían glucosa como fuente de carbono adicional, se evidenció una concentración máxima de proteínas de 0.628 g/L y una actividad enzimática de 0.924 UI/mL a las 48 h. En comparación, en los medios que tenían almidón únicamente, se halló una concentración de proteínas de 0.435 g/L y una actividad enzimática 0.534 UI/mL en el mismo tiempo.

Figura 7

Concentración de azúcares reductores producto de la degradación de almidón durante 120 h de fermentación



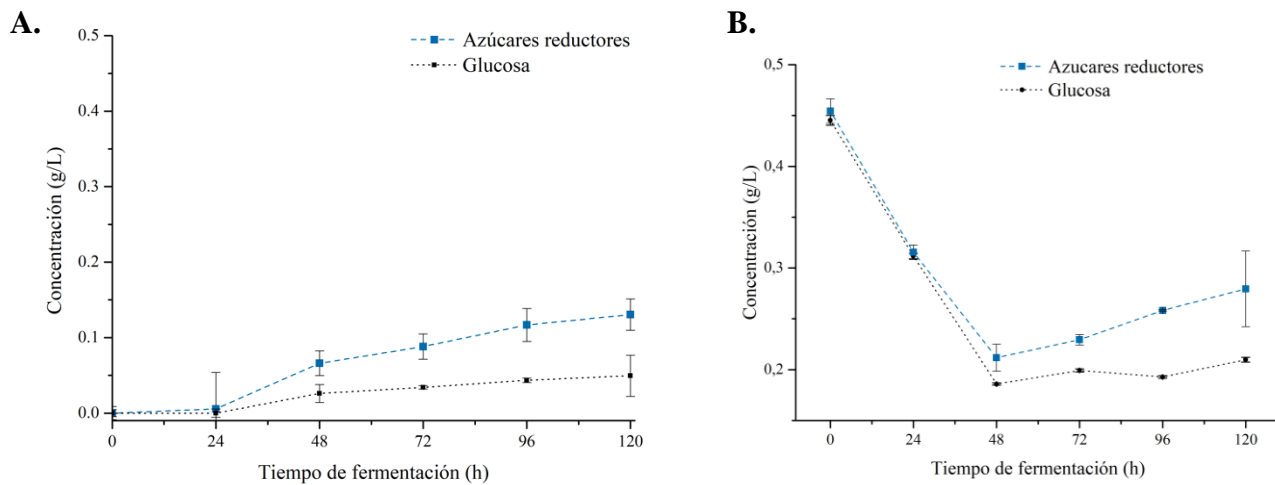
Nota. La degradación de almidón fue llevada a cabo por el aislado M2C5 empleando dos medios de cultivo. En A) medio de cultivo con almidón como única fuente de carbono y B) medio con almidón y glucosa.

4.5.2 Monitoreo de la degradación de celulosa con el aislado M2C3

En la Figura 8.A se observa que, en el medio con solo celulosa como fuente de carbono, hubo un incremento de la concentración de azúcares reductores desde las 24 h, hasta alcanzar 0.130 ± 0.020 g/L a las 120 h. Sin embargo, este valor no supera a lo encontrado con la combinación de celulosa y glucosa, donde la concentración de azúcares reductores fue de 0.289 ± 0.028 g/L. Por otra parte, a las 72 h se observó un incremento en la cantidad de proteínas en ambos tratamientos, tiempo en el que se procedió a cuantificar la actividad enzimática. En los medios con celulosa y glucosa se encontró una concentración de proteínas de 0.683 ± 0.012 g/L y una actividad enzimática de 0.504 UI/mL. En comparación, cuando se utilizó solo celulosa se determinó una concentración de proteína de 0.532 ± 0.128 g/L y una actividad enzimática de 0.375 UI/mL.

Figura 8

Concentración de azúcares reductores producto de la degradación de celulosa durante 120 h de fermentación

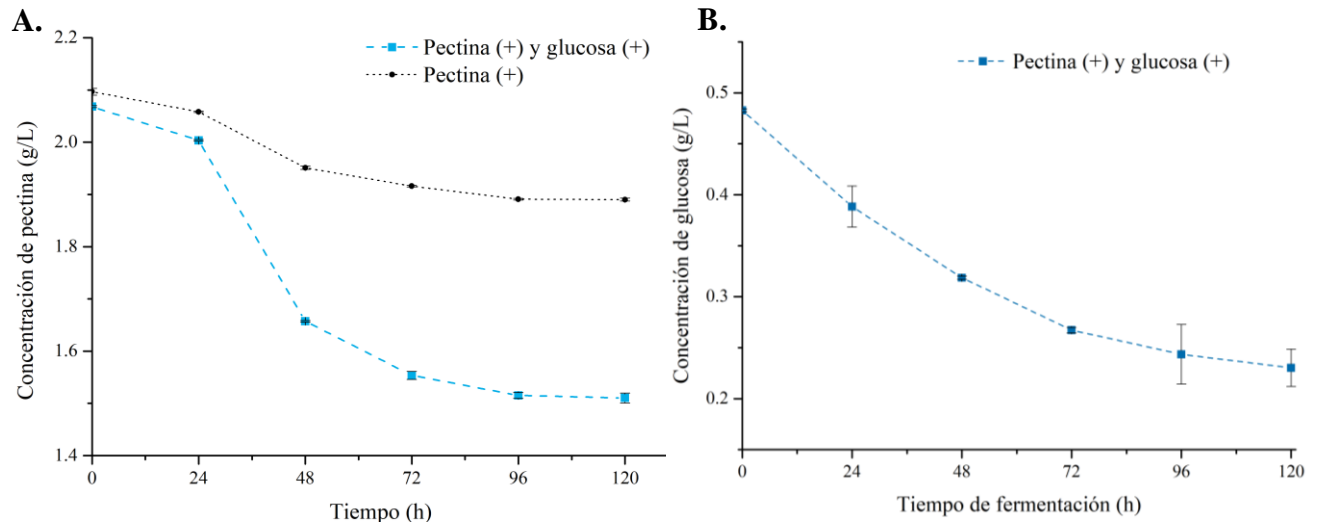


Nota. Azúcares reductores producidos por el aislado M2C3 empleando dos medios de cultivo. En A) medio de cultivo con celulosa como única fuente de carbono y B) medio con celulosa y glucosa.

4.5.2 Monitoreo de la degradación de pectina con el aislado M3C4

En la Figura 9, se muestra que la concentración de pectina disminuyó de 2.0 a $1.51 \text{ g/L} \pm 0.009$ en 120 horas cuando el medio de cultivo contenía glucosa como fuente de carbono adicional y de 2.0 a 1.89 ± 0.0028 cuando el microorganismo creció únicamente con pectina.

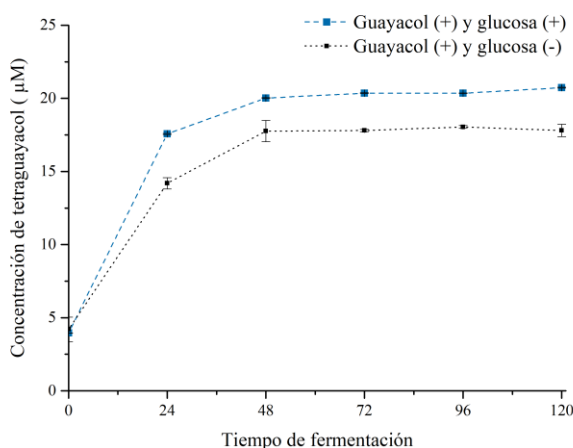
Por otra parte, se encontró una mayor concentración de proteínas a las 72 h, por lo que se utilizó este hallazgo para calcular la actividad enzimática. Cuando se utilizó glucosa y pectina, la concentración de proteínas fue de 0.484 g/L y la actividad enzimática de 0.738 UI/mL. Mientras que, cuando se empleó solo pectina, se obtuvo una concentración de proteína de 0.209 g/L y una actividad enzimática de 0.464 UI/mL.

Figura 9*Degradación de pectina durante 120 h de fermentación*

Nota. En A) se presenta la degradación de pectina en los medios de cultivo con y sin glucosa y en B) el consumo de glucosa en el medio que contenía pectina y glucosa.

4.5.2 Monitoreo de la oxidación de guayacol con el aislado M2C3

En la Figura 10 se evidenció una mayor producción de tetraguayacol por parte de M2C3 cuando se inoculó en el medio suplementado con glucosa (20.72 μM), que cuando se añadió al medio que contenía únicamente guayacol como fuente de carbono (17.81 μM). Este patrón se repitió de igual manera en la concentración de proteínas y en la actividad enzimática, pues se encontró que el microorganismo produjo más proteína y tuvo mayor actividad enzimática en presencia de glucosa (0.361 g/L y 0.0108 UI/mL), que sin ella (0.221 g/L, 0.00936 UI/mL).

Figura 10*Producción de tetraguayacol durante 120 h de fermentación*

Nota. La concentración de tetraguayacol se calculó con $\epsilon = 26000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

5. Discusión

5.1 Parámetros fisicoquímicos durante y después del compostaje

La temperatura es un factor crítico durante el compostaje, ya que influye en la actividad metabólica de los microorganismos y, por ende, en la tasa de degradación de la materia orgánica. En este estudio, se encontró que la temperatura aumentó hasta 32 °C en el día 60, momento en el que se observaron los diámetros más amplios de los halos de degradación (Ver Figura 4.B). Esto concuerda con la investigación de Kazemi *et al.* (2017), quienes encontraron mayores actividades metabólicas en los picos más altos de temperatura (55°C). Si bien en este compostaje no se alcanzaron temperaturas por encima de 50°C como lo documentan dichos autores, el valor registrado permite la proliferación de bacterias mesófilas, catalogados como los descomponedores más efectivos según Polomski (2009). Además, los resultados del análisis fisicoquímico sugieren que los parámetros medidos se encuentran dentro del rango óptimo para un compost de calidad. Por ejemplo, según los parámetros evaluados por Martínez *et al.* (2013), el pH registrado (6.69) se

considera favorable para el desarrollo de microorganismos, el proceso de descomposición y el crecimiento de las plantas. Asimismo, este autor recomienda que, para mantener una población microbiana activa en un compostaje, la relación carbono-nitrógeno disponible debe mantenerse entre 10-15, lo que concuerda con los valores obtenidos (C: N = 11.6).

5.2 Aislamiento y evaluación semicuantitativa de la actividad enzimática

A lo largo de tres muestreos fue posible aislar 15 bacterias con potencial para degradar materia orgánica. Todas tuvieron la capacidad de consumir celulosa, lignina y almidón. No obstante, solo 2 de ellas mostraron actividad pectinolítica. Este patrón guarda relación con los hallazgos de Yeager (2017), quienes evaluaron la capacidad degradativa de 112 aislados y encontraron que solo 20 hidrolizaron pectina. Adicionalmente, Ruíz (2020) estudió la actividad pectinolítica de los microorganismos presentes en diferentes tipos de compostas (restos de café, bovinos, forestales, lombricomposta y residuos caseros) y encontró que ninguna de las bacterias aisladas de los residuos domésticos fue capaz de degradar pectina. Este resultado podría explicarse de acuerdo con lo señalado por Mohnen (2008), quien destaca que, debido a que la pectina es un polisacárido muy complejo y heterogéneo, su degradación requiere la acción de múltiples enzimas con diferentes especificidades y mecanismos de regulación. Además, en los materiales que se utilizaron para realizar el compostaje doméstico había una cantidad limitada de cítricos, que, según Nasrollahzadeh *et al.* (2021), son los vegetales en donde está en mayor abundancia la pectina.

Por lo anterior, el M3C4 evidenció un halo de hidrólisis de pectina de 1.95 ± 0.053 cm de diámetro. Estos resultados son comparables con los hallazgos de Arellano *et al.* (2015), quienes obtuvieron halos de hidrólisis con un diámetro promedio de 1.7 cm. Además, demuestran un mayor potencial que los reportados en la investigación de Cedeño *et al.* (2015) en donde se encontraron halos de hidrólisis con 0.17 ± 0.03 y 0.18 ± 0.047 cm de diámetro en especies del género *Bacillus*.

Por otro lado, M2C3 registró un halo de 3.65 ± 0.045 cm de diámetro como indicativo de la degradación de celulosa. Este valor es mayor a los reportados por Pazmiño (2021) y Dewiyanti *et al.* (2022) cuyas cepas bacterianas más efectivas lograron producir halos con un diámetro de 1.68 cm y 2.27 cm, de manera respectiva. En cuanto a la degradación del almidón, el aislado M2C5 fue capaz de formar un halo con 3.65 ± 0.037 cm de diámetro en 48 h. Este hallazgo sugiere una mayor eficiencia en la degradación de almidón en comparación con los resultados obtenidos Paillié (2012), que encontró halos de degradación con 2.72, 2.83, y 5.05 cm en los días 4, 7 y 13 de incubación, respectivamente. Finalmente, la oxidación de guayacol como evidencia indirecta de la degradación de lignina también mostró resultados positivos, pues se obtuvieron halos con 2.01 ± 0.021 cm de diámetro.

Lo anterior, destaca la importancia de esta investigación, puesto que encontrar microorganismos con capacidad para degradar almidón, pectina, lignina y celulosa, establece un punto de partida para futuras investigaciones encaminadas hacia el uso de consorcios microbianos para el aprovechamiento de la materia orgánica y el mejoramiento del compostaje, tal como lo demuestran Oviedo *et al.* (2022), quienes inocularon compostas con microorganismos pertenecientes a los géneros *Paenibacillus* y *Bacillus*, que habían sido aislados de la fase de enfriamiento y cuya capacidad de degradar celulosa y hemicelulosa había sido comprobada mediante la aparición de halos. En su estudio, concluyeron que la adición de estas bacterias disminuyó el tiempo de compostaje en 13 días y contribuyó a obtener un producto más estable con un índice respiratorio (IR) de $2.9 \pm 0,2$ g de CO_2 $\text{kgVS}^{-1}\text{d}^{-1}$, en comparación con el experimento control en el que se evidenció un IR igual a $4.5 \pm 0,1$ g de CO_2 $\text{kgVS}^{-1}\text{d}^{-1}$.

5.3 Sinergismo y antagonismo entre las bacterias más eficientes

Las pruebas de sinergismo y antagonismo permiten seleccionar las bacterias que posiblemente pueden llevar a cabo la degradación de la materia orgánica de manera parcial o completa debido a la producción de sustratos complementarios que aumentan la actividad metabólica y el crecimiento microbiano. Por ejemplo, Deng y Wang (2016) encontraron que la actividad enzimática de la enzima β -1,4-glucosidasa, implicada en la degradación de celulosa, se incrementó hasta tres veces cuando se trabajó con cultivos sinérgicos (133.5 nmol/h/ml) en comparación de cuando se emplearon cultivos puros (43,7 nmol/h/ml).

Por otra parte, se encontró que, de los cinco aislados con mayor potencial degradativo, solo tres (M2C3, M3C4 Y M2C5) crecieron en sinergia, por lo que podrían ser utilizados como inoculantes de compostas en futuras investigaciones. Por otra parte, las bacterias M1C1 y M2C1 presentaron efectos antagonistas, esta última destaca porque tuvo el mayor halo en la oxidación de guayacol. En relación, Ismail *et al.* (2016), mencionan que dicho efecto se produce debido a la secreción de sustancias antibióticas por parte de algunas bacterias para inhibir el crecimiento de otras.

5.4 Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática con los aislados que evidenciaron actividad sinérgica.

Rodríguez (2018) sugieren que la adición de glucosa a un cultivo microbiano podría potenciar el crecimiento de los microorganismos y la actividad metabólica durante los periodos de fermentación. Lo anterior, guardó concordancia con lo encontrado en este estudio, puesto que la presencia de glucosa mejoró la degradación de pectina, la producción de azúcares reductores cuando se evaluó la actividad amilolítica y celulolítica, y la oxidación del guayacol.

En cuanto a la actividad amilolítica, S. Wang *et al.* (2016) evaluó la influencia de nueve monosacáridos sobre la actividad de la α -amilasa y encontró que la glucosa tuvo el mayor efecto inductor, pues incrementó la población bacteriana y la producción de esta enzima hasta en un 165%. Por otro lado, en la Figura 7.B se puede observar que las bacterias tuvieron la capacidad de consumir almidón y glucosa simultáneamente y que no hubo una competencia entre los sustratos. Esto se podría explicar según Rodríguez (2018), quien menciona que el metabolismo de la glucosa no interfiere en la degradación de almidón.

Con respecto a la degradación de la celulosa, en la figura 8.B se observa inicialmente una preferencia hacía la glucosa como sustrato, esto concuerda con lo reportado por Hsieh (2014), quién demostró que las concentraciones elevadas de monosacáridos pueden actuar como inhibidores de la actividad de las celulasas. Lo anterior, explica por qué se observó un incremento en la concentración de azúcares reductores justo después de que la cantidad de glucosa disminuyó drásticamente. Por lo tanto, se puede inferir que este monómero impulsó indirectamente a la producción de una mayor cantidad de azúcares reductores al potenciar el crecimiento poblacional durante las primeras 72 h, en comparación con en el medio que solo contenía celulosa como fuente de carbono.

Por otra parte, en cuanto a la degradación de la pectina, Fontana y Silveira (2019) encontraron un efecto inductor de la glucosa sobre la producción de enzimas pectinolíticas. Esto guarda relación con lo descrito en la Figura 9, en donde se evidencia un mayor consumo de pectina cuando dicho monosacárido estuvo presente. De igual manera, se encontró una disminución en la concentración de glucosa desde el inicio, lo que concuerda con lo expuesto por Dušková y Marounek (2001), quienes mencionan que ambos sustratos pueden ser utilizados simultáneamente. Este mismo comportamiento se encontró cuando se evaluó la oxidación de Guayacol, puesto que

se halló una mayor concentración de tetraguayacol cuando los microorganismos crecieron con una fuente de carbono adicional. En la Figura 10 se observa que las concentraciones se mantuvieron constantes después de las 24 h, Rosa *et al.* (2020) sugiere que esto sucede debido a la inestabilidad del tetraguayacol y a que este es utilizado como sustrato por la misma enzima que lo produce.

6. Conclusión

Se obtuvo un total de 15 aislados bacterianos, como M1C1, M1C2, M1C3, M1C4, M1C5, M2C1, M2C2, M2C3, M2C4, M2C5, M3C1, M3C2, M3C3, M3C4 y M3C5, en los tres muestreos realizados en el compostaje doméstico. Todas las bacterias demostraron capacidad para consumir almidón, celulosa y guayacol. Sin embargo, solo 2 de ellas, M2C5 y M3C4, evidenciaron actividad pectinolítica. Adicionalmente, se encontró que M2C5 tuvo la mayor capacidad para degradar almidón, M2C3 para degradar celulosa, M2C1 para degradar lignina (evaluada mediante la oxidación del guayacol) y M3C4 mostró el mayor potencial para degradar pectina. De los 4 aislados mencionados, M2C3, M3C4 y M2C5, interactuaron sinérgicamente por lo que podrían ser empleados para establecer un consorcio microbiano implicado en la degradación de materia orgánica, en busca de contribuir en la producción de compostas de manera más eficiente y proponer alternativas de mitigación frente al creciente problema de los residuos orgánicos a nivel local y nacional.

Referencias

- Abbott, D. W., & Boraston, A. B. (2008). Structural biology of pectin degradation by Enterobacteriaceae. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), 301-316. 10.1128/MMBR.00038-07
- Alurralde, A. L., Imhoff, S., Gariglio, N., & Albers, A. B. (2021). Caracterización de abonos sólidos y líquidos derivados del compostaje de alperujo y restos de poda de olivares. *Ciencia del suelo*, 39(1), 94-111. <http://www.scielo.org.ar/pdf/cds/v39n1/1850-2067-cds-39-01-94.pdf>
- Arellano, J., Ilich, S., Salazar, M., Rodríguez, I., Torres, P., & Alarcón, W. (2015). Producción de pectinasas por *Bacillus* spp. a partir de cáscaras de naranja y de toronja como fuente de carbono. *Rebiol*, 35(1), 62-69. <https://core.ac.uk/download/pdf/267888175.pdf>
- Aristizábal, B. H., Vanegas, E., Mariscal, J. P., & Camargo, M. A. (2015). Digestión anaerobia de residuos de poda como alternativa para disminuir emisiones de gases de efecto invernadero en rellenos sanitarios. *Energética*, 46, 2936. https://revistas.unal.edu.co/index.php/energetica/article/view/51305/n46_a4_51305
- Bernal, M. P., Sommer, S. G., Chadwick, D., Qing, C., Guoxue, L., & Michel Jr, F. C. (2017). Current approaches and future trends in compost quality criteria for agronomic, environmental, and human health benefits. *Advances in Agronomy*, 144, 143-233. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2017.03.002>
- BioSystems S.A. (2011). Glucosa Oxidasa/Peroxidasa. <https://www.clinicord.com/wp-content/uploads/pdfs/11503c.pdf>

- Burgos, M. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3, 5-dinitrosalicílico. *Revista de Investigación*, 13(1), 57-66. <https://doi.org/10.29097/23461098.308>
- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., & Oomah, B. D. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 172-184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022>
- Castelblanco, E. M. S., Martín, J. P. H., Morales, S. M. B., & Rodríguez, J. P. M. (2020). Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), 36-44: 10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.71278
- Cedeño, Á. M., Zambrano Pazmiño, D. E., Rivera Fernández, R. D., Rondón, A. J., Silva, M. L., & Pérez Quintana, M. (2015). Aislamiento y selección de bacterias autóctonas de Manabí-Ecuador con actividad celulolítica. *Cultivos Tropicales*, 36(1), 7-16. <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v36n1/ctr01115.pdf>
- Chandna, P., Nain, L., Singh, S., & Kuhad, R. C. (2013). Assessment of bacterial diversity during composting of agricultural byproducts. *BMC Microbiology*, 13(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-99>
- Chang, C. C., Ng, C. C., Wang, C. Y., & Shyu, Y. T. (2009). Activity of cellulase from *Thermoactinomyces* and *Bacillus* spp. isolated from *Brassica* waste compost. *Scientia Agricola*, 66, 304-308. [10.1590/S010390162009000300004](https://doi.org/10.1590/S010390162009000300004)
- Comité Técnico Interinstitucional De Educación Ambiental (2020). Aprovechamiento de residuos orgánicos domiciliarios a partir de la elaboración de compostaje casero en 60 viviendas urbanas del municipio de san francisco, Cundinamarca.

<https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/19504/Anexo%20.pdf?sequence=4&isAllowed=y#:~:text=El%20proyecto%20va%20dirigido%20a,ecol%C3%B3gica%20y%20ambiental%2C%20y%20a%20la>

Consejo Nacional de Política Económica y Social [CONPES]. (2016). Política Nacional para la Gestión de Residuos Sólidos:

<https://colaboracion.dnp.gov.co/CDT/Conpes/Econ%C3%B3micos/3874.pdf>

Cornejo-Ramírez, Y. I., Martínez-Cruz, O., Del Toro-Sánchez, C. L., Wong-Corral, F. J., Borboa-Flores, J., & Cinco-Moroyoqui, F. J. (2018). The structural characteristics of starches and their functional properties. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 1003-1017. 10.1080/19476337.2018.1518343

Decreto 0153 de 2022 [Alcaldía de Bucaramanga]. Por el cual se prorroga la situación de riesgo de emergencia sanitaria y ambiental en el Municipio de Bucaramanga contenido en el Decreto Municipal 0365 del 29 de agosto de 2020. 29 de septiembre de 2022.

<https://www.bucaramanga.gov.co/wp-content/uploads/2022/09/DECRETO-0153-PRORROGA-SITUACION-DE-RIESGO-DE-EMERGENCIA-SANITARIA-AMBIENTAL-CONTENIDA-DECRETO-0365-DE-2020.pdf>

Deng, Y. J., & Wang, S. Y. (2016). Synergistic growth in bacteria depends on substrate complexity. *Journal of Microbiology*, 54, 23-30. [10.1007/s12275-016-5461-9](https://doi.org/10.1007/s12275-016-5461-9)

Dewiyanti, I., Darmawi, D., Muchlisin, Z. A., Helmi, T. Z., Arisa, I. I., Rahmiati, R., & Destri, E. (2022). Cellulase enzyme activity of the bacteria isolated from mangrove ecosystem in Aceh Besar and Banda Aceh. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 951(1), 012113. 10.1088/1755-1315/951/1/012113

- Dušková, D., & Marounek, M. (2001). Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rumen bacterium *Lachnospira multiparus*. *Letters in Applied Microbiology*, 33(2), 159-163. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00970.x>
- Ermolaev, E., Sundberg, C., Pell, M., & Jönsson, H. (2014). Greenhouse gas emissions from home composting in practice. *Bioresource Technology*, 151, 174-182. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.049>
- Elsevier B.V. (2004). *Scopus* [Database].
[KEY%28composting+and+bacteria+and+organic+waste%29&sort=plf](#)
- Flores, R. B., Mariños, D. C., Rodríguez, N. B., & Rodríguez, D. S. (2013). Optimización de las condiciones de extracción de pectina a partir de cáscara de limón francés (*Citrus medica*) utilizando la metodología de superficie de respuesta. *Agroindustrial Science*, 3(2), 77-89. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6583454>
- Gao, X., Xu, Z., Li, Y., Zhang, L., Li, G., Nghiem, L. D., & Luo, W. (2021). Bacterial dynamics for gaseous emission and humification in bioaugmented composting of kitchen waste. *Science of the Total Environment*, 801. [10.1016/j.scitotenv.2021.149640](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149640)
- Gedikli, S., Aytar, P., Ünal, A., Yamaç, M., Çabuk, A., & Kolankaya, N. (2010). Enhancement with inducers of lacasse production by some strains and application of enzyme to dechlorination of 2, 4, 5-trichlorophenol. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(6), 6-7. [10.2225/vol13-issue6-fulltext-9](https://doi.org/10.2225/vol13-issue6-fulltext-9)
- García-Hidalgo, J., Ravi, K., Kuré, L. L., Lidén, G., & Gorwa-Grauslund, M. (2019). Identification of the two-component guaiacol demethylase system from

- Rhodococcus rhodochrous* and expression in *Pseudomonas putida* EM42 for guaiacol assimilation. *AMB Express*, 9(1), 1-10. 10.1186/s13568-019-0759-8.
- Gonawala, S. S., & Jardosh, H. (2018). Organic waste in composting: a brief review. *International Journal of Current Engineering and Technology*, 8(1), 36-38. 10.14741/ijcet.v8i01.10884
- Guerra, E. E. (2014). Daños a la salud por mala disposición de residuales sólidos y líquidos en Dili, Timor Leste. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(2), 270-277. <http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v52n2/hig11214.pdf>
- Hsieh, C. W. C., Cannella, D., Jørgensen, H., Felby, C., & Thygesen, L. G. (2014). Cellulase inhibition by high concentrations of monosaccharides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(17), 3800-3805. <https://doi.org/10.1021/jf5012962>
- Huaman, L. C. (2020). *Evaluación de la calidad del compost obtenido a partir de residuos orgánicos y microorganismos eficaces (EM) en el distrito de Huayucachi*. [Tesis de pregrado, Universidad Continental]. Repositorio Institucional Continental. <https://hdl.handle.net/20.500.12394/8245>
- Howard, A. (1933). The waste products of agriculture: their utilization as humus. *Journal of the Royal Society of Arts*, 82, 84-121. <http://www.jstor.org/stable/41360014>.
- Ismail, A., Ktari, L., Ahmed, M., Bolhuis, H., Boudabbous, A., Stal, L. J., ... & El Bour, M. (2016). Antimicrobial activities of bacteria associated with the brown alga *Padina pavonica*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1072. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01072>
- Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdorska-Burek, U., Jarosz-Wilkolażka, A., & Paszczyński, A. (2017). Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved,

- genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(6), 941-962.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fux049>
- Kabir, M. S., & Tasmim, T. (2019). Isolation of pectinase producing bacteria from the rhizosphere of *Andrographis paniculata* Nees and 16S rRNA gene sequence comparison of some potential strains. *Advances in Microbiology*, 9(01), 1. 10.4236/aim.2019.91001
- Kaza, S., Yao, L., Bhada-Tata, P., & Van Woerden, F. (2018). *What a waste 2.0: a global snapshot of solid waste management to 2050*. World Bank Publications.
- Kazemi, K. (2017). Assessment of microbial communities and their relationship with enzymatic activity during composting. *World Journal of Engineering and Technology*, 5(03), 93. [10.4236/wjet.2017.53B011](https://doi.org/10.4236/wjet.2017.53B011)
- Koduri, R. S., & Tien, M. (1995). Oxidation of Guaiacol by Lignin Peroxidase: Role Of Veratryl Alcohol. *Journal of Biological Chemistry*, 270(38), 22254-22258.
[https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)90128-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)90128-6/pdf)
- Martínez, M., Pantoja, A., & Román, P. (2013). Manual de compostaje del agricultor experiencias en américa latina. *Santiago de Chile, Chile, FAO*.
<https://www.fao.org/3/i3388s/I3388S.pdf>
- Ma, C., Hu, B., Liu, F. Y., Gao, A. H., Wei, M. B., & Zhang, H. Z. (2020). Changes in the microbial succession during sewage sludge composting and its correlation with physico- chemical properties. *Nature Environment & Pollution Technology*, 19(1), 237-244.
- McFarland, J. (1907). Nephelometer: an instrument for media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for

vaccines. *J. Am. Med. Assoc*, 49, 1176-1178.
10.1001/jama.1907.25320140022001f

Mika, A., & Luthje, S. (2003). Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiology*, 132(3), 1489-1498. 10.1104/pp.103.020396

Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 266-277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>.

Nasrollahzadeh, M., Sajjadi, M., Nezafat, Z., & Shafiei, N. (2021). Polysaccharide biopolymer chemistry. In M. Nasrollahzadeh (Ed.), *Biopolymer based metal nanoparticle chemistry for sustainable applications* (pp. 45-105). Elsevier

Noble, J. E., & Bailey, M. J. (2009). Quantitation of protein. In R. Burgess, & P. Deutscher (Eds.) *Methods in enzymology* (pp. 73-95). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1)

Lee, S., Kang, M., Bae, J. H., Sohn, J. H., & Sung, B. H. (2019). Bacterial valorization of lignin: strains, enzymes, conversion pathways, biosensors, and perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00209>

Luang-In, V., Yotchaisarn, M., Saengha, W., Udomwong, P., Deeseenthum, S., & Maneewan, K. (2019). Isolation and identification of amylase-producing bacteria from soil in Nasinuan Community Forest, Maha Sarakham, Thailand. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 12(3), 1061-1068. <https://dx.doi.org/10.13005/bpj/1735>

Ortiz, W. G. C. (2014). Tratamientos aplicables a materiales lignocelulósicos para la obtención de etanol y productos químicos. *Revista de Tecnología*, 13(1), 3944. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6041572>

- Ortega-Torres, A. E., Rico-García, E., Guzmán-Cruz, R., Torres-Pacheco, I., Tovar-Pérez, E. G., & Guevara-González, R. G. (2021). Addition of Phosphatases and Phytases to Mature Compost to Increase Available Phosphorus: A Short Study. *Agronomy*, *11*(12), 2555. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122555>
- Oviedo-Ocaña, E. R., Soto-Paz, J., Torres, V. S., Castellanos-Suarez, L. J., & Komilis, D. (2022). Effect of the addition of the *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp. bacterial strains on the co-composting of green and food waste. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 107816. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107816>
- Paillié, M. (2012). *Determinación de la actividad celulolítica, ligninolítica y amilolítica de actinobacterias aisladas de suelo rizosférico de Trébol Blanco (*Trifolium Repens*)*. [Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana]. Repositorio institucional. <http://hdl.handle.net/10554/11781>
- Parada, R. B., Marguet, E. R., & Vallejo, M. (2017). Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *19*(2), 17-23. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.64098>
- Pazmiño, D. E. (2021). *Bioprospección de cepas de hongos y bacterias productoras de enzimas que aceleren la descomposición de residuos agropecuarios en el compostaje*. [Tesis de maestría, Universidad Técnica Del Norte]. <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/11112/2/PG%20823%20TRABAJO%20GRADO.pdf>
- Pepe, O., Ventorino, V. y Blaiotta, G. (2013). Dinámica de grupos microbianos funcionales durante el compostaje mesófilo de residuos agroindustriales y la aplicación de bacterias fijadoras de

- (N2) de vida libre. *Gestión de residuos*, 33 (7), 1616-1625.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.03.025>
- Polomski, R. (2009). *Smart gardener handbook*. DHEC. <https://www.slideshare.net/Danousis85z/a1y601>
- Ravi, K., García-Hidalgo, J., Gorwa-Grauslund, M. F., & Lidén, G. (2017). Conversion of lignin model compounds by *Pseudomonas putida* KT2440 and isolates from compost. *Applied microbiology and biotechnology*, 101, 5059-5070. 10.1007/s00253-017-8211-y
- Rodríguez, E. (2018). Mejoramiento de un proceso de fermentación de almidón de yuca a escala de laboratorio [Tesis de pregrado, Universidad Icesi]. https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/83840/1/TG01986.pdf
- Rosa, G. P., Barreto, M. D. C., Pinto, D. C., & Seca, A. M. (2020). A green and simple protocol for extraction and application of a peroxidase-rich enzymatic extract. *Methods and Protocols*, 3(2), 25. <https://doi.org/10.3390/mps3020025>
- Roslan, M. A. M., Jefri, N. Q. U. A., Ramlee, N., Rahman, N. A. A., Chong, N. H. H., Bunawan, H., ... & Razali, H. (2021). Enhancing food waste biodegradation rate in a food waste biodigester with the synergistic action of hydrolase-producing *Bacillus paralicheniformis* GRA2 and *Bacillus velezensis* TAP5 co-culture inoculation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(5), 3001-3012. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.02.041>
- Ruiz, Y. (2020). *Degradación de residuos orgánicos domésticos a través de un consorcio bacteriano para la formación de una composta* [Tesis de pregrado, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/11480>

- Sánchez, Ó. J., Ospina, D. A., & Montoya, S. (2017). Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste management*, *69*, 136–153. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.08.012>
- Sulewski, P., Kais, K., Gołaś, M., Rawa, G., Urbańska, K., & Wąs, A. (2021). Home Bio-Waste Composting for the Circular Economy. *Energies*, *14*(19), 6164. <https://doi.org/10.3390/en14196164>
- Superintendencia de Servicios Públicos Domiciliarios. (2021). Informe de Disposición Final de Residuos Sólidos. <http://www.superservicios.gov.co/sites/default/files/inline-files/Informe-Nacional-de-Disposicion-Final-de-Residuos-Solidos.pdf.pdf>
- Sullivan, D. M., Bary, A. I., Miller, R. O., & Brewer, L. J. (2018). *Interpreting compost analyses* (pp. 1-10). Corvallis, OR, USA: Oregon State University Extension Service. <https://catalog.extension.oregonstate.edu/em9217/html>
- Tiwari, S. P., Srivastava, R., Singh, C. S., Shukla, K., Singh, R. K., Singh, P., ... & Sharma, R. (2015). Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. *J Global Biosci*, *4*(1), 1886-1901. <https://www.mutagens.co.in/jgb/vol.04/1S/12.pdf>
- Unidad Administrativa Especial de Servicios Públicos (UAESP). (2018). Guía técnica para el aprovechamiento de residuos orgánicos a través de metodologías de compostaje y lombricultura. Universidad Nacional de Colombia. https://www.uaesp.gov.co/images/Guia-UAESP_SR.pdf
- Wang, S., Meng, Q., Zhu, Q., Niu, Q., Yan, H., Li, K., Li, G., Li, X., Liu, H., Liu Y., & Li, Q. (2021). Efficient decomposition of lignocellulose and improved composting performances driven by thermally activated persulfate based on metagenomics analysis. *Science of the Total Environment*, *794*,148-530. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148530>

- Wang, S., Lin, C., Liu, Y., Shen, Z., Jeyaseelan, J., & Qin, W. (2016). Characterization of a starch-hydrolyzing α -amylase produced by *Aspergillus niger* WLB42 mutated by ethyl methanesulfonate treatment. *International journal of biochemistry and molecular biology*, 7(1), 1. 27335681
- Wang, Y., Gong, J., Li, J., Xin, Y., Hao, Z., Chen, C., & Li, J. (2020). Insights into bacterial diversity in compost: Core microbiome and prevalence of potential pathogenic bacteria. *Science of the Total Environment*, 718, 137-304. [10.1016/j.scitotenv.2020.137304](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137304)
- Wei, H., Tucker, M. P., Baker, J. O., Harris, M., Luo, Y., Xu, Q., Himmel, M., & Ding, S. Y. (2012). Tracking dynamics of plant biomass composting by changes in substrate structure, microbial community, and enzyme activity. *Biotechnology for Biofuels*, 5(20), 1-14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-20>
- Wu, D., Wei, Z., Mohamed, T. A., Zheng, G., Qu, F., Wang, F., ... & Song, C. (2022). Lignocellulose biomass bioconversion during composting: Mechanism of action of lignocellulase, pretreatment methods and future perspectives. *Chemosphere*, 286, 131- 635. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131635>
- Yeager, C. M., Gallegos-Graves, L. V., Dunbar, J., Hesse, C. N., Daligault, H., & Kuske, C. R. (2017). Polysaccharide degradation capability of Actinomycetales soil isolates from a semiarid grassland of the Colorado Plateau. *Applied and environmental microbiology*, 83(6), e03020-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.03020-16>
- Zhao, Y., Zhuge, C., Weng, Q., & Hu, B. (2022). Additional strains acting as key microbes promoted composting process. *Chemosphere*, 287(3), 132-304. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132304>