

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



ESCUELA DE POSGRADO

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS PARA EL DESARROLLO SUSTENTABLE
CON MENCIÓN EN
GESTIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE**

**CONSORCIOS MICROBIANOS PARA POTENCIAR EL
COMPOSTAJE DE RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS
URBANOS A BAJAS TEMPERATURAS.**

Autora: Ms. Ernestina Rosario Vásquez Castro

Asesor: Dr. Carlos Eduardo Millones Chanamé.

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2022

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS DE DOCTORADO EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM



ANEXO 6-H

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS DE MAESTRÍA () / DOCTORADO (X) EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): Vásquez Castro, Ernestina Rosario
DNI N°: 16701575
Correo electrónico: ernestina.vasquez@untrm.edu.pe
Nombre de la Maestría () / Doctorado (X): Ciencias Para el Desarrollo SUSTENTABLE

Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): _____
DNI N°: _____
Correo electrónico: _____
Nombre de la Maestría () / Doctorado (): _____

2. Título de la tesis para obtener el grado académico de Maestro () / Doctor (X)

CONTRÓLLOS MICROBIANOS PARA POTENCIAR EL COMPOSTAJE DE RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS URBANOS A BAJAS TEMPERATURAS

3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: MILLONES CHANAME, CARLOS EDUARDO
DNI, Pasaporte, C.E N°: 16702744
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) <https://orcid.org/0000-0001-7286-6591>

Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: _____
DNI, Pasaporte, C.E N°: _____
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) _____

4. Campo del conocimiento según Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud- Medicina básica- Inmunología)

https://salalogs.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_foro.html
1.06.00. Biología / 1.06.01 Biotecnología, Microbiología

5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el(la) autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

6. Autorización de publicación

El(los) titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la licencia creative commons de tipo BY-NC: licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación- RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 30 de noviembre, 2022


Firma del autor 1

Firma del autor 2


Firma del Asesor 1

Firma del Asesor 2

DEDICATORIA

A mis amados padres: Domingo y María Magdalena, a quienes les debo lo que soy.

A Carlos Eduardo, mi esposo y amigo, merecedor de mi amor, respeto y admiración y a Carla Abigail, mi dulce niña, motivos de superación y felicidad en la vida.

A mis hermanos: Arturo, Ana, Marina, Elena y Luz María, mi cariño y gratitud eterna.

A la memoria de mi hermano Juan, en mi corazón por siempre.

A la memoria de mis queridos suegros: Aníbal y Juana, conocerlos fue un maravilloso regalo de Dios.

AGRADECIMIENTO

Al Proyecto Concytec - Banco Mundial “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia [Contrato número 03-2018-FONDECYT-BM-PDAEG], por el financiamiento de la presente investigación.

Al Dr. Danilo Bustamante Mostajo, Dra. Martha Steffany Calderón Ríos e Ing. Samia Fernández Güimac, equipo de investigación del Proyecto Metacafé N°030-2018-FONDECYT_BM-IADT-MU, por su valioso aporte en el secuenciamiento y análisis filogenético de las cepas bacterianas en la presente investigación.

A los responsables de los laboratorios de: Entomología y Fitopatología, Investigación de Suelos y Aguas (LABISAG), Enfermedades Infecciosas y Parasitarias de Animales Domésticos y laboratorios de Biología, Microbiología y Tecnología Agroindustrial de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias (FICA), por brindarme las facilidades para la ejecución de la presente investigación.

Al personal administrativo de los laboratorios antes mencionados, especialmente a Ana Valqui Rituay, Lisbeth Yóplac Morán y Marlenia Ángeles, por el apoyo técnico, cordialidad y proactividad demostrada en su trabajo.

Al Instituto de Desarrollo de Ceja de Selva. INDES-CES-UNTRM por haber cedido el invernadero para realización del segundo objetivo del presente estudio.

A la Ing. Xiomara Valqui Reina, subdirectora de Limpieza Pública, Tratamiento y Disposición Final de la Municipalidad Provincial de Chachapoyas por brindar las facilidades para acceder a la recolección de las muestras de la Planta de Compostaje.

A los docentes del Doctorado en Ciencias para el Desarrollo Sustentable de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, cuya experiencia ha contribuido grandemente a nuestra formación.

Al Dr. Carlos Millones Chanamé, asesor y mentor, por su invaluable apoyo y orientación en la conducción de la presente investigación.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO
RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI

RECTOR

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

VICERRECTOR ACADÉMICO

Dr. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN

VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN

Dr. RAÚL RABANAL OYARCE

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE POSGRADO

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL

PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 6-K

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO () / DOCTOR (X)

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada CONSORCIOS MICROBIANOS PARA POTENCIAR EL COMPOSTAJE DE RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS URBANOS A BAJAS TEMPERATURAS; cuyo autora ERNESTINA ROSARIO VÁSQUEZ CASTRO es estudiante del ciclo/egresado (X) de la Escuela de Posgrado, Maestría () / Doctorado (X) en CIENCIAS PARA EL DESARROLLO SUSTENTABLE, con correo electrónico institucional ernestina.vasquez@untrm.edu.pe.

El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 27 de MAYO del 2022

Firma y nombre completo del Asesor

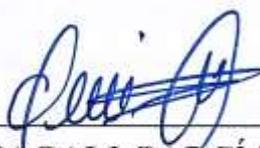


JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



Dr. PEDRO JAVIER MANSILLA CÓRDOVA

PRESIDENTE



Dra. LIGIA MAGALI GARCÍA ROSERO

SECRETARIA



Dr. CARLOS HINOJOSA SALAZAR

VOCAL

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



ANEXO 6-O

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO () / DOCTOR (X)

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Consorcios microbianos para potenciar el compostaje de residuos sólidos orgánicos urbanos a bajas temperaturas
presentada por el estudiante () / egresado (X)

de la Escuela de Posgrado, Maestría () / Doctorado (X) en *Ciencias para el Desarrollo Sustentable, mención Gestión de los Recursos Naturales y Medio Ambiente*
con correo electrónico institucional *er.nestina.vasquez@untrm.edu.pe*

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- a) La citada Tesis tiene *2.1* % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (X) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- b) La citada Tesis tiene % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.

Chachapoyas *21* de *septiembre* del *2022*



[Signature]
SECRETARIO
Ligia Magali Garzón Posco

[Signature]
PRESIDENTE
Pedro Javier Mansilla Cordova

[Signature]
VOCAL
Carlos A. Huancasi

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 6-5

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO () / DOCTOR (X)

En la ciudad de Chachapoyas, el día 11 de Octubre del año 2022 siendo las 16:00 horas, el aspirante Mg. Finesthira Rosario Vázquez Castro, Asesorado por Dr. Carlos Eduardo Melles Chacame, defiende en sesión pública presencial () a distancia () la Tesis titulada: "Consorcios microbianos para potenciar el compostaje de residuos sólidos orgánicos urbanos a bajas temperaturas", para obtener el Grado Académico de Maestro () / Doctor () en Ciencias para el desarrollo sustentable, a ser otorgado, por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, conformado por:

Presidente: Dr. Pedro Favón Manillo Córdova
Secretario: PhD. Ligia Magali Carcía Rosero
Vocal: Dr. Carlos Alberto Hingosa Salazar

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y método, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis de Maestría () / Doctorado (), en términos de:

Aprobado () por Unanimidad () / Mayoría () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 18:00 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Grado Académico de Maestro () / Doctor ().


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....
.....

ÍNDICE

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS DE DOCTORADO EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM.....	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
AUTORIDADES DE LA UNTRM	v
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS.....	vi
JURADO EVALUADOR	vii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS.....	viii
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS	ix
ÍNDICE	x
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT.....	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	5
1.1.1. Residuos sólidos urbanos (RSU)	5
1.1.2. Compostaje	5
1.1.3. Parámetros fisicoquímicos del compostaje.....	7
1.1.4. Sustrato y agente de carga	10
1.1.5. Inoculación con microorganismos para potenciar el compostaje	11
1.1.6. Enzimas microbianas: celulasas y amilasas.....	12
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Etapa I: Aislamiento, identificación y selección de cepas microbianas con actividad celulolítica y amilolítica.....	14
2.1. Ámbito y Material de estudio	14

2.2. Determinación de parámetros fisicoquímicos de las muestras: pH, temperatura, conductividad eléctrica (CE) y humedad.....	15
2.3. Aislamiento y tamizaje de bacterias celulolíticas a 30°C	16
2.4. Tamizaje de la actividad enzimática bacteriana a 15°C	18
2.5. Identificación de las cepas bacterianas	18
2.5.1 Análisis filogenético molecular de las cepas bacterianas	18
2.5.2 Caracterización morfológica	19
2.5.3 Caracterización bioquímica y fisiológica.....	20
2.6. Determinación cuantitativa de la producción de celulasa y amilasa de las cepas bacterianas	20
2.7. Análisis de datos	21
2.8. Conformación de los consorcios microbianos.....	22
2.9. Ensayo de antagonismo	22
Etapa II: Determinación de la eficiencia de los consorcios microbianos en el compostaje de residuos orgánicos urbanos a baja temperatura.....	23
2.10. Ámbito del estudio	23
2.11. Residuos sólidos orgánicos urbanos.....	23
2.12. Análisis físico químico de los residuos sólidos orgánicos urbanos (RSOU) ...	23
2.13. Propagación de los consorcios microbianos	25
2.14. Instalación de los sistemas de compostaje	26
2.15. Inoculación de los consorcios microbianos.....	26
2.16. Manejo de las composteras: controles y mediciones	26
2.17. Cosecha del compost.....	26
2.18. Análisis y evaluación del compost obtenido	27
2.19. Análisis de datos	28
III. RESULTADOS	30
Etapa I: Aislamiento, identificación y selección de cepas microbianas con actividad celulolítica y amilolítica.....	30

3.1. Caracterización fisicoquímica de las muestras	30
3.2. Aislamiento bacteriano y tamizaje de la actividad celulolítica y amilolítica a 30°C y 15°C.	31
3.3. Selección de las cepas bacterianas con mejor actividad enzimática a 15°C.....	33
3.4. Identificación de las cepas bacterianas	38
3.5. Determinación cuantitativa de la producción de celulasas y amilasas	44
3.6. Estimación cuantitativa de la producción de celulasa y amilasa	46
3.7. Antagonismo.....	49
3.8. Conformación de los consorcios microbianos.	49
Etapa II: Determinación de la eficiencia de los consorcios microbianos en el compostaje de residuos orgánicos urbanos a baja temperatura.....	50
3.9. Temperatura, pH y conductividad eléctrica en el proceso de compostaje de residuos sólidos orgánicos.....	50
3.10. Porcentaje de carbono, nitrógeno y relación C/N en el proceso de compostaje de residuos sólidos orgánicos.	51
3.11. Evaluación del compost.	54
IV. DISCUSIÓN	56
V. CONCLUSIONES	63
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos para la Evaluación de los Consorcios Microbianos en el Compostaje de Residuos Sólidos Orgánicos Urbanos.....	29
Tabla 2. Características Físicoquímicas de las Muestras de la Planta de Compostaje Municipal de Chachapoyas.....	30
Tabla 3. Características Físicoquímicas de las Muestras de Suelo del Bosque de Palmeras de Ocol, Amazonas, Perú.....	31
Tabla 4. Número de Bacterias Aisladas de la Planta de Compostaje Municipal de Chachapoyas con Actividad Celulolítica y Amilolítica a 30° y 15° C.....	32
Tabla 5. Número de Bacterias Aisladas del Bosque de Palmeras de Ocol, con Actividad Celulolítica y Amilolítica a 30° y 15°C.....	33
Tabla 6. Número de Cepas y Porcentaje de Especies Bacterianas Identificadas Mediante el Análisis Filogenético Molecular.....	40
Tabla 7. Tinción Gram, Forma y Dimensiones de las Bacterias Identificadas de la Planta de Compostaje Municipal de Chachapoyas y del Bosque de Palmeras de Ocol.	41
Tabla 8. Resultados de las Pruebas Bioquímicas: Catalasa, Indol, Citrato, Producción de Hemolisinas y Coagulasa de las Cepas Identificadas.....	42
Tabla 9. Caracterización Fisiológica de las Cepas Identificadas, Concerniente a las Pruebas de Tolerancia a Diferentes Temperaturas, pH y Concentraciones de NaCl.....	43
Tabla 10. MANOVA Bifactorial de los Efectos de las Cepas y Temperaturas Bajas y sus Efectos Combinados en la Actividad Metabólica Bacteriana	44
Tabla 11. Conformación de los Consorcios Microbianos Según su Actividad Enzimática.....	49
Tabla 12. Coliformes Totales, Coliformes Fecales y Salmonella en el Compost de RSOU-Chachapoya, Según Tratamiento.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Recolección de las Muestras de la Planta de Compostaje Municipal de Chachapoyas (izquierda) y de Suelo del Bosque de Palmeras de Ocol (derecha).....	15
Figura 2. Tamizaje de las Muestras (izquierda), Prueba del Rojo Congo (centro) y Cultivos Axénicos de las Bacterias Aisladas.	17
Figura 3. Prueba del Lugol para Evidenciar la Actividad Amilolítica de las Cepas Bacterianas Aisladas.	17
Figura 4. Propagación de los Consorcios Microbianos.	25
Figura 5. Análisis de Clúster para Evaluar la Actividad Bacteriana Celulolítica a 15°C de las Cepas Aisladas de la Planta de Compostaje de la Municipalidad Provincial de Chachapoyas (Método de Ward).....	34
Figura 6. Análisis de Clúster para Evaluar la Actividad Amilolítica a 15°C de las Cepas Bacterianas Aisladas de la Planta de Compostaje de la Municipalidad de Chachapoyas (Método de Ward).....	35
Figura 7. Análisis de Clúster para Evaluar la Actividad Celulolítica a 15° de las Cepas Bacterianas Aisladas del Suelo del Bosque de Palmeras de Ocol (Método de Ward).....	36
Figura 8. Análisis de Clúster para Evaluar la Actividad Amilolítica a 15°C de las Cepas Bacterianas Aisladas del Bosque de Palmeras de Ocol (Método de Ward)...	37
Figura 9. Árbol Filogenético de las Cepas Aisladas de la Planta de Compostaje de la Municipalidad de Chachapoyas y del Bosque de Palmeras de Ocol.....	39
Figura 10. Respuesta Metabólica de las Cepas Bacterianas Aisladas de la Planta de Compostaje de la Municipalidad de Chachapoyas y del Bosque de Palmeras de Ocol, Ensayadas en dos Temperaturas de Crecimiento.....	45
Figura 11. Respuesta Metabólica de Cepas Bacterianas Aisladas de la Planta de Compostaje de la Municipalidad de Chachapoyas y del Bosque de Palmeras de Ocol, Ensayadas en dos Temperaturas de Crecimiento.....	47
Figura 12. Componentes Principales de la Actividad Metabólica de Cepas Bacterianas Cultivadas a 15 y 20°C.....	48
Figura 13. Registro de Temperaturas (Máxima, Mínima y Media) y Humedad Relativa de Agosto a Diciembre del Año 2021	50

Figura 14. Cambios en los Niveles de pH, Temperatura y Conductividad Eléctrica Durante el Proceso de Compostaje de Residuos Orgánicos Urbanos Empleando Consorcios Bacterianos.....	52
Figura 15. Cambios en el Porcentaje de Carbono, Nitrógeno y la Relación C/N Durante el Proceso de Compostaje de Residuos Orgánicos Urbanos Empleando Consorcios Bacterianos.	53
Figura 16. Porcentaje de Germinación de Semillas de Brócoli cv. Green Sprouting Calabrese (Emerald Seeds).....	55
Figura 17. Índice de Germinación de Semillas de Brócoli cv. Green Sprouting Calabrese (Emerald Seeds).	55

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar consorcios microbianos para potenciar el compostaje de residuos sólidos orgánicos urbanos (RSOU) a bajas temperaturas. En este trabajo se aislaron cepas bacterianas de la Planta de Compostaje Municipal de Chachapoyas, ubicada en Tuctilla, distrito de Chachapoyas y suelo del Bosque de Palmeras de Ocol, distrito de Molinopampa, Amazonas, Perú. Se realizó el tamizaje para evaluar su actividad metabólica a bajas temperaturas, agrupando cepas con actividad celulolítica y actividad celulolítica/amilolítica, posteriormente, se realizó el análisis filogenético molecular y la determinación cuantitativa de producción de celulasas y amilasas en la identificación de bacterias para conformar los consorcios microbianos evaluando su eficiencia en el compostaje de los RSOU a baja temperatura. Fueron identificadas seis especies de cepas bacterianas con actividad metabólica a bajas temperaturas: *B. wiedmanii*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. safensis* subsp. *safensis* y *B. cereus*. La caracterización morfológica, fisiológica, molecular y la producción de celulasas y amilasas permitieron establecer dos consorcios bacterianos con mayor actividad celulolítica y actividad celulolítica/amilolítica. Los valores de temperatura, pH, porcentaje de carbono y la relación C/N evaluados en el proceso de compostaje de los RSOU fueron los criterios para evaluar la madurez y calidad del compost obtenido, siendo el consorcio conformado por las cepas *B. safensis* subsp. *safensis* (Tc4-67) y *B. subtilis* (TC1-16) el más eficiente para el compostaje. Este trabajo demuestra que es posible el uso de consorcios bacterianos que beneficia el proceso de compostaje de RSOU a bajas temperaturas.

Palabras clave: Actividad celulolítica, actividad amilolítica, análisis filogenético molecular, consorcio bacteriano, residuos sólidos orgánicos urbanos.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate microbial consortia to enhance the composting of urban organic solid waste (UOSW) at low temperatures. In this work, bacterial strains were isolated from the Municipal Composting Plant of Chachapoyas, located in Tuctilla, district of Chachapoyas, and soil of the Ocol Palm Forest, district of Molinopampa, Amazonas, Peru. Screening was carried out to evaluate its metabolic activity at low temperatures, grouping strains with cellulolytic activity and cellulolytic/amylolytic activity, subsequently, molecular phylogenetic analysis and quantitative determination of cellulase and amylase production were carried out in the identification of bacteria to form the microbial consortia evaluating their efficiency in composting UOSW at low temperature. Six species of bacterial strains with metabolic activity at low temperatures were identified: *B. wiedmanii*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. safensis* subsp. *safensis* and *B. cereus*. The morphological, physiological, molecular characterization and the production of cellulases and amylases allowed the establishment of two bacterial consortia with greater cellulolytic activity and cellulolytic/amylolytic activity. The values of temperature, pH, percentage of carbon and the C/N ratio evaluated in the composting process of the UOSW were the criteria to evaluate the maturity and quality of the compost obtained, being the consortium made up of the strains *B. safensis* subsp. *safensis* (Tc4-67) and *B. subtilis* (TC1-16) the most efficient for composting. This work demonstrates that it is possible to use bacterial consortia that benefit the composting process of RSOU at low temperatures.

Keywords: Cellulolytic activity, amylolytic activity, molecular phylogenetic analysis, microbial consortia, urban organic solid waste.

I. INTRODUCCIÓN

Los residuos sólidos urbanos (RSU), se encuentran dentro del grupo de los residuos municipales o de ámbito de gestión municipal, comprenden los residuos domiciliarios y los provenientes del barrido de espacios públicos y otras actividades urbanas no domiciliarias (D.L. N°1278). En las últimas décadas, ha habido un gran incremento de los RSU producto del aumento de la población, urbanización y desarrollo económico. Los residuos sólidos urbanos (RSU) contienen aproximadamente un 75 % de sustancias biodegradables que representan la fracción biológica u orgánica (Al-Dhabi, 2019), generalmente están conformados por desechos de cocina y de restaurantes, además de material lignocelulósico como desechos de jardín, malezas, podas de árboles (Voběrková et al., 2017). La fracción orgánica de los RSU es variada, siendo mucho mayor en zonas rurales y en países menos industrializados (De Vries y Andrade, 2008).

En Europa, la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (RSU) comprende aproximadamente 30-40 % (Cesaro et al., 2019) mientras que en Bangladesh, uno de los países más contaminados del mundo, este porcentaje es alrededor de 75 – 85 % (Khatiwada et al., 2016). En Perú, la situación no es diferente, según el Plan Nacional de Gestión Integral de Residuos Sólidos 2016-2024, en el año 2014, se generó 7 497 482 t/año de residuos sólidos urbanos, de los cuales el 64 % fueron residuos domiciliarios y respecto a su composición el 53,16% correspondió a la fracción orgánica. En el año 2015, el 74% de los residuos sólidos urbanos (RSU) generados en la región Amazonas se destinaron al botadero y solo un pequeño porcentaje (6,40 %) se empleó en el compostaje (Orihuela, 2018).

La falta de tratamiento adecuado de los residuos sólidos urbanos (RSU) conduce a la formación de gases de tipo invernadero como metano (CH_4) y gases de óxido nitroso (N_2O), constituyendo un riesgo para la salud de las personas (Pereira et al., 2018). El metano, después del dióxido de carbono, constituye el gas de efecto invernadero de mayor impacto en el cambio climático (Khatiwada et al., 2016). Por ello, la producción cada vez mayor de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (RSU), hace necesario establecer un sistema de gestión que sea amigable con el medio ambiente (Wei et al., 2017).

El tratamiento biológico de los residuos sólidos municipales, permite recuperar recursos biodegradables con potencial uso, siendo una alternativa a su desecho en los rellenos sanitarios (Bayard et al., 2018). En ese sentido, el compostaje resulta un método de tratamiento sostenible de los residuos sólidos orgánicos y es el más recomendado para el reciclaje por sus beneficios económicos y ambientales (Pereira et al., 2018). El compostaje es un proceso bioquímico, que los microorganismos realizan en condiciones aeróbicas, degradan los desechos orgánicos, transformándolo en un producto maduro con alto contenido de sustancias húmicas (HSs), que sirve de enmienda al suelo (Guo, Liu, & Wu, 2019).

Durante el compostaje, se origina una curva característica de incremento de temperatura que va desde la etapa inicial, llegando a la etapa mesofílica, hasta alcanzar temperaturas mayores en la etapa termofílica, y disminuyendo en las etapas de enfriamiento y maduración del compost (Raza & Ahmad, 2016; Zhao et al., 2018). La generación de calor durante el compostaje proviene de la actividad enzimática de los microorganismos para degradar carbohidratos, lípidos y proteínas presentes en la materia orgánica y la temperatura, constituye un factor regulador de la actividad metabólica degradativa en los sistemas de compostaje y predispone la sucesión de las comunidades de microorganismos presentes (Akyol et al., 2019; Liu et al., 2017; Wang et al., 2015). El alto porcentaje de material lignocelulósico en los residuos sólidos urbanos dificulta su degradación debido a su compleja estructura, conformada por los polímeros de hemicelulosa y lignina contenida en su matriz, por ello el empleo de microorganismos celulolíticos como estrategia para su descomposición resulta muy beneficiosa (Ozkam y Ahmet, 2016; Voběrková et al., 2017)

La inoculación con microorganismos representa una de las estrategias importantes para potenciar el compostaje (Reyes-Torres et al., 2018). Su empleo resulta cada vez de mayor interés para muchos investigadores (Ribeiro et al., 2017), ya que debido a su actividad metabólica aceleran la degradación de la materia orgánica, disminuyen el tiempo del proceso de compostaje y mejoran la calidad del compost, permitiendo el aumento de la mineralización de carbono y nitrógeno (Aveiga et al., 2016; Awasthi et al., 2014; Yang et al., 2018). Se ha demostrado que la actividad de los consorcios microbianos en conjunto supera a la de los microorganismos individuales, por lo que la selección de las especies

que integran el consorcio se convierte en un reto para lograr un resultado exitoso (Faust, 2019).

El compostaje desarrollado a temperatura ambiental alrededor de los 20 a 30°C ha sido ampliamente estudiado (Gou et al., 2017), y se sabe que el compostaje tradicional resulta demasiado lento para la obtención de abono orgánico que abastezca las necesidades de dos o tres cosechas anuales, por ello, el empleo de inoculantes microbianos especialmente con actividad celulolítica es una buena alternativa para acelerar el proceso de degradación (Abdel-Rahman, 2016). Un desafío técnico para el inicio del compostaje, lo representan las bajas temperaturas durante el invierno, principalmente en regiones de climas fríos (Xie et al., 2017). A temperaturas menores a 20°C la actividad de las enzimas microbianas suele volverse lenta disminuyendo considerablemente e incluso puede detenerse (Tateda et al., 2002; De Maayer et al., 2014). Esto conlleva a una menor producción de energía de los microorganismos, menor tasa de remoción de agua y biodegradación (Zhao et al., 2012). Estudios realizados demuestran que, en temporada de invierno, a temperatura ambiental baja entre 3 y 9°C, existe una menor tasa de remoción de agua y biodegradación, a causa de la menor producción de energía de los microorganismos haciendo que el proceso inicie con retraso (Zhao et al., 2012). Esto se debe a que la actividad de las enzimas microbianas se ralentiza o disminuye considerablemente a bajas temperaturas (De Maayer et al., 2014).

Se conoce que gran parte de la superficie terrestre se encuentra en forma periódica o permanentemente fría y existen microorganismos que han logrado sobrevivir en estos entornos, debido a que poseen mecanismos moleculares de adaptación (De Maayer et al., 2014). Algunos microorganismos pueden desarrollar a temperaturas inferiores a 0°C, con una temperatura óptima de 15°C, y máxima de 20°C; denominados psicrófilos, y otros, los psicrótrofos que, aunque toleran temperaturas menores a 0°C, desarrollan mejor entre 20 a 25°C (De Maayer et al., 2014). Esto abre la posibilidad de que la inoculación con microorganismos adaptados al frío juegue un papel muy importante al impulsar la etapa inicial del compostaje realizado a temperatura ambiental baja (Xie et al., 2017). A bajas temperaturas, la etapa inicial de arranque del compostaje es crucial por lo que la inoculación con microorganismos podría acelerar este proceso (Sun et al., 2021). Sin embargo, existe poca información al respecto, siendo necesario establecer la relación entre actividad enzimática y temperatura para estudiar el efecto de los inoculantes

adaptados al frío en el compostaje a bajas temperaturas (Sun et al., 2017). No obstante, aún quedan muchas interrogantes respecto a la degradación de la materia orgánica a bajas temperaturas, mayores estudios al respecto permitirían un mejor uso de los recursos y favorecería la producción de energía y degradación de compuestos (Sun et al., 2021).

La presente tesis doctoral contribuye al estudio del compostaje de residuos sólidos urbanos (RSU), mediante la identificación de especies bacterianas de interés biotecnológico a partir del suelo del Bosque de Palmeras de Ocol para el aprovechamiento de su potencial metabólico celulolítico y amilolítico a bajas temperaturas, asimismo de bacterias aisladas de material orgánico en diferentes etapas de descomposición. Las especies identificadas que evidenciaron mejor actividad celulolítica y amilolítica, conformaron un consorcio bacteriano empleado en la degradación de residuos sólidos urbanos (RSU), contribuyendo al adecuado manejo y utilización de los desechos orgánicos urbanos de la ciudad de Chachapoyas, de forma sostenible y consecuente con el medio ambiente.

El estudio se desarrolló en dos fases acorde a los siguientes objetivos específicos:

- i. Aislar, seleccionar e identificar cepas microbianas con actividad celulolítica y amilolítica a partir de diferentes sustratos.
- ii. Determinar la eficiencia de los consorcios microbianos aislados, en el compostaje de residuos sólidos urbanos (RSU) a baja temperatura.

1.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.1. Residuos sólidos urbanos (RSU)

Los residuos sólidos urbanos (RSU), son aquellos residuos producidos en domicilios, comercios, oficinas y edificios públicos, siendo la cantidad generada mucho mayor en zonas urbanas y de desarrollo industrial (Bonmatí, 2008). En los residuos generados en centros urbanos, predomina generalmente el componente orgánico o biodegradable, principalmente residuos de alimentos, estiércol de animales, podas de jardinería, y pueden ser degradados por los microorganismos (Puerta, 2004). Se ha determinado que, a pesar de la heterogeneidad en la generación y composición de los residuos sólidos domiciliarios en ciudades importantes de Paraguay, México, Perú, Colombia y Ecuador, la fracción orgánica sigue siendo predominante (Hernández et al, 2017).

En América Latina, los residuos sólidos urbanos (RSU) que se generen, pasará de 130 millones de toneladas en el 2012 a 220 millones de toneladas en el 2025 (Hoornweg y Bhada-Tata, 2012). La ineficiencia en la gestión de los residuos sólidos urbanos (RSU) y su inadecuada disposición final, representa un serio problema de contaminación ambiental en las grandes ciudades, que afecta la salud humana (Lloréns et al, 2007). Por ello la adecuada valorización que se realice de la fracción orgánica, mediante el compostaje, vermicompostaje o producción de biogás, alimentación animal, entre otras, impactaría positivamente en el medioambiente (Puerta, 2004).

1.1.2. Compostaje

Sarkar et al, (2010), definen el compostaje como “una descomposición aeróbica de materiales orgánicos por una variedad de microorganismos bajo condiciones controladas para convertir en un producto similar al humus que se emplea en la agricultura como fertilizante”. El compostaje permite reducir la eliminación de la fracción orgánica de los residuos sólidos a los vertederos o rellenos sanitarios (Muscolo et al, 2018). El compost tiene diferentes aplicaciones, que pueden ser la fertilización de suelo, restauración de suelos degradados, secuestro de carbono, así como el desarrollo de actividades productivas paisajísticas, debido a ello, el compostaje tiene un importante rol en la sostenibilidad de los agroecosistemas (Pergola et al, 2018).

El proceso de compostaje presenta cuatro fases que se describen a continuación:

Etapa de inicio y etapa mesofílica

El inicio del compostaje comprende desde el incremento de la temperatura ambiente (0°C-25°C) hasta rangos de 25°C-45°C (Partanen et al., 2010). En esta etapa, los grupos microbianos predominantes aprovechan la abundancia de nutrientes y generan energía producto del metabolismo principalmente de los carbohidratos (Antunes et al., 2016).

Etapa termofílica

Esta etapa se caracteriza por el incremento de la temperatura como consecuencia de la intensa actividad microbiana (Wei et al., 2018), las altas temperaturas generadas, pueden variar de 45 -70°C (Azim et al., 2017; Ryckeboer et al., 2003). Asimismo, se intensifica la despolimerización de los compuestos carbonados debido a la intensificación de la actividad metabólica microbiana (Antunes et al., 2016). Ocurre la degradación de la lignocelulosa a lignina, probablemente por hongos termofílicos y actinomicetos, ya que hongos, como los causantes de la podredumbre blanca de la raíz, más eficientes en la mineralización de la lignina, no sobreviven a temperaturas altas (Tuomela et al., 2000). Por otro lado, las altas temperaturas de esta etapa tienen un efecto de esterilización del compost, disminuyendo notablemente las poblaciones de patógenos, como *Pseudomonas*, *Flexibacter* (Zhang et al., 2016), *Nitrobacter*, (Chroni et al., 2009), *Escherichia coli*, *Streptococcus fecales*, *Salmonella*, así como levaduras y hongos filamentosos (Hassen et al., 2001).

Etapa de enfriamiento

También denominada por Ryckeboer et al, (2003), como segunda fase mesofílica, es transitoria entre las fases de biooxidación, (mesofílica y termofílica) y la fase de maduración (López-González et al., 2015). Debido a la notable reducción de la temperatura, las bacterias de la etapa termofílica tiende a disminuir (Liu et al., 2017). Es una etapa de estabilización del sustrato, donde reaparecen los microorganismos mesófilos (Azim et al., 2017). Sin embargo; éstos difieren de los presentes en la primera etapa mesofílica (Ryckeboer et al., 2003). Por lo general, en esta fase y en la maduración, predominan Actinomicetos, que junto a los hongos degradan los materiales recalcitrantes (Bernal et al., 2009).

Etapa de maduración

Los grupos de bacterias que aparecen en esta etapa, están relacionados con el metabolismo de sustancias remanentes difíciles de degradar, principalmente lignina, cuya degradación estaría asociada a la producción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Antunes et al., 2016). En esta última fase, también se ha detectado niveles altos de actividad enzimática de la celulasa y B-glucosidasa, la cual ha sido correlacionada con las comunidades funcionales de bacterias y hongos (Li et al., 2013). Las reacciones secundarias que ocurren en esta etapa, determinan el proceso de humificación, generándose los ácidos fúlvicos (FA), los cuales son compuestos intermedios en la producción de los ácidos húmicos (HA), y posteriormente dan lugar a compuestos húmicos estables y beneficiosos para el suelo (Azim et al., 2017). La relación existente entre AH/AF, sería indicador de la dinámica microbiana al final del compostaje (Awasthi et al., 2014). La adecuada madurez y estabilidad del compost, también están asociadas a la alta conductividad eléctrica, contenido de cobre y baja fitotoxicidad (Silva et al., 2016).

1.1.3. Parámetros fisicoquímicos del compostaje

Los parámetros fisicoquímicos como temperatura, pH, materia orgánica, aireación, humedad, entre otros, son determinantes para el desarrollo de los microorganismos (Nakasaki et al., 2019). Estos parámetros influyen la composición de las poblaciones microbianas asociadas a los sistemas de compostaje (Zhang et al., 2011) siendo su monitoreo muy importante para regular las comunidades microbianas presentes y hacer más eficiente el proceso (Wang et al., 2015).

Temperatura

La degradación de los sustratos por acción microbiana, genera cambios de temperatura (Antunes et al., 2016), originando desde la etapa inicial una curva característica de incremento de la misma, llegando a la etapa mesofílica, hasta alcanzar temperaturas mayores en la etapa termofílica, y disminuyendo en las etapas de enfriamiento y maduración del compost (Raza & Ahmad, 2016; Zhao et al., 2018). A la vez, la temperatura se considera un factor que regula la actividad metabólica degradativa en los sistemas de compostaje y predispone a las variaciones de las comunidades de microorganismos (Akyol et al., 2019; Liu et al., 2017; Wang et al., 2015).

Relación Carbono: Nitrógeno (C: N)

La relación carbono/nitrógeno (C: N) es un parámetro fisicoquímico determinante en la estructura y distribución de las comunidades de microorganismos durante la degradación de la materia orgánica. El carbono presente en la materia orgánica, resulta imprescindible como fuente energética para el desarrollo microbiano (Liu et al., 2017; Wang et al., 2015). El nitrógeno es un macronutriente crítico para los microorganismos, siendo fundamental para la síntesis de compuestos nitrogenados como aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos (Azim et al., 2017). La relación inicial óptima de C:N, se encuentra en el rango de 25 – 30 (Awasthi et al., 2018). El empleo de una relación mayor a este rango, retarda el compostaje, por el exceso de carbono y contenido limitado de nitrógeno (Bernal et al., 2009). El empleo de una relación C:N menor al rango óptimo, ocasiona que los microorganismos agoten rápidamente el carbono presente e incrementen el consumo de nitrógeno (Román et al., 2015). En este caso, el exceso de nitrógeno puede originar su volatilización como gas amonio o su lixiviación como nitrato (Ryckeboer et al., 2003). La relación C:N tiende a disminuir durante el proceso de compostaje (Wei et al., 2018), puesto que, a medida que se degradan los sustratos, el contenido de carbono se reduce y el contenido de CO₂ y nitrógeno se incrementa (Voběrková et al., 2017). Al finalizar el compostaje, la relación C:N se sitúa entre 16 a 20, siendo un buen indicador de la madurez del compost (Liu et al., 2017; Goyal, Dull y Kapoor, 2005) y de la degradación del sustrato inicial (Tighe-Neira et al., 2014). La aplicación de compost inmaduro, perjudica el crecimiento y desarrollo de las plantas, debido al bloqueo biológico del nitrógeno disponible en el suelo, producción de sustancias fitotóxicas y la disminución del oxígeno, generando un ambiente reductor para las raíces (Jimenez y Pérez Garcia, 1989).

pH

El pH óptimo permite el establecimiento y actividad de los microorganismos (Voběrková et al., 2017). Los valores óptimos de pH inicial se ubican entre 5,5 a 8 (Bertoldi et al., 1983). Valores de pH por debajo de 5,5 al inicio del compostaje, están asociados al mayor contenido de nitrógeno en el sustrato (Wang et al., 2015). La variación del pH es un indicador directo de la actividad microbiana (Li et al., 2019), su alteración representa un factor estresante que influye en la sucesión de las comunidades microbianas durante el compostaje (Liu et al., 2017). En las etapas mesofílica y termofílica, el pH tiende a acidificarse debido a la generación de ácidos orgánicos producto de un metabolismo incompleto de los productos de desecho (Voběrková et al., 2017). En la etapa de

maduración, el pH llega a estabilizarse hasta niveles de 7 u 8 (Raza & Ahmad, 2016; Zhao et al., 2018), siendo este rango de pH requerido en el compost, debido a que después de su aplicación como biofertilizante no afectará el pH del suelo y por lo tanto, habrá una mejor disponibilidad de nutrientes para las plantas (Nadia et al., 2015). En consecuencia, el pH se constituye en un parámetro importante asociado a la calidad del compost (Wang et al., 2015).

Humedad

Para algunos autores, la humedad resulta más influyente que la temperatura para el metabolismo microbiano durante el compostaje (Zhang et al., 2011), puesto que proporciona el medio acuoso para la disolución de los nutrientes y facilita la actividad enzimática del metabolismo microbiano (Liu et al., 2017). Un rango inicial de humedad de 50-60% es lo requerido (Azim et al., 2017). Los valores iniciales por encima o por debajo de dicho rango, alteran la estructura física de la materia orgánica en descomposición, haciendo difícil el metabolismo microbiano (Awasthi et al., 2018; Wang et al., 2015).

Oxígeno

Durante el compostaje, la degradación de compuestos orgánicos ocurre en presencia de oxígeno, lo cual permite la mineralización del carbono y nitrógeno, que resurgen a la atmósfera como CO₂ (Pereira et al., 2018). La disponibilidad del oxígeno influye en el perfil microbiano del compost, permitiendo el desarrollo de los microorganismos responsables de la degradación progresiva del material lignocelulósico y de la transformación de la hemicelulosa a celulosa y lignina (Rivas et al., 2017). De reducirse la concentración de oxígeno, por la baja porosidad de la materia en descomposición (Wang et al., 2015), disminuye la degradación, y existe menor pérdida de humedad y calor (Guo et al., 2012), originando condiciones anaeróbicas no deseadas, propicias para el surgimiento de gases de mayor efecto invernadero como el CH₄ y N₂O, que impactan en el medio ambiente (Pereira et al., 2018).

Volteado

Las condiciones anaeróbicas pueden provocar la desaceleración temporal de la actividad enzimática, influyendo no solo en la composición y estructura microbiana sino también en sus perfiles funcionales (Antunes et al., 2016). Por tanto, se requiere suministrar oxígeno en todas las etapas del compostaje aerobio, incluso durante la maduración, lo cual influye en la calidad del compost (Guo et al., 2012; Pereira et al., 2018). El volteado de los desechos orgánicos durante el compostaje, es una técnica que permite suministrar

oxígeno, favoreciendo la oxidación aeróbica realizada por los microorganismos. A mayor frecuencia de volteado, mayor tasa de degradación y menor tiempo de maduración (Getahun et al., 2012). El volteado, también favorece el resurgimiento de microorganismos aerobios al finalizar la etapa termofílica, los cuales completan la degradación de las macromoléculas remanentes, originando una fermentación secundaria, hasta que la temperatura finalmente desciende (Liu et al., 2017).

1.1.4. Sustrato y agente de carga

El tipo de materia orgánica empleada como sustrato y la interacción con los parámetros fisicoquímicos influyen en la dinámica de las comunidades microbianas intrínsecas durante el compostaje (Rivas et al., 2017; Villar et al., 2016; Zhao et al., 2018).. El tamaño de las partículas del sustrato puede ser útil para el control de las propiedades fisicoquímicas durante el compostaje, el menor tamaño de las partículas favorece el desarrollo microbiano y contribuye al aumento de la temperatura (Liu et al., 2017). El tamaño de partícula óptimo empleado varía según distintos estudios, pudiendo ser de 1 a 2 mm (Wei et al., 2018), 10 a 20 mm (Awasthi et al., 2014), de 20 a 30 mm (Gou et al., 2017; Zhao et al., 2017).

La materia orgánica que se emplea para el compostaje puede ser de fácil degradación por los microorganismos, como los azúcares solubles, ácidos orgánicos, entre otros (Bertoldi et al., 1983). También existen materiales refractarios o de difícil degradación, como la lignocelulosa, un complejo formado por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina fuertemente unidos entre sí (Pérez et al., 2002; Zhao et al., 2017). Residuos con mayor contenido de lignina son más recalcitrantes a la degradación, debido a su estructura tri dimensional que protege a la celulosa y hemicelulosa de la acción enzimática microbiana (Bayard et al., 2018).

Diferentes tipos de sustratos orgánicos han sido evaluados para su empleo en el compostaje. Dentro de las fuentes orgánicas utilizadas destacan los residuos de origen vegetal (Tighe-Neira et al., 2014) y los de origen animal, como el estiércol de vaca (Meng et al., 2019), estiércol de cerdo (Huang et al., 2004), estiércol de caballo (Tortarolo et al., 2008), y estiércol de pollo (Gu et al., 2017). También se han empleado residuos de origen industrial como los desechos de cervecería (Storey et al., 2015).

Para iniciar el compostaje, al sustrato seleccionado, suele agregarse agentes de carga con la finalidad de corregir la baja relación carbono-nitrógeno (Bernal et al., 2009). El mayor

contenido de agente de carga en la mezcla, mejora el flujo de aire al interior, lo cual favorece el desarrollo de microorganismos aerobios (Pergola et al., 2018) y disminuye las emisiones de gases de efecto invernadero como NH₃, N₂O y CH₄, beneficiando al medio ambiente (Bong et al., 2016; Neugebauer y Sołowiej, 2017). Los agentes de carga, generalmente provienen de material vegetal (Tuomela et al., 2000) y la selección depende de su disponibilidad, pudiendo ser aserrín (Getahun et al., 2012; Jain et al., 2018), astillas de madera (Partanen et al., 2010), paja de trigo (Akyol et al., 2019), pajilla de arroz (Wei et al., 2018; Zhou et al., 2015), papel (Voběrková et al., 2017), entre otros. El compostaje de residuos de cocina en hogares polacos demostró que el agregado de al menos 40% de agente de carga (residuos de jardín, hojas secas, etc.), redujo significativamente la emisión de gases de efecto invernadero (Neugebauer y Sołowiej, 2017). Por otro lado, se ha comprobado que mezclas que contienen 70% de agente de carga disminuyen no solo la pérdida de nitrógeno sino también la generación de olores, lixiviados (Guidoni, et al., 2018).

1.1.5. Inoculación con microorganismos para potenciar el compostaje

La inoculación con microorganismos lignocelulolíticos durante el compostaje resulta de gran interés por los beneficios durante el proceso debido a su actividad metabólica (Vásquez y Millones, 2021). Los consorcios microbianos tienen una influencia positiva en las comunidades microbianas endógenas durante el compostaje, tal es el caso del consorcio *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus nidulans* y *A. oryzae* (Xu, et al., 2019). El empleo de especies de *Bacillus* y *Pseudomonas*, aisladas del compostaje de residuos de vegetales, subcultivadas e inoculadas en el proceso de degradación del mismo tipo de residuos, influyó positivamente en la calidad del compost obtenido en un período de 50 días (Indumathi, 2017). Asimismo, la actividad enzimática de la celulasa durante el compostaje se incrementó con el empleo del consorcio formado por *Streptomyces* sp. y *Actinobacteria bacterium* (Zhao et al., 2017). Otras enzimas como la ureasa y polifenol oxidasa también han demostrado mayor actividad durante el compostaje, al inocularse el consorcio formado por *Ralstonia* sp., *Penicillium* sp., *P. aurantiogriseum* y *Acremonium alternatum* (Yang et al., 2018). La inoculación de la bacteria celulolítica *Axoxubacillus* sp MGA110, aislada del compostaje de residuos sólidos municipales (RSU), demostró su efectividad al ser empleada en la degradación de la materia orgánica incrementando la duración de la fase termofílica y la actividad de la celulasa (Ghaffari et al., 2011).

Por otro lado, para superar el problema del inicio del compostaje de residuos sólidos a temperatura ambiental baja, se ha ensayado el empleo de enmiendas de biochar en el compostaje de estiércol de cerdo, prolongándose la duración de la etapa termofílica alrededor de 55°C, cuando la temperatura ambiental fue de 5°C (Liu et al., 2019). Gou et al, (2017) evaluaron el empleo de un consorcio microbiano termofílico psicotrópico conformado por *Brevundimonas diminuta*, *Flavobacterium glaciei*, *A. niger*, *Penicillium commune*, el cual aceleró el inicio del compostaje de estiércol de leche y paja de arroz realizado en un reactor en condiciones de baja temperatura. Asimismo, Xie et al, (2017), desarrollaron un método de inoculación de un consorcio microbiano adaptado al frío (CAMC), para iniciar con éxito el compostaje a 10°C, el cual actuó generando el autocalentamiento de la pila de manera efectiva a las 37 horas de iniciado el compostaje.

1.1.6. Enzimas microbianas: celulasas y amilasas

Celulasas

Las celulasas son homopolímeros lineales de unidades de celobiosa con enlaces 1-4 glicosídicos (Abdullah et al., 2016). Conforman un complejo sistema enzimático que catalizan la hidrólisis de la celulosa en glucosa, mediante la acción sinérgica de tres enzimas: endo-1,4 glucanasa, celobiohidrolasas, (exoglucanasas, endoglucanasas y glucosidasas (Sadhu y Tushar, 2013). Constituye un grupo de enzimas de gran importancia e interés industrial, producidas por hongos y bacterias; sin embargo, la inestabilidad térmica a las altas temperaturas es una de las principales desventajas en el uso de cepas fúngicas (Abdel-Rahman, 2016). Por ello, actualmente las celulasas de origen bacteriano son ampliamente estudiadas, debido a que conforman complejos multienzimáticos y a diferencia de los hongos, las bacterias habitan diferentes ambientes y nichos industriales, resistiendo a agentes ambientales agresivos; tienen además una tasa alta de crecimiento lo que permite mayor producción recombinante de enzimas (Sadhu y Tushar, 2013).

Numerosos géneros de bacterias han sido reportados como productores de celulasas, entre los más estudiados se encuentran: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomospira*, *Bacillus*, *Ruminococcus*, *Streptomyces*, entre otros (Masngut et al., 2017). Por otro lado, celulasas con gran potencial para su uso en la industria, que fueron obtenidas de cepas salvajes y

mutantes de *Bacillus* tuvieron una actividad óptima a 50°C y a pH de 5,0 a 9,0 (Abdullah et al., 2016).

Amilasas

Las amilasas constituyen un grupo de enzimas que escinden los enlaces glicosídicos de la molécula del almidón en dextrinas y oligosacáridos. Comprenden tres tipos: las α -amilasa, las β -amilasas y las γ -amilasas (Sundarram y Murthy, 2014). Se trata de enzimas producidas por plantas, animales y microorganismos (bacterias y hongos), sin embargo, las α -amilasas de origen microbiano, particularmente las producidas por bacterias tienen gran demanda debido a su rápido crecimiento y producción menos costosa, lo cual representa una ventaja comparada con los hongos (Gopinath et al., 2017).

Las α -amilasas hidrolizan los enlaces glicosídicos α -1,4 del almidón originando moléculas de glucosa, maltosa y maltotriosas. El almidón está construido de dos polímeros de glucosa: la amilosa que constituye el 20-25% y amilopectina el 75-80%. La amilosa es una cadena lineal de unidades de moléculas de glucosa unidas por enlaces α -1,4 glicosídicos, mientras que la amilopectina es una cadena ramificada de moléculas de glucosa, unidas cada 15 a 45 unidades de glucosa por enlaces α -1,6 glicosídicos (Sundarram y Murthy, 2014).

Además, las amilasas microbianas son de uso predominante en los procesos industriales debido a ello vienen siendo ampliamente estudiadas. Los métodos que determinan la actividad de esta enzima se basan en el incremento de azúcares reductores, disminución del color del iodo en el sustrato empleado y disminución de la viscosidad de la suspensión de almidón (Gupta et al., 2003).

Existen reportes de diversos géneros de bacterias productoras de α -amilasas, principalmente del género *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* y *B. amiloliquefaciens* (Souza y Magalhães, 2010). *Lipomyces konenkae*, *Streptomyces bovis*, y hongos productores de glucoamilasas: *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus awamori*, y *Aspergillus turingensis* (Favaro et al., 2015).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Etapa I: Aislamiento, identificación y selección de cepas microbianas con actividad celulolítica y amilolítica

2.1. Ámbito y Material de estudio

En la primera fase del estudio se emplearon dos tipos de muestras. ambas no probabilísticas, recolectadas en el mes de enero del año 2021. El primer tipo de muestra fue residuos sólidos orgánicos urbanos (RSOU) de la Planta de Compostaje Municipal de la ciudad de Chachapoyas, ubicada en Tuctilla (S: 06°14'21.2", WO: 77° 50'47.4" y 2 311 m.s.n.m), región Amazonas, Perú. Según la metodología desarrollada por Wang et al. (2019), se recolectaron muestras de 5 pilas que se encontraban en diferentes etapas de compostaje. Cada muestra fue de 500 g, tomadas a diferentes puntos de profundidad de las pilas de compostaje.

El segundo tipo de muestra fue suelo del Bosque de Palmeras de Ocol, ubicado en el distrito de Molinopampa, región Amazonas, para lo cual se adaptó la metodología de Viteri (2016) fijando cinco puntos de colecta diferentes, en cada punto se tomaron 500 g de suelo: (OC-21-A: S: 06°15'58,9", WO: 77° 34'14,3", 2 261 m.s.n.m; OC-21-B: S: 06°15'5,4", WO: 77° 34'27,3", 2 281 m.s.n.m; OC-21-C: S: 06°15'49,1", WO: 77° 34'33,7", 2 306 m.s.n.m. ; OC-21-D: S: 06°15'44,2", WO: 77° 34'41,4", 2 357 m.s.n.m ; OC-21-E: S: 06°15'43,1"; WO: 77° 34'41,1", 2 347 m.s.n.m.) (Figura 1).

Las muestras colectadas fueron depositadas individualmente, en bolsas de polietileno autosellables, codificadas y transportadas a 4°C con gel refrigerante, en una caja de tecnopor para su procesamiento en el Laboratorio de Biología de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, (UNTRM), ubicada en la ciudad de Higos Urco, calle Universitaria 304, Chachapoyas, región Amazonas.

Figura 1

Recolección de las Muestras de la Planta de Compostaje Municipal de Chachapoyas (izquierda) y de Suelo del Bosque de Palmeras de Ocol (derecha)



2.2. Determinación de parámetros fisicoquímicos de las muestras: pH, temperatura, conductividad eléctrica (CE) y humedad

El análisis físico químico de las muestras consistió en la determinación de la temperatura, pH y conductividad eléctrica (CE), los cuales fueron registrados directamente en las zonas de muestreo. La temperatura fue tomada con un termómetro impermeable digital para compost (HANNA HI 9350005, Rumania). Para determinar el pH se empleó un medidor multiparámetro de pH del suelo (HANNA HI99121, Rumania). La conductividad eléctrica (CE) se registró con un kit de medición de conductividad directa de la actividad del suelo (HANNA HI93310, Rumania).

El contenido de humedad se determinó mediante el método gravimétrico, empleando la fórmula propuesta por la American Wood Preservers Association Standards:

$$MC\% = W - w * 100$$

donde (MC) es el contenido de humedad, W es el peso inicial de la muestra y w es el peso constante luego de retirar la muestra del horno 110°C (Saha, 2014). Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Biología y Microbiología - UNTRM, Perú.

2.3. Aislamiento y tamizaje de bacterias celulolíticas a 30°C

El aislamiento de las bacterias celulolíticas se realizó empleando el método de diluciones seriadas, a partir de 10 g de muestra homogenizada y tamizada, (empleando un tamiz N° 1° U.S. Standard Testing Sieve de abertura 2.00 mm) y 90 mL de agua peptonada 0,1% (p/v), como diluyente (Song et al., 2018; Zhao et al., 2017). A partir de la suspensión inicial se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-6}). De cada dilución, se tomó una alícuota de 100 μ L que fue diseminada sobre la superficie de placas con medio Agar Carboximetilcelulosa (CMC) 1% compuesto por: carboximetilcelulosa 10 g/L, triptona 2 g/L, KH_2PO_4 4 g/L, Na_2HPO_4 4 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,004 g/L, agar 15 g/L y el pH ajustado a 7. Las placas fueron inoculadas por duplicado e incubadas a 30°C durante 24 a 48 horas (Behera et al., 2016). Las colonias que crecieron en forma aisladas fueron seleccionadas y sub cultivados mediante siembra por estría empleando placas con medio CMC 1% por duplicado, incubadas a la misma temperatura anterior.

Posteriormente, se realizó un primer tamizaje a todos los aislados obtenidos para evidenciar la producción de celulasa, mediante la prueba del Rojo Congo (Fathollahi et al., 2019).

Esta prueba consistió en cubrir la superficie de los cultivos en placa con el colorante rojo Congo 1 % (p/v) durante 15 minutos. Posteriormente se realizó el lavado con una solución de NaCl 1 M la cual se descartó transcurrida una hora. Finalmente, se agregó una solución de ácido acético al 2% durante 10 segundos, lo cual permitió evidenciar con mayor claridad el halo formado alrededor de la colonia. En los cultivos donde se observó dicha reacción, se registró el diámetro de la colonia y el halo formado (Nadia et al., 2015; Viteri, Castillo, & Viteri, 2016).

Los inóculos de las colonias de bacterias con actividad celulolítica fueron subcultivadas y purificadas en placas de agar CMC 1% hasta la obtención de cultivos axénicos. Finalmente fueron transferidas asépticamente a tubos con Agar Luria Bertoni (LB) (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5%, agar 15%, H_2O 1L), pH 6,0 – 7,0 (w/v) e incubados a 30°C durante 24 horas (Zhao et al., 2017). Los cultivos puros fueron codificados de acuerdo con el lugar de muestreo, número de muestra (punto de colecta o número de pila) y número correlativo conforme al aislamiento de la colonia. Se añadió a los cultivos una solución de glicerol 20% y fueron mantenidos en congelación para posteriores ensayos (Ozkan y Ahmet, 2016) (Figura 2).

Figura 2

Tamizaje de las Muestras (izquierda), Prueba del Rojo Congo (centro) y Cultivos Axénicos de las Bacterias Aisladas



Capacidad amilolítica de los aislados bacterianos

Las bacterias con capacidad celulolítica seleccionadas en el tamizaje a 30°C, fueron cultivadas en Agar Almidón 2% (AA) (extracto de carne 3 g/L, NaCl 6 g/L, almidón 2g/L, agar 12 g/L). Transcurridas 24 a 48 h de incubación, la superficie de los cultivos fue cubierta con una solución de Lugol (2 g ioduro de potasio y 1 g de iodo en 300 mL de agua) para evidenciar las zonas claras de degradación por actividad de la amilasa (Ng et al., 2019) (Figura 3).

Figura 3

Prueba del Lugol para Evidenciar la Actividad Amilolítica de las Cepas Bacterianas Aisladas



2.4. Tamizaje de la actividad enzimática bacteriana a 15°C

Se realizó un segundo tamizaje a 15°C para evaluar la actividad celulolítica y amilolítica, para lo cual los aislados obtenidos fueron sub cultivadas mediante puntura, por triplicado en placas Petri con agar carboximetilcelulosa CMC 1% y Agar Almidón 2%, respectivamente. Los cultivos fueron incubadas a 15°C en una incubadora refrigerada (VELP.Scientifica, Italia), durante 24 a 72 horas.

Transcurrido el período de incubación, se determinó la actividad celulolítica y amilolítica de las cepas mediante la prueba de Rojo Congo y prueba de Lugol descritas anteriormente. Se realizó la medición en milímetros del diámetro de las colonias y de los halos formados producto de la hidrólisis de la celulosa y/o almidón, respectivamente.

La determinación del índice celulolítico (IC) o índice amilolítico (IA) fue calculado mediante la siguiente ecuación: *(Naresh et al., 2019).

$$ICel \text{ o } IAmil = \frac{(Diámetro \text{ del halo} - Diámetro \text{ de la colonia bacteriana})}{Diámetro \text{ de la colonia bacteriana}} (*)$$

2.5. Identificación de las cepas bacterianas

La identificación de las cepas bacterianas seleccionadas se realizó mediante el análisis filogenético molecular y métodos bacteriológicos convencionales, teniendo en cuenta la morfología de la célula, características fisiológicas, bioquímicas y de la colonia en medio sólido.

2.5.1 Análisis filogenético molecular de las cepas bacterianas

Las cepas celulolíticas y amilolíticas seleccionadas en el tamizaje a 15°C, fueron identificadas mediante tres marcadores moleculares: ARN ribosómico 16S; gyrA, subunidad A de la ADN girasa; y rpoB, subunidad β de la ARN polimerasa. Para ello, se realizó un raspado superficial del cultivo axénico de cada aislado bacteriano y se depositó en un vial Safelock Eppendorf de 2,0 mL respectivamente rotulados.

La extracción del ADN genómico se realizó empleando un kit de minipreparación de ADN (ZymoBIOMICS, California, EE. UU.) según instrucciones del fabricante. Se empleó la siguiente combinación de cebadores para los tres marcadores: GM3F (5' -

AGAGTTTGATCMTGGC - 3') para 16S y GM4R (5' - TACCTTGTTACGACTT - 3') (Muyzer et al. 1995); para gyrA, 42f (5' - CAGTCAGGAAATGCGTACGTC - 3') y 1066 (5' - CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT - 3') (Rooney et al. 2009); y para rpoB, 2292f (5' - GACGTGGATGGCTACAAC - 3') y 3354r (5' - ATTGTCGCCTTTAACGATGG - 3') (Gharsa et al . 2021).

La amplificación de cada marcador se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con MasterMix (Promega, Madison, Wisconsin, EE. UU.) empleando la siguiente combinación: 10 ng de ADN y 0,25-0,5 pmol de los cebadores directo e inverso en un volumen total de 10 µL. Se realizó un proceso de desnaturalización a 95 °C por 3 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, el recocido se realizó a 55 °C durante 1 minuto y la extensión a 72 °C también por 1 min. Finalmente se realizó la elongación a 72 °C/5 min. Los amplicones se purificaron utilizando un kit Macherey-Nagel (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Düren, Alemania). Las secuencias de las cadenas directa e inversa fueron determinadas comercialmente por MacroGen (Seúl, Corea del Sur) y luego editadas en el software Chromas v1.45 (McCarthy 1998).

Las secuencias se alinearon inicialmente utilizando los algoritmos MUSCLE (Thompson et al., 1994) y se ajustaron manualmente con MEGA7 (Kumar et al., 2016). El modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustaba a cada marcador se seleccionó utilizando PartitionFinder (Lanfear et al., 2012). La mejor estrategia de partición y el mejor modelo de evolución de la secuencia se seleccionaron en función del criterio de información bayesiano (BIC). El análisis de máxima verosimilitud (ML) se realizó con raxmlHPC-AVX implementado en la interfaz raxmlGUI 1.3.1 (Silvestro y Michalak 2012) utilizando el mejor modelo según el caso con 1000 réplicas bootstrap para ambos conjuntos de datos. La divergencia intraespecífica e interespecífica por pares se estimó utilizando el modelo de distancia p en MEGA7.

2.5.2 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de las bacterias fue realizada mediante tinción Gram empleando un microscopio de luz binocular (Leica MD500) (Pozo et al., 2006; Kunasundari, Naresh y Che, 2017). Además, se determinó el diámetro y longitud de las bacterias empleando un microscopio profesional OLYMPUS BX538 (Tokyo, Japan), con software de visualización en tiempo real y medición que permite realizar mediciones manuales, automáticas, calibrar escala fotográfica y registro en JPEG.

2.5.3 Caracterización bioquímica y fisiológica

Las cepas bacterianas fueron evaluadas en base a sus características bioquímicas y fisiológicas empleando métodos convencionales de acuerdo con el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Siu-Rodas et al., 2018). Las pruebas realizadas incluyeron: catalasa, producción de indol, citrato, hidrólisis de la gelatina y producción de hemolisinas.

Se evaluó el desarrollo de las cepas a diferentes temperaturas: 10, 20, 30, 40, 50 y 60°C empleando caldo CMC 1%. Además, se determinó la tolerancia a diferentes porcentajes de NaCl (5%, 10%, y 20%) y niveles de pH 5, 6, 7, 8, 9 y 10 (Ozkan y Ahmet, 2016).

Las características del cultivo y apariencia de la colonia (tamaño, color, forma, borde, aspecto y olor) fueron descritas según métodos estándar (Behera et al, 2016).

2.6. Determinación cuantitativa de la producción de celulasa y amilasa de las cepas bacterianas

La determinación cuantitativa de la producción de celulasas y amilasas, se realizó empleando el método 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), el cual mide la acumulación de productos (azúcares reductores) después de la hidrólisis (Sadhu & Tushar, 2013). Para ello, se inocularon las cepas bacterianas en tubos de ensayo conteniendo 10 mL de caldo almidón 2% y caldo CMC 1%, respectivamente, y se incubaron a 10°C, 15°C y 20°C, por 72 horas. Los cultivos obtenidos se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos y se empleó el sobrenadante como solución de enzima. Se tomó 0,1 mL de la enzima y se agregó a 1 mL de solución buferada de almidón al 1%, pH 7, esta mezcla se incubó a 37°C por 10 min. Para detener la reacción enzimática se agregó 2 mL de reactivo DNS (ácido dinitrosalicílico 1g, NaOH, 16 g, tartrato de sodio y potasio 300 g y agua destilada, enrasar a 1 L), luego se llevó a ebullición por 10 minutos para el desarrollo del color, enseguida se llevó a enfriar en baño de agua helada por 2 minutos para estabilizar el color. Posteriormente se tomaron 200 µL y se diluyeron con 2,5 mL de agua destilada para medir su densidad óptica a 540 nm empleando un espectrofotómetro (UviLine 9400, China). El blanco contenía todos los reactivos a excepción de la enzima. Con las lecturas de la absorbancia se determinó la concentración de glucosa en base a la curva estándar (Maharsiwi et al., 2020).

La actividad enzimática se determinó empleando una curva de calibración para-D-glucosa. Una unidad de actividad enzimática se traduce como la cantidad de enzima que liberó 1 μmol de azúcares reductores como equivalentes de glucosa por minuto (Maharsiwi et al., 2020).

2.7. Análisis de datos

Análisis de Conglomerados

Se realizó el análisis de conglomerados con base en las distancias euclidianas al cuadrado (Gonzales et al., 2006) para formar grupos de cepas bacterianas con eficiencia metabólica a baja temperatura (15°C) empleando los datos del índice celulolítico e índice amilolítico. El análisis de los datos se realizó con el paquete SAS (Statistical Analysis System) for Windows V8.

Análisis multivariante: Manova de dos vías.

Para analizar la actividad metabólica de las cepas con mayor actividad celulolítica y/o amilolítica a bajas temperaturas se emplearon datos referentes al índice celulolítico, índice amilolítico, azúcares reductores en caldo CMC y azúcares reductores en caldo almidón, a los cuales se les realizó un análisis de varianza multivariado donde el Factor A: Cepa bacteriana [Tc2-25, Tc2-28, Tc2-29, Tc5-82 (*B. wiedmanii*); OcA-10 (*B. subtilis*); OcE-31 (*B. velezensis*) y Tc3-42 (*B. subtilis*)] y Factor B: Temperatura de crecimiento (15°C y 20°C). Las diferencias significativas se analizaron a $\rho \leq 0,05$ y $\rho \leq 0,01$, respectivamente. Previamente se comprobó la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de las varianzas, el diseño fue balanceado con todas las muestras analizadas bajo condiciones similares y no hubo datos faltantes. En el procesamiento de los datos no se incluyó el nivel temperatura 10°C del Factor B por registrar un escaso crecimiento en esa temperatura en ensayos preliminares.

Para evaluar diferencias entre los diferentes tipos de actividad metabólica (tratamientos) se empleó el análisis de varianza (ANOVA) de dos factores y post-hoc Tukey HSD, respectivamente.

Análisis de los componentes principales

La relación entre las actividades metabólicas se realizó con la técnica de análisis de los componentes principales (ACP). Los resultados de los componentes principales se visualizaron con el Biplot construido entre los dos primeros componentes principales

(PC1 y PC2). Todos los análisis estadísticos fueron conducidos con el software R versión 4.1.0.

2.8.Conformación de los consorcios microbianos.

Realizada la identificación y selección de las cepas en función a su actividad celulolítica y amilolítica a la mejor temperatura de respuesta según el diseño experimental empleado, se conformaron dos consorcios microbianos: consorcio 1 (C:1) y consorcio 2 (C:2),

2.9.Ensayo de antagonismo

Este ensayo se realizó mediante el método de difusión de pozos de agar utilizado por Hesari et al. (2017), el cual consistió en inocular mediante siembra en césped, una suspensión de la bacteria a ensayar a una concentración de 3×10^8 cel /mL, equivalente a 0,5 MacFarland en placas de agar Muller Hinton, posteriormente se colocaron 80 μ L de la suspensión de las bacterias a confrontar en cada uno de los pocillos realizados previamente empleando una pipeta Pasteur estéril como sacabocado. El procedimiento se realizó por triplicado y las placas fueron incubadas a 30°C por 24 h para observar los halos de inhibición.

Etapa II: Determinación de la eficiencia de los consorcios microbianos en el compostaje de residuos orgánicos urbanos a baja temperatura.

2.10. Ámbito del estudio

La fase de campo para realizar el compostaje de los residuos sólidos urbanos (RSU) orgánicos empleando consorcios microbianos, se realizó en el Centro experimental Agroforestal- Área Vivero-Instituto de Ceja de Selva-INDES de la Universidad Nacional Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM-Amazonas), ubicado en el distrito de Chachapoyas, provincia de Chachapoyas, región Amazonas.

2.11. Residuos sólidos orgánicos urbanos

Los residuos sólidos orgánicos urbanos (RSOU) fueron obtenidos directamente de la Planta de Compostaje de la Municipalidad de Chachapoyas, localizada en Tuctilla, distrito de Chachapoyas, Amazonas, Perú.

2.12. Análisis físico químico de los residuos sólidos orgánicos urbanos (RSOU)

El análisis fisicoquímico de los RSOU se realizó en el laboratorio de Biología y Laboratorio de Tecnología Agroindustrial de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias de la UNTRM. Se determinó el contenido de humedad (método gravimétrico), pH (potenciómetro), Nitrógeno (Kjeldahl), contenido de materia orgánica, Carbono y relación C/N.

Determinación de Nitrógeno

La cantidad de nitrógeno contenido en los residuos sólidos orgánicos se determinó mediante el método de Kjeldahl. En tres etapas: la digestión, en la cual el nitrógeno orgánico es transformado a nitrógeno amoniacal o ion amonio (NH_4^+) La muestra es tratada con ácido sulfúrico concentrado, empleando un catalizador a altas temperaturas; la destilación: en esta etapa se empleó una solución de Hidróxido de Sodio al % para alcalinizar fuertemente el medio y desplazar el amoníaco (NH_3) de las sales amónicas y posterior fijación en una solución ácida de concentración conocida; la titulación donde la cantidad de nitrógeno contenida en la muestra es determinada de acuerdo a la cantidad de ácido neutralizado por el amoníaco disuelto (Barrena, 2006).

Determinación de la relación C/N

La relación de Carbono/Nitrógeno fue determinada mediante el porcentaje de carbono (%C) y el porcentaje de nitrógeno (%N) a partir de los residuos sólidos orgánicos urbanos (RSOU) y forraje seco de avena (FSA).

Para la determinación del porcentaje de carbono, se realizó la medición del contenido de materia orgánica expresada como LOI (Barrena, 2006; DOF, 1992), empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ LOI} = \frac{(X - Y)}{(X - Z)} \times 100$$

donde,

X = peso del crisol y de la muestra seca antes de la ignición (g),

Y = peso del crisol y de la muestra seca después de la ignición (g), y

Z = peso del crisol (g).

Obtenido el % LOI, se determinó el porcentaje de carbono (Barrena, 2006; DOF, 1992) mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ C} = (\% \text{ LOI}) \times 0,58$$

donde,

% LOI = porcentaje de materia orgánica

0,58 = constante de Jackson (Barrena, 2006)

Realizados los cálculos de la relación C/N de los RSOU y FSA, se calculó la proporción de los componentes a emplear en el llenado de las macetas para el proceso de compostaje, utilizando 80% de RSM y 20% de FSA, dando lugar a una relación inicial de 30:1 de C/N.

2.13. Propagación de los consorcios microbianos

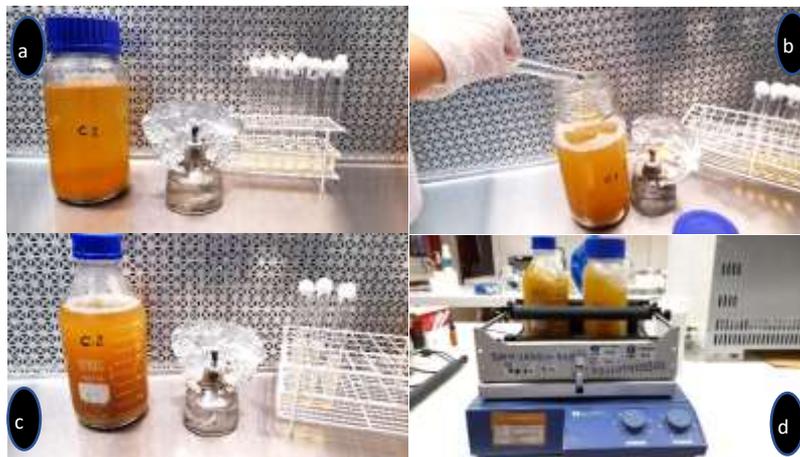
Las cepas seleccionadas en la primera parte del estudio fueron subcultivadas individualmente en agar CMC 1% a 15°C por 24 a 72 horas y posteriormente repicadas en tubos de 16 x 150 mm conteniendo 5 mL de caldo CMC 1%, incubados bajo las mismas condiciones anteriores. (Abdel-Ramal, 2016). Luego de reactivadas las cepas, los inóculos de cada una de ellas se estandarizaron a una concentración final de 10^8 UFC/mL, empleando un densitómetro MC Farland DEN-1, Marca Grant-bio.

Para su propagación, los cultivos microbianos estandarizados fueron inoculados en una proporción 1:1 (w/w) (Xu et al., 2019), en frascos Schott rotulados conteniendo 1 litro de caldo peptonado estéril, suplementado con CMC 1%., pH 7, previamente esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Los frascos inoculados con los consorcios microbianos C:1 y C:2, se incubaron a temperatura ambiente en agitación constante por 24 horas, empleando un agitador IKA Labortechnik ks 250 Basic, quedando listos para su posterior empleo (Figura 4).

Figura 4

Propagación de los Consorcios Microbianos



Nota. Inoculación en los Medios de propagación (a), Consorcio Microbiano 1 (b), Consorcio Microbiano 2 (c), Incubación de los Consorcios en Agitación (d).

2.14. Instalación de los sistemas de compostaje

Para evaluar el proceso de compostaje de los residuos sólidos orgánicos se emplearon macetas de plástico de 50 L de volumen. Cada maceta estuvo compuesta por 26 kg de RSOU picados en aproximadamente 4 cm, más 6,5 kg de forraje seco de avena picado en aproximadamente 7 cm. La mezcla de estos dos elementos se colocaron en las macetas en un ratio C:N de 30:1, y 65% de humedad.(Li et al., 2019; Wei, Wang, Hassan, & Xie, 2018).

2.15. Inoculación de los consorcios microbianos

Instaladas las unidades experimentales con el sustrato indicado en el ítem anterior, se inoculó el consorcio microbiano correspondiente, a una concentración de 10^8 UFC/mL. Se aplicó 100 mL de consorcio por cada 10 kg de material compostado (Aveiga et al., 2016). El inóculo del consorcio microbiano fue distribuido uniformemente removiendo la superficie (Ribeiro et al., 2017).

2.16. Manejo de las composteras: controles y mediciones

Para mantener la humedad de 65 % y favorecer la actividad microbiana degradativa se añadió agua semanalmente. El volteado del sustrato en cada unidad experimental se realizó cada 7 días para proveer de aireación, éste se realizó en forma mecánica por remoción empleando una lampa (Aveiga et al., 2016). Se realizó el registro de temperatura, pH y la conductividad eléctrica CE de cada unidad experimental (UE) diariamente durante los primeros 15 días, posteriormente en forma semanal. Además, se tomaron 100 g de muestra de cada UE para determinar la humedad, materia orgánica, carbono y nitrógeno.

2.17. Cosecha del compost

Al finalizar el proceso de compostaje se realizó el cernido, pesaje, y secado. Se tomó una muestra de 100 g de cada UE o réplica para los análisis correspondientes (materia orgánica,

nitrógeno y relación C/N) en el laboratorio de Biología y Tecnología Agroindustrial de la UNTRM.

2.18. Análisis y evaluación del compost obtenido

El análisis microbiológico del compost comprendió la determinación de coliformes totales y coliformes fecales por el Método del Número Más Probable (NMP) y se investigó la presencia de *Salmonella* spp. La evaluación de la calidad del compost se realizó mediante el ensayo de fitotoxicidad.

Coliformes Totales y Fecales

Se investigó la presencia de coliformes totales y fecales, mediante la Técnica del Número Más Probable (NMP), empleando como diluyente solución de Peptona al 0,1 %, y Caldo verde Brillante Bilis Lactosa (BGBL) (ICMSF, 2000).

Investigación de Salmonella

Para la investigación de *Salmonella* sp. en las muestras del compost obtenido, se realizó siguiendo el método recomendado por la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-15, para lo cual se realizó un enriquecimiento de 25 g de compost en 225 ml de caldo lactosado y se incubó a 35°C durante 24 horas. Posteriormente se realizó un enriquecimiento selectivo, inoculando 1 ml del cultivo anterior en 10 ml de caldo selenito el cual fue incubado a 43°C por 24 horas. a partir de este cultivo se realizaron siembras por estría en placas con agar Salmonella-Shigella, las cuales fueron incubadas a 35°C/24 horas. Las colonias sospechosas seleccionadas se sembraron en Agar Mac Conkey e incubaron a 35 °C /24 horas, se realizó además la tinción Gram para confirmar su morfología y reacción tintorial. Las pruebas bioquímicas para la identificación de *Salmonella* se realizaron a partir de las colonias seleccionadas del Agar Mac Conkey, y se inocularon en los medios de cultivo diferenciales: TSI, LIA, Citrato, caldo úrea, caldo triptonado para realizar la prueba de indol.

Ensayo de fitotoxicidad

La evaluación de la fitotoxicidad del compost obtenido a partir de RSOU y FSA se realizó adaptando los protocolos de Cesaro et al. (2015) y Ofosu-Budu et al. (2010). Se colocaron 20 semillas de brócoli cv. Green Sprouting Calabrese (Emerald Seeds) sobre papel filtro

en placas Petri de 100 mm de diámetro. Se prepararon extractos acuosos de cada uno de los tratamientos de compost para lo cual, 20 g de compost fueron diluidos en 40 mL de agua destilada y almacenados por dos horas. 20 mL de extractos acuosos fueron centrifugados a 4060 rcf por 15 minutos, el sobrenadante fue empleado para humedecer las semillas en las placas y colocadas en una estufa a 25 °C. Se utilizó agua destilada como control para humedecer las semillas. Las evaluaciones se realizaron a los 7 días, tiempo en la cual las semillas tuvieron una adecuada germinación. Semillas no germinadas fueron definidas como aquellas con cero (0) cm de longitud. El índice de germinación combinó la germinación de semillas y longitud de la raíz, ambos expresados en relación con el control. El índice de germinación (IG) fue calculado de la siguiente manera:

$$IG(\%) = \frac{G1L1}{G2L2} \times 100$$

Donde, G1 número de semillas germinadas en contacto con la solución de compostaje; L1 es el promedio de longitud de la radícula originada en contacto con la solución de compostaje; G2 número de semillas germinadas en contacto con agua destilada; L2 es el promedio de longitud de la radícula originada en contacto con agua destilada (Cesaro et al., 2015).

El extracto de compost que produjo un IG mayor de 100 fue considerado como estimulante del crecimiento, mientras que un IG menor de 100 fue considerado como fitotóxico (Ofosu-Budu et al. 2010).

2.19. Análisis de datos

Para evaluar los consorcios microbianos en el compostaje de residuos sólidos urbanos, se elaboraron gráficos de las medias del testigo absoluto (Tabs), testigo control (Tc) y los tratamientos inoculados con los consorcios microbianos: Consorcio 1 (C:1) y Consorcio 2 (C:2), respectivamente (Tabla 1).

La unidad experimental estuvo constituida por una maceta de 50 L de volumen empleada como compostera. Cada tratamiento con 5 repeticiones, obteniendo un total 20 repeticiones.

Tabla 1

Tratamientos para la Evaluación de los Consorcios Microbianos en el Compostaje de Residuos Sólidos Orgánicos Urbanos

Tratamiento	Composición	Inóculo
T ₁	RSOU, forraje seco de avena	Consortio 1 (C:1)
T ₂	RSOU, forraje seco de avena	Consortio 2 (C:2)
T _c	RSOU y forraje seco de avena.	Sin inocular
T _{abs}	Residuos sólidos urbanos (RSOU)	Sin inocular

III. RESULTADOS

Etapa I: Aislamiento, identificación y selección de cepas microbianas con actividad celulolítica y amilolítica.

3.1. Caracterización fisicoquímica de las muestras

Las características fisicoquímicas de las muestras de la planta de compostaje de Chachapoyas mostraron diferencias en cuanto a las características de temperatura, pH, conductividad eléctrica (CE) y humedad, de acuerdo con la etapa en la que se encontraba la pila (mesofílica, termofílica y maduración) (Tabla 2).

Tabla 2

Características Fisicoquímicas de las Muestras de la Planta de Compostaje Municipal de Chachapoyas

Código de pila	Fase de la pila	Temp. °C	pH	CE	Humedad %
Tc-1	Mesofílica	27,0	4,04	1,59	72,13
Tc-2	Mesofílica	32,0	4,09	1,55	72,71
Tc-3	Termofílica	54,2	6,27	1,19	56,12
Tc-4	Termofílica	53,0	7,38	0,85	53,48
Tc-5	Enfriamiento y maduración	36,0	7,04	1,07	38,01

Las características fisicoquímicas de las muestras de suelo del Bosque de Palmeras de Ocol, Amazonas, indican que las muestras Oc-D y Oc-E tuvieron valores de pH ácido y conductividad eléctrica (CE) mayor, en comparación con las muestras Oc-A, Oc-B y Oc-C, las cuales registraron valores de pH ligeramente alcalinos y menor conductividad eléctrica (CE) (Tabla 3).

Tabla 3

Características Fisicoquímicas de las Muestras de Suelo del Bosque de Palmeras de Ocol, Amazonas, Perú

Código	T°	pH	C.E (ms/cm)	Humedad %
OC-A	16,5	8,13	0,59	19,5
OC-B	17,0	7,76	0,40	42,2
OC-C	17,2	7,87	0,46	25,2
OC-D	17,6	5,49	0,84	65,9
OC-E	17,7	5,76	0,71	32,3

3.2. Aislamiento bacteriano y tamizaje de la actividad celulolítica y amilolítica a 30°C y 15°C.

En el tamizaje inicial a 30°C, se aislaron 60 cepas bacterianas empleando medio Agar Carboximetil celulosa 1% (CMC) y medio agar almidón 2%, a partir de los residuos sólidos orgánicos de la Planta Municipal de Compostaje de Chachapoyas. 55 cepas mostraron actividad celulolítica/amilolítica, mientras que 5 cepas mostraron solo actividad celulolítica. Por otro lado, 17 cepas aisladas de la pila Tc-1 y 9 cepas aisladas de la pila Tc-2 correspondieron a pilas en fase mesofílica; 8 cepas aisladas de la pila Tc-3 y 12 cepas aisladas de la pila Tc-4 correspondieron a pilas en fase termofílica, y 14 cepas aisladas de la pila Tc-5 correspondieron a pilas en la fase de enfriamiento y maduración (Tabla 2 y 4).

Por otro lado, en el tamizaje secundario a 15°C realizado a las mismas cepas, solo 49 mostraron crecimiento, de las cuales 39 tuvieron actividad celulolítica/amilolítica en tanto que 10 cepas evidenciaron solo actividad celulolítica. Además, se observó que 16 cepas aisladas de la pila Tc-1 y 8 cepas aisladas de la pila Tc-2 correspondieron a pilas en fase mesofílica; 7 cepas aisladas de la pila Tc-3 y 12 cepas aisladas de la pila Tc-4 correspondieron a pilas en fase termofílica, en tanto que 6 cepas aisladas de la pila Tc-5 correspondieron a pilas en la fase de enfriamiento y maduración (Tabla 2 y 4).

Tabla 4

Número de Bacterias Aisladas de la Planta de Compostaje Municipal de Chachapoyas con Actividad Celulolítica y Amilolítica a 30° y 15° C

Código	Tamizaje 30°C		Tamizaje 15°C				Actividad celulolítica				Actividad celulolítica-Amilolítica			
			Crecieron		No crecieron		30°C		15°C		30°C		15°C	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
TC-1	17	28	16	27	1	2	0	0	1	2	17	28	15	25
TC-2	9	15	8	13	1	2	2	3	1	2	7	12	7	12
TC-3	8	13	7	12	1	2	1	2	1	2	7	12	6	10
TC-4	12	20	12	20	0	0	2	3	6	10	10	17	6	10
TC-5	14	23	6	10	8	13	0	0	1	2	14	23	5	8
Total	60	100	49	82	11	18	5	8	10	17	55	92	39	65

En la Tabla 5, se muestra que, en el tamizaje inicial a 30°C, se aislaron 12 cepas bacterianas con actividad celulolítica y amilolítica, a partir del suelo del Bosque de Palmeras de Ocol. Por otro lado, en el tamizaje secundario a 15°C, solo 7 mostraron un crecimiento, de las cuales 5 mostraron actividad amilolítica y 2 mostraron actividad celulolítica/amilolítica.

Tabla 5

Número de Bacterias Aisladas del Bosque de Palmeras de Ocol, con Actividad Celulolítica y Amilolítica a 30° y 15°C

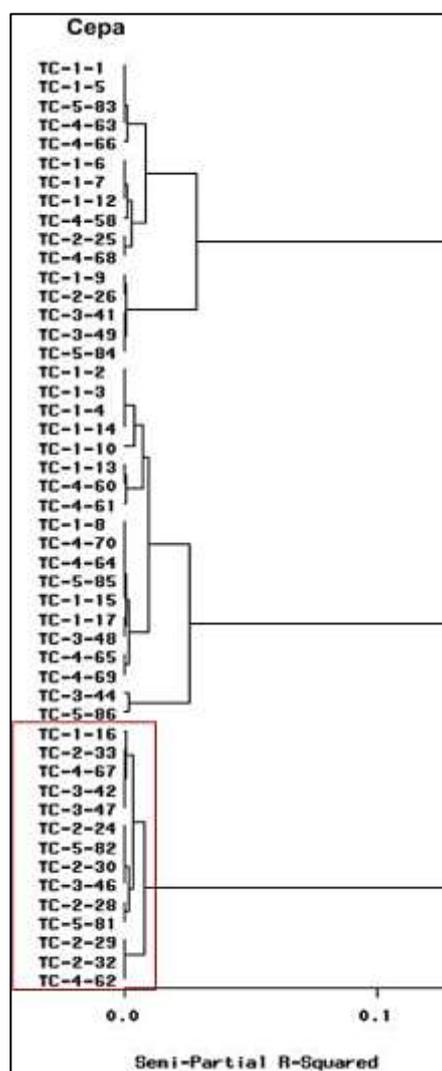
Código	Tamizaje 30°C		Tamizaje 15°C				Cepas celulolíticas				Cepas amilolíticas				Cepas celulolítica-amilolítica			
					No		30°C		15°C		30°C		15°C		30°C		15°C	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
TC-1	17	28	16	27	1	2	0	0	1	2	0	0	0	0	17	28	15	25
TC-2	9	15	8	13	1	2	2	3	1	2	0	0	0	0	7	12	7	12
TC-4	8	13	7	12	1	2	1	2	1	2	0	0	0	0	7	12	6	10
TC-5	12	20	12	20	0	0	2	3	6	10	0	0	0	0	10	17	6	10
TC-6	14	23	6	10	8	13	0	0	1	2	0	0	0	0	14	23	5	8
Total	60	100	49	82	11	18	5	8	10	17	0	0	0	0	55	92	39	65

3.3. Selección de las cepas bacterianas con mejor actividad enzimática a 15°C

De acuerdo con el análisis de clúster obtenido por el método de Ward, fueron agrupadas 49 cepas bacterianas procedentes de las muestras de la planta de compostaje de la Municipalidad de Chachapoyas, que mostraron un adecuado desarrollo a 15°C, teniendo en cuenta su actividad celulolítica o amilolítica. En ese sentido, 14 cepas mostraron mejor actividad celulolítica y comprenden los aislamientos Tc1-16 a Tc4-62 (Figura 5), cuyos diámetros de halo de hidrólisis de la celulosa estuvieron comprendidos en el rango de 7,50 a 8,6 mm e índice celulolítico de 0,33 a 0,9.

Figura 5

Análisis de Clúster para Evaluar la Actividad Bacteriana Celulolítica a 15°C de las Cepas Aisladas de la Planta de Compostaje de la Municipalidad Provincial de Chachapoyas (Método de Ward)

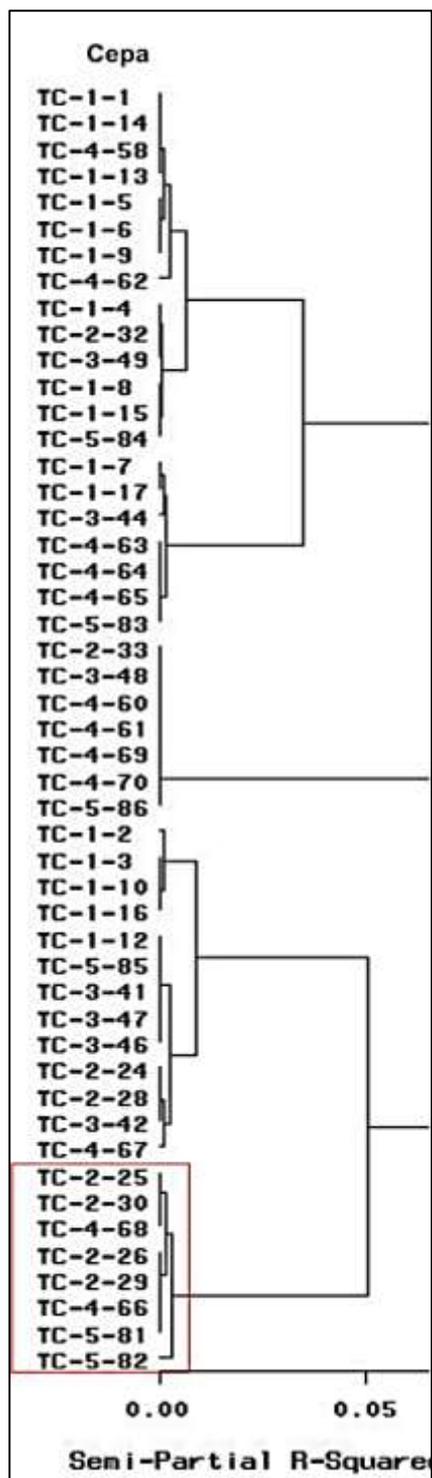


Por otro lado, en el tamizaje a 15°C, 8 cepas mostraron mejor actividad amilolítica y estuvieron comprendidas las cepas Tc2-25 a Tc5-82 (Figura 6), cuyo rango de halo de hidrólisis del almidón resultó entre 10,6 a 12,8 mm e índice amilolítico de 2,01 a 2,57.

En el análisis de la actividad celulolítica y amilolítica a 15°C de los aislados bacterianos, se obtuvo que las cepas Tc2-30, Tc2-29, Tc5-81 y Tc5-82 mostraron eficiencia en ambas actividades metabólicas (Figura 5 y 6).

Figura 6

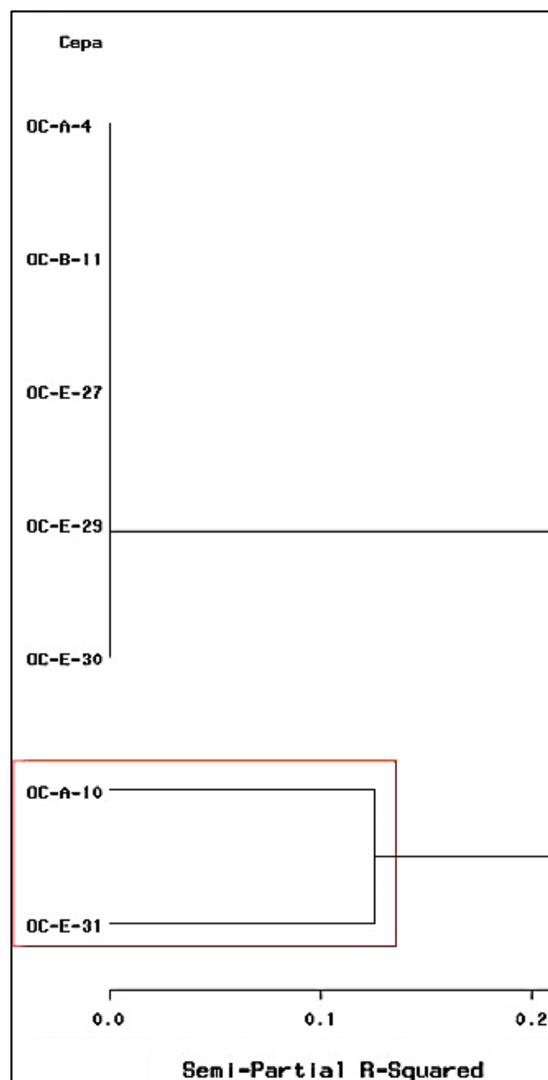
Análisis de Clúster para Evaluar la Actividad Amilolítica a 15°C de las Cepas Bacterianas Aisladas de la Planta de Compostaje de la Municipalidad de Chachapoyas (Método de Ward)



Según el análisis de clúster para evaluar la actividad bacteriana celulolítica a 15°C de las cepas aisladas del bosque de Palmeras de Ocol, se identificaron a dos cepas (Oc-A-10 y Oc-E-31) que mostraron actividad a baja temperatura, desarrollando halos de hidrólisis de celulosa de 2,60 a 5,30 mm e índice celulolítico de 1,6 a 2,53 (Figura 7).

Figura 7

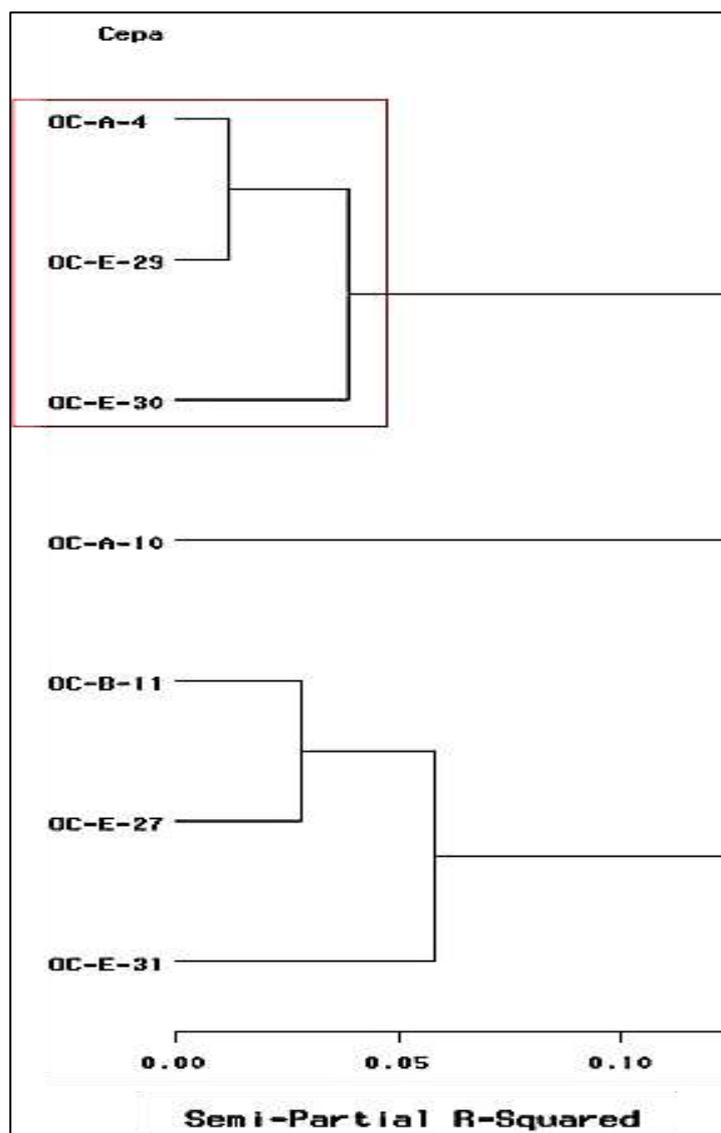
Análisis de Clúster para Evaluar la Actividad Celulolítica a 15° de las Cepas Bacterianas Aisladas del Suelo del Bosque de Palmeras de Ocol (Método de Ward)



El análisis de clúster para evaluar la actividad amilolítica de las cepas aisladas del bosque de Palmeras de Ocol, determinó que tres de las siete cepas mostraron los mejores halos de hidrólisis, con un diámetro de 6,9 a 8,5 mm e índice amilolítico de 1,76 a 5,85 (Figura 8).

Figura 8

Análisis de Clúster para Evaluar la Actividad Amilolítica a 15°C de las Cepas Bacterianas Aisladas del Bosque de Palmeras de Ocol (Método de Ward)



Realizada la evaluación de la actividad enzimática a 15°C, fueron seleccionados veinte aislados bacterianos que mostraron mejor actividad celulolítica y/o amilolítica, de las cuales 18 cepas fueron aisladas de la planta de compostaje municipal (Tc1-16, Tc2-24, Tc2-25, Tc2-26, Tc2-28, Tc2-29, Tc2-30, Tc2-32, Tc2-33, Tc4-42, Tc4-46, Tc4-47, Tc5-62, Tc5-66, Tc5-67, Tc5-68, Tc6-81, Tc6-82) y 2 cepas aisladas del Bosque de Palmeras de Ocol (OcA-10, OcE-31).

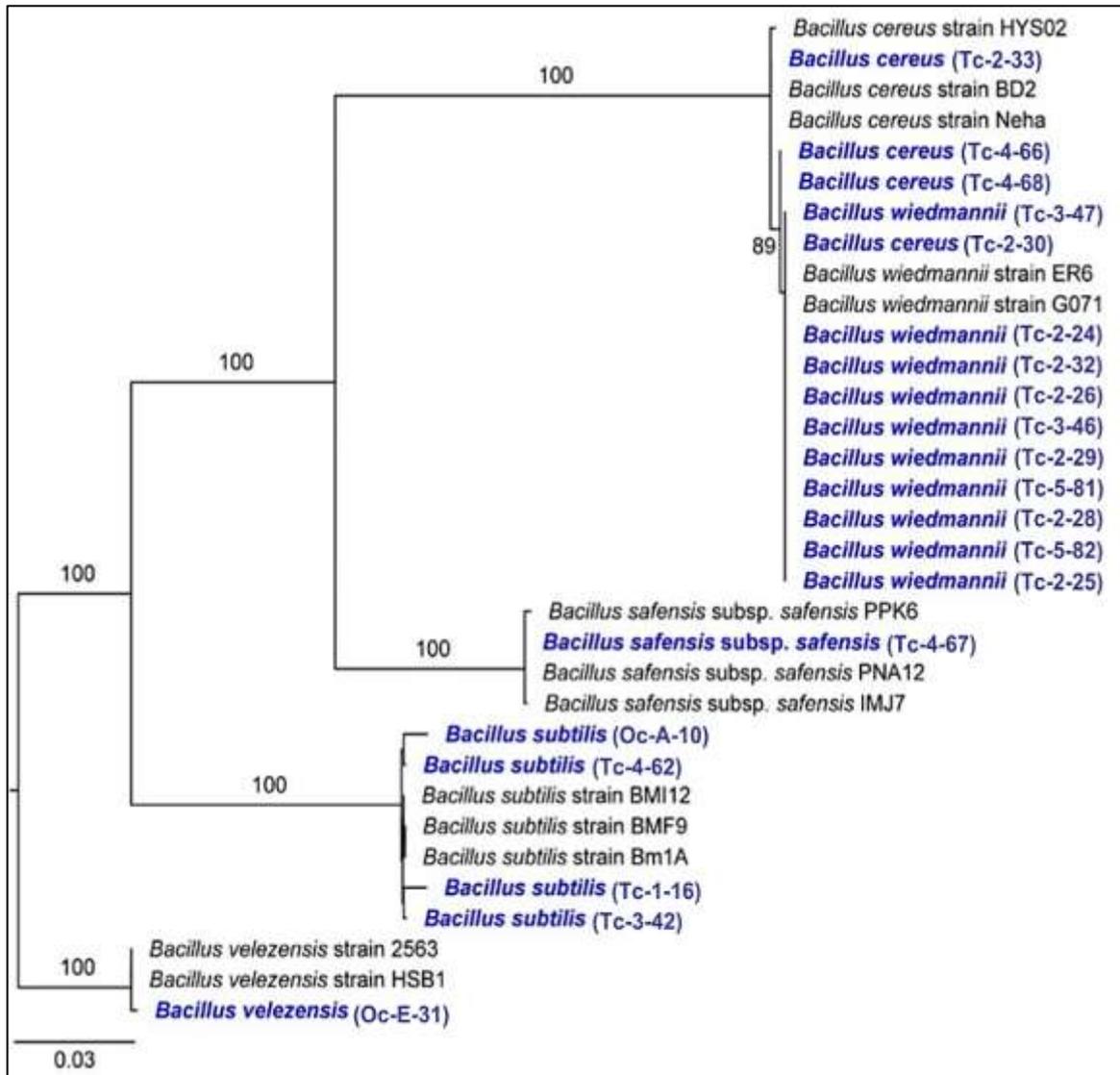
3.4. Identificación de las cepas bacterianas

Análisis filogenético molecular

El análisis filogenético exploratorio se llevó a cabo para entablar las relaciones filogenéticas de las 20 cepas especies de bacterias presentes en las pilas de compostaje de Tuxtilla y suelos del Bosque de Palmeras de Ocol, registrándose cinco especies de cepas bacterianas con actividad metabólica a bajas temperaturas (Figura 9, Tabla 6). Se generaron un total de 34 secuencias de 1/2 y se depositaron en el GenBank (Tabla S1, Anexo 1).

Figura 9

Árbol Filogenético de las Cepas Aisladas de la Planta de Compostaje de la Municipalidad de Chachapoyas y del Bosque de Palmeras de Ocol



Nota. Se Muestran las Relaciones Filogenéticas de las Secuencias del Gen 16r, del Gen 16rRNA, la Subunidad Alfa de la ADN Girasa (gyrA) y la Subunidad Beta de la ARN Polimerasa de las Bacterias Identificadas.

Tabla 6

Número de Cepas y Porcentaje de Especies Bacterianas Identificadas Mediante el Análisis Filogenético Molecular

Especies bacterianas	Número de cepas	%
<i>B. wiedmanii</i>	10	50
<i>B. subtilis</i>	4	20
<i>B. velezensis</i>	1	5
<i>B. safensis</i> subsp. <i>safensis</i>	1	5
<i>B. cereus</i>	4	20
Total	20	100

Caracterización morfológica

Las 20 cepas fueron bacilos gram positivos, de bordes ovalados, agrupados mayormente en cadenas, con visible formación de esporas en la tinción Gram. Las dimensiones de las bacterias se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Tinción Gram, Forma y Dimensiones de las Bacterias Identificadas de la Planta de Compostaje Municipal de Chachapoyas y del Bosque de Palmeras de Ocol

N°	Código	Especie	Gram	Forma	Longitud (µm)	Ancho (µm)
1	TC-2-25	<i>B. wiedmanii</i>	Positiva	bacilo	2,40 ± 0,48	0,91 ± 0,26
2	TC-2-28	<i>B. wiedmanii</i>	Positiva	bacilo	3,70 ± 0,75	0,75 ± 0,24
3	TC-2-29	<i>B. wiedmanii</i>	Positiva	bacilo	2,75 ± 0,23	1,03 ± 0,12
4	TC-3-47	<i>B. wiedmanii</i>	Positiva	bacilo	2,69 ± 0,24	0,83 ± 0,19
5	TC-4-68	<i>B. cereus</i>	Positiva	bacilo	3,21 ± 0,49	0,80 ± 0,23
6	TC-5-82	<i>B. wiedmanii</i>	Positiva	bacilo	2,39 ± 0,31	0,93 ± 0,23
7	Oc-A-10	<i>B. subtilis</i>	Positiva	bacilo	2,27 ± 0,42	0,51 ± 0,20
8	OC-E-31	<i>B. velezensis</i>	Positiva	bacilo	2,98 ± 0,57	0,53 ± 0,06
9	TC-2-24	<i>B. wiedmanii</i>	Positiva	bacilo	2,42 ± 0,27	0,92 ± 0,18
10	TC-2-30	<i>B. cereus</i>	Positiva	bacilo	2,88 ± 1,27	0,93 ± 0,22
11	TC-2-26	<i>B. wiedmanii</i>	Positiva	bacilo	2,42 ± 0,33	0,76 ± 0,06
12	TC-4-66	<i>b. cereus</i>	Positiva	bacilo	3,16 ± 0,39	0,99 ± 0,17
13	TC-3-42	<i>B. subtilis</i>	Positiva	bacilo	2,82 ± 0,37	0,56 ± 0,10
14	TC-2-32	<i>B. wiedmanii</i>	Positiva	bacilo	2,66 ± 0,32	0,82 ± 0,17
15	TC-2-33	<i>B. cereus</i>	Positiva	bacilo	3,35 ± 0,79	0,99 ± 0,35
16	TC-4-67	<i>B. safensis</i> subsp. <i>safensis</i>	Positiva	bacilo	1,81 ± 0,19	0,45 ± 0,12
17	TC-1-16	<i>B. subtilis</i>	Positiva	bacilo	1,97 ± 0,24	0,60 ± 0,10
18	TC-3-46	<i>B. wiedmanii</i>	Positiva	bacilo	2,64 ± 0,47	1,06 ± 0,08
19	TC-4-62	<i>B. subtilis</i>	Positiva	bacilo	1,91 ± 0,25	0,57 ± 0,10
20	TC-5-81	<i>B. wiedmanii</i>	Positiva	bacilo	2,42 ± 0,42	0,77 ± 0,21

Datos presentados con medias ± desviación estándar.

Caracterización bioquímica y fisiológica

Las 20 cepas caracterizadas fueron bacilos aerobios productoras de la enzima catalasa y productoras de hemolisinas. Ninguna de las cepas dio positivo a la prueba de indol y utilización del citrato. En relación con la producción de gelatinasa, fueron negativas a excepción de las cepas OcA-10, Tc3-42, Tc1-16 y Tc4-62 (Tabla 8).

Tabla 8

Resultados de las Pruebas Bioquímicas: Catalasa, Indol, Citrato, Producción de Hemolisinas y Coagulasa de las Cepas Identificadas

N°	Código cepa	Especie	Prueba bioquímica				
			Catalasa	Indol	Citrato	Hemólisis	Gelatinasa
1	TC-2-25	<i>B. wiedmanii</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
2	TC-2-28	<i>B. wiedmanii</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
3	TC-2-29	<i>B. wiedmanii</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
4	TC-3-47	<i>B. wiedmanii</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
5	TC-4-68	<i>B. cereus</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
6	TC-5-82	<i>B. wiedmanii</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
7	Oc-A-10	<i>B. subtilis</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
8	OC-E-31	<i>B. velezensis</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
9	TC-2-24	<i>B. wiedmanii</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
10	TC-2-30	<i>B. cereus</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
11	TC-2-26	<i>B. wiedmanii</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
12	TC-4-66	<i>b. cereus</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
13	TC-3-42	<i>B. subtilis</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
14	TC-2-32	<i>B. wiedmanii</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
15	TC-2-33	<i>B. cereus</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
16	TC-4-67	<i>B. safensis</i> subsp. <i>safensis</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
17	TC-1-16	<i>B. subtilis</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
18	TC-3-46	<i>B. wiedmanii</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
19	TC-4-62	<i>B. subtilis</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
20	TC-5-81	<i>B. wiedmanii</i>	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)

La Tabla 9 muestra la caracterización fisiológica de las cepas aisladas, respecto a la evaluación del comportamiento de las cepas a diferentes temperaturas, observándose que la mayoría de las cepas no desarrollaron a 10°C, sin embargo, las cepas Tc2-29, Tc3-47, OcE-31, Tc4-67 y Tc5-81 mostraron un escaso desarrollo a esta temperatura. No obstante, a temperaturas de 20°C, 30°C y 40°C todas las cepas tuvieron un buen crecimiento. Por otro lado, solamente las cepas Tc4-68, OcA-10, OcE-31, Tc4-66, Tc3-42, Tc2-33, Tc4-67, Tc1-16 y Tc4-62 mostraron buen crecimiento a 50°C, en tanto que ninguna desarrolló a 60°C.

Respecto a la prueba de tolerancia al NaCl, todas las cepas ensayadas toleraron la concentración de 5% y no se observó desarrollo a concentraciones NaCl de 10 y 20%.

En relación con la prueba de desarrollo a diferentes pH, se determinó que todas las cepas mostraron crecimiento a pH 5, 6, 7, 8, 9 y 10, sin embargo, mostraron un crecimiento óptimo a pH 6, 7, 8 y 9.

Tabla 9

Caracterización Fisiológica de las Cepas Identificadas, Concerniente a las Pruebas de Tolerancia a Diferentes Temperaturas, pH y Concentraciones de NaCl

Cepa N°	Código	Especie	T°						pH						NaCl %		
			10	20	30	40	50	60	5	6	7	8	9	10	5	10	20
1	TC-2-25	<i>B. wiedmanii</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
2	TC-2-28	<i>B. wiedmanii</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
3	TC-2-29	<i>B. wiedmanii</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
4	TC-3-47	<i>B. wiedmanii</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
5	TC-4-68	<i>B. cereus</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
6	TC-5-82	<i>B. wiedmanii</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
7	Oc-A-10	<i>B. subtilis</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
8	OC-E-31	<i>B. velezensis</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
9	TC-2-24	<i>B. wiedmanii</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
10	TC-2-30	<i>B. cereus</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
11	TC-2-26	<i>B. wiedmanii</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
12	TC-4-66	<i>b. cereus</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
13	TC-3-42	<i>B. subtilis</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
14	TC-2-32	<i>B. wiedmanii</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
15	TC-2-33	<i>B. cereus</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
16	TC-4-67	<i>B. safensis</i> subsp. <i>safensis</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
17	TC-1-16	<i>B. subtilis</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
18	TC-3-46	<i>B. wiedmanii</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
19	TC-4-62	<i>B. subtilis</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
20	TC-5-81	<i>B. wiedmanii</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)

3.5. Determinación cuantitativa de la producción de celulasas y amilasas

En base a los resultados de la caracterización microbiológica y molecular, asimismo, la actividad metabólica como índice celulolítico, índice amilolítico e hidrólisis de polisacáridos en azúcares reductores se emplearon 07 cepas, correspondiendo cuatro a *B. wiedmanii* (Tc2-25, Tc2-28 Tc2-29, Tc5-82); *B. subtilis* (OcA-10) y *B. velezensis* (OcE-31) y *B. subtilis* (Tc3-42), las cuales mostraron actividad celulolítica y amilolítica.

El MANOVA bifactorial de las variables respuesta índice celulolítico e índice amilolítico, producción de celulasas y amilasas de cepas aisladas de la planta de compostaje de Tuctilla y del Bosque de Palmeras de Ocol, mostraron que los factores cepas, temperaturas y efecto de interacción cepas x temperatura fueron de alta significación ($\rho \leq 0,01$) con efecto sobre el metabolismo bacteriano de las cepas aisladas (Tabla 10).

Tabla 10

MANOVA Bifactorial de los Efectos de las Cepas y Temperaturas Bajas y sus Efectos Combinados en la Actividad Metabólica Bacteriana

Factores	Wilk's Lambda	F	p
Cepas	0,0002	40,17	**
Temperatura	0,2099	23,53	**
Cepas x temperatura	0,0190	7,79	**

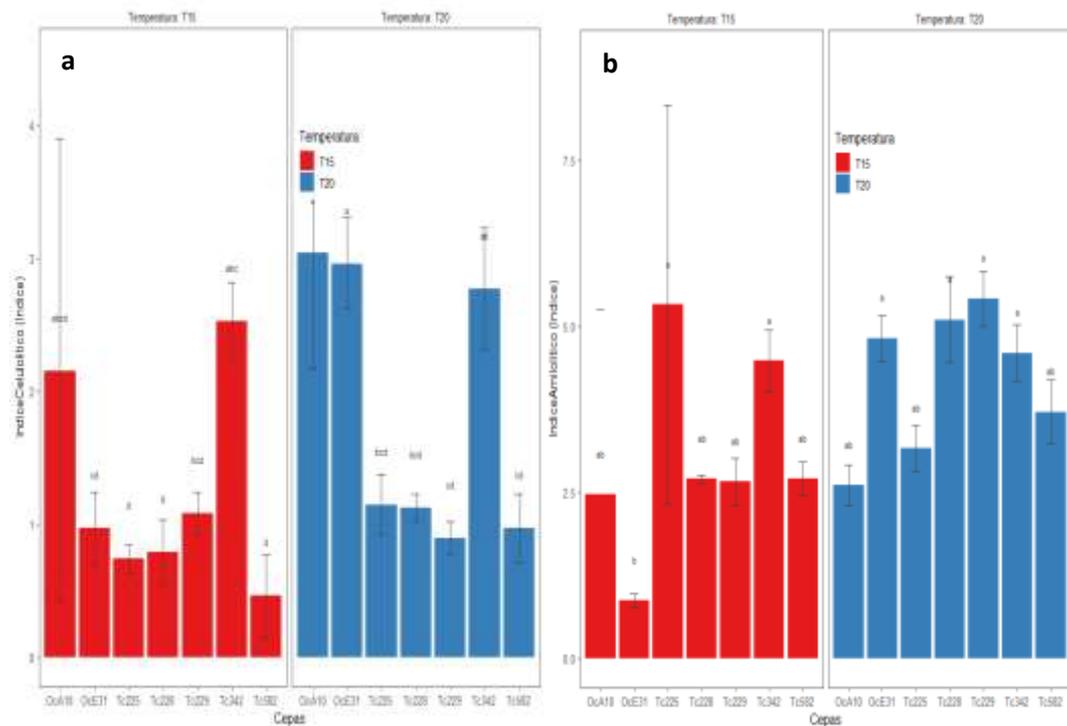
** Diferencia significativa a $\rho \leq 0,01$.

La actividad metabólica evaluada a través del índice celulolítico e índice amilolítico, la respuesta de las cepas bacterianas aisladas de la planta de la Planta de Compostaje de Chachapoyas y del Bosque de Palmeras de Ocol, fue diferente en las dos temperaturas evaluadas; así tenemos que las cepas bacterianas de *B. wiedmanii* Tc2-29 y *B. subtilis* Tc3-42 y *B. subtilis* OcA-10 cultivadas en medio CMC 1% registraron un índice celulolítico similar en ambas temperaturas, sobresaliendo en mayor actividad metabólica las cepas *B. subtilis* Tc3-42 y OcA-10, siendo la prueba significativa (Figura 10a), demostrando tolerancia a temperaturas de 15 y 20°C. En tanto, las cepas bacterianas *B.*

wiedmanii Tc2-25, Tc2-28, Tc2-29 y Tc5-82, así como *B. subtilis* Tc3-42 y Oca-10, cultivadas en medio almidón registraron un índice amilolítico similar a 15 y 20°C (Figura 10b), reflejando tolerancia en su crecimiento y actividad metabólica a estas temperaturas. Por otro lado, se puede apreciar que las cepas muestran una mayor efectividad metabólica cuando desarrollaron en medio almidón, en comparación con medio CMC, debido a los mayores valores de índice amilolítico (Figura 10a y 10b).

Figura 10

Respuesta Metabólica de las Cepas Bacterianas Aisladas de la Planta de Compostaje de la Municipalidad de Chachapoyas y del Bosque de Palmeras de Ocol, Ensayadas en dos Temperaturas de Crecimiento



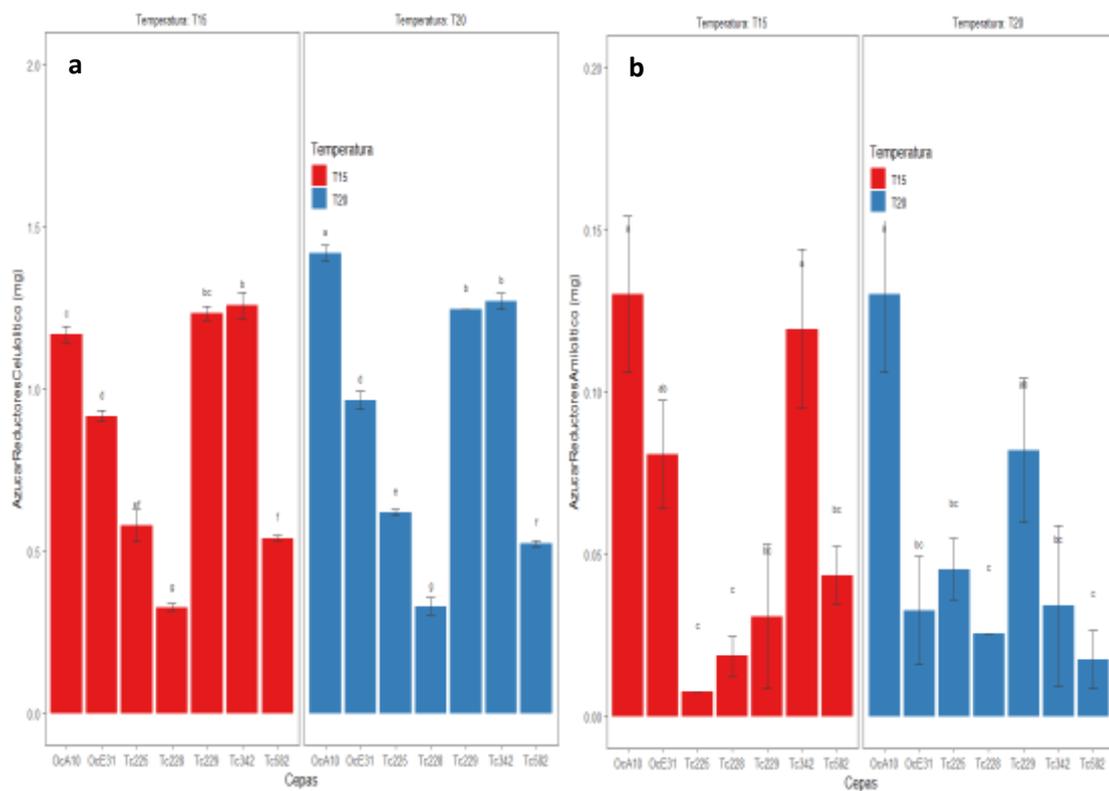
Nota. a) índice celulolítico de cepas bacterianas cultivadas en medio CMC 1%, b) índice amilolítico de cepas bacterianas cultivadas en medio Almidón. Datos presentados con medias \pm desviación estándar, diferentes letras indican diferencias significativas en los parámetros para un $p \leq 0,05$ de acuerdo con la Prueba de Tukey.

3.6. Estimación cuantitativa de la producción de celulasa y amilasa

La actividad metabólica para degradar los polisacáridos a azúcares reductores, la respuesta de las cepas aisladas de Tuctilla y Ocol, mostraron diferencias en las dos temperaturas evaluadas (15 y 20 °C). Así tenemos, las cepas bacterianas *B. wiedmanii* Tc2-25, Tc2-28, Tc2-29 y Tc5-82; *B. subtilis* Tc3-42 y *B. velezensis* OcE-31 cultivadas en caldo CMC 1% registraron una degradación de la celulosa en azúcares reductores similar en ambas temperaturas, sobresaliendo en una mayor actividad de degradación las cepas *B. subtilis* Tc3-42, *B. wiedmanii* Tc2-29 y *B. velezensis* OcE-31), siendo la prueba significativa (Figura 11a) indicando una tolerancia en su crecimiento y actividad metabólica a bajas temperaturas. En tanto, las cepas bacterianas *B. wiedmanii* Tc2-28 y *B. subtilis* OcA-10 cultivadas en Caldo Almidón 1% registraron una degradación del almidón en azúcares reductores similar en ambas temperaturas, sin embargo, las cepas *B. subtilis* Tc3-42, OcA-10 y *B. velezensis* OcE-31 sobresalieron en mayor actividad metabólica a 15°C, siendo la prueba significativa (Figura 11b). por otro lado, se puede apreciar que las muestras tuvieron una mayor efectividad metabólica respecto a los mayores valores de azúcares reductores cuando desarrollaron en caldo CMC 1% en comparación con su desarrollo en Caldo Almidón (Figura 11a y 11b).

Figura 11

Respuesta Metabólica de Cepas Bacterianas Aisladas de la Planta de Compostaje de la Municipalidad de Chachapoyas y del Bosque de Palmeras de Ocol, Ensayadas en dos Temperaturas de Crecimiento



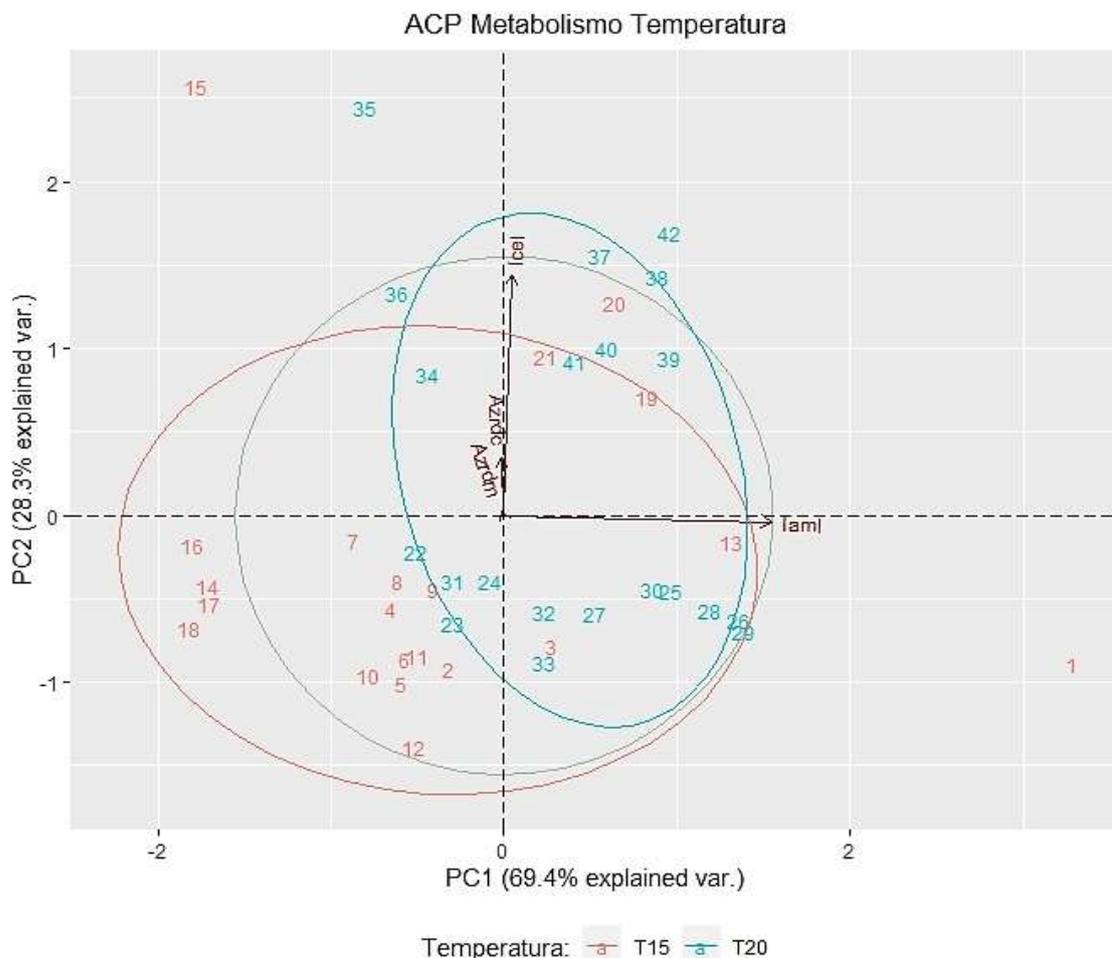
Nota. a) Azúcares reductores en cepas bacterianas cultivadas en caldo CMC 1% b) Azúcares reductores en cepas bacterianas cultivadas en caldo Almidón.

Datos presentados con medias \pm desviación estándar, diferentes letras indican diferencias significativas en los parámetros para un $p \leq 0.05$ de acuerdo con la Prueba de Tukey.

Las respuestas de la actividad metabólica de las cepas bacterianas con actividad celulolítica y amilolítica sometidas a dos temperaturas de crecimiento fueron evaluadas a través del análisis de componentes principales (PC), las PC1 y PC2 explican el 97,67% de la variabilidad de los datos (Figura 12). Correlaciones positivas fueron registradas en las variables índice celulolítico e índice amilolítico, no existiendo una dependencia entre ellas. Por tanto, los resultados muestran que la actividad celulolítica es diferente a la actividad amilolítica de las cepas evaluadas y que estas cepas pueden ser seleccionadas de acuerdo con el tipo de actividad metabólica requerida en el estudio.

Figura 12

Componentes Principales de la Actividad Metabólica de Cepas Bacterianas Cultivadas a 15 y 20°C



Nota. Se evidencian los Componentes Principales de la Actividad Metabólica de Cepas Bacterianas Cultivadas a 15 y 20°C, en las Variables Índice Celulolítico (ICel), Índice Amilolítico (IAmil), Azúcares Reductores en Bacterias con Mayor Actividad Celulolítica (Azrdc), Azúcares Reductores en Bacterias con Mayor Actividad Amilolítica (Azrdm).

3.7. Antagonismo

El ensayo de antagonismo se realizó para determinar el efecto inhibitorio entre las cepas y descartar la incompatibilidad de los aislados *in vitro*, determinando aquellos que no resulten antagónicos en cultivo mixto y puedan ser empleados para la formulación del consorcio microbiano con capacidad degradativa de la celulosa y almidón. Las cepas seleccionadas no originaron reducción del crecimiento bacteriano en el ensayo de antagonismo, demostrando una buena interacción (compatibilidad) entre las mismas, siendo adecuadas en la formulación de consorcios microbianos que interactúen de manera mutualista en la degradación de los residuos sólidos orgánicos.

3.8. Conformación de los consorcios microbianos.

Los consorcios conformados se detallan en la Tabla 11.

Tabla 11

Conformación de los Consorcios Microbianos Según su Actividad Enzimática

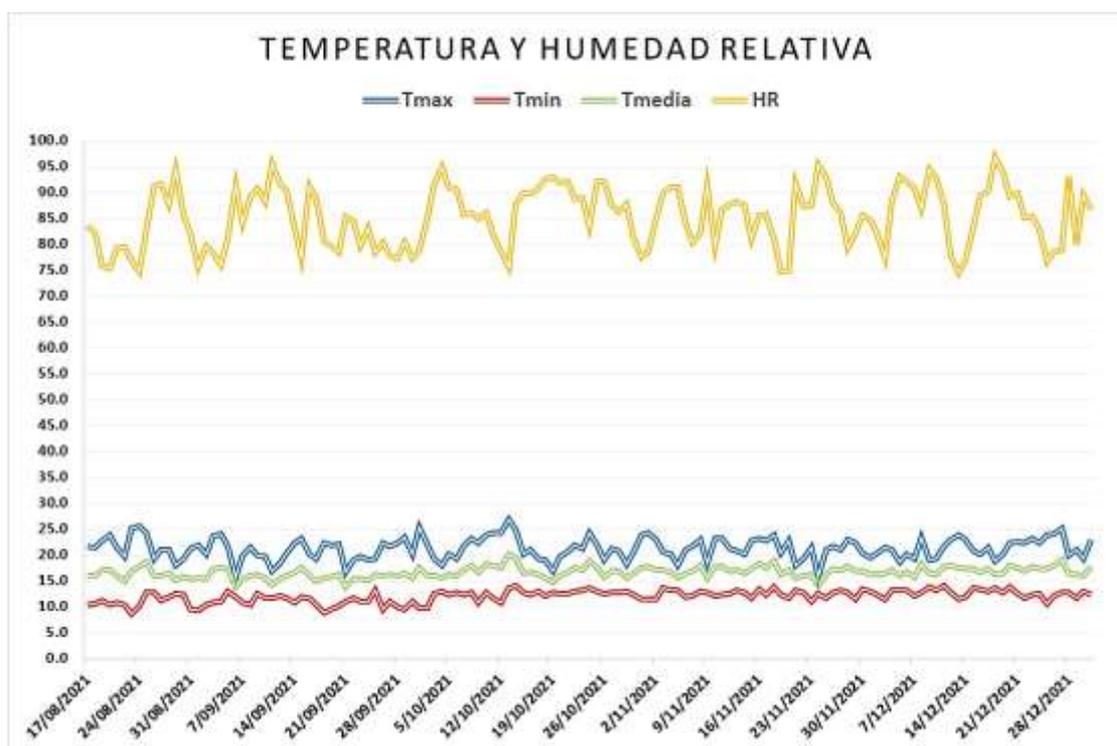
Consortio microbiano	Cepas microbianas	Actividad enzimática
C:1	<i>B. wiedmanii</i> (Tc2-29)	Mayor actividad amilolítica y celulolítica
	<i>B. velezensis</i> (OcE-31)	
	<i>B. subtilis</i> (Tc3-42)	
C:2	<i>B. safensis</i> subsp. <i>safensis</i> (Tc4-67)	Mayor actividad celulolítica
	<i>B. subtilis</i> (TC1-16)	

Etapa II: Determinación de la eficiencia de los consorcios microbianos en el compostaje de residuos orgánicos urbanos a baja temperatura.

El experimento para evaluar la eficiencia de los consorcios microbianos se llevó a cabo en casa malla en los meses de agosto a diciembre del año 2021, cuya temperatura media fue de 15°C y humedad relativa que fluctuó entre 75 y 95% (Figura 13).

Figura 13

Registro de Temperaturas (Máxima, Mínima y Media) y Humedad Relativa de Agosto a Diciembre del Año 2021



Fuente: INDES-CS, UNTRM.

3.9. Temperatura, pH y conductividad eléctrica en el proceso de compostaje de residuos sólidos orgánicos.

Los niveles de pH en las dos primeras semanas de compostaje experimentaron los niveles más ácidos comprendidos entre 3,5 a 5,5. El consorcio 2 experimentó una subida gradual del pH en las dos primeras semanas, en tanto, el testigo absoluto registró los niveles de pH más bajos entre 3,5 a 4. En la semana 3 se alcanzaron niveles de pH neutro y en la semana 4 a la semana 10 se alcanzaron niveles de pH alcalino. Al final del proceso de compostaje se alcanzaron niveles ligeramente ácidos (Figura 14).

La temperatura en la semana 1 y 2 del proceso de compostaje de los RSOU estuvo comprendida entre los 35 a 45 °C, registrando las mayores temperaturas en los tratamientos inoculados con el consorcio 1 y 2 en comparación con el testigo y el testigo absoluto. En la semana 3 la temperatura fue descendiendo los valores de 30 a 40°C, y a finales de la semana 4 descendió a aproximadamente 25°C (Figura 14).

La conductividad eléctrica en la semana 1 a 3 registró niveles de 3 a 7 mS/cm, en la semana 4 a 7 los niveles descendieron a valores de 1,5 a 3,5 mS/cm. En las últimas semanas registraron valores de 4 a 5 mS/cm. En los tratamientos evaluados, el testigo absoluto es el que registró los mayores niveles de conductividad eléctrica durante todo el proceso de compostaje (Figura 14)

3.10. Porcentaje de carbono, nitrógeno y relación C/N en el proceso de compostaje de residuos sólidos orgánicos.

El porcentaje de carbono no registró cambios significativos en las primeras 4 semanas de compostaje. A partir de la semana 4 de compostaje registró una significativa disminución del carbono hasta la etapa de la maduración. La disminución del contenido de carbono en el proceso de compostaje fue evidenciada principalmente cuando se emplearon los consorcios bacterianos 1 y 2 en comparación con el testigo y testigo absoluto (Figura 15).

El porcentaje de nitrógeno en las primeras semanas de compostaje no experimentó variaciones, fluctuando entre 0,6 a 0,7 %N. A partir de la semana 4 a la 10 experimentó aumentos de los valores de 0,7 a 0,9 %N y en la etapa de madurez registró rangos de 0,8 a 1 % N (Figura 15).

La relación C/N en la semana 4 inicia el descenso de esta relación, en la semana 10 registró una disminución significativa en el consorcio 2 con una relación de 25. En la etapa de madurez existe una disminución a 17 en el consorcio 2 (Figura 15).

Figura 14

Cambios en los Niveles de pH, Temperatura y Conductividad Eléctrica Durante el Proceso de Compostaje de Residuos Orgánicos Urbanos Empleando Consorcios Bacterianos

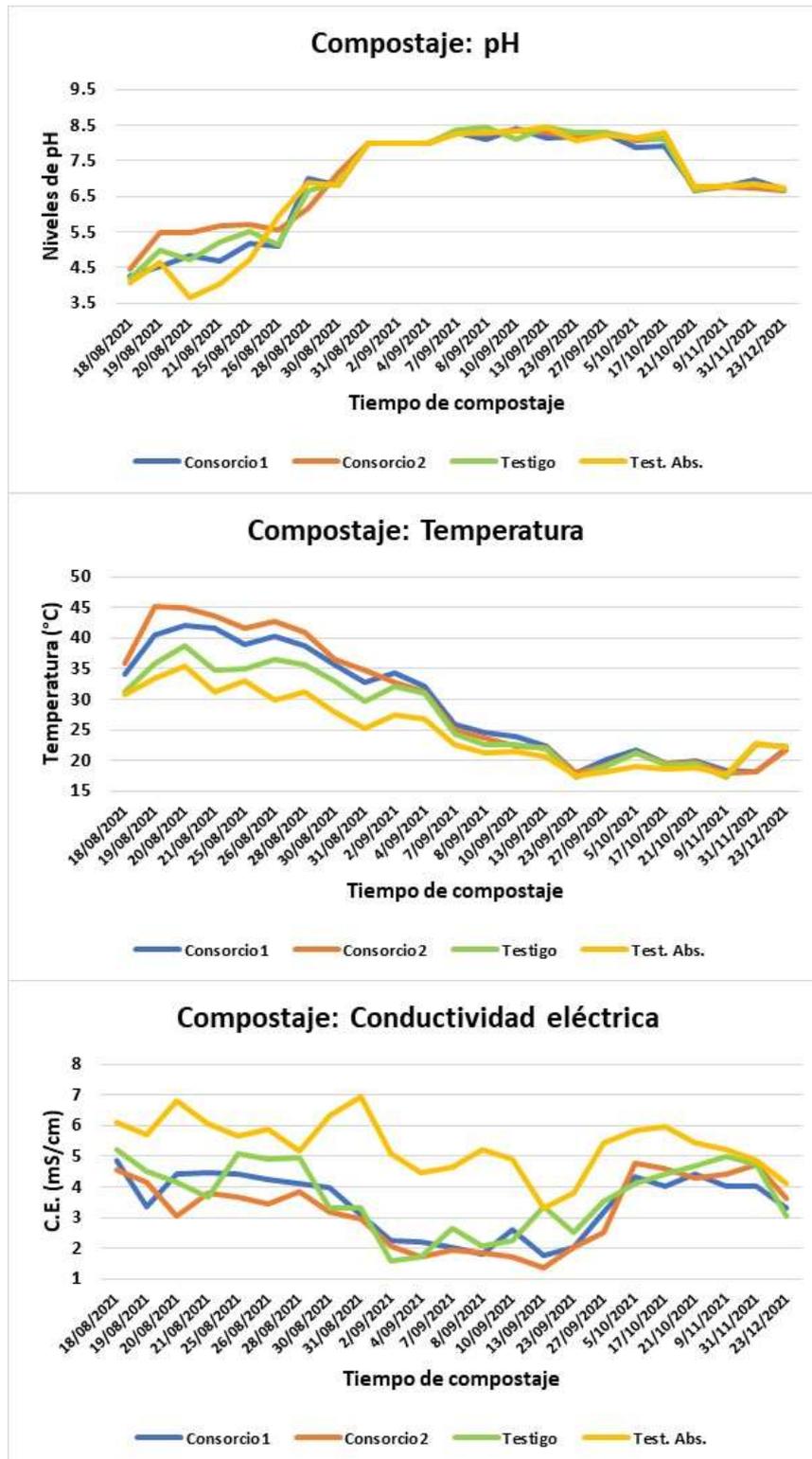
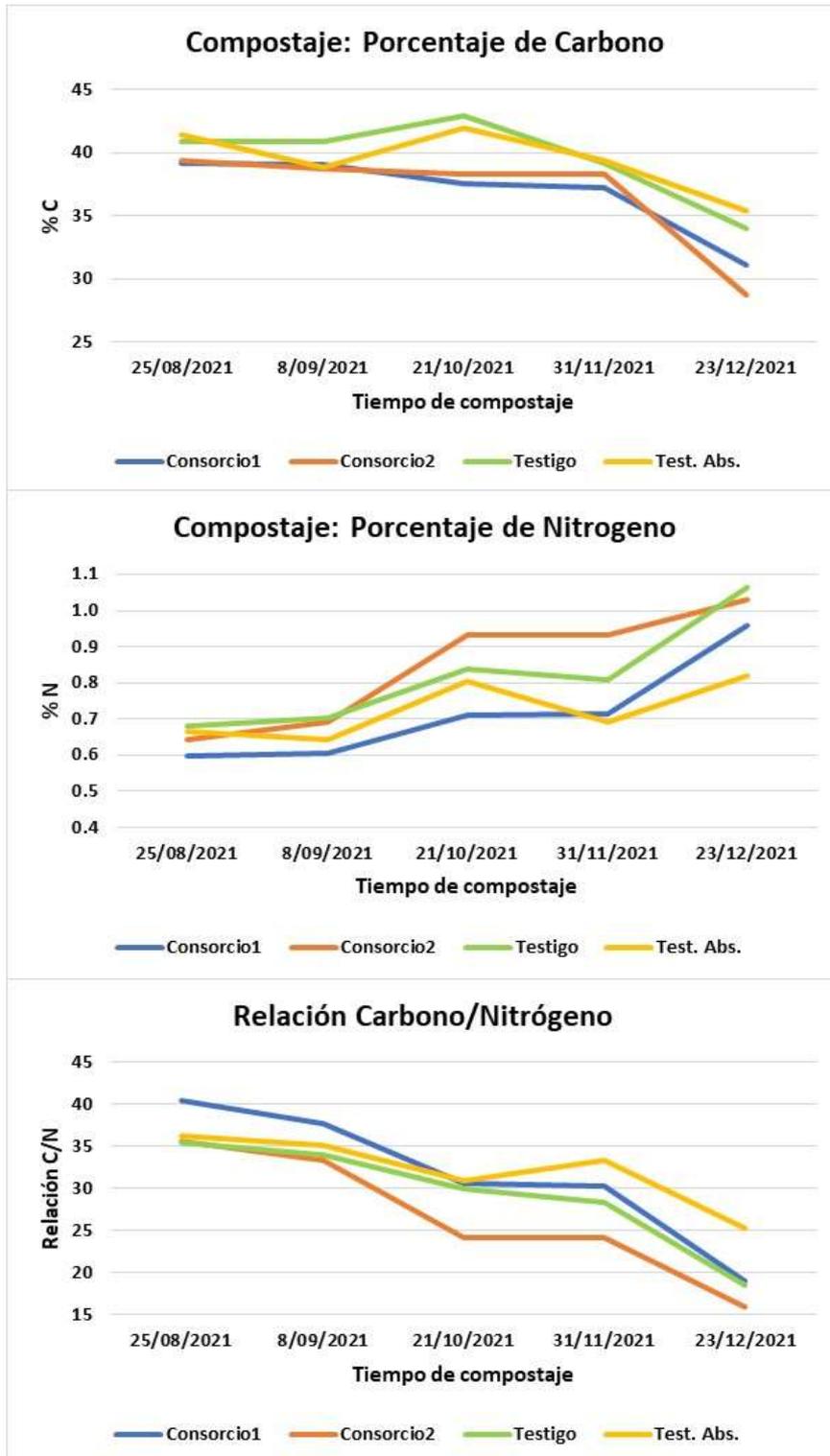


Figura 15

Cambios en el Porcentaje de Carbono, Nitrógeno y la Relación C/N Durante el Proceso de Compostaje de Residuos Orgánicos Urbanos Empleando Consorcios Bacterianos



3.11. Evaluación del compost.

Análisis microbiológico

Los resultados obtenidos de la evaluación microbiológica se presentan en la Tabla 12, los cuales indican que el índice del NMP (número más probable) de coliformes totales y fecales de los tratamientos T1 (Consortio 1); T2 (Consortio 2), T3 (Testigo control) se encontraron dentro del límite permisible ($< 1\ 100$ NMP/ g), según la Norma Chilena Oficial 2880 y la Norma Ambiental para el Distrito Federal NADF-020-AMBT-2011, que establece los criterios mínimos para la producción de compost a partir de la fracción orgánica de los residuos orgánicos. Sin embargo, el T4 (Tratamiento Absoluto) se encontró por encima de este valor. Por otro lado, sólo en los tratamientos T3 (testigo control) y T4 (testigo absoluto) se determinó la presencia de *Salmonella sp.*

Tabla 12

Coliformes Totales, Coliformes Fecales y Salmonella en el Compost de RSOU-Chachapoya, Según Tratamiento

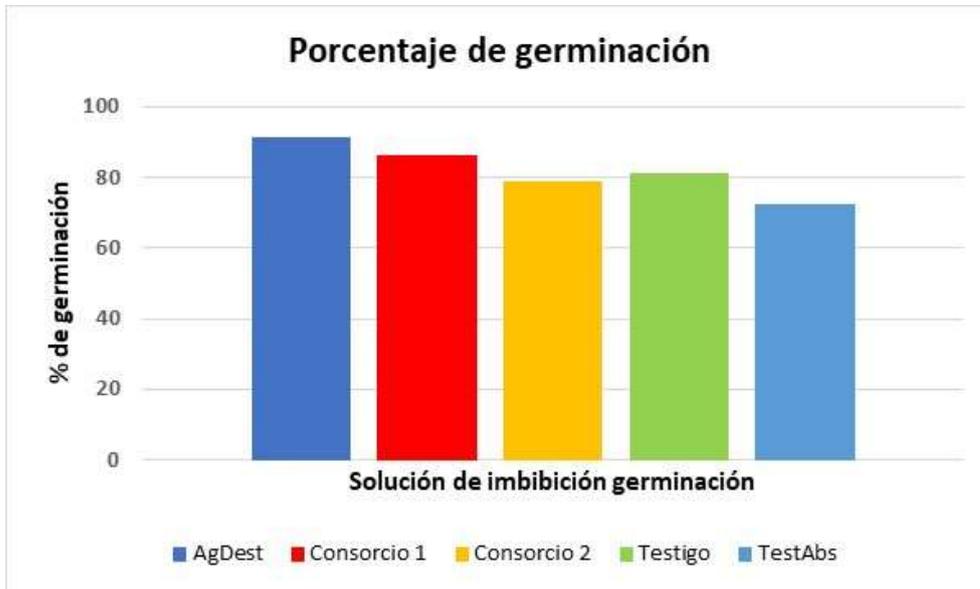
Tratamiento	Coliformes totales (NMP/g) Promedio	Coliformes fecales (NMP/g) Promedio	<i>Salmonella sp.</i>
T1 (C:1)	110	15.3	Ausente en 25 g
T2 (C:2)	87	11.7	Ausente en 25 g
TC	403.3	130	Presente
Tab.	$> 1\ 100$	$> 1\ 100$	Presente

Fitotoxicidad

El ensayo de fitotoxicidad el porcentaje de germinación en semillas de brócoli registró valores en promedio de 80% en los extractos acuosos de los compostajes en el consorcio 1, 2 y el testigo, la disminución del porcentaje de germinación (70% aproximadamente) en extractos acuosos de compostaje del testigo absoluto (Figura 16).

Figura 16

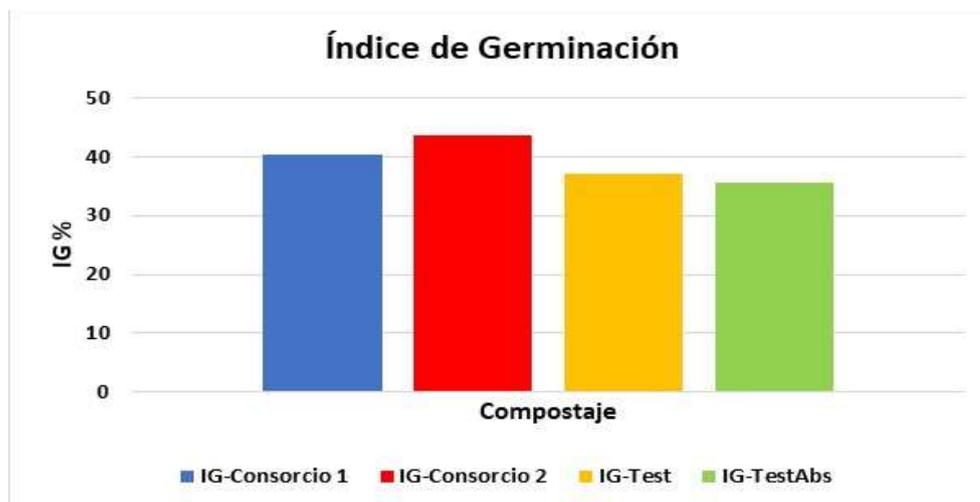
Porcentaje de Germinación de Semillas de Brócoli cv. Green Sprouting Calabrese (Emerald Seeds)



Los valores del índice de germinación empleando semillas de brócoli, los extractos acuosos del compost en los consorcios 1 y 2 permitieron obtener un índice de germinación por encima de 40%, en tanto, los extractos acuosos del compost en el testigo y testigo absoluto estuvieron por debajo de 40% (Figura 17).

Figura 17

Índice de Germinación de Semillas de Brócoli cv. Green Sprouting Calabrese (Emerald Seeds)



IV. DISCUSIÓN

Tamizaje de la actividad celulolítica y amilolítica

El halo de hidrólisis representa una medida de la capacidad enzimática de un microorganismo sea bacteria u hongo, de sintetizar enzimas que pueden ser celulasas o amilasas (Pham et al., 2022; Naresh et al., 2019). En el presente estudio, la selección de las cepas con mayor actividad metabólica (celulolítica o amilolítica) en el tamizaje a 15°C, se realizó en función al análisis de conglomerados, el cual empleó como criterios de selección los valores de diámetro del halo de hidrólisis y los índices celulolítico o amilolítico. La desventaja de evaluar la actividad enzimática en base a los halos de hidrólisis es que se pueden tener mediciones de halos grandes con crecimiento de colonia grande o pequeña, lo cual podría conllevar a registros poco precisos de la actividad metabólica de los microorganismos (Sánchez et al., 2021). Sin embargo, el empleo de índices o radios de hidrólisis permite realizar una relación entre el diámetro de la colonia y el diámetro del halo de hidrólisis, representando valores más precisos para evaluar cualitativamente el metabolismo de la bacteria. Es así, que en diferentes estudios se han empleado estos índices para medir la actividad metabólica de cepas bacterianas, así tenemos, radios de hidrólisis en almidón empleados en *B. amyloliquefaciens* (Abd-Elhalem et al., 2015), radio de hidrólisis de celulosa y almidón empleados en microorganismos aislados de suelos de humedales (Sánchez et al., 2021). Por otro lado, se han empleado índices celulolíticos en *B. cereus* (Olukunle et al., 2021), índices celulolíticos en bacterias termofílicas (Naresh et al., 2019); índices amilolíticos en *B. cereus* (Da Costa Júnior et al., 2021). En nuestro estudio, el empleo de halos de hidrólisis e índices celulolíticos o amilolíticos permitió realizar la selección de 20 cepas bacterianas con potencial celulolítico o amilolítico en el tamizaje secundario a temperatura de 15°C.

Análisis filogenético molecular de los aislados bacterianos

El análisis filogenético exploratorio evidenció las relaciones filogenéticas de las especies de bacterias presentes en las pilas de compostaje de Tuctilla y suelos del Bosque de Palmeras de Ocol, identificándose seis especies de bacterias: *B. wiedmanii*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. safensis* subsp. *safensis* y *B. cereus*, las cuales evidenciaron actividad metabólica a baja temperatura (15°C). En el presente estudio, el análisis filogenético molecular fue determinante, debido a que las especies del género *Bacillus* poseen algunos

caracteres morfológicos y bioquímicos similares, que hacen difícil su identificación mediante métodos microbiológicos convencionales (Sherpa et al., 2018).

B. subtilis es un bacilo gram positivo, forma spora y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. El grupo *B. subtilis* comprende cuatro subespecies: *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* y *B. subtilis* subsp. *stercoris* (Dunlap et al., 2020; Porwal et al., 2009). En este estudio dos cepas de *B. subtilis* con eficiencia metabólica en la degradación de celulosa o almidón mostraron diferencias, siendo que la cepa Tc3-42 registró una actividad celulolítica y amilolítica, en tanto, las cepas Tc1-16 y Tc4-62 mostraron solo actividad celulolítica.

Miembros del grupo de *B. velezensis* fueron asignados previamente dentro del agrupamiento con *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* debido a que compartían un 99% de similitud filogenética porcentual de ADN a ADN; sin embargo, con las reasignaciones pangenómicas las diferencias filogenómicas han podido esclarecer estos contrastes filogenéticos (Adeniji et al., 2019). Los reportes de *B. velezensis* indican que es un bacilo gram positivo cuyos principales nichos son suelo, agua, raíces, madera fermentada (Alenezi et al., 2021), y tiene la capacidad para desarrollar en zonas frías como los glaciares (Sherpa et al., 2018). En la presente investigación la cepa de *B. velezensis* fue aislada a partir de los suelos del Bosque de Palmeras de Ocol, zona caracterizada por tener un clima húmedo y templado, registrando buena actividad metabólica en la degradación de la celulosa y del almidón a azúcares reductores, mostrando mayor degradación del almidón a 15°C en comparación a 20°C (Figura 11b), asimismo, mostró un escaso desarrollo cuando fue cultivada a 10°C, en comparación con otras cepas que se caracterizaron por no registrar crecimiento alguno.

El grupo de *B. cereus* incluye muchas especies filogenéticamente organizados en tres clades, donde *B. anthracis* y *B. wiedmanii* se ubican en el Clade 1, grupo II (Baldwin, 2020; Manzulli et al., 2021). La cepa FSL W8-0169 de *B. wiedmanii* fue aislada por primera vez de leche cruda almacenada en una planta de procesamiento de lácteos en Estados Unidos (Miller et al., 2016). Esta especie muestra una tolerancia a bajas temperaturas (Safitri et al., 2020; Sherpa et al., 2018). En el presente trabajo fueron aisladas 10 cepas de *B. wiedmanii* de la planta de compostaje de Tuctilla, siendo la cepa

TC-2-29 la de mayor actividad metabólica en la degradación de la celulosa a azúcares reductores a bajas temperaturas (Figura 11a).

B. safensis es un bacilo gram positivo aislada de muestras de leche condensada contaminada. El grupo *B. safensis* comprende dos subespecies como *B. safensis* subsp. *safensis* y *B. safensis* subsp. *osmophilus* (Abril et al., 2019; Ahmed et al., 2020). En la presente investigación se identificó una sola cepa registrada como TC-5-67 caracterizada por su actividad celulolítica, no posee actividad amilolítica como lo reportado por Abril et al. (2019) y esto permite su diferencia con *B. safensis* subsp. *osmophilus* que tiene actividad amilolítica.

Identificación fenotípica

Las cepas bacterianas celulolíticas y/o amilolíticas, fueron también identificadas en base a su morfología y características bioquímicas. En la caracterización microscópica *B. wiedmanii* se observó como bacilos gram positivos, con endosporas elipsoidales de posición central visibles en la tinción Gram. El promedio de longitud de la célula fue de 2,8 μm y promedio de ancho de 1 μm y crecimiento en rangos de temperatura de 10 a 40 $^{\circ}\text{C}$, valores similares a los reportados por Miller et al. (2016) en esta especie. Por otro lado, la cepa *B. wiedmanii* FSL W8-0169 fue gelatinasa positiva (Miller et al. 2016), en tanto, en el presente estudio, las 10 cepas aisladas de *B. wiedmanii* fueron gelatinasa negativa (Tabla 7).

B. safensis subsp. *safensis* se caracterizó por tratarse de bacilos gram positivos, formadores de esporas y crecimiento en rangos de temperatura de 10 a 50 $^{\circ}\text{C}$, similares valores a los reportados en esta especie por Abril et al. (2019). No obstante, en nuestro estudio se encontró que estos bacilos fueron gelatinasa negativo y la longitud de bacilo fue 1,8 μm y 0,5 μm de ancho, reportes diferentes a los de Abril et al. (2019)

B. subtilis se observó como bacilos gram positivos, formadores de esporas, promedio de longitud 2,24 μm y promedio de ancho de 0,56 μm , crecimiento en rangos de 20 a 50 $^{\circ}\text{C}$, gelatinasa positiva, datos similares a los reportados por Dunlap et al. (2020), sin embargo,

las cepas OcA-10 y Tc3-42 registraron actividad metabólica en la degradación de la celulosa y el almidón, y las cepas Tc1-16 y Tc4-62 solo registraron actividad metabólica en la degradación de la celulosa (Figura 11 y 12).

Antagonismo

El antagonismo de las bacterias se puede evidenciar por la producción de enzimas líticas, producción de metabolitos secundarios como sideróforos o antibióticos que se evidencia por la difusión de moléculas de una cepa que inhiben el desarrollo de otra (Zhao et al., 2016). En el ensayo ninguno de los aislados originó niveles de reducción del crecimiento bacteriano, demostrando una buena interacción (compatibilidad) entre las cepas ensayadas, evidenciando que pueden ser empleados en la formulación de consorcios microbianos que interactúen de manera mutualista en la degradación de la materia orgánica.

Determinación cuantitativa de la producción de celulasas y amilasas

El potencial celulolítico de las cepas de *Bacillus* aisladas, debido a la secreción de celulasas, fue visible por la formación del halo de hidrólisis (8,6 mm de diámetro) en medio carboximetilcelulosa CMC 1%. Esto coincide con los reportes de las especies de *Bacillus* que son buenas productoras de celulasas (Pham et al., 2022; Da Silva et al., 2021; Nandimath et al., 2016; Bai et al., 2012). Las cepas *B. subtilis* OcA-10, Tc3-42, Tc1-16 y Tc4-62, evidenciaron actividad celulolítica en el presente estudio por su degradación de la celulosa en azúcares reductores debido a la síntesis de enzimas celulasas, que pueden ser del tipo endo y exocelulasas, siendo esta especie también reportada en el compostaje de residuos de café (Siu-Rodas et al., 2018), estiércol de vaca (Bai et al., 2012).

Evaluación del compost obtenido a partir de RSOU empleando consorcios bacterianos

Los niveles de pH al inicio del proceso de compostaje fueron ácidos registrando valores de 4,5 aproximadamente, valor característico a los residuos sólidos orgánicos por la liberación de los ácidos orgánicos (Chaves-Arias et al., 2019; Song et al., 2018). A partir de la segunda semana los valores de pH fueron aumentando gradualmente hasta alcanzar

en la semana 3 y 4 pH 8 a 8,5 probablemente por una mayor disposición de amoníaco como consecuencia de la intensa mineralización de la materia orgánica presente en los residuos sólidos con la respectiva liberación de amonio, el cual incrementó los niveles de pH (Chaves-Arias et al., 2019; Zhao et al., 2016; Yu et al., 2015). A partir de la semana 10 el pH del compost bajó a niveles neutro evidenciado por la completa descomposición de los residuos sólidos orgánicos (Chaves-Arias et al., 2019).

La temperatura es un índice significativo que podría afectar el proceso de compostaje y la actividad microbiana durante el compostaje de los residuos sólidos orgánicos (Morales et al., 2016). Al respecto, en la presente investigación la temperatura del proceso de compostaje en las dos primeras semanas experimentó un aumento en aquellos tratamientos en los que se inoculó los consorcios bacterianos, registrando rangos de temperatura entre 40 a 45°C, los cuales se mantuvieron por alrededor de 6 días, en comparación al testigo y testigo absoluto que fluctuó entre 35 a 37,5 °C. La temperatura alcanzada en los consorcios 1 y 2 se debió probablemente a la transformación de los materiales solubles y con mayor disponibilidad como azúcares y aminoácidos por acción de la degradación de las bacterias en alta concentración en los consorcios bacterianos (García-Ramos et al., 2019). Por tanto, la temperatura fue un importante indicador de la eficiencia del proceso de compostaje en las dos primeras semanas por acción de los consorcios bacterianos empleados.

La temperatura ambiente durante el proceso de compostaje fluctuó en alrededor de 15°C; sin embargo, la temperatura en las composteras se incrementó en las dos primeras semanas de aplicados los tratamientos (consorcio 1 y 2), disminuyendo en la tercera y cuarta semana, respectivamente (Figura 14). Por tanto, estos consorcios pueden ser aplicados como un catalizador para aumentar la temperatura y acelerar el inicio del compostaje en zonas con bajas temperaturas (Xin-Yu et al., 2017).

En el proceso de compostaje de residuos sólidos orgánicos, la transformación biológica y degradación de la materia orgánica representan una fuente significativa de carbono y energía para los microorganismos, a su vez, es un indicador adecuado de la madurez y calidad del compost obtenido (Sun et al., 2017; Zhou et al., 2015). Al respecto, en este

estudio los cambios en el porcentaje de carbono son ilustrados en la Figura 15, siendo que en los tratamientos T1 y T2 el porcentaje de carbono fue disminuyendo en mayor medida comparados al testigo y testigo absoluto, esta diferencia podría deberse al incremento de la actividad microbiana durante el compostaje como consecuencia de la inoculación con los consorcios microbianos C:1 y C:2. Asimismo, estos resultados sugieren que las cepas seleccionadas por su adecuada actividad metabólica a bajas temperaturas para conformar los consorcios microbianos, lograron multiplicarse en las primeras semanas de compostaje, lo cual permitió la biodegradación del carbono y aceleración del proceso de compostaje, obteniéndose un compost con adecuadas características fisicoquímicas.

En las primeras semanas de compostaje los tratamientos 1 y 2 alcanzaron temperatura entre 40 a 45°C, manteniéndose así durante 6 días, lo cual probablemente disminuyó la población de coliformes totales y coliformes fecales, encontrándose rangos permisibles de acuerdo con Norma Chilena Oficial 2880 y la Norma Ambiental para el Distrito Federal NADF-020-AMBT-2011. Asimismo, a diferencia de los tratamientos 3 y 4 no hubo presencia de *Salmonella* sp. Estos resultados pueden ser tomados como criterios de la calidad aceptable en el uso de compost obtenido para uso agrícola, huertas o jardinería (García-Ramos et al., 2019). Por otro lado, las temperaturas alcanzadas en los consorcios 1 y 2 no solo disminuyeron la cantidad de microorganismos patógenos, sino que fue favorable para el desarrollo de los consorcios bacterianos, los cuales se caracterizaron por ser tolerantes a un rango de temperatura entre 10 a 50°C (Tabla 8) (Zhou et al., 2015).

La germinación de las semillas de brócoli alcanzó porcentajes de germinación por encima de 80% en el consorcio 2, y por debajo de 80% en el consorcio 1 y el testigo pudiendo ser considerados como sustratos no tóxicos (Villacis et al., 2016). Por otro lado, el índice de germinación (IG) es representativo para evaluar la fitotoxicidad del compost obtenido, los valores de IG de 0 a 40% indica una sensible inhibición del crecimiento vegetal, IG de 40 a 80% indica una moderada inhibición del crecimiento vegetal, IG de 80 a 120 sin efecto alguno y IG de 120 para adelante indica una estimulación del crecimiento vegetal (Cesaro et al., 2015). Al respecto en la presente investigación, el IG de los consorcios 1 y 2 registraron valores por encima de 40% indicando que el compost obtenido indica una moderada inhibición del crecimiento vegetal. En tanto, el testigo y el testigo absoluto

registraron valores de IG por debajo de 40%, indicando que el compost obtenido muestra una sensible inhibición del crecimiento vegetal (Figura 17). El IG puede proporcionar información acerca de la fitotoxicidad del compost obtenido, al estar relacionado con compuestos tóxicos que usualmente están presentes en compost inestables (Luo et al., 2018; Cesaro et al., 2015). En ese sentido, el IG puede emplearse como una herramienta de prueba para determinar la madurez del compost obtenido (Ofosu-Budu et al., 2010).

V. CONCLUSIONES

En el presente estudio fueron aisladas 49 cepas bacterianas con actividad metabólica a 15°C, (39 con actividad celulolítica/amilolítica y 10 con actividad celulolítica) de la planta de compostaje de la Municipalidad Provincial de Chachapoyas. Asimismo, fueron aisladas 7 cepas (5 amilolíticas y 2 celulolíticas/amilolíticas) a partir del suelo del Bosque de Palmeras de Ocol, Molinopampa, Amazonas, Perú.

Fueron seleccionadas 20 cepas bacterianas por su actividad metabólica a bajas temperaturas (15°C), agrupadas en cinco especies: *B. wiedmanii*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. safensis* subsp. *Safensis* y *B. cereus*.

Se conformaron dos consorcios microbianos por su actividad metabólica a bajas temperaturas, el consorcio 1 con mayor actividad amilolítica y celulolítica (*B. wiedmanii*, *B. subtilis*, *B. velezensis*) y el consorcio 2 con mayor actividad celulolítica (*B. safensis* subsp. *Safensis* y *B. subtilis*).

El consorcio microbiano conformado por las cepas *B. safensis* subsp. *safensis* (Tc4-67) y *B. subtilis* (Tc1-16) registró la mejor actividad metabólica en el proceso de compostaje de residuos sólidos orgánicos urbanos a baja temperatura. Obteniéndose un compost en 4 meses con adecuadas características para su uso en la agricultura o jardinería.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril, A. G., Rama, J. L. R., Feijoo-Siota, L., Calo-Mata, P., Salazar, S., Peix, A., ... y Villa, T. G. (2019). *Bacillus safensis* subsp. *osmophilus* subsp. nov., isolated from condensed milk, and description of *Bacillus safensis* subsp. *safensis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(1), 189-195.
- Abdel-Rahman, M. A. (2016). Establishment of efficient cellulolytic bacterial consortium potential for designed composting of rice straw. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 3(4), 211-228.
- Abdullah, R., Zafar, W., Nadeem, M., Iqtedar, M., Kaleem, A., y Nazazi, S. (2016). Partial Purification and Characterization of Cellulases Produced by bacillus Strain. *Romanian Biotechnological Letters*, 21(1), 11103–11109.
- Adeniji, A. A., Loots, D. T., & Babalola, O. O. (2019). *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(9), 3669-3682.
- Ahmed, T., Shahid, M., Noman, M., Niazi, M. B. K., Zubair, M., Almatroudi, A., ... & Li, B. (2020). Bioprospecting a native silver-resistant *Bacillus safensis* strain for green synthesis and subsequent antibacterial and anticancer activities of silver nanoparticles. *Journal of advanced research*, 24, 475-483.
- Akyol, Ç., Ince, O., & Ince, B. (2019). Crop-based composting of lignocellulosic digestates: Focus on bacterial and fungal diversity. *Bioresource Technology*, 288(May). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121549>

- Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Mohammed Ghilan, A. K., & Arasu, M. V. (2019). Composting of vegetable waste using microbial consortium and biocontrol efficacy of streptomycetes Sp. Al-Dhabi 30 isolated from the Saudi Arabian environment for sustainable agriculture. *Sustainability (Switzerland)*, *11*(23). <https://doi.org/10.3390/su11236845>
- Alenezi, F.N.; Slama, H.B.; Bouket, A.C.; Cherif-Silini, H.; Silini, A.; Luptakova, L.; Nowakowska, J.A.; Oszako, T. y Belbahri, L. (2021). *Bacillus velezensis*: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal, Biocontrol and Environmental Importance. *Forests* 2021, *12*, 1714. <https://doi.org/10.3390/f12121714>
- Antunes, L. P., Martins, L. F., Pereira, R. V., Thomas, A. M., Barbosa, D., Lemos, L. N. y Batista, J. (2016). Microbial community structure and dynamics in thermophilic composting viewed through metagenomics and metatranscriptomics. *Nature Publishing Group*, (August), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep38915>
- Aveiga, E., Alcívar, R., Cañarte, F., y Vera, H. (2016). Uso de biopreparados en el compostaje de residuos orgánicos urbanos. *Revista Espamciencia*, *7*(2), 135–142.
- Awasthi, Pandey, A. K., Khan, J., Bundela, P. S., Wong, J. W. C., y Selvam, A. (2014). Evaluation of thermophilic fungal consortium for organic municipal solid waste composting. *Bioresource Technology*, *168*, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.048>

- Awasthi, S. K., Wong, J. W. C., Li, J., Wang, Q., Zhang, Z., Kumar, S. y Awasthi, M. K. (2018). Evaluation of microbial dynamics during post-consumption food waste composting. *Bioresource Technology*, 251, 181–188.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.040>
- Azim, K., Soudi, B., Boukhari, S., Perissol, C., Roussos, S. y Thami Alami, I. (2017). Composting parameters and compost quality: a literature review. *Organic Agriculture*, 8(2), 141–158. <https://doi.org/10.1007/s13165-017-0180-z>
- Baldwin, V.M. (2020). You Can't B. cereus – A Review of Bacillus cereus Strains That Cause Anthrax-Like Disease. *Front. Microbiol.* 11:1731. doi: 10.3389/fmicb.2020.01731
- Bai, S., Ravi, M., Mukesh., D. J., Balashanmugam, P., Bala, M.D. y Kalaichelban, P.T., (2012). Cellulase production by Bacillus subtilis isolated from cow dung. *Scholar Research Library* 4(1), 269–279.
(<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)
- Barrena, R. (2006). Compostaje de residuos sólidos orgánicos. Aplicación de técnicas respirométricas en el seguimiento del proceso (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Bayard, R., Benbelkacem, H., Gourdon, R. y Buffière, P. (2018). Characterization of selected municipal solid waste components to estimate their biodegradability. *Journal of Environmental Management*, 216, 4–12.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.087>

- Behera, B. C., Mishra, R. R., Singh, S. K., Dutta, S. K. y Thatoi, H. (2016). Cellulase from *Bacillus licheniformis* and *Brucella* sp. isolated from mangrove soils of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Biocatalysis and Biotransformation*, 34(1), 44–53. <https://doi.org/10.1080/10242422.2016.1212846>
- Bernal, M. P., Albuquerque, J. A. y Moral, R. (2009). Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology*, 100(22), 5444–5453. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.027>
- Bertoldi, M. De, Vallini, G. y Pera, A. (1983). The Biology of Composting : a review. *Waste Management & Research*, 1, 157–176. <https://doi.org/10.1177/0734242X8300100118>
- Bong, C. P. C., Lim, L. Y., Ho, W. S., Lim, J. S., Klemeš, J. J., Towprayoon, S., ... Lee, C. T. (2016). A review on the global warming potential of cleaner composting and mitigation strategies. *Journal of Cleaner Production*, 146, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.07.066>
- Bonmatí, A. (2008). Gestión y Tratamiento de Resíduos Sólidos Urbanos.. En P. Andrés y R. Rodríguez. Evaluación y prevención de riesgos ambientales en Centroamérica (pp. 215). Girona, España: Documenta Universtaria.
- Cesaro, A., Belgiorno, V. y Guida, M. (2015). Compost from organic solid waste: Quality assessment and European regulations for its sustainable use. *Resources, Conservation and Recycling*, 94(1): 72-79.

- Cesaro, A., Conte, A., Belgiorno, V., Siciliano, A. y Guida, M. (2019). The evolution of compost stability and maturity during the full-scale treatment of the organic fraction of municipal solid waste. *Journal of Environmental Management*, 232(October 2018), 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.121>
- Chaves-Arias, R., Campos-Rodríguez, R., Brenes-Peralta, L. y Jiménez-Morales, M. F. (2019). Compostaje de residuos sólidos biodegradables del restaurante institucional del Tecnológico de Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 32(1), 39-53.
- Chroni, C., Kyriacou, A., Manios, T. y Konstantia, L. (2009). Investigation of the microbial community structure and activity as indicators of compost stability and composting process evolution. *Bioresource Technology*, 100(15), 3745–3750. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.016>
- Da Costa Junior, J. A., da Rosa, G. M., Wastowski, A. D., Soriani, H. H., Locatelli, A. P. C., da Silva, D. W., ... y Bones, U. A. (2021). Biotechnology: identification and evaluation of the *Bacillus cereus* amyolytic activity. *Research, Society and Development*, 10(13), e437101321301-e437101321301.
- Da Silva, R. N., de Andrade Melo, L. F. y Finkler, C. L. L. (2021). Optimization of the cultivation conditions of *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01 for cellulase production. *Biotechnology Reports*, 29, e00599.
- Decreto Legislativo No 1278 MINAM, Ley de Gestión Integral de los Residuos Sólidos (2017). <https://busquedas.elperuano.pe/download/url/decreto-legislativo-que-aprueba-la-leyde-gestion-integral-d-decreto-legislativo-n-1278-1466666-4>

- De Maayer, P., Anderson, D., Cary, C. y Cowan, D. A. (2014). Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO reports*, 15(5), 508-517.
- De Vries, B. V. W. y Andrade, D. (2008). CAPÍTULO 1 VOLCANISMO Y SISMICIDAD. In *Evaluación y prevención de riesgos ambientales en Centroamérica* (p. 29). Documenta Universitaria.
- DOF, Diario Oficial de la Federación - NMX-AA-67-1985. Protección al ambiente-contaminación del suelo residuos sólidos municipales-determinación de la relación carbono/nitrógeno. 6 de Noviembre de 1992. 2.
- Dunlap, C. A., Bowman, M. J. y Zeigler, D. R. (2020). Promotion of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* and *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* to species status. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113(1), 1-12.
- Faust, K. (2019). Microbial Consortium Design Benefits from Metabolic Modeling. *Trends in Biotechnology*, 37(2), 123–125.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.11.004>
- Fathollahi, Z., Habibpour, B., Imani, S., Hassanzadeh, N. y Abdigoudarzi, M. (2021). Identification of Cellulolytic Bacteria from Guts of *Microcerotermes diversus* Silvestri (Isoptera: Termitidae) in Southern Iran. *Current Microbiology*, 78(4), 1305-1316.
- García-Ramos, C., Arozarena-Daza, N.J., Martínez-Rodríguez, F., Hernández-Guillén, M., Pascual-Amaro, J.A., y Santana-Gato, D. (2019). Obtención de compost mediante la biotransformación de residuos de mercados agropecuarios. *Cultivo Tropicales*, 40(2), 1-32.

- Getahun, T., Nigusie, A., Entele, T., Gerven, T. Van. y Bruggen, B. Van Der. (2012). Effect of turning frequencies on composting biodegradable municipal solid waste quality. *Resources, Conservation and Recycling*, 65, 79–84.
<https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2012.05.007>
- Ghaffari, S., Sepahi, A. A., Razavi, M. R., Malekzadeh, F. y Haydarian, H. (2011). Effectiveness of inoculation with isolated *Anoxybacillus* sp. MGA110 on municipal solid waste composting process. *African Journal of Microbiology Research*, 5(30), 5373-5378.
- Gharsa, H., Bouri, M., Mougou Hamdane, A., Schuster, C., Leclerque, A., & Rhouma, A. (2021). *Bacillus velezensis* strain MBY2, a potential agent for the management of crown gall disease. *Plos one*, 16(6), e0252823.
- González, A., Sahagún, J., Pérez, D.J., Domínguez, A., Serrato, R., Landeros, V. y Dorantes, E. (2006). Diversidad fenotípica de maíz cacahuacintle en el valle de Toluca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(3), 255-261.
- Gopinath, S. C., Anbu, P., Arshad, M. M., Lakshmipriya, T., Voon, C. H., Hashim, U., & Chinni, S. V. (2017). Biotechnological processes in microbial amylase production. *BioMed research international*, 2017. Hindawi BioMed Research International Volume 2017, <http://dx.doi.org/10.1155/2017/1272193>
- Gou, C., Wang, Y., Zhang, X., Lou, Y. y Gao, Y. (2017). Inoculation with a psychrotrophic-thermophilic complex microbial agent accelerates onset and promotes maturity of dairy manure-rice straw composting under cold climate conditions. *Bioresource Technology*, 243, 339–346.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.097>

- Goyal, S., Dhull, S. K. y Kapoor, K. K. (2005). Chemical and biological changes during composting of different organic wastes and assessment of compost maturity. *Bioresource technology*, 96(14), 1584-1591.
- Gu, W., Lu, Y., Tan, Z., Xu, P., Xie, K., Li, X. y Sun, L. (2017). Fungi diversity from different depths and times in chicken manure waste static aerobic composting. *Bioresource Technology*, 239, 447–453.
- Guidoni, L. L. C., Marques, R. V., Moncks, R. B., Botelho, F. T., da Paz, M. F., Corrêa, L. B. y Corrêa, É. K. (2018). Home composting using different ratios of bulking agent to food waste. *Journal of environmental management*, 207, 141-150.
- Guo, R., Li, G., Jiang, T., Schuchardt, F., Chen, T., Zhao, Y. y Shen, Y. (2012). Effect of aeration rate, C/N ratio and moisture content on the stability and maturity of compost. *Bioresource Technology*, 112, 171–178.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.099>
- Guo, X., Liu, H. y Wu, S. (2019). Humic substances developed during organic waste composting : Formation mechanisms , structural properties , and agronomic functions. *Science of the Total Environment*, 662, 501–510.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.137>
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process biochemistry*, 38(11), 1599-1616. doi:10.1016/S0032-9592(03)00053-0

- Hang, Y., Junqiu, J., Qingliang, Z., Kun, W., Yunshu, Z., Zhen, Z., & Xiaodi, H. (2015). Bioelectrochemically-assisted anaerobic composting process enhancing compost maturity of dewatered sludge with synchronous electricity generation. *Bioresource Technology*, 193, 1-7.
- Hassen, A., Belguith, K., Jedidi, N., Cherif, A., Cherif, M. y Boudabous, A. (2001). Microbial characterization during composting of municipal solid waste. *Bioresource Technology*, 80(3), 217–225. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00065-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00065-7)
- Hernández-Berriel, M., Aguilar-Virgen, Q., Taboada-González, P., Lima-Morra, R., Eljaiek-Urzola, M., Márquez-Benavides, L. y Buenrostro-Delgado, O. (2017). Generación y composición de los residuos sólidos urbanos en América Latina y el Caribe. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 32, 11-22.
- Hesari, M. R., Darsanaki, R. K. y Salehzadeh, A. (2017). Antagonistic Activity of Probiotic Bacteria Isolated from Traditional Dairy Products against E. coli O157:H7. *Journal of Medical Bacteriology*, 6(3–4), 23–30. Retrieved from <http://jmb.tums.ac.ir/index.php/jmb/article/view/332>
- Hoornweg, D., & Bhada-Tata, P. (2012). What a waste: a global review of solid waste management. Huang, G. F., Wong, J. W. C., Wu, Q. T. y Nagar, B. B. (2004). Effect of C/N on composting of pig manure with sawdust. *Waste Management*, 24(8), 805–813. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2004.03.011>
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, US). 1983. 2 ed. v.1, ptt. 2. Trad. Editorial Acribia. 1988

- Indumathi, D. (2017). Microbial Conversion of Vegetable Wastes for Bio fertilizer Production. *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 03(02), 43–47.
<https://doi.org/10.9790/264x-03024347>
- INEN EP . (2009). NTE INEN 1529-15, Control microbiológico. Método de detección de Salmonella. Quito, Ecuador.
- Instituto Nacional de Normalización . (2004). Norma Chilena de Calidad del Compost (Norma Chilena Oficial 2880). <https://bit.ly/34PjmPU>
- Jain, M. S., Daga, M. y Kalamdhad, A. S. (2018). Composting physics: A science behind bio-degradation of lignocellulose aquatic waste amended with inoculum and bulking agent. *Process Safety and Environmental Protection*, 116, 424–432.
<https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.03.017>
- Jimenez, E. I. y Pérez Garcia, V. (1989). Evaluation of City Refuse Compost Maturity : A Review. *Biological Wastes*, 27, 115–142.
- Khatiwada, P., Ahmed, J., Sohag, M. H., Islam, K. y Azad, A. K. (2016). Isolation, Screening and Characterization of Cellulase Producing Bacterial Isolates from Municipal Solid Wastes and Rice Straw Wastes. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, (April). <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000280>
- Kunasundari, B., Naresh, S. y Zakaria, N. Z. C. (2017, September). Isolation and characterization of cellulase producing bacteria from tropical mangrove soil. In *Proceedings of the 2017 International Conference on Biomedical Engineering and Bioinformatics* (pp. 34-37).

- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y., Guindon, S. (2012). PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 29(6), 1695-1701.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mss020>
- Li, C., Li, H., Yao, T., Su, M., Ran, F., Han, B., ... Gun, S. (2019). Microbial inoculation influences bacterial community succession and physicochemical characteristics during pig manure composting with corn straw. *Bioresource Technology*, 289(March), 121653.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121653>
- Li, H., Xu, X., Chen, H., Zhang, Y., Xu, J., Wang, J. y Lu, X. (2013). Molecular analyses of the functional microbial community in composting by PCR-DGGE targeting the genes of the b -glucosidase. *Bioresource Technology*, 134, 51–58.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.077>
- Liu, H., Wang, L. y Lei, M. (2019). Positive impact of biochar amendment on thermal balance during swine manure composting at relatively low ambient temperature. *Bioresource Technology*, 273, 25–33.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.033>
- Liu, L., Wang, S., Guo, X., Zhao, T. y Zhang, B. (2017). Succession and diversity of microorganisms and their association with physicochemical properties during green waste thermophilic composting. *Waste Management*, 73(31270679), 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.12.026>

- Lloréns, 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.
- López-González, J. A., Vargas-García, M. del C., López, M. J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M. del M. y Moreno, J. (2015). Biodiversity and succession of mycobiota associated to agricultural lignocellulosic waste-based composting. *Bioresource Technology*, 187, 305–313.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.124>
- Luo, Y., Liang, Y., Zeng, G., Chen, M., Mo, D., Li, G., & Zhang, D. (2018). Seed germination test for toxicity evaluation of compost: Its roles, problems and prospects. *Waste Management*, 71, 109-114.
- Maharsiwi, W., Astuti, R. I., Meryandini, A. y Wahyudi, A. T. R. I. (2020). Screening and characterization of sponge-associated bacteria from Seribu Island , Indonesia producing cellulase and laccase enzymes. *BIODIVERSITAS*, 21(3), 975–981. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210317>
- Masngut, N., Manap, S., Man, R. C., & Shaarani, S. (2017). Bacteria isolation from landfill for production of industrial enzymes for waste degradation. *Indian J. Sci. Technol*, 10(7), 1-5. [https:// doi: 10.17485/ijst/2017/v10i7/111224](https://doi.org/10.17485/ijst/2017/v10i7/111224)

- Manzulli, V.; Rondinone, V.; Buchicchio, A.; Serrecchia, L.; Cipolletta, D.; Fasanella, A.; Parisi, A.; Difato, L.; Iatarola, M.; Aceti, A. y Galante, D. (2021). Discrimination of *Bacillus cereus* Group Members by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Microorganisms*, 9(6), 1202. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061202>
- Meng, Q., Yang, W., Men, M., Bello, A., Xu, X. y Xu, B. (2019). Microbial Community Succession and Response to Environmental Variables During Cow Manure and Corn Straw Composting. *Frontiers in Microbiology*, 10(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00529>
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Miller, R. A., Beno, S. M., Kent, D. J., Carroll, L. M., Martin, N. H., Boor, K. J. y Kovac, J. (2016). *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(11), 4744.
- Morales, A. B., Bustamante, M. A., Marhuenda-Egea, F. C., Moral, R., Ros, M. y Pascual, J. A. (2016). Agri-food sludge management using different co-composting strategies: study of the added value of the composts obtained. *Journal of Cleaner Production*, 121, 186-197. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.02.012>

- Muscolo, A., Papalia, T., Settineri, G., Mallamaci, C. y Jeske-Kaczanowska, A. (2018). Are raw materials or composting conditions and time that most influence the maturity and/or quality of composts? Comparison of obtained composts on soil properties. *Journal of cleaner production*, 195, 93-101.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O., & Jannasch, H. W. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology*, 164(3), 165-172.
- Nadia, O. F., Xiang, L. Y., Lie, L. Y., Anuar, C., Afandi, M. P. y Baharuddin, S. A. (2015). Investigation of physico-chemical properties and microbial community during poultry manure co-composting process. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 28, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.07.023>
- Nakasaki, K., Hirai, H., Mimoto, H., Quyen, T. N. M., Koyama, M. y Takeda, K. (2019). Succession of microbial community during vigorous organic matter degradation in the primary fermentation stage of food waste composting. *Science of the Total Environment*, 671, 1237–1244. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.341>
- Nandimath, A. P., Kharat, K. R., Gupta, S. G. y Kharat, A. S. (2016). Optimization of cellulase production for *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. soil isolates. *African Journal of Microbiology Research*, 10(13), 410-419.

- Naresh, S., Kunasundari, B., Gunny, A. A. N., Teoh, Y. P., Shuit, S. H., Ng, Q. H. y Hoo, P. Y. (2019). Isolation and partial characterisation of thermophilic cellulolytic bacteria from north Malaysian tropical mangrove soil. *Tropical life sciences research*, 30(1), 123.
- Neugebauer, M. y Sołowiej, P. (2017). The use of green waste to overcome the difficulty in small-scale composting of organic household waste. *Journal of Cleaner Production*, 156, 865–875.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.04.095>
- Ng, S. M., Tey, L. H., Leong, S. Y. y Ng, S. A. (2019). Isolation, screening and characterization of the potential microbes to enhance the conversion of food-wastes to bio-fertilizer. *AIP Conference Proceedings*, 2157(1) 020048.
- Norma Ambiental para el Distrito Federal NADF-020-AMBT-2011, Que establece los requerimientos mínimos para la producción de composta a partir de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos, agrícolas, pecuarios y forestales, así como las especificaciones mínimas de calidad de la composta producida y/o distribuida en el Distrito Federal.
- Ofosu-Budu, G.K., Hogarh, J.N., Fobil, J.N., Quaye, A., Danso, S.K.A. y Carboo, D. (2010). Harmonizing procedures for the evaluation of compost maturity in two compost types. *Resources, Conservation and Recycling*, 54(1), 205-209.
- Ozkan, B. M. y Ahmet, A. (2016). Isolation, identification and molecular characterization of cellulolytic bacteria from rumen samples collected from Erzurum slaughter house, Turkey. *Research Journal of Biotechnology*, 11(2), 32-38.

- Orihuela, C. (2018). Un Análisis de la Eficiencia de la Gestión Municipal de Residuos Sólidos en el Perú y sus determinantes. *Instituto Nacional de Estadística*.
- Partanen, P., Hultman, J., Paulin, L., Aluvinen, P. y Romantschuk, M. (2010). Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-94>
- Pergola, M., Persiani, A., Palese, A. M., Di Meo, V., Pastore, V., D'Adamo, C. y Celano, G. (2018). Composting: The way for a sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, 123, 744-750.
- Pereira, R. F., Cardoso, E. J. B. N., Oliveira, F. C., Estrada-bonilla, G. A. y Cerri, C. E. P. (2018). A novel way of assessing C dynamics during urban organic waste composting and greenhouse gas emissions in tropical region Bioresource Technology Reports A novel way of assessing C dynamics during urban organic waste composting and greenhouse gas emissions. *Bioresource Technology Reports*, 3(June), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.02.002>
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De La Rubia, T. y Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. *International Microbiology*, 5(2), 53–63. <https://doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>
- Pham, V. H. T., Kim, J., Shim, J., Chang, S. y Chung, W. (2022). Coconut Mesocarp-Based Lignocellulosic Waste as a Substrate for Cellulase Production from High Promising Multienzyme-Producing *Bacillus amyloliquefaciens* FW2 without Pretreatments. *Microorganisms*, 10(2), 327. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020327>

- Porwal, S., Lal, S., Cheema, S. y Kalia, V. C. (2009). Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: diversity in Bacillus. *PLoS One*, 4(2), e4438.
- Pozo, Y. R., Romero, L. C., Suárez, A. G., Pérez, J. G., & Álvarez-Rivera, V. P. (2006). Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género Bacillus antagonistas de Pectobacterium carotovorum. *Fitosanidad*, 10(3), 187-191.
- Puerta Echeverri, S. M. (2004). Los residuos sólidos municipales como acondicionadores de suelos.
- Raza, S. y Ahmad, J. (2016). *Composting process : a review*. 4(2), 102–104.
<https://doi.org/10.14419/ijbr.v4i2.6354>
- Reyes-torres, M., Oviedo-ocaña, E. R., Dominguez, I., Komilis, D. y Sánchez, A. (2018). A systematic review on the composting of green waste : Feedstock quality and optimization strategies. *Waste Management*.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.04.037>
- Ribeiro, N. de Q., Souza, T. P., Costa, L. M. A. S., Castro, C. P. de, y Dias, E. S. (2017). Microbial additives in the composting process. *Ciência e Agrotecnologia*, 41(2), 159–168. <https://doi.org/10.1590/1413-70542017412038216>
- Rivas, M., Gonzáles, M., Belloso, G. y Silva, R. (2017). Población de hongos y actinomicetes presentes en el proceso de compostaje con base de bora (Eichhornia crassipes), residuos de café y jardinería. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*, 29.(December), 358–366.

- Rooney, A. P., Price, N. P., Ehrhardt, C., Swezey, J. L., & Bannan, J. D. (2009). Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(10), 2429-2436.
- Román, Pilar; Martínez María M.; Pantoja, A. (2015). Manual de compostaje del agricultor. In Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i3388s.pdf>
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J. y Swings, J. (2003). A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of microbiology*, 53(4), 349-410.
- Sadhu, S. y Tushar, K. M. (2013). Cellulase Production by Bacteria: A Review. *British Microbiology Research Journal*, 3(3), 235–258.
<https://doi.org/10.9734/bmrj/2013/2367>
- Safitri, R., Kusumawardhani, D. P., Annisa, A., Partasmita, R., Asharina, S. y Maskoen, A. M. (2020). Characterization and identification of three thermophilic *Bacillus* strain isolated from Domas Crater, Mt. Tangkuban Perahu, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(8).
- Saha, A. (2014). Isolation and Characterization of Bacteria Isolated from Municipal Solid Waste for Production of Industrial Enzymes and Waste Degradation. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1(1).
<https://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00003>
- Sarkar, S., Banerjee, R., Chanda, S., Das, P., Ganguly, S. y Pal, S. (2010). Eficacia de la inoculación con cepas aisladas de *Geobacillus* en la etapa termófila del

compostaje de residuos vegetales. *Tecnología de biorecursos* , 101 (8), 2892-2895.

Sherpa, M. T., Najar, I. N., Das, S. y Thakur, N. (2018). Diversity of bacillus species from chumbu glacier. *Res J Life Sci, Bioinf, Pharm Chem Sci*, 4(3), 164-174.

Silva, M. E. F., Lopes, A. R., Cunha-Queda, A. C. y Nunes, O. C. (2016). Comparison of the bacterial composition of two commercial composts with different physicochemical, Stability and maturity properties. *Waste Management*, 50, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.02.023>

Silvestro, D., Michalak, I. (2012). raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution*, 12(4), 335-337. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0056-0>

Siu-Rodas, Y., de los Angeles Calixto-Romo, M., Guillén-Navarro, K., Sánchez, J. E., Zamora-Briseno, J. A. y 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.

Song, C., Zhang, Y., Xia, X., Qi, H., Li, M., Pan, H. y Xi, B. (2018). Effect of inoculation with a microbial consortium that degrades organic acids on the composting efficiency of food waste. *Microbial Biotechnology*, 11(6), 1124–1136. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13294>

Souza, P. M. D., & Magalhães, P. D. O. (2010). Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian journal of microbiology*, 41, 850-861. ISSN 1517-8382

- Storey, S., Ní, D., Doyle, O., Clipson, N. y Doyle, E. (2015). Comparison of bacterial succession in green waste composts amended with inorganic fertiliser and wastewater treatment plant sludge. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 179, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.107>
- Sun, Q., Wu, D., Zhang, Z., Zhao, Y., Xie, X., Wu, J., ... y Wei, Z. (2017). Effect of cold-adapted microbial agent inoculation on enzyme activities during composting start-up at low temperature. *Bioresource technology*, 244, 635-640.
- Sun, Q., Zhao, Y., Zhang, H., Mohamed, T. A. y Wei, Z. (2021). The key bacteria as the “Activator” promotes the rapid degradation of organic compounds during the start-up of low-temperature compost. *Bioresource Technology*, 330, 124950.
- Sundarram, A., & Murthy, T. P. K. (2014). α -amylase production and applications: a review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4), 166-175.
- Tateda, M., Trung, L. D., Hung, N. V., Ike, M. y Fujita, M. (2002). Comprehensive temperature monitoring in an in-vessel forced-aeration static-bed composting process. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 4(1), 62-69.
- Tighe-Neira, R., Leonelli-Cantergiani, G., Montalba-Navarro, R., Cavieres-Acuña, C. y Morales-Ulloa, D. (2014). Caracterización de compost a base de espinillo en relación a la Norma Chilena N°2880. *Agron. Mesoam.*, 25(2), 347–355.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>

- Tortarolo, M. F., Pereda, M., Palma, M. y Arrigo, N. M. (2008). Influencia de la inoculación de microorganismos sobre la temperatura en el proceso de compostaje. *Ciencia Del Suelo*, 26(1), 41–50.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. y It, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment : a review. *Bioresource Technology*, 72, 169–183.
- Vásquez Castro, E. y Millones Chanamé, C. (2021). Una revisión sobre la diversidad microbiana y su rol en el compostaje aerobio. *Aporte Santiaguino*, 14(2), pág. 253-275. <https://doi.org/10.32911/as.2021.v14.n2.822>
- Villar, I., Alves, D., Garrido, J. y Mato, S. (2016). Evolution of microbial dynamics during the maturation phase of the composting of different types of waste. *Waste Management*, 54, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.05.011>
- Villacís-Aldaz, L. A., Zapata-Vela, J. J., León-Gordón, O. A., Vásquez-Freitez, C. L., Mullo-Sarzosa, J. G., Zapata-Vela, A. C., & Gutierrez-Alban, A. C. (2016). Compatibilidad y sobrevivencia de microorganismos benéficos de uso agrícola (*Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis* y *Paecilomyces lilacinus*) en compost. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 4(2), 93-99.
- Viteri, P., Castillo, D. y Viteri, S. (2016). Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia. *Acta Agronomica*, 65(4), 2–7.
- Voběrková, S., Vaverková, M. D., Burešová, A., Adamcová, D., Vršanská, M., Kynický, J., Adam, V. (2017). Effect of inoculation with white-rot fungi and fungal consortium on the composting efficiency of municipal solid waste. *Waste Management*, 61, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.12.039>

- Wang, X., Cui, H., Shi, J., Zhao, X., Zhao, Y. y Wei, Z. (2015). Relationship between bacterial diversity and environmental parameters during composting of different raw materials. *Bioresource Technology*, *198*, 395–402.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.041>
- Wang, Liu, Z., Xia, J. y Chen, Y. (2019). Effect of microbial inoculation on physicochemical properties and bacterial community structure of citrus peel composting. *Bioresource Technology*, *291*, 121843.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121843>
- Wei, Y., Li, J., Shi, D., Liu, G., Zhao, Y. y Shimaoka, T. (2017). Environmental challenges impeding the composting of biodegradable municipal solid waste: A critical review. *Resources, Conservation and Recycling*, *122*, 51–65.
<https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.01.024>
- Wei, H., Wang, L., Hassan, M. y Xie, B. (2018). Succession of the functional microbial communities and the metabolic functions in maize straw composting process. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.050>
- Xie, X-Y., Zhao, Y., Sun, Q-H., Wang, X-Q., Cui, H-Y., Zhang, X., Li, Y-J., Wei, Z-M., A. (2017). A novel Method for Contributing to Composting Start-up at Low Temperature by Inoculating Cold-adapted Microbial Consortium, *Bioresource Technology*. *238*, 39-47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.036>
- Xin-Yu, X., Zhao, Y., Qing-Hong, S., Xue-Qin, W., Hong-Yang, C., Xu, Z., Yan-Jie., L., & Zi-Min, W.(2017). A novel method for contributing to composting start-up at low temperature by inoculating cold-adapted microbial consortium. *Bioresource Technology*, *238*, 39-47.

- Xu, J., Jiang, Z., Li, M., & Li, Q. (2019). A compost-derived thermophilic microbial consortium enhances the humification process and alters the microbial diversity during composting. *Journal of environmental management*, 243, 240-249.
- Yang, L., Jie, G., She-qi, Z., Long-xiang, S., Wei, S., Xun, Q. y Man-li, D. (2018). *Effects of Adding Compound Microbial Inoculum on Microbial Community Diversity and Enzymatic Activity During Co-Composting*. 35(4), 270–278.
<https://doi.org/10.1089/ees.2016.0423>
- Zhao, L., Gu, W., Shao, L., & He, P. (2012). Sludge bio-drying process at low ambient temperature: effect of bulking agent particle size and controlled temperature. *Drying Technology*, 30(10), 1037-1044.
<http://dx.doi.org/10.1080/07373937.2012.665113>
- Zhao, Y., Lu, Q., Wei, Y., Cui, H., Zhang, X., Wang, X., ... & Wei, Z. (2016). Effect of actinobacteria agent inoculation methods on cellulose degradation during composting based on redundancy analysis. *Bioresource technology*, 219, 196-203.
- Zhao, X., Wei, Y., Fan, Y., Zhang, F., Tan, W., He, X. y Xi, B. (2018). Roles of bacterial community in the transformation of dissolved organic matter for the stability and safety of material during sludge composting. *Bioresource Technology*, 267(July), 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.060>
- Zhao, K., Xu, R., Zhang, Y., Tang, H., Zhou, C., Cao, A., Guo, H. (2017). Development of a novel compound microbial agent for degradation of kitchen waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), 442–450.
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.011>

Zhang, J., Zeng, G., Chen, Y., Yu, M., Yu, Z., Li, H., ... Huang, H. (2011). Effects of physico-chemical parameters on the bacterial and fungal communities during agricultural waste composting. *Bioresource Technology*, *102*(3), 2950–2956.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.089>

Zhang, Lili, Jia, Y., Zhang, X., Feng, X., Wu, J., Wang, L. y Chen, G. (2016). Wheat straw: An inefficient substrate for rapid natural lignocellulosic composting. *Bioresource Technology*, *209*, 402–406.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.004>

Zhou, C., Liu, Z., Huang, Z. L., Dong, M., Yu, X. L. y Ning, P. (2015). A new strategy for co-composting dairy manure with rice straw: Addition of different inocula at three stages of composting. *Waste Management*, *40*, 38–43.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.03.016>

ANEXOS

Anexo1

Tabla S1. Lista de taxones utilizados en los análisis moleculares junto con el código de la cepa seguido del número de acceso, la localidad de recogida, la fecha y la fuente de aislamiento. Números de acceso al GenBank bajo cada marcador; si el marcador no fue secuenciado se indica con "-". Las secuencias generadas en el presente estudio están en negrita.

Species, Collection site, date, source of isolation and strain code	16S	<i>gyrA</i>	<i>rpoB</i>	Reference
<i>Bacillus cereus</i>				
Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-4-68	OP45 1872	–	–	This study
Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-2-30	OP45 1876	–	–	This study
Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-2-33	OP45 1879	–	–	This study
Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-4-66	OP45 2926	–	–	This study
Strain HYS02	MF10 1471	–	–	Unpublished
Malaysia; 09-Oct-2015; isolated from the host beebread; BD2	KY773 595	–	–	Unpublished
isolated from soil rhizosphere; strain Neha	MF97 7311	–	–	Unpublished
<i>Bacillus wiedmannii</i>				
Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-2-28	OP45 1869	–	–	This study
Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-2-29	OP45 1870	–	–	This study
Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-3-47	OP45 1871	–	–	This study
Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-5-82	OP45 1873	–	–	This study
Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-2-24	OP45 1874	–	–	This study
Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-2-25	OP45 1875	–	–	This study

Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-2-26	OP45 1877	–	–	This study
Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-2-32	OP45 1878	–	–	This study
Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-3-46	OP45 1880	–	–	This study
Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-5-81	OP45 1881	–	–	This study
Strain ER6	MT12 4531	–	–	Unpublished
Japan; 30-Sep-2019; isolated from Homo sapiens; G071	LC515 603	–	–	Tanaka et al. (2019)
<i>Bacillus safensis</i> subsp. <i>safensis</i>				
Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-4-67	OP45 2925	–	OP43 5795	
Indonesia; strain PPK6	MZ73 4317	–	–	Unpublished
Strain P-NA1-2	MT53 3923	–	–	Unpublished
Strain IMJ7	MT51 6334	–	–	Unpublished
Strain Bs5	–	–	JX183 162	Branquinho et al. (2012)
Strain Bs19	–	–	JX183 175	Branquinho et al. (2012)
Seongsan-ri, Jeju Island, South Korea; Nov-2011; isolated from marine sponge; KCTC 12796BP	–	–	CP01 8197	Unpublished
<i>Bacillus subtilis</i>				
Ocol Palm Forest, Amazonas, Peru; 23-Feb-2021; isolated from soil forest; Oc-A-10	OP45 2854	OP43 5785	OP43 5790	This study
Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-1-16	OP45 2856	OP43 5787	OP43 5792	This study
Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-4-62	OP45 2857	OP43 5788	OP43 5793	This study

Tuctilla, Amazonas, Peru; 30-Nov-2020; isolated from compost; Tc-3-42	OP45 2858	OP43 5789	OP43 5794	This study
Morocco; Dec-2019; isolated from Cactus rhizosphere; BMI12	MZ71 2061	–	–	Unpublished
Morocco; Dec-2019; isolated from Cactus rhizosphere; BMF9	MZ71 2058	–	–	Unpublished
Morocco; Dec-2019; isolated from Cactus rhizosphere; BM1A	MZ71 2046	–	–	Unpublished
Manipur, India; 19-Mar-2013; isolated from from fermented bamboo shoot; FB6-3	–	CP03 2089	–	Unpublished
China; 01-May-2015; isolated from marine sediment; BS155	–	CP02 9052	–	Unpublished
Assam, Sivasagar, India; 10-Jan-2015; isolated from soil; SR1	–	CP02 1985	–	Unpublished
Kyiv, Ukraine; 1985; isolated from Hay; UCMB5021	–	–	CP05 1466	Unpublished
Dushanbe, Tajikistan; 1992; isolated from cotton plant surface sterilized stem; UCMB5121	–	–	CP05 1465	Unpublished
<i>Bacillus velezensis</i>				
Ocol Palm Forest, Amazonas, Peru; 23-Feb-2021; isolated from soil forest; Oc-E-31	OP45 2855	OP43 5786	OP43 5791	This study
China, Ningxia; host: Wolfberry; HSB1	MT62 6060	–	–	Unpublished
Strain 2563	MT61 1594	–	–	Unpublished
Harbin, China; 30-10-2019; isolated from <i>Populus davidiana</i> x <i>Populus alba</i> var. <i>pyramidalis</i> ; BY6	–	CP05 1011	CP05 1011	Zhang et al. (2021)
Beijing, China; 22-Jun-2017; isolated from carnation; LPL061	–	CP04 2271	–	Unpublished
South Korea; 20-06-2016; isolated from Ganjang (Korean Soy Sauce); SRCM101368	–	–	CP03 1694	Bang et al. (2020)

References

Bang MS, Jeong HW, Lee YJ, Lee SC, Lee GS, Kim S, Lee HH, Shin JI, Oh CH. (2020) Complete Genome Sequence of *Bacillus velezensis* Strain DKU_NT_04, Isolated from a Traditional Korean Food Made from Soybeans (Cheonggukjang). *Microbiol Resour Announc.* 9(24): e00477-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.00477-20>.

Branquinho R., Meirinhos-Soares L., Carriço J.A., Pintado M., Peixe L.V. (2014) Phylogenetic and clonality analysis of *Bacillus pumilus* isolates uncovered a highly heterogeneous population of different closely related species and clones. FEMS Microbiology Ecology, 90 (3): 689–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12426>

Tanaka M., Onizuka S., Nakayama J. (2020) Germination and cultural isolation of spore-forming bacteria in human feces by using various bile acids. Scientific Reports 10: 15041. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71883-1>

Zhang P., Diao J., Xie G., Ma L., Wang L. (2021) A Complete Genome Sequence of the Wood Stem Endophyte *Bacillus velezensis* BY6 Strain Possessing Plant Growth-Promoting and Antifungal Activities. Biomed Res Int. 3904120, doi: <https://doi.org/10.1155/2021/3904120>

Anexo2. Reporte análisis estadístico empleando el software R versión 4.1.0.

MANOVA

```
> ?manova  
> metabolismo.model<- manova(Y.metabolismo ~ Cepas * Temperatura, data  
= IndCelAmilRed)
```

```
> summary(metabolismo.model, test = "wilks") #wilks' Lambda  
Df wilks approx F num Df den Df Pr(>F)  
Cepas 6 0.000177 40.166 24 88.425 < 2.2e-16 ***  
Temperatura 1 0.209850 23.533 4 25.000 3.634e-08 ***  
Cepas:Temperatura 6 0.019022 7.787 24 88.425 3.105e-13 ***  
Residuals 28  
---  
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

UNIFACTORIAL

```
> summary.aov(metabolismo.model)
```

```
Response Icel :  
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)  
Cepas 6 0.64007 0.106678 16.9063 3.756e-08 ***  
Temperatura 1 0.11577 0.115770 18.3472 0.0001957 ***  
Cepas:Temperatura 6 0.10479 0.017465 2.7678 0.0306153 *  
Residuals 28 0.17668 0.006310  
---  
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Response Iamil :  
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)  
Cepas 6 0.29952 0.049920 4.5245 0.0025224 **  
Temperatura 1 0.22085 0.220848 20.0167 0.0001166 ***  
Cepas:Temperatura 6 0.36963 0.061605 5.5836 0.0006539 ***  
Residuals 28 0.30893 0.011033  
---  
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Response Azredcel :  
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)  
Cepas 6 0.32957 0.054929 1550.724 < 2.2e-16 ***  
Temperatura 1 0.00106 0.001061 29.941 7.649e-06 ***  
Cepas:Temperatura 6 0.00268 0.000446 12.593 7.491e-07 ***  
Residuals 28 0.00099 0.000035  
---  
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Response Azredamil :  
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)  
Cepas 6 0.0083801 0.00139668 28.8128 9.492e-11 ***  
Temperatura 1 0.0001350 0.00013502 2.7853 0.1063  
Cepas:Temperatura 6 0.0034739 0.00057898 11.9440 1.247e-06 ***  
Residuals 28 0.0013573 0.00004847  
---  
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Shapiro-wilk normality test

```
data: Z  
W = 0.95311, p-value = 0.08353
```

```
> mvn(Y.metabolismo, desc = T, mvnTest= "mardia" , multivariatePlot =  
"qq") #Mardia
```

```
$multivariateNormality
```

	Test	Statistic	p value	Result
1	Mardia Skewness	26.3736979908912	0.15382148040758	YES
2	Mardia Kurtosis	-1.21484472345646	0.224425319604054	YES
3	MVN	<NA>	<NA>	YES

```
$Descriptives
```

	n	Mean	Std.Dev	Median	Min	Max	25th	75th	Skew	Kurtosis
Icel	42	0.37572590	0.15905996	0.31501982	0.049218023	0.71180723	0.264571778	0.53402505	0.5145723	-0.7752227
Iami1	42	0.63434862	0.17100314	0.63689665	0.246672333	0.98900462	0.567282009	0.76404767	-0.7248617	0.1730534
Azredcel	42	0.26664115	0.09029762	0.28704953	0.116151049	0.38597094	0.186361159	0.35169499	-0.2852922	-1.4917740
Azredami1	42	0.02373097	0.01804214	0.01752627	0.003141987	0.05991947	0.008875577	0.03933052	0.7127174	-0.8210299

TUKEY

Índice Celulolítico

```
> dt$Tukey <- cld$Letters
```

```
> print(dt)
```

```
# A tibble: 14 x 5
```

```
# Groups: Cepas [7]
```

	Cepas	Temperatura	Icel_mean	sd	Tukey
	<chr>	<chr>	<dbl>	<dbl>	<chr>
1	cepa7	T20	3.04	0.871	a
2	cepa8	T20	2.96	0.343	a
3	cepa13	T20	2.77	0.460	ab
4	cepa13	T15	2.52	0.294	abc
5	cepa7	T15	2.15	1.74	abcd
6	cepa1	T20	1.15	0.224	bcd
7	cepa2	T20	1.12	0.101	bcd
8	cepa3	T15	1.08	0.161	bcd
9	cepa6	T20	0.973	0.257	cd
10	cepa8	T15	0.970	0.272	cd
11	cepa3	T20	0.898	0.122	cd
12	cepa2	T15	0.790	0.247	d
13	cepa1	T15	0.740	0.109	d
14	cepa6	T15	0.464	0.307	d

Índice Amilolítico

```
> dt$Tukey <- cld$Letters
> print(dt)
# A tibble: 14 x 5
# Groups:   Cepas [7]
  Cepas Temperatura Iamil_mean      sd Tukey
  <chr>   <chr>          <dbl>   <dbl> <chr>
1 cepa3  T20                5.42  0.416 a
2 cepa1  T15                5.33  3.00  a
3 cepa2  T20                5.10  0.647 a
4 cepa8  T20                4.82  0.345 a
5 cepa13 T20                4.60  0.421 a
6 cepa13 T15                4.48  0.465 a
7 cepa6  T20                3.71  0.478 ab
8 cepa1  T20                3.16  0.341 ab
9 cepa6  T15                2.70  0.248 ab
10 cepa2  T15                2.70  0.0675 ab
11 cepa3  T15                2.66  0.359 ab
12 cepa7  T20                2.61  0.301 ab
13 cepa7  T15                2.47  2.77  ab
14 cepa8  T15                0.869 0.103 b
```

Azúcares Reductores Celulolíticos

```
> dt$Tukey <- cld$Letters
> print(dt)
# A tibble: 14 x 5
# Groups:   Cepas [7]
  Cepas Temperatura Azredcel_mean      sd Tukey
  <chr>   <chr>          <dbl>   <dbl> <chr>
1 cepa7  T20                1.42  0.0240 a
2 cepa13 T20                1.27  0.0246 b
3 cepa13 T15                1.26  0.0427 b
4 cepa3  T20                1.25  0      b
5 cepa3  T15                1.23  0.0222 bc
6 cepa7  T15                1.17  0.0240 c
7 cepa8  T20                0.965 0.0288 d
8 cepa8  T15                0.917 0.0167 d
9 cepa1  T20                0.619 0.00937 e
10 cepa1  T15                0.581 0.0496 ef
11 cepa6  T15                0.541 0.00898 f
12 cepa6  T20                0.526 0.00898 f
13 cepa2  T20                0.331 0.0262 g
14 cepa2  T15                0.327 0.0104 g
```

Azúcares Reductores Amilolíticos

```
> dt$Tukey <- cld$Letters
> print(dt)
# A tibble: 14 x 5
# Groups:   Cepas [7]
  Cepas Temperatura Azredamil_mean      sd Tukey
  <chr>   <chr>          <dbl>    <dbl> <chr>
1 cepa7  T15                0.130  0.0240 a
2 cepa7  T20                0.130  0.0240 a
3 cepa13 T15                0.119  0.0246 a
4 cepa3   T20                0.0820 0.0222 ab
5 cepa8   T15                0.0808 0.0167 ab
6 cepa1   T20                0.0455 0.00937 bc
7 cepa6   T15                0.0435 0.00898 bc
8 cepa13  T20                0.0342 0.0246 bc
9 cepa8   T20                0.0327 0.0167 bc
10 cepa3  T15                0.0308 0.0222 bc
11 cepa2  T20                0.0257 0         c
12 cepa2  T15                0.0187 0.00601 c
13 cepa6  T20                0.0176 0.00898 c
14 cepa1  T15                0.00758 0         c
```