



El Colegio de la Frontera Sur

Diferencia de la actividad carboximetilcelulasa (CMCasa) de los procesos de compostaje y lombricompostaje.

TESIS

Presentada como requisito parcial para optar al grado de
Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

por

Luis Fernando Sánchez Villatoro

2017

DEDICATORIA

A mis padres Edilberto Sánchez Espinosa y Sandra Luz Villatoro Peña, porque aunque no estén conmigo esto es para ustedes.

A mi hijo Fernando Alonso, eres lo mejor que me pudo suceder en la vida esta es una de todas las cosas que quiero compartir contigo, te amo hijo.

A mi esposa Aurora Quezada, gracias por ser mi amiga, compañera de vida y amante, me has enseñado tantas cosas de la vida, y ahora solo quiero estar contigo siempre.

A mis hermanos Irving Salím Sánchez Rivera, Marco Antonio Sánchez Rivera y Sabrina Marroquín Villatoro, por su incondicional apoyo y complicidad en todas las decisiones de mi vida.

.A mi abuelita Eloísa Espinosa Arreola por darme el amor y la dedicación de su vida.

A mis segundas madres Araceli y Ma. Luisa Sánchez Espinosa, porque ustedes han sido las verdaderas artífices de mi persona, aprecio infinitamente su dedicación y apoyo en mi formación como profesionista y ahora padre y esposo, en verdad gracias.

A mi abuelito Jesús de quien probablemente herede la locura.

A mis tíos, Martín, Emmi, Gladís, Chío y Adélita saben que los quiero, admiro y respeto y también forman parte de mi vida.

A mis primos Yesí, Karen, Coke, Yayí, Dady, Muma, Kikín, Diego, Tani, Ceci, Ale, Mía y Frída.

A mis sobrinos, Geo, Jade, Arath, Maya, Ivanna, Victoria y Kokechín.

A todos y cada uno de ustedes los amo con todo mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A ECOSUR por ser el centro de investigación que me brindó la oportunidad de cursar el posgrado.

A CONACYT por la beca otorgada (No. 591146/308193) para la realización del trabajo de investigación .

A mi directora Dra. Griselda Karina Guillén por el esfuerzo, la paciencia, la tolerancia, la confianza, la dedicación, el empeño y apoyo recibido para la realización de este trabajo, estaré siempre agradecido con usted.

A mis asesores: Dra. María de los Ángeles Calixto Romo, M.C. Raúl Cuevas González, por fortalecer y mejorar el trabajo de investigación.

A la M. en C. Verónica García Fajardo y al M.C. David Herrera López por su valiosa participación en todos los aspectos de la investigación y por ser los mejores compañeros de laboratorio que pude tener.

A mis sinodales por el tiempo y la dedicación otorgada a la revisión de la tesis de manera extraordinaria.

A mis catedráticos del posgrado por sus enseñanzas y conocimientos impartidos en mi formación académica.

Al maestro Javier Francisco Valle Mora por su apoyo y cooperación para el análisis de los datos.

A mis amigos de la maestría Hernán, Erick, Óscar, Karen y Romier, también a los doctores Edi A. Malo y Alfredo Castillo Vera, a quienes también considero mis amigos, Si ustedes me dicen!

ÍNDICE

RESUMEN	7
1.- INTRODUCCIÓN	9
1.1.- Generalidades de las enzimas	9
1.2.- Enzimas celulasas y celulosa	13
1.3.- Compostaje y Lombricompostaje una respuesta a la contaminación por residuos	19
1.3.1.- Principios básicos del compostaje	21
1.3.2.- Principios básicos del lombricompostaje	25
1.3.3.- Generalidades de las lombrices (<i>E. Fetida</i>) Savigny	27
1.4.- Justificación	30
1.5.- Objetivo General	31
1.5.1.- Objetivos Específicos	31
2.- ARTÍCULO	33
3.- TABLAS Y FIGURAS	48
4.- CONCLUSIÓN	51
5.- REFERENCIAS	53

RESUMEN

La celulosa es el polímero más abundante en la tierra, es también el mayor constituyente de la biomasa de las plantas, la utilización de la celulosa como fuente de energía depende principalmente de la capacidad de algunos organismos para degradar celulosa, estos deben poseer una batería de enzimas denominadas celulasas.

Las enzimas celulasas son ampliamente utilizadas en industrias como la de papel y de los alimentos, sin embargo los procesos de producción involucran en ocasiones cambios en la temperatura y en el pH, por ello existe una creciente demanda de enzimas celulasas que posean características de resistencia a cambios de temperatura y pH.

Los procesos de compostaje y el lombricompostaje ocurren comúnmente en la naturaleza y son realizados en gran medida por consorcios microbianos para convertir residuos de origen orgánico en productos humificados con un valor agregado denominados abonos orgánicos. Mientras estos procesos se llevan a cabo en ellos ocurren cambios bruscos de temperatura y niveles de pH, estos factores aumentan ó disminuyen según sea el caso, esta serie de cambios físico-químicos ambientales provoca que la colonización microbiana de los residuos atraviese sucesiones inherentes, no obstante a pesar de la sucesión microbiana la degradación de los residuos sigue activa, esto se debe principalmente a la acción de enzimas

extracelulares celulolíticas que permanecen activas y constantemente degradan los constituyentes de los residuos. Los procesos de compostaje y lombricompostaje son además una alternativa a la problemática de la acumulación y mala disposición de los residuos agroindustriales de la región, también presentarían una atractiva ventana de bioprospección de enzimas.

En el presente trabajo se realizó una mezcla de residuos para evaluar actividad enzimática carboximetilcelulasa (CMCasa) de los procesos de compostaje y lombricompostaje.

Los procesos fueron evaluados por parámetros físico-químicos, contenido de celulosa, además se realizó una extracción enzimática a diferentes niveles de pH, desde ácido (3.6) hasta el ligeramente básico (7.8); posteriormente se hicieron ensayos de actividad que fueron realizados cada 15 días, desde el día 0 hasta el día 60 de los procesos.

Los resultados obtenidos en el estudio, demuestran que el proceso de lombricompostaje tiene una actividad carboximetilcelulasa superior a la del compostaje, exceptuando el día 0 del compostaje en el cual la actividad fue mayor debido principalmente a la riqueza de azúcares de los residuos crudos.

Por otro lado se registraron actividades celulolíticas en todos los niveles de pH; en las etapas tempranas la actividad mayor fue registrada en el pH ácido, mientras que en las etapas posteriores fueron mayor en pH neutro (6.8) y en el ligeramente alcalino (8).

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Generalidades de las enzimas.

Las enzimas son biomoléculas orgánicas consideradas catalizadores, ya que aumentan la velocidad a la que ocurren las reacciones químicas en los organismos reduciendo la energía de activación (Weaver, 2012). El componente principal de las enzimas son secuencias de aminoácidos, que forman cadenas y estructuras tridimensionales características de las proteínas (Hafiz, 2005).

La diversidad de enzimas que se conocen son estudiadas por las especies de organismos que las producen, otra manera de estudiar la diversidad es mediante la similitud en la secuencia específica de aminoácidos que la conforman (Weaver, 2012).

Durante la síntesis de una enzima su estructura atraviesa por una serie de modificaciones, como la unión covalente de puentes disulfuro y puentes de hidrógeno, además puede existir la adición de otra proteína o la eliminación de parte de la secuencia, también adición de grupos metilo y de coenzimas como las vitaminas o iones metálicos que actuarán como cofactores dando lugar a una estructura prematura denominada holoenzima (Copeland, 2000).

Previo a que una enzima adquiera su estructura final, la cadena de aminoácidos interacciona entre sí, es decir, los grupos radicales laterales de la cadena polipeptídica

se atraen o se repelen espacialmente, confiriéndole plegamiento y la conformación tridimensional (Metzler, 2003).

Una holoenzima al entrar en contacto con un sustrato específico a través de un sitio de unión, darán forma a una proteína activa biológicamente que se denominará enzima, esta catalizará un sustrato y generará un producto de manera rápida y prácticamente sin alterar la energía de activación (Metzler, 2003).

La funcionalidad de una enzima depende de diversos factores como la temperatura del medio, la superficie de contacto entre el sustrato y la enzima, la concentración del sustrato, y la estructura química de la enzima misma (Copeland, 2000).

En cuanto a la estructura química de la enzima, los grupos radicales en las cadenas laterales y la secuencia de aminoácidos le confieren ciertas características bioquímicas, por ejemplo, los radicales ayudan a estabilizar la estructura de la enzima, y también determinan su carga neta, en este sentido el punto isoeléctrico de las proteínas es el punto en la escala de pH en el que una proteína en solución adquiere una carga neta cero o neutra (Meltzer, 2003).

Recordemos que los aminoácidos que constituyen a las enzimas tienen un comportamiento anfotérico debido a que los extremos de la cadena polipeptídica pueden comportarse como ácidos o bases dependiendo de la naturaleza de los iones de la solución en que se encuentre, además los grupos radicales laterales de la cadena

polipeptídica también interaccionan con los iones del medio (Malacinski y Freifelder, 1998).

Debido a las características mencionadas previamente, el pH de una solución puede alterar la conformación estructural de una enzima, a un grado tal de desactivación biológica conocida como desnaturalización, otro factor que puede guiar a la desnaturalización de la enzima son temperaturas elevadas ($> 60^{\circ}\text{C}$) (Weaver, 2012).

La desnaturalización de una proteína provoca un desdoblamiento de la estructura tridimensional a un estado de menor plegamiento, en este estado los grupos amida que se forman de la unión de los aminoácidos en la cadena forman puentes de hidrogeno con las moléculas de agua adyacentes y con agentes desnaturalizantes, que evitan su reconformación (Meltzer, 2003).

Los agentes desnaturalizantes pueden disminuir la fuerza de las interacciones hidrofóbicas que promueven el plegamiento, y durante la desnaturalización se pierden actividades bioquímicas características, y propiedades físicas también (Berg *et al.* 2002).

La desnaturalización de una enzima puede ser reversible en algunos casos, es decir, si se regresan las condiciones ambientales óptimas para la enzima, y se retiran los agentes desnaturalizantes la enzima puede plegarse nuevamente y generar conformaciones tridimensionales para obtener acción catalítica nuevamente, sin

embargo, si las condiciones no son favorables la enzima terminará por degradarse con el paso del tiempo (Ugwu y Apte, 2004).

En este sentido, al trabajar con enzimas extracelulares, se procura mantener las condiciones ambientales idóneas para una enzima, comúnmente se utilizan soluciones amortiguadoras. (Ugwu y Apte, 2004).

Una solución amortiguadora tiene la capacidad de resistir variaciones en el nivel de pH, permitiendo que exista un equilibrio ácido base, por ejemplo los grupos radicales y terminales que conforman las enzimas pueden interactuar con los iones que poseen las soluciones amortiguadoras, de manera que pueden ayudar a que las enzimas mantengan su conformación y conserven su actividad catalítica (Hafiz, 2005).

En los seres vivos existen sistemas amortiguadores que justamente ayudan a que las reacciones enzimáticas sucedan en condiciones controladas, sin embargo cuando la acción catalítica de las enzimas se lleva a cabo fuera de las células los sistemas amortiguadores no siempre están presentes (Meltzer, 2003).

La utilización de enzimas provenientes de microorganismos es hoy en día una actividad redituable, la extracción de enzimas provenientes de ambientes como los procesos de compostaje y lombricompostaje pueden presentar características biotecnológicas deseables como resistencia a altas temperaturas y cambios de pH (Copeland, 2000).

Una técnica comúnmente utilizada en biología molecular para la separación de biomoléculas es la centrifugación diferencial, si se realiza bajo condiciones controladas de temperatura y utilizando soluciones amortiguadoras correctas las biomoléculas pueden extraerse de manera íntegra (Copeland, 2000).

La utilización de una solución amortiguadora a un pH dado generaría en las proteínas una relativa solubilidad cercana al punto isoeléctrico de las proteínas, y presentaría una solución a la problemática que infiere la extracción de enzimas extracelulares de muestras como los residuos en transformación de los procesos de compostaje y lombricompostaje (Ugwu y Apte, 2004).

1.2.- Enzimas celulasas, celulosa y carboximetilcelulosa.

Las enzimas celulasas, son las encargadas de hidrolizar la celulosa (Gan *et al.* 2003), las fibras que constituyen la pared celular de las plantas son el componente más abundante de los residuos orgánicos, siendo la celulosa (**Figura 1**) el polímero que se encuentra en mayor proporción (Bath, 2000).

Molecularmente la celulosa, es un homopolisacárido lineal constituido por unidades de glucosa (D-glucopiranososa) unidas mediante enlaces glucosídicos β -1,4 (Wilson, 2011), al cabo de unos cientos o miles de moléculas de glucosa, se generan reacciones de condensación, que propician que existan interacciones intermoleculares que producen

dobleces en la cadena del polímero, estos dobleces, permiten que se generen interacciones mediante puentes de hidrógeno entre los monosacáridos de la misma cadena y le confieren al polímero de celulosa una conformación fibrilar (Gan *et al.* 2003).

Esta conformación espacial le confiere a la molécula de celulosa parte de su rigidez estructural e insolubilidad en agua, además de que ayuda a la molécula a mantenerse más unida. (Wilson, 2001)

Las fibras del polímero de celulosa se unen con otras, formando fibras más grandes, a esta estructura bien fusionada de celulosa se le conoce como celulosa cristalina (Vaclavik, 1998), esta celulosa cristalina se encuentra en una proporción de más del 70% en las paredes celulares de las plantas (Bayer *et al.* 1998).

Sin embargo, la molécula no es del todo homogénea, ya que mientras se doblan las cadenas y se unen, existen zonas donde no habrá dicha interacción, formando lo que se conoce como celulosa amorfa (Wilson, 2011).

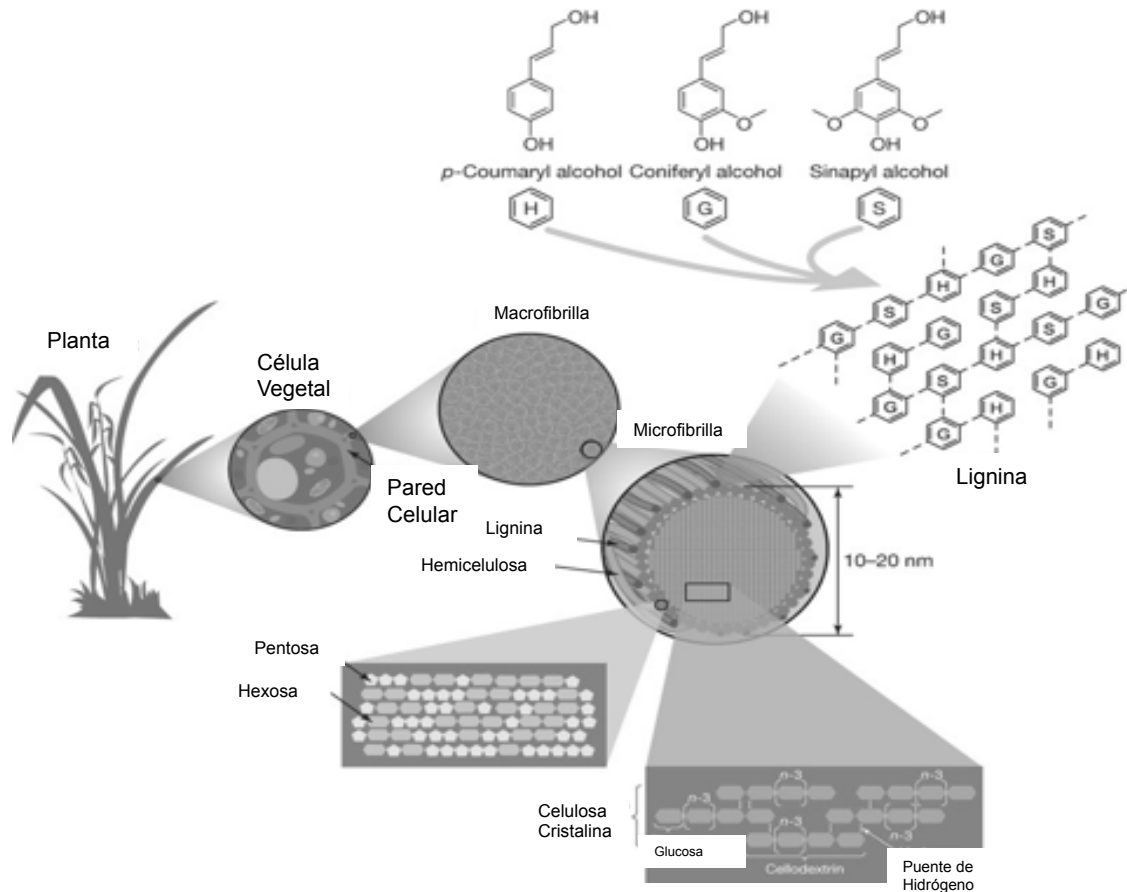


Figura 1. Representación de las moléculas de celulosa, hemicelulosa y lignina en una planta. Se aprecia que la lignina y la hemicelulosa forman fibras que recubren el esqueleto cristalino de la celulosa (Rubin E, 2008)

Los constituyentes de la pared celular de las plantas son diferentes (Wilson, 2011), lo que sugiere que la hidrólisis de las moléculas se lleva a cabo mediante reacciones enzimáticas diferentes, pero sinérgicas, es decir, se tienen que llevar a cabo conjuntamente (Fioretto *et al.* 2005).

Las enzimas celulasas han sido ampliamente estudiadas debido a su potencial aplicación industrial y biotecnológica (Claus, 2004). La mayor diversidad de enzimas celulasas provienen de bacterias y hongos, aunque se conoce que algunas especies de termitas, moluscos y protozoarios también las producen (Wilson, 2011).

A la fecha se conocen 11 familias de estas enzimas en base a su homología de secuencia de aminoácidos, y estas a su vez forman parte de una superfamilia de enzimas denominadas glucósido hidrolasas (Carbohydrate Active Enzymes database, CAZy, <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>) En general, la actividad celulasa se agrupa en tres grupos principales (Bayer *et al.* 1998), actividad endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa, tal como se muestra en la **Figura 2**.

Sin embargo en algunas especies de hongos se ha descrito un cuarto sistema enzimático, denominado exoglucosidasa que hidroliza enlaces glucosídicos y da lugar a monosacáridos sin tener que formar previamente celobiosa (Gan *et al.* 2003). La hidrólisis de la celulosa requiere de la acción sinérgica de estas tres enzimas celulolíticas en un mismo sistema.

No obstante existe una serie de sucesos previos al rompimiento de la larga cadena de carbohidratos que componen a la celulosa: primero, como se aprecia en la **Figura 1**, la celulosa debe desprenderse de las fibras de lignina y hemicelulosa que la rodean; para ello se requiere de enzimas como la lacasa que hidroliza lignina (Wilson, 2001). Una

vez que se descubre la estructura de la celulosa, las tres enzimas actúan sinérgicamente como se muestra en la **Figura 2**.

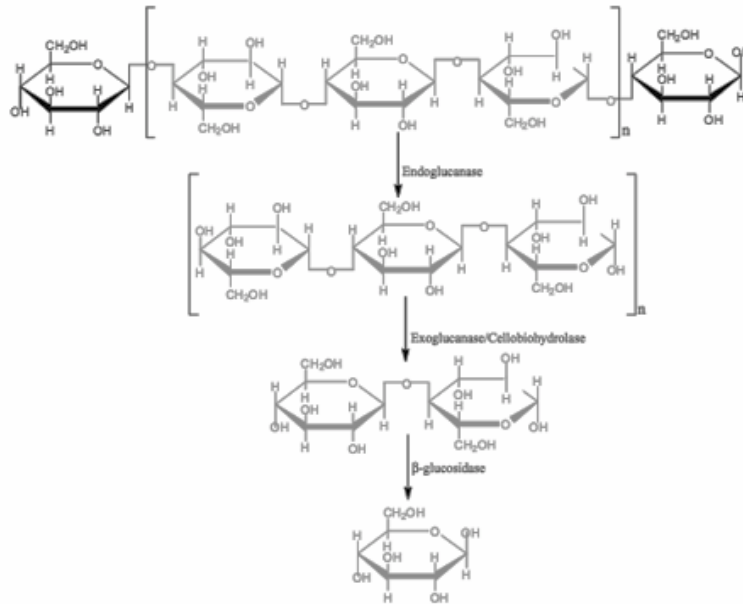


Figura 2. Sitio de acción catalítica de las enzimas celulasas (Juturu y Wu, 2014).

Una vez expuesta la celulosa, la enzima endoglucanasa va a actuar aleatoriamente sobre la estructura de la celulosa dando lugar a oligosacáridos cortos; la enzima exoglucanasa actuará sobre los monosacáridos que se encuentran en los extremos de las cadenas cortas. Por último un disacárido resultante de la hidrólisis de la celulosa denominado celobiosa, es catalizado por la acción de la enzima β-glucosidasa o celobiohidrolasa. (Bayer *et al.* 1998)

El producto final de la degradación de la celulosa es la glucosa, por lo que puede ser una fuente de energía útil para diversos organismos, o puede utilizarse como sustrato

para diversos productos en la industria. (Bath, 2000)

Existen diversos organismos que producen celulasas extracelulares que poseen un dominio de unión al sustrato denominado Módulo de Unión a los Carbohidratos (CBM por sus siglas en inglés) (Wilson, 2011). No obstante, algunas especies de hongos y bacterias anaeróbicas, las producen en forma de celulosomas (Bayer *et al.* 1998).

Los celulosomas son estructuras proteicas acopladas a la pared celular de las bacterias, formadas por complejos enzimáticos que requieren de unión a otras proteínas denominadas cohesinas. Para poder unirse específicamente a la celulosa e hidrolizarla, requiere de otras estructuras proteínicas denominadas unidades andamios, que a su vez permiten la interacción entre las cohesinas y el sustrato (celulosa) para la liberación de las celulasas (Wilson, 2011).

En estudios de laboratorio se trabaja con análogos sintéticos de la celulosa, uno de los más utilizados es la Carboximetilcelulosa, esta última es producida mediante la esterificación de la celulosa. La carboximetilcelulosa es hidrosoluble, además es biodegradable en la naturaleza por lo cual su utilización no presenta daño ecológico alguno. (Batelaan *et al.* 1992)

Actualmente se conocen algunos genes que codifican para las tres actividades celulolíticas y se utilizan ampliamente en la industria (Juturu y Wu, 2014). Existe actualmente en la base de datos CAZ y una distribución de la clasificación de estas

enzimas basándose en la secuencia de aminoácidos (Carbohydrate Active Enzymes database, CAZy, <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>).

A la fecha se han identificado las sucesiones de consorcios microbianos que participan en la degradación de la celulosa en procesos de compostaje (Li *et al.* 2013; He *et al.* 2012).

Y aunque es bien sabido que es difícil cultivar la totalidad de microorganismos presentes en muestras ambientales, se han logrado aislar y cultivar diferentes comunidades fúngicas degradadoras de celulosa y otros componentes de la pared celular presentes en composta y lombricomposta (Anastasi *et al.* 2005).

A pesar de algunos trabajos bibliográficos en donde se muestra un patrón de variación diferente de actividades celulolíticas entre los procesos de compostaje y lombricompostaje, no se han evaluado las actividades enzimáticas con extracciones a diferentes niveles de pH, desde el ácido hasta el ligeramente básico; las extracciones a diferente pH, permitirán abrir una ventana de extracción de enzimas con potencial biotecnológico.

1.3.- Compostaje y lombricompostaje una respuesta a la contaminación por residuos.

Todas las actividades humanas generan alguna clase de residuo, los cuales tienen

efectos directos sobre los ecosistemas (Sanderson *et al.* 2002), uno de los residuos que más atención genera son los residuos agroindustriales (Lal, 2005).

Esta clase de residuos al ser producidos en gran cantidad, suelen acumularse y depositarse en lugares inapropiados causando un problema ambiental que se denomina contaminación por residuos (Garg *et al.* 2006).

Generalmente suele confundirse a los residuos con los desechos, y aunque poseen propiedades en común, son diferentes (Yepes *et al.* 2008), ya que un residuo es todo aquel producto susceptible de ser utilizado y aprovechado para obtener otros productos que posean un valor agregado (Di Blasi *et al.* 1997), mientras que un desecho ya no tiene utilidad y debe ser depositado o contenido para su final tratamiento o eliminación (Saval, 2012).

En el año 2003, en México se promulgó la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos, en esta se dictamina que los residuos provenientes de la industria agrícola deben ser tratados de una manera especial, de modo que su generación no represente riesgo a la salud o al ambiente (Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos, 2003).

Sin embargo, se sabe que los residuos generados en actividades agrícolas, no son tratados correctamente, en su lugar son depositados en sitios inapropiados (Drake y Horne, 2007).

En este contexto, el Soconusco, Chiapas es una de las regiones del estado que genera mayor cantidad de residuos provenientes de la actividad agrícola (2.5 millones de toneladas por año) si se compara con otras regiones del país (Indicadores Estatales Socioeconómicos, Chiapas 2011).

Una característica importante de los residuos agrícolas es el alto contenido de celulosa; la celulosa es un polímero cuya unidad fundamental es la glucosa, este producto es una fuente de energía interesante, por ejemplo para producción de bioetanol (Saval, 2012).

Con la finalidad de mitigar la problemática que ocasionan los residuos agroindustriales, se han propuesto diversas alternativas; dos de las técnicas más utilizadas son el compostaje y el lombricompostaje (Butler *et al.* 2001).

Por ello los procesos de compostaje y lombricompostaje pudiesen presentar una atractiva fuente de extracción y producción de enzimas que posean las características deseadas para actividades biotecnológicas.

1.3.1.- Principios básicos del compostaje.

El compostaje es el proceso de transformación de residuos de origen orgánico llevado a cabo por microorganismos del ambiente, el proceso debe llevarse a cabo bajo condiciones controladas de aireación y humedad que promuevan el metabolismo de

microorganismos aeróbicos (Lung, *et al.* 2001, Epstein, 1997).

Diversos factores bióticos y abióticos influyen el comportamiento del proceso y las características fisicoquímicas de los productos resultantes (Zhu, 2007).

La temperatura es uno de los factores más importantes en el proceso de compostaje, dependiendo de los grados de temperatura en la mezcla de residuos se puede apreciar cuatro fases (Antil *et al.* 2014).

La primera denominada de latencia, que se caracteriza por que los residuos poseen la misma temperatura del medio ambiente, en esta fase los microorganismos del ambiente colonizan los residuos y comienzan a reproducirse (Bhattacharya y Pletchke, 2014).

Posteriormente, mientras la biomasa microbiana aumenta, la temperatura se verá influenciada por el metabolismo microbiano provocando que la temperatura de la mezcla de residuos aumente; a esta segunda fase se le conoce como mesofílica y se caracteriza por que las temperaturas rondan entre los 25 y los 40 ° C (Antil *et al.* 2014).

El mismo autor menciona que durante la etapa mesofílica los microorganismos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Streptomyces*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Humicola* y *Penicillium* son los más abundantes.

No obstante, el metabolismo microbiano sigue en aumento y esto propicia que la

temperatura de los residuos siga aumentando, y cuando la temperatura sobrepasa los 40 ° C se considera que la mezcla de residuos se encuentra en una fase termofílica, llegando a alcanzar temperaturas entre los 60 y 80 ° C (Bhattacharya y Pletchke, 2014).

Esta tercera fase tiene una duración promedio de 10 a 14 días, y debido a las altas temperaturas que se generan en la mezcla de residuos se eliminan la mayoría de los microorganismos patógenos (Antil *et al.* 2014).

Díaz *et al.* (2007) menciona que las especies que más abundan durante esta etapa pertenecen a los géneros *Thermoactinomyces*, *Thermus*, *Thermomospora*, *Mycropolyspora*, *Chaetomium*, *Thermophile* y *Aspergillus*.

Al término de la etapa termofílica, la temperatura de la mezcla de residuos comenzará a descender hasta alcanzar nuevamente las temperaturas de la fase mesofílica. A partir de este periodo se considera que el proceso está alcanzado su etapa de maduración y por ello esta cuarta fase toma el nombre de fase de maduración (Bhattacharya y Pletchke, 2014).

Los cambios en la temperatura de la mezcla de residuos generan cambios y sucesiones de las comunidades microbianas (Raut *et al.* 2008).

La humedad de los residuos es otro factor principal y debe ser constante durante el proceso de transformación; existe una pérdida sensible de agua en forma de vapor

debido al incremento de la temperatura de la etapa termofílica, para evitar este efecto se recomienda la adición de agua en un 40 a 60% en base a masa de los residuos durante todo el proceso (Antil *et al.* 2014).

Al igual que el vapor de agua durante el proceso se libera dióxido de carbono (CO_2) proveniente del metabolismo microbiano (Finstain y Morris, 1975), y conforme el oxígeno del ambiente sea consumido por el metabolismo microbiano, la tasa de degradación de los residuos se verá afectada, ya que se crearán zonas de poca o nula oxigenación a partir de las cuales se promoverán procesos fermentativos (Bhattacharya y Pletchke, 2014).

Si esto ocurriese, las comunidades microbianas que proliferan en ambientes anaerobios acidificarían el medio, debido a la producción de ácidos orgánicos. Este efecto deterioraría la calidad del producto final, y la transformación de los residuos tomaría más tiempo. Además existirían pérdidas sensibles de nitrógeno por procesos de desnitrificación que se llevan a cabo en ambientes anaeróbicos (Antil *et al.* 2014).

Por el contrario, si se estimula la aireación de los residuos y la humedad permanece constante, el proceso se estará llevando de manera correcta (Forsyth y Webley, 1948).

Durante la etapa de maduración los residuos comienzan a estabilizarse y degradarse en su totalidad, se considera que la temperatura de los residuos debe ser similar a la del ambiente, los polímeros que componen los residuos se reducirán hasta su

monómero más simple, los niveles de pH se situarán entre siete y ocho, la relación C/N de los residuos deberá estar debajo de 20, y los residuos cambiarán su estado físico hasta obtener un aspecto similar al de la tierra fresca (Bhattacharya y Pletchke, 2014).

Es importante mencionar que, durante todo el proceso los consorcios microbianos sintetizan enzimas y complejos enzimáticos que metabolizan los componentes de los residuos (Caldwell, 2005).

Convenientemente, al igual que la temperatura y el pH, las comunidades microbianas son sustituidas, sin embargo las actividades enzimáticas siguen presentes (Aira *et al.* 2007).

1.3.2.- Principios básicos del lombricompostaje.

Se sabe que las lombrices tienen un efecto directo sobre los microorganismos y la microfauna que habita en el suelo, así mismo sobre una mezcla de residuos orgánicos (Brown, 1995).

Las lombrices propician la aireación en una de mezcla de residuos debido a que realizan túneles por donde el oxígeno difunde (Aira *et al.* 2007), Al ingerir la mezcla de residuos introducen a su intestino microorganismos que encuentran condiciones propicias para su reproducción, además al alimentarse de los residuos los fragmentan de modo que se vuelven más accesible para los microorganismos, esto contribuye a

acelerar la degradación de los residuos (Laverack, 1963).

Las lombrices al excretar dispersan microorganismos que colonizan la mezcla de residuos, acelerando de esta forma la transformación (Dominguez *et al.* 1997; Brown, 1995).

Durante el lombricompostaje se pueden apreciar dos fases caracterizadas por el movimiento de las lombrices en la mezcla de residuos (Lazcano *et al.* 2008): la fase activa, donde las lombrices procesan los residuos modificando su estado físico por la acción mecánica de su aparato digestivo, reduciéndolos a partículas más pequeñas, aumentando así el acceso de los consorcios microbianos a la superficie de los residuos (Lores, *et al.* 2006); y la fase de maduración, marcada por el desplazamiento de las lombrices hacia la parte interna de los residuos, donde suelen vivir para evitar ser devorados por depredadores (Edwards y Bohlen, 1996).

El tiempo de duración de las fases no se encuentra delimitado por tiempo, más bien depende de diversos factores, como:

- 1) la especie que se utilice, ya que algunas debido a su tamaño y metabolismo consumen más rápido los residuos (Lazcano *et al.* 2008).

- 2) la densidad de las lombrices, que significa que mientras mayor sea el número de individuos consumiendo los residuos, más acelerada será la transformación (Garg *et al.* 2006).

3) la tasa de digestión, que se considera como la capacidad de cada especie de lombriz para digerir distintas clases de residuos (Domínguez, *et al.* 1997).

En todo el proceso de lombricompostaje la temperatura se mantiene en los rangos mesofílicos característicos del compostaje que rondan los 25 y 30 ° C (Antil *et al.* 2014), la humedad en el lombricompostaje juega también un papel importante, esta debe permanecer entre 40 y 50 % con respecto a masa de los residuos, ya que las lombrices no poseen la capacidad de masticar los residuos, únicamente los succionan (Laverack, 1963) y al igual que en el compostaje se deben favorecer procesos metabólicos aerobios.

El principal actor en el lombricompostaje son las lombrices, estos animales son invertebrados pertenecientes al filo annelida y a la clase oligoqueto; hasta la fecha se han descrito 8,300 especies diferentes en la clase oligoquetos, de las cuales casi la mitad son lombrices terrestres (Raynolds y Wetzel, 2004).

1.3.3.- Generalidades de las *Lombrices*, (*Eisenia fétida*, Sav).

Todas las especies de lombriz son iguales, anatómica y fisiológicamente hablando poseen las siguientes características; son bilateralmente simétricas, poseen un cuerpo segmentado que le da un aspecto anillado, y que generalmente coincide con septos que dividen el interior del cuerpo; los segmentos varían en amplitud, siendo más

amplios en la zona clitelar, una zona ensanchada en donde generalmente se localizan los orificios sexuales, y que ayuda a identificar si una lombriz está en una etapa madura o no (Edwards y Bohlen, 1996).

Histológicamente no poseen un esqueleto óseo, pero su estructura se encuentra dada por capas de músculo liso concéntrico que le permite el movimiento retráctil, poseen cutícula y epidermis especializadas que le ayudan a reconocer cambios en la humedad, pH y temperatura; son hermafroditas, es decir poseen gametos tanto masculinos como femeninos, sin embargo requieren de una pareja para copular y estimular la fecundación (Edwards y Bohlen, 1996).

Anatómicamente poseen también un tubo digestivo, básicamente un canal que va desde la boca hasta el ano y está compuesto por el prostomio o boca, le sigue la faringe, el esófago, el estómago y por último los intestinos y el ano o pigidio (Edwards y Bohlen, 1996).

Existe actualmente controversia con la división correcta de los intestinos, y la clasificación puede variar de acuerdo con los autores consultados y con el tipo de estudio que se pretende realizar (López-Méndez *et al.* 2013).

Las lombrices además tienen un sistema vascular y nervioso particular, ya que poseen alrededor de 5 corazones primitivos que empujan la sangre a lo largo de la lombriz (Edwards y Bohlen, 1996); al igual que los mamíferos poseen un tejido sanguíneo

encargado del transporte de oxígeno y difusión de dióxido de carbono a través de los vasos sanguíneos; aunque no poseen pulmones, el intercambio gaseoso se lleva a cabo a través de la epidermis (Edwards y Bohlen, 1996).

Actualmente la lombricultura es un actividad ampliamente conocida, una de las especies de lombriz más utilizada en esta práctica es *Eisenia fetida* (Savigny), se le llama comúnmente lombriz roja californiana, es la lombriz más empleada en la transformación de los desechos orgánicos a través de lombricompostaje (en un 90 % a escala mundial), fue descrita por Savigny en 1826 (Domínguez y Edwards, 2010).

Se ha registrado que *E. fetida* puede vivir en un amplio rango de temperatura alrededor de 25 °C, un porcentaje de humedad preferentemente en 85 %, y en residuos cuyos pH poseen un rango entre 6.8 - 8.2. (Domínguez y Edwards, 2010).

Dependiendo de la calidad y la naturaleza del sustrato la tasa de reproducción varía, se ha reportado que presenta el siguiente ciclo criada en estiércol vacuno: El capullo o cocón, atraviesa un periodo de incubación de entre 18 y 26 días (etapa embrionaria); pasado este tiempo emergen hasta cuatro lombrices inmaduras de cada cocón (etapa post-embrionaria) dependiendo de la temperatura. Desde el nacimiento hasta la aparición del clitelo transcurren entre 40 a 60 días; una vez que alcanza la madurez sexual o que el clitelo es apreciable, transcurren alrededor de tres días para la aparición de los cocones. Bajo estas condiciones esta especie tiene una expectativa de vida de hasta 5 años (Dominguez y Edwards, 2010).

Tanto los procesos de compostaje como de lombricompostaje ayudan a mitigar la problemática de acumulación de desechos agroindustriales, sin embargo lo interesante de la transformación es resultado de las interacciones microbianas que sucesivamente van participando en la degradación mediante la síntesis de enzimas para aprovechar los componentes de los residuos y obtener una fuente de energía.

1.4.- Justificación

Las enzimas celulolíticas participan en ciclos biogeoquímicos que rigen la vida en la tierra, son responsables de la síntesis y degradación de la biomasa de las plantas, la utilización de la celulosa como fuente de energía es llevada a cabo únicamente por microorganismos con capacidad celulolítica.

Aunque es el polímero más abundante en la tierra, actualmente carecemos de tecnología de fácil acceso económico y técnico para la utilización de la celulosa con fines biotecnológicos, por ello existe una demanda de enzimas con una mayor actividad, que sean capaces de resistir cambios en la temperatura y el pH del medio.

Dos procesos que podrían presentar una ventana de bioprospección de enzimas con estas características son el compostaje y el lombricompostaje, ambos procesos ocurren en la naturaleza y presentan diferentes beneficios, el más atractivo es la generación de abonos orgánicos y la reducción del volumen de los residuos hasta en un 60 %, por lo

que ayudarían a mitigar el daño ocasionado por los residuos, sin embargo mientras se llevan a cabo, los microorganismos que colonizan los residuos producen complejos enzimáticos que pudiesen ofrecer solución a la necesidad de obtención de enzimas termotolerantes y pH resistentes.

Este estudio propone abrir una ventana para una futura bioprospección de enzimas, ya que la extracción de enzimas celulolíticas de procesos como el compostaje y el lombricompostaje es evaluada a diferentes niveles de pH en ambos procesos, se puede determinar el punto en el tiempo de los procesos en el cual se podrían obtener las enzimas con mayor actividad o que resistan cambios en las condiciones de pH.

1.5.- Objetivo general

Comparar la actividad enzimática CMCasa de los procesos de compostaje y lombricompostaje.

1.5.1.- Objetivos específicos

- Evaluar la dinámica de los parámetros fisicoquímicos de ambos procesos.
- Monitorear posibles variaciones del contenido de celulosa en los dos procesos.
- Determinar mediante las diferencias encontradas, tendencias que dictaminen en que proceso existe mayor actividad para proponerlo como una ventana de bioprospección de enzimas.

Diferencia de la actividad carboximetilcelulasa (CMCasa) en los procesos de compostaje y lombricompostaje.

2.- ARTÍCULO

1 Enviado a la Revista Mexicana de Ingeniería Química

2 **Autores:** Fernando Sánchez Villatoro, Karina Guillén-Navarro, Ma. de los Ángeles Calixto-
3 Romo y Raúl Cuevas González.

4

5 **Título:** Diferencia de la actividad carboximetilcelulasa (CMCasa) en los procesos de compostaje
6 y lombricompostaje.

7

8 El Colegio de la Frontera Sur Unidad Tapachula. Carretera antiguo aeropuerto km 2.5, C.P.
9 30700. Tapachula, Chiapas, México.

10 Autor correspondiente: Karina Guillén-Navarro.

11 E-mail: kguillen@ecosur.mx

12 Tel: (962)6289800 Ext.

13 Fax:

14

15

16

17

18

19

20

22
23 **DIFERENCIA DE LA ACTIVIDAD CARBOXIMETILCELULASA (CMCasa) EN LOS**
24 **PROCESOS DE COMPOSTAJE Y LOMBRICOMPOSTAJE**

25
26 **DIFFERENCES OF CARBOXIMETILCELLULASE ACTIVITY (CMCase) AMONG THE**
27 **COMPOSTING AND VERMICOMPOSTING PROCESSES**

28
29 Luis Fernando Sánchez-Villatoro¹, Karina Guillén-Navarro¹¹, Ma. de los Ángeles Calixto-Romo¹, Raúl
30 Cuevas-González¹.

31 ¹*El Colegio de la Frontera Sur Unidad Tapachula. Carretera Antiguo Aeropuerto km 2.5, C.P. 30700.*
32 *Tapachula, Chiapas, México.*

33 Fecha de envío: diciembre de 2016

34 **Resumen:**

35
36 En el presente estudio se determinó la actividad carboximetilcelulasa (CMCasa) en los procesos de
37 compostaje y lombricompostaje a partir de una mezcla de residuos orgánicos de mercado, con el
38 objetivo de evaluar una ventana de bioprospección de enzimas. Se realizaron extracciones proteínicas a
39 diferente pH, además se comparó la actividad celulasa en ambos procesos. El estudio se llevó a cabo
40 durante 60 días y se realizaron determinaciones de parámetros físico-químicos, contenido de celulosa y
41 actividad CMCase. La actividad enzimática en cada tiempo y con cada pH fue diferente, siendo más alta
42 durante el lombricompostaje ($p = 0.0002$). Entre los días 30, 45 y 60 se observó un patrón de actividad
43 similar en ambos procesos a los diferentes pH de extracción, lo que sugiere que probablemente se
44 habían equilibrado y estabilizado. En la etapa final, la actividad mayor se registró en la extracción con
45 pH cercano al neutro (6.8) y ligeramente alcalino (7.8).

46
47 *Palabras clave:* Carboximetilcelulasas, celulosa, pH, compostaje, lombricompostaje.

48
49 **Abstract:**

50
51 In this study, the carboximetilcellulase activity (CMCase) in two bioprocesses, composting and
52 vermicomposting from municipal solid waste was assessed with the aim of evaluating an enzyme
53 bioprospecting window. Different pH protein extractions were made, and the enzymatic activity in both
54 systems was compared too. The study was performed for 60 days. We evaluate physics and chemical
55 parameters, cellulose content, and CMCase activity. The enzymatic activity showed differences on each
56 time and at different pH levels, being higher during vermicomposting ($p = 0.0002$). On day 30, 45 and
57 60, a very similar pattern of activity was observed in both processes at every pH level extractions; which
58 suggest that the systems were already balanced and stabilized. At the final stage, the higher activity was
59 registered close to neutral pH (6.8) and the slightly alkaline pH (7.8).

60
61 **Key words:** Carboximetilcellulases, cellulose, pH, composting, vermicomposting.

¹ *Autor para la correspondencia. E-mail: kguillen@ecosur.mx*
Tel. +52 (962) 628 9800, ext 5411; fax: +52 (962) 628 9806

62 1. Introducción

63

64 La generación de residuos agroindustriales provoca contaminación en el ambiente debido a la
65 inadecuada disposición final de los residuos (Lal, 2005; Saval, 2012), y el compostaje y el
66 lombricompostaje son alternativas para mitigar esta problemática (Butler *y col.* 2001). El primero de
67 ellos es un proceso bio-oxidativo de compuestos de origen orgánico (Antil *y col.* 2014), y es realizado
68 por la acción conjunta de diversos organismos, que en condiciones de humedad y aireación continua
69 promueven el desarrollo y la sucesión de diversos microorganismos (Lung *y col.* 2001).

70 Durante el compostaje se producen variaciones en la temperatura, pH y la concentración de sales del
71 medio (Bhattacharya y Pletchke, 2014; Antil *y col.* 2014; Insam y Bertoldi, 2007; Quintana *y col.* 2006).
72 Estos cambios pueden afectar el establecimiento de poblaciones microbianas.

73 Por otro lado, el lombricompostaje es el proceso de transformación de residuos orgánicos llevado a cabo
74 por algunas especies de lombrices en sinergia con los microorganismos (Domínguez y Edwards, 2000;
75 Aira *y col.* 2007). Dado que las lombrices son sensibles a los cambios de temperatura y pH que ocurren
76 en las etapas tempranas del compostaje, deben entrar en contacto con los residuos una vez que el
77 proceso de compostaje se encuentra en etapa de maduración (Amoseé *y col.* 2013).

78 Los microorganismos como las bacterias y los hongos presentes en los procesos de compostaje y
79 lombricompostaje obtienen nutrientes y carbono a partir de compuestos orgánicos complejos, y lo hacen
80 a través de reacciones enzimáticas (da Cruz Ramos *y col.* 2016). Por lo que, los consorcios microbianos
81 producen enzimas extracelulares que hidrolizan polímeros que constituyen los residuos en unidades
82 asimilables por las células (Jackson *y col.* 2013).

83 El mayor componente de los residuos agroindustriales que pueden emplearse para producir compostas
84 es la celulosa, un homopolisacárido estructural de la pared celular de las plantas, compuesta por
85 unidades de glucosa (D-glucopiranosas) y unidas por enlaces β -1,4 glucosídicos (Wilson, 2011).
86 Dependiendo del grado de organización estructural de la celulosa, se aprecian dos zonas, una cristalina y
87 una amorfa (Gan *y col.* 2003; Bayer *y col.* 1998; Bath, 2000; Wilson, 2011). Por lo que, las
88 características físico-químicas de la celulosa hacen que la hidrólisis de este compuesto requiera de la
89 acción de un complejo de enzimas que actúan sinérgicamente, y son denominadas celulasas (Fioretto *y*
90 *col.* 2005; Wilson, 2011). Dependiendo del sitio de acción sobre el polímero de celulosa se les agrupa
91 en: i) Endoglucanasas, ii) Exoglucanasas, iii) y Glucosidasas (Fujii *y col.* 2012; Gan *y col.* 2003).

92 Debido a que la celulosa es la fuente de carbono más abundante en todos los ecosistemas, se ha
93 reportado una gran diversidad de organismos que producen estas enzimas, entre los que sobresalen los
94 hongos y bacterias, aunque también se han reportado en insectos y plantas (Gautam *y col.* 2012). En
95 estudios experimentales para monitoreo de celulasas comúnmente se utiliza carboximetilcelulosa (CMC)
96 como sustrato, el cual es un análogo sintético metilado de la celulosa; por lo que es utilizada en estudios
97 de laboratorio para evaluar actividad enzimática celulolítica (Zhou *y col.* 2004). En ese sentido, para la
98 prospección de enzimas celulolíticas es uno de los reactivos más utilizados (Ghose, 1987). Algunos
99 componentes de un sistema enzimático de celulasas permanecen unidos cuando se adhieren a la
100 celulosa, similar a como se encuentran en solución, por lo que la actividad CMCasa puede ser utilizada
101 para reflejar toda la actividad de celulasas libres o unidas (Zhou *y col.* 2004).

102 Actualmente las celulasas son ampliamente utilizadas en la industria donde se requiere que puedan
103 actuar a condiciones ambientales cambiantes, por lo que enzimas provenientes de los procesos de
104 compostaje y lombricompostaje pueden presentar características biotecnológicas deseables como la
105 resistencia a altas temperaturas, o tolerancia a diferentes pH de acción (Bath, 2000).

106 La mayoría de las celulasas utilizadas en biotecnología derivan de bacterias y hongos no extremófilos
107 bien caracterizados. Algunos reportes muestran que las celulasas alcalino-resistentes y termoestables son
108 requeridas en la industria textil y en la de los detergentes (Hiroshi, 1999; Ito, 1997). Las celulasas
109 extremófilas pueden obtenerse por ingeniería proteica o aislarse de microorganismos extremófilos donde
110 estas propiedades de las enzimas se pueden encontrar (Dutta *y col.* 2008).
111 La actividad enzimática de celulasas ha sido estudiada en procesos de compostaje y lombricompostaje
112 con el fin de evaluar el estado de maduración de los productos finales (Cayuela *y col.* 2008; Castaldi *y*
113 *col.* 2008; Butler *y col.* 2001; Boulter *y col.* 2000; Aira *y col.* 2007). Actualmente estos procesos son
114 analizados con fines de bioprospección, mediante técnicas moleculares como la metagenómica, que
115 según Nannipieri (2006), es una herramienta útil, pero tiene la limitante de que no detecta directamente
116 la proteína activa.
117 La extracción de enzimas extracelulares a partir de muestras ambientales es un paso fundamental para la
118 evaluación de la actividad enzimática (Keiblinger *y col.* 2012). El pH de la solución de extracción puede
119 tener un efecto directo sobre las enzimas que se estén evaluando, debido a que la estructura final activa
120 de una enzima esta determinada por las interacciones entre los grupos radicales laterales en la cadena de
121 aminoácidos que genera interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas, enlaces iónicos, y puentes disulfuro.
122 De esta manera, el pH de extracción puede afectar estas interacciones, provocando que las enzimas se
123 vuelvan inactivas y precipiten (Ugwu y Apte, 2004). Por lo que, para fines de prospección de enzimas es
124 deseable realizar los procedimientos de extracción a distinto pH. Además, la extracción a diferentes pH
125 puede ser utilizada para evaluar indirectamente la diversidad enzimática en cada proceso. También
126 permitiría evaluar la etapa donde se encuentra la mayor actividad, en este caso de los procesos de
127 compostaje y lombricompostaje. Un estudio de esta naturaleza posibilitaría abrir una ventana de
128 localización de enzimas celulolíticas con fines de bioprospección tecnológica para potenciales
129 aplicaciones industriales.
130

131 **2. Materiales y métodos**

132 133 *2.1. Recolección de residuos*

134
135 Se colectaron dos tipos de residuos: Cascabillo de café proveniente del beneficio seco de la Finca
136 Alianza, que se localiza en el municipio de Cacahoatán, Chiapas (coordenadas: Longitud: -92.182778,
137 Latitud: 15.046667, a 670 metros sobre el nivel del mar) y residuos orgánicos de mercado (ROM)
138 provenientes del la estación provisional del Mercado San Juan, ubicado sobre la carretera Antiguo
139 Aeropuerto s/n a un costado del parque deportivo Los Cerritos de la ciudad de Tapachula, Chiapas,
140 México.

141 142 *2.2. Compostaje*

143
144 Los ROM fueron cortados y triturados para obtener una mezcla uniforme de trozos de aproximadamente
145 1 a 2 cm cúbicos, y se mezclaron con cascabillo de café en relación 3:1. La mezcla se colocó en
146 recipientes rectangulares de plástico de 38.5 cm de ancho x 69 cm de largo x 30 cm de profundidad,
147 provistos de orificios en el fondo para escurrimiento del agua. Al proceso de compostaje se le realizó

148 una aireación mecánica con pala y saturación con agua una vez por semana. Se realizaron tres
149 repeticiones de este tratamiento.

150

151 2.3. *Lombricompostaje*

152

153 Para evitar exponer a las lombrices de los cambios bruscos de pH y la temperatura de los residuos, se
154 realizó un pre-tratamiento de la mezcla de los residuos en una pila, que se aireó mecánicamente con pala
155 y se saturó con agua en los días 12, 20 y 28. Al cabo de 34 días, la mezcla pre-tratada presentó una
156 temperatura de 28 °C, y un pH de 8. Esta mezcla fue colocada en recipientes de las mismas proporciones
157 y características a los usados en el compostaje. Posteriormente, los recipientes fueron inoculados con
158 300 lombrices de la especie *Eisenia fetida* (Savigny) en edad reproductiva (clitelo visible). El
159 tratamiento se realizó con tres repeticiones.

160

161 2.4. *Muestreo.*

162

163 Se realizó un muestreo no probabilístico, en el cual se tomaron muestras compuestas de 10 g de cada
164 tratamiento para la determinación de pH y conductividad eléctrica cada 5 días, y de 100 g para ensayos
165 de actividad enzimática y fracciones de fibra (celulosa) cada 15 días, desde el comienzo de los
166 tratamientos (día 0) hasta los 60 días.

167

168 2.5. *Parámetros Físico-Químicos*

169

170 El pH y la conductividad eléctrica se determinaron utilizando 10 g de la muestra compuesta, que fueron
171 colocados en un vaso de precipitado de 50 ml, y se le añadieron 30 ml de agua desionizada para lograr
172 una proporción residuos y agua de 1:3 (Mclean, 1982), que se mezcló durante un minuto, y se dejó
173 precipitar por gravedad un minuto. Pasado este tiempo se filtró el líquido utilizando una gasa estéril, el
174 filtrado resultante fue analizado inmediatamente con un equipo multiparamétrico de la marca ORION
175 modelo 4 STAR. La determinación de la temperatura se realizó en los mismos días que el pH, y la
176 conductividad (cada cinco días a partir del día 0 hasta el día 60) utilizando un termómetro de mercurio
177 de la marca Brannan con rango de temperatura de -20 a 110 °C; para ello, el bulbo del termómetro fue
178 colocado de forma vertical hasta el último tercio de profundidad del recipiente con mezcla de residuos
179 durante un minuto. Se repitió la técnica a los costados de cada recipiente.

180

181 2.6. *Análisis Químico Proximal (Fibras de celulosa)*

182

183 Se realizó en el Laboratorio Institucional de Bromatología de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR),
184 Unidad San Cristóbal de Las Casas, Chiapas. Para ello se tomaron 100 g de muestra de cada uno de los
185 tratamientos y se colocaron en bolsas plásticas debidamente rotuladas y empaquetadas para su envío, el
186 análisis se realizó por incineración a 550 °C durante 3 horas (Van Soest, 1973).

187

188 2.7. *Obtención de Extractos Enzimáticos*

189

190 Una muestra de 10 g de cada uno de los tratamientos fue colocada en tubos de centrifuga de 50 ml
191 previamente enfriados en hielo, por cada tratamiento se realizó una serie de extracciones utilizando las
192 siguientes soluciones amortiguadoras: 1) Acetato de sodio pH 3.6; 2) Acetato de sodio pH 4.6; 3)

193 Acetato de sodio pH 5.6; 4) Fosfato de sodio pH 5.8; 5) Fosfato de sodio pH 6.8; y 6) Fosfato de sodio
194 pH 7.8. Cada solución amortiguadora se utilizó como tratamiento de extracción para los dos procesos;
195 en total fueron seis tubos por muestra. Estos fueron agitados ligeramente en vortex durante 10 minutos,
196 y se incubaron en hielo durante un minuto; se colectó el sobrenadante de cada tubo y se traspasó a tubos
197 para microcentrífuga de 2 ml limpios y previamente rotulados. Posteriormente se centrifugaron a 4 °C a
198 14000 xg durante 1 minuto, el sobrenadante resultante se colocó en tubo nuevo y se depositó en hielo; a
199 partir de este punto se considera que obtuvimos un extracto enzimático crudo.

200

201 *2.8 Actividad enzimática carboximetilcelulasa*

202

203 La actividad enzimática fue estimada a partir de la determinación de azúcares reductores mediante una
204 modificación del método de ácido dinitrosalicílico (DNS) propuesto por Ghose (1987), y se describe
205 brevemente: en un tubo para microcentrífuga de 2 ml se añadieron 200 µl de extracto enzimático crudo
206 y 200 µl de carboximetilcelulosa al 1 %; después de mezclar ligeramente, los tubos se incubaron a 28
207 °C agitando a 300 rpm, durante 20 minutos. Inmediatamente después, se añadió a cada tubo 1 ml de
208 reactivo DNS (Lorenz-Miller, 1960), y se incubó a 100 °C en baño maría durante cinco minutos.
209 Inmediatamente después los tubos se retiraron del baño maría y se detuvo la reacción colocándolos en
210 hielo durante cinco minutos; al cabo de este tiempo se tomó la lectura de absorbancia a 540 nm,
211 utilizando un espectofotómetro de la marca Shimadzu, modelo Pharma Spec UV-1700. La actividad se
212 reporta en UI, donde 1 UI se define como la cantidad de enzima en 1 ml de solución que produce una
213 cantidad de azúcar reductor equivalente a 1.0 mg de glucosa cuando se incuba por 30 min a 30 °C con 1
214 ml de carboximetilcelulosa al 1%.

215

216 *2.9. Análisis Estadístico*

217

218 Los resultados de los parámetros físico-químicos y de la fracción de fibra (celulosa) y las actividades
219 enzimáticas, se evaluaron de manera descriptiva. Para comparar diferencias en la actividad enzimática
220 entre los dos tratamientos se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas. Todos los análisis de
221 datos y gráficas fueron realizados con el software estadístico R versión 3.2.4 (R Core Team, 2016).

222

223 **3. Resultados y discusión**

224

225 *3.1 Parámetros físico-químicos*

226

227 *3.1.1 Temperatura*

228

229 La temperatura promedio en ambos procesos a partir del tiempo 0, hasta el día 60 fueron diferentes entre
230 si, tal como se muestra en la Fig. 1. En el proceso de compostaje se observó el aumento de la
231 temperatura de la etapa termofílica, donde al cabo de 15 días se registró un punto máximo de 55 °C;
232 después de este tiempo la temperatura comenzó a disminuir gradualmente. He y col. (2012), registraron
233 temperaturas entre 60 y 70 °C entre los días 13 y 14 de su tratamiento de compostaje a partir de una
234 mezcla de residuos constituida por estiércol de gallina, cáscara de arroz y residuos de hongos en una
235 relación 5:1:3 respectivamente, llegando a menos de 50 °C hasta el día 34, por lo que mantuvieron su
236 etapa termofílica durante casi 20 días. Sin embargo, es sabido que uno de los factores que favorecen el

237 incremento de la temperatura es la naturaleza de los residuos y el volumen de estos en una pila (Antil y
238 *col.* 2014); en este estudio se mantuvo la etapa termofílica por 10 días: al realizar el proceso en
239 recipientes no se promovió el aumento y mantenimiento de la temperatura. Hasta el día 35 se registró
240 una temperatura de 30 °C, que indicó el inicio de la etapa de maduración (Bhattacharya y Pletchke,
241 2014). Por el contrario, en el proceso de lombricompostaje se observó poca variación de la temperatura,
242 que fluctuó entre los 27 y 28 °C durante todo el estudio.

243
244 Boulter *y col.* (2000) y Garg *y col.* (2006) mencionan que durante el proceso de compostaje y en el
245 tratamiento previo del lombricompostaje, la temperatura es un factor clave para controlar la actividad
246 microbiana. Las altas temperaturas alcanzadas en la etapa termofílica del compostaje sugieren una
247 sucesión de microorganismos a lo largo del tiempo, que afectaría la actividad y la diversidad enzimática,
248 como se muestra más adelante. Según Tripathi y Bhardwaj (2014) la temperatura óptima de crecimiento
249 para *Eisenia fetida* es de 25 °C, pero puede sobrevivir entre 15 y 35 °C, por lo que la temperatura de los
250 recipientes se encontraba en rangos que permitían el establecimiento de *E. fetida*.

251
252 **Figura 1.**

253
254 *3.1.2. pH*

255
256 En el compostaje se observa una fluctuación en los rangos de pH a partir del día 0 hasta el día 35 (Fig.
257 1), donde se observó un aumento en el rango desde 5.3 a 9.1. Quintana *y col.* (2006) mencionan que el
258 pH ligeramente ácido al inicio de la mezcla de los residuos es debido a la presencia de ácidos orgánicos
259 procedentes de la degradación de los residuos. Sin embargo, una vez que se realizó la mezcla y la
260 aireación de los residuos, el pH del medio fue aumentando debido al aumento en las comunidades
261 microbianas aerobias, que probablemente produjeron dióxido de carbono (CO₂) y carbonatos (HCO₃⁻ y
262 CO₃⁻) (Sundberg *y col.* 2004). Otra razón del aumento de pH de los residuos podría deberse a la
263 descomposición de la materia orgánica, lo cual produce amoníaco (NH₃) y amonio (NH₄⁺) (Mengel *y*
264 *col.* 2001). La aireación mecánica del proceso de compostaje estimuló el metabolismo aeróbico de las
265 comunidades microbianas, por lo que posterior al día 35, el pH disminuyó hasta quedar en un rango
266 entre 7 y 8. Sundberg *y col.* (2004) mencionan que el pH en procesos de compostaje es una variable que
267 depende de ciertos factores como la temperatura, esta última delimita las comunidades microbianas que
268 se encuentran en las distintas fases, por lo que a su vez se ve afectada la producción y tipo de enzimas
269 que producen. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se presume que en la fase inicial del
270 proceso de compostaje las comunidades microbianas son en su mayoría tolerantes a pH ácidos, mientras
271 que en la fase termofílica y de maduración las comunidades resisten el aumento del pH. He *y col.* (2012)
272 encontraron un incremento en el rango de pH de 8.07 a 9.56 en el primer día de tratamiento, la
273 neutralización se observó en el día 45, ellos mencionan que las características de los residuos
274 determinan el pH que acompaña a los procesos.

275 Por otro lado, durante el proceso de lombricompostaje el pH fluctuó en un rango de 7.5 a 8 hasta el final
276 del estudio; no obstante, se ha mencionado que los valores de pH en procesos de lombricompostaje son
277 ligeramente ácidos y es atribuido a la humificación de la materia orgánica, y a la mineralización del
278 nitrógeno y el fósforo (Pathma y Sakthivel 2012). Los valores de pH del presente trabajo concuerdan
279 con los encontrados por Garg *y col.* (2006) quienes a partir de mezclas de diferentes clases de residuos
280 describen que del inicio a los 60 días de tratamiento de lombricompostaje con *E. fetida* obtuvieron
281 promedios de pH de 8.1 a 8.6. Edwards y Bohlen (1996) demostraron que esta especie de lombriz tiene

282 un óptimo crecimiento en un rango de pH entre 5 y 9, también mencionan que las lombrices
283 proporcionan una aireación pasiva, debida a su movimiento en la mezcla de residuos, lo que contribuye
284 a la estabilización del pH.

285 286 3.1.3. Conductividad Eléctrica

287
288 En ambos procesos se observó una disminución alternada de los valores de conductividad eléctrica
289 (Fig.1), esto debido al proceso de toma de muestra que ocurría justo después del suministro de agua. En
290 el caso del proceso de lombricompostaje, la conductividad eléctrica comenzó en 0.5 mS/cm, y al cabo
291 de 60 días llegó a 0.1 mS/cm. Los resultados obtenidos en este estudio difieren de los obtenidos por
292 Garg *y col.* (2006) quienes al inicio del lombricompostaje obtuvieron valores menores a 0.4 mS/cm y al
293 cabo de 60 días obtuvieron valores de 0.5 hasta 1.7 mS/cm de su mezcla de residuos; ellos atribuyen el
294 incremento gradual en la salinidad a los iones libres y los minerales generados por las excretas de las
295 lombrices. Sin embargo Pathma y Sakthivel (2012) mencionan que durante el proceso de
296 lombricompostaje se producen cantidades mínimas de metabolitos solubles como las sales de amonio, y
297 que la precipitación de las sales disueltas generan valores de conductividad eléctrica bajos, como los
298 observados en nuestros resultados.

299 Por otro lado, en el proceso de compostaje se obtuvo una conductividad eléctrica al inicio de la mezcla
300 de residuos de 0.5 mS/cm y al cabo de 60 días se registró una conductividad de 0.2 mS/cm. Fancou *y col.*
301 (2005), obtuvieron resultados contrastantes, debido que al inicio obtuvieron valores de conductividad de
302 0.6 mS/cm y al final del proceso de compostaje la conductividad eléctrica aumentó a 3.06 mS/cm.
303 Albanell *y col.* (1988) mencionan que en procesos de compostaje se obtienen pocas sales disueltas, pero
304 poseen una mayor capacidad de intercambio iónico.

305 3.2. Contenido de celulosa

306
307 En la Fig. 2 se observa el aumento en la proporción de fibras de celulosa desde el día 0 hasta el día 30,
308 este efecto se observó en ambos procesos. Probablemente esto se deba a que los datos son expresados en
309 porcentaje, que a su vez expresan la proporción de todos los componentes; esto sobreestima la cantidad
310 de celulosa que se encuentra en el medio, es decir, al irse consumiendo los componentes más asimilables
311 como los azúcares y proteínas, la proporción de fibras de celulosa es mayor en proporción. Sin embargo
312 a partir del día 45 se observó una ligera disminución en la proporción de celulosa contenida en ambos
313 procesos, probablemente debido a que la fuente de carbono restante en los procesos fue
314 mayoritariamente celulosa, que en esta etapa estaba siendo consumida por los microorganismos y por
315 las lombrices. El porcentaje de fibras de celulosa fue similar en ambos casos, aunque fue ligeramente
316 mayor en el lombricompostaje hasta el día 30; sin embargo, disminuyó ligeramente en el día 45. Esto
317 último podría considerarse un factor resultante de la acción de las lombrices que actúan en conjunto con
318 consorcios microbianos para degradar la celulosa y que en ese momento del proceso ya habían
319 comenzado a consumir la celulosa disminuyendo su concentración (Aira *y col.* 2007).

320
321 **Figura 2.**

322 323 3.3. Actividad enzimática

324 Con los datos obtenidos en la determinación de la actividad celulasa a lo largo de los dos procesos
325 (Tabla 1), se ajustó un modelo de análisis de varianza de medidas repetidas para determinar diferencias
326 entre tratamientos y entre actividad de CMCasas extraídas a diferente pH a lo largo del tiempo. Los
327 resultados indican que existe una diferencia entre las actividades CMCasa de los dos procesos, siendo
328 mayor en el lombricompostaje. La prueba se realizó con un valor de significancia del 95%; el valor
329 calculado de p (<0.05) fue de 0.0002 entre tratamientos. Mientras que para el conjunto de los extractos
330 crudos obtenidos con diferente pH a lo largo del tiempo, la prueba menciona que no existen diferencias
331 significativas, el valor calculado de p (>0.05) fue de 0.0819. No obstante, al analizar los datos por
332 separado, las actividades enzimáticas muestran una diferencia entre pH diferente en cada tiempo, esto se
333 debe a que la prueba estadística genera una sobrestimación al analizar los datos observados en conjunto,
334 por ello entre diferentes pH el valor de la prueba es cercano a 0.05 (Quiin y Keough, 2002). La
335 sobrestimación de la prueba se debe principalmente a que en el día 0, la elevada actividad obtenida en
336 los extractos del compostaje compensó la disminución de la actividad en los días posteriores, como se
337 muestra en la Fig. 3. Pese a la sobreestimación de la prueba, en el análisis descriptivo se observa un
338 marcado aumento en la actividad CMCasa del lombricompostaje a partir del día 15.
339

340 **Tabla 1.**

341
342 Charles y Ling-Chiang (1980) mencionan que la degradación de la celulosa, no depende solamente de
343 los complejos enzimáticos que interactúan en el sustrato, dependen también de factores como el
344 porcentaje de humedad, el porcentaje de celulosa cristalina y el grado de polimerización de la molécula
345 de celulosa asociada con otras fibras como la lignina y la hemicelulosa.

346 La actividad enzimática puede verse afectada por el pH según Ugwu y Apte (2004); sin embargo,
347 analizar extractos crudos extraídos a pH distintos, desde ácidos a ligeramente alcalinos, permite
348 identificar patrones de diversidad enzimática, debido a que habrán enzimas que actúen bien a pH ácido,
349 y otras que tengan actividad eficaz a pH alcalino o neutro. En la Fig. 3, se muestra la actividad
350 enzimática obtenida de los extractos enzimáticos a diferentes pH, en distintos días de los procesos.
351

352 **Figura 3.**

353
354 Haciendo la comparación de las actividades CMCasa entre los dos tratamientos, para cada tiempo de
355 muestreo de cada extracto obtenido a distinto pH, se observó lo siguiente (Fig. 3):

356 En el día 0, la actividad enzimática en el proceso de compostaje es hasta 20 UI mayor que en el
357 lombricompostaje (pH 5.8); la diferencia de actividad es menor en el pH 3.6, con una diferencia de 15
358 UI. Esto se puede deber a que en el compostaje los residuos podrían tener una cantidad considerable de
359 azúcares (glucosa, fructosa y almidón), por lo que al realizar la extracción no solo se encontraba una
360 mayor cantidad de organismos productores de enzimas, si no que los azúcares obtenidos en la extracción
361 aumentarían la concentración de grupos aldehídos que actuaban en la reacción del DNS: se ha sugerido
362 que la presencia de disacáridos como la celobiosa, la maltosa y lactosa afectan la reacción de DNS
363 reducido aumentando la absorbancia hasta en un 20 % (Saquib y Whitney, 2011).

364 En el día 15, la tendencia de actividad CMCasa en ambos procesos fue diferente en todos los pH. Por
365 ejemplo, en el pH 3.6 la diferencia fue mayor en el compostaje; en el pH 4.6 la actividad enzimática fue
366 mayor en el lombricompostaje, aquí se registró la mayor diferencia de actividad de casi 0.6 UI; en los
367 pH 5.6 y 5.8 la actividad fue mayor en el proceso de compostaje; mientras que para los pH 6.8 y 7.8 la

368 actividad fue mayor en el lombricompostaje; estas diferencias en la actividad pudiesen ser un reflejo de
369 la sucesión microbiana que se lleva a cabo en ambos procesos.

370 A partir del día 30 y el 45 todas las actividades registradas fueron mayores en el lombricompostaje, a
371 excepción del pH 3.6, en ambos días la mayor diferencia de actividad se registró en el pH 6.8, con una
372 diferencia de casi 4 UI. Por otro lado, en el día 60 las actividades en todos los pH fueron mayores en el
373 lombricompostaje.

374
375 En general, el comportamiento de la actividad CMCasa en el proceso de lombricompostaje fue mayor
376 que en el compostaje a partir del día 15. Devi *y col.* (2009) observaron mayor actividad enzimática
377 CMCasa en procesos de lombricompostaje en comparación con procesos de compostaje, esta diferencia
378 ocurría durante los días 21 al 35. Aira *y col.* (2007), mencionan que las lombrices presentes en su
379 mezcla de residuos incrementaron considerablemente la actividad β -Glucosidasa, hasta 1.2 veces
380 comparado a un proceso de compostaje, lo atribuyen a la actividad celulasa propia de la lombriz.

381 En este estudio, a partir del día 30 al 60 no se observó variabilidad en la actividad CMCasa, esto sugiere
382 que los procesos se encontraban estabilizados; se ha descrito que en la etapa de maduración se lleva a
383 cabo un equilibrio de reacciones, marcado por los componentes que permanecen en los residuos, que
384 son los mas resistentes y se degradan de forma lenta (Bhattacharya y Pletchke 2014). Durante este
385 proceso, la materia orgánica se humifica y las enzimas extracelulares forman complejos con los ácidos
386 orgánicos presentes en la mezcla de residuos y probablemente se inactivan (Edwards, 2011). Esto se
387 puede explicar debido a que las fases previas se encargaron de delimitar las sucesiones microbianas
388 presentes en el ambiente tanto del compostaje como del lombricompostaje; los organismos remanentes
389 agotaron las fuentes de nutrientes fácilmente disponibles, y los organismos restantes son aquellos con la
390 capacidad enzimática de hidrolizar los componentes más recalcitrantes de los residuos como lo son las
391 fibras. Esta limitación en la diversidad y la capacidad de colonización puede suponer un aparente
392 equilibrio del sistema (Sen y Chandra, 2009; Dominguez y Edwards, 2010).

393
394 Además, descartando el día 0, la mayor actividad de todo el estudio en ambos procesos se registró en el
395 extracto con pH cercano al neutro (6.8) y el ligeramente alcalino (7.8). Raut *y col.* (2008) observaron la
396 mayor actividad celulolítica en pH ácido (5.2) a los 12 días en procesos de compostaje; después de este
397 día observaron disminución en la actividad. Stunzenberg *y col.* (1970) observaron una máxima actividad
398 celulolítica en compostaje utilizando extractos a pH 6.0, por lo que sugieren que las características
399 físico-químicas del medio determinan la actividad enzimática. No obstante, los resultados de este
400 estudio sugieren que los complejos enzimáticos en el proceso de lombricompostaje son más efectivos, o
401 se encuentran en mayor concentración, mayor cantidad y diversidad, debido al efecto de las lombrices
402 sobre las comunidades microbianas, tal y como lo menciona Aira *y col.* (2007).

403
404 En el caso de procesos de compostaje Turpeinen *y col.* (2005) y Stutzenberg *y col.* (1970) mencionan
405 que en las etapas de maduración del proceso, cuando el pH esta en rangos neutros o alcalinos (pH 7-9),
406 *Paecilomyces inflatus* y *Thermonospora curvata* son las especies de hongos mas predominantes en
407 aislados de compostaje. Mientras que Dutta *y col.* (2008) encontraron nuevas enzimas celulasas
408 termoestables y alcalino resistentes (pH 8-9) provenientes de hongos filamentosos aislados de suelo
409 mejorado con composta (*Penicillium citrinum*). Esto presenta una atractiva fuente de enzimas, sin
410 embargo la producción de enzimas provenientes de hongos es relativamente lenta, por lo que la
411 prospección de enzimas provenientes de bacterias sugieren una mejor fuente.

412 En el mismo contexto, en ambientes donde las lombrices aceleran los procesos de degradación Yami y
413 col. (2003) aislaron colonias de bacterias celulolíticas (*Bacillus circulans*, *Cellulomonas uda* y
414 *Micrococcus roseus*) en residuos de procesos de lombricompostaje, y dentro del intestino de *Eisenia*
415 *fetida*. Mientras que Fujii y col. (2012) aislaron e identificaron 13 cepas bacterianas y 12 cepas fúngicas
416 del intestino de lombrices endogeas (*Aminitas heteropodas* y *E. fetida*) con actividad celulolítica; de los
417 organismos aislados encontraron que los géneros *Burkholderia* y *Chaetomium*, eran los mas abundantes
418 tanto de bacterias como de hongos, respectivamente.

419
420 El cultivo y el aislamiento de microorganismos son herramientas limitantes para evaluar la diversidad de
421 ecosistemas, debido a que no se pueden igualar las condiciones ambientales ni nutricionales del medio
422 donde se encuentren los microorganismos (Lee y Lee, 2013). Por ello resulta difícil cultivar el total de
423 los microorganismos. Ante esta problemática, los acercamientos proteómicos resultan ser una
424 herramienta sumamente útil con fines de bioprospección, ya que se extraen proteínas activas o enzimas
425 que se encuentran actuando en el medio, aún cuando los microorganismos que las sintetizaron ya no
426 existieran en el sistema (Sukharnikov y col. 2011).

427
428 Los cambios en la actividad celulolítica a diferentes rangos de pH sugieren cambios en la actividad
429 enzimática, debido a la diversidad microbiana que participa en la hidrólisis de la celulosa en ambos
430 procesos. Es decir, según el tipo de consorcios microbianos serán los complejos enzimáticos que estén
431 participando, estos tendrán diferentes características bioquímicas, como el pH óptimo al que actúan
432 cuando están en contacto con su sustrato.

433

434 **4. Conclusión**

435
436 El proceso de lombricompostaje fue el que mostró la mayor actividad CMCasa a partir del día 15, en
437 extractos con pH neutro y ligeramente alcalino. Esto indica que las lombrices tienen efectos directos
438 sobre las poblaciones microbianas y sobre la actividad celulolítica. No obstante, en los dos sistemas
439 existe una inherente diversidad en las enzimas celulolíticas que actúan sobre la degradación de los
440 residuos utilizados en los procesos de compostaje y lombricompostaje.

441 Las celulasas de ambos sistemas parecen ser más activas a pH neutro o ligeramente alcalino. Aunque, la
442 actividad celulolítica en ambos procesos fue diferente, debido a factores bióticos, como la presencia de
443 lombrices y la diversidad microbiana correspondiente; así como factores abióticos, como la temperatura
444 y el pH que influyen en el curso de ambos procesos.

445 Por lo tanto, el compostaje como el lombricompostaje tienen potencial para bioprospección de enzimas,
446 siendo las de mayor actividad las obtenidas del lombricompostaje, mientras que las provenientes del
447 compostaje parecen ser más tolerantes a cambios de temperatura y de pH.

448

449 **5. Agradecimientos**

450
451 Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada No. 591146/308193
452 para cursar la Maestría en Ciencias Naturales y Desarrollo Rural, con orientación en Biotecnología, del
453 posgrado de El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula, incluida en el padrón del Programa
454 Nacional de Posgrados de Calidad. Especial agradecimiento a la M.C. Veronica García Fajardo, al M.C.
455 David Herrera López y al M.C. Javier Fco. Valle Mora por su valiosa contribución en este trabajo.

456

457 6. Referencias

458

459 Aira, M., Monroy, F. y Domínguez, J. (2007). Earthworms strongly modify microbial biomass and
460 activity triggering enzymatic activities during vermicomposting independently of the application
461 rates of pig slurry. *Science of the Total Environment* 385, 252–261.

462 Amossé, J., Bettarel, Y., Bouvier, C., Bouvier, T. Duc, T., Thu, D. y Jouquet, P. (2013). The flows of
463 nitrogen, bacteria and viruses from the soil to water compartments are influenced by earthworm
464 activity and organic fertilization (compost vs. vermicompost). *Soil Biology and Biochemistry* 66,
465 197-203.

466 Albanell, E., Plaixats, J. y Cabrero, T. (1988). Chemical change during vermicomposting (*Eisenia*
467 *foetida*) of sheep manure mixed with cotton industrial waste. *Biology and Fertility of Soils* 6 ,
468 266–269.

469 Antil, R., Raj, D., Abdalla, N. y Inubushi K. (2014). Physical, chemical and biological parameters for
470 compost maturity assessment: A Review. En: *Composting for Sustainable Agriculture*.
471 Maheshwari, D. Springer

472 Bath, M.K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18, 355–
473 383.

474 Bayer, E., Chanzyt, H., Lamed, R. y Shoham, Y. (1998). Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current*
475 *Opinion in Structural Biology* 8, 548-557.

476 Bhattacharya, A. y Pletchke, B. (2014) Thermophilic *Bacilli* and their enzymes in composting. En:
477 *Composting for Sustainable Agriculture*. Pp. 103-124. Maheshwari, D. Springer

478 Boulter, J.I., Boland, G.J. y Trevors, J.T. (2000). Compost: A study of the development process and
479 end-product potential for suppression of turfgrass disease. *World Journal of Microbiology and*
480 *Biotechnology* 16, 115-134.

481 Butler, T. A., Sikora, L. J., Steinhilber, P. M. y Douglass, L. W. (2001). Compost age and sample
482 storage effects on maturity indicators of biosolids compost. *Journal of Environmental Quality* 30,
483 2141–2148.

484 Castaldi, P., Garau, G. y Melis, P. (2008). Maturity assessment of compost from municipal solid waste
485 through the study of enzyme activities and water-soluble fractions. *Waste Management* 28, 534-
486 540.

487 Cayuela, M., Mondini, C., Sánchez-Monedero, M. y Roig, A. (2008). Chemical properties and
488 hydrolytic enzyme activities for the characterisation of two-phase olive mill wastes composting.
489 *Bioresource Technology* 99, 4255-4262.

490 Charles, E.D., Ling-Chang, C. (1980). Cellulose degradation: A common link. En: *Utilization and*
491 *recycle of agricultural waste and residues*. CRC press Inc, 19-65.

492 da Cruz-Ramos, G., Ramos, P., Passarini, M., Silveira, M., Okamoto, D., Gonçalves de Oliveira, L.,
493 Vieira Zezzo, L., Marem, A., Rocha, R., Batista da Cruz, J., Juliano, L. y Pantaroto de
494 Vasconcellos, S. (2016). Cellulolytic and proteolytic ability of bacteria isolated from
495 gastrointestinal tract and composting of a hippopotamus. *AMB express* 6, 17.

496 Devi, S., Vijayalakshmi, K., Jyotsna, K.P., Shaheen, S.K., Jyothi, K., Rani, M.S. (2009). Comparative
497 assessment in enzyme activities and microbial populations during normal and vermicomposting.
498 *Journal of Environmental Biology* 30, 1013-1017.

- 499 Domínguez, J. y Edwards, C. (2010). Biology and ecology of earthworm species used for
500 vermicomposting. En: *Vermiculture technology: earthworms, organic wastes, and environmental*
501 *management*, (Edwards, C., Arancon, N. y Sherman, R., eds.), Pp. 27-40, CRC Press.
- 502 Domínguez, J. y Edwards, C. (2010). Relationships between composting and vermicomposting. En:
503 *Vermiculture technology: earthworms, organic wastes, and environmental management*,
504 (Edwards, C., Arancon, N. y Sherman, R., eds.), Pp. 11-26, CRC Press..
- 505 Dutta, T., Sahoo, R., Sengupta, R., Sinha, S., Bhattacharjee, A. y Ghosh, S. (2008). Novel cellulases
506 from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization.
507 *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35, 275-282.
- 508 Edwards, C. y Bohlen, P.J. (1996). The Biology of Earthworms. En: *Biology and Ecology of*
509 *Earthworms*. Chapman and Hall.
- 510 Fioretto, A., Di Nardo, C., Papa, S. y Fuggi, A. (2005). Lignin and cellulose degradation and nitrogen
511 dynamics during decomposition of three leaf litter species in a Mediterranean ecosystem. *Soil*
512 *Biology and Biochemistry* 37, 1083–1091.
- 513 Francou, C., Poitrenaud, M. y Houot1, S. (2005). Stabilization of organic matter during composting:
514 influence of process and feedstocks. *Compost Science and Utilization* 13, 72-83.
- 515 Fujii, K., Ikeda, K. y Yoshida, S. (2012). Isolation and characterization of aerobic microorganisms with
516 cellulolytic activity in the gut of endogeic earthworms. *International Microbiology* 15, 121-130.
- 517 Gan, Q., Allen, S. y Taylor G. (2003). Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of
518 cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling. *Process Biochemistry*
519 38, 1003-1018.
- 520 Garg, P., Gupta, A. y Satya, S. (2006). Vermicomposting of different types of waste using *Eisenia*
521 *foetida*: A comparative study. *Bioresource Technology* 97, 391-395.
- 522 Gautam, S.P., Bundela, P.S., Pandey, A.K., Awasthi, M.K. y Sarsaiya, S. (2010). Microbial consortium
523 for effective composting of municipal solid waste by enzymatic activities. *Journal of Applied*
524 *Science in Enviromental Sanitation* 5, 301-330.
- 525 Gautam, S.P., Bundela, P.S., Pandey, A.K., Jamaluddin, A. K., Awasthi, M.K. y Sarsaiya, S. (2012).
526 Diversity of cellulolytic microbes and the biodegradation of municipal solid waste by a potential
527 strain. *International Journal of Microbiology* 2012, 325907.
- 528 Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* 59, 257-268.
- 529 He, Y., Xie, K., Xu, P., Huang, X. Gu, W., Zhang, F. y Tang, S. (2012). Evolution of microbial
530 community diversity and enzymatic activity during composting. *Research in Microbiology* 164,
531 189-198.
- 532 Horikoshi, K. (1999). Alkalophiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology*
533 *and Molecular Biology Reviews* 63, 735–750.
- 534 Insam, H. y Bertoldi F. (2007) Microbiology of the composting process. En: *Compost Science and*
535 *Technology* (Díaz, L.F., Bertoldi, M., Bidlingmaier, W. y Stentiford, eds.), Pp. 25-45, Elsevier.
- 536 Ito, S. (1997). Alkaline cellulases from alkaliphilic *Bacillus*: enzymatic properties, genetics and
537 application to detergents. *Extremophiles* 1, 61–66
- 538 Jackson, C. R., Tyler, H. L., Millar, J. J. (2013). Determination of microbial extracellular enzyme
539 activity in waters, soils, and sediments using high throughput microplate assays. *Journal of*
540 *Visualized Experiments* 2013, e50399.
- 541 Keiblinger, K., Wilhartitz, I., Schneider, T., Roschitzki, B., Schmid, E., Eberl, L., Riedel, K. y
542 Zechmeister-Boltenstern, S. (2012). Soil metaproteomics-comparative evaluation of protein
543 extraction protocols. *Soil Biology and Biochemistry* 54, 14-24.

- 544 Lal, R. (2005). World crop residues production and implications of its use as a biofuel. *Environmental*
545 *International* 31, 575-584.
- 546 Lee, M. y Lee, S. (2013). Bioprospecting potential of the soil metagenome: novel enzymes and
547 bioactivities. *Genomics and Informatics* 11, 114-120.
- 548 Lorenz-Miller, G., Blum, R., Glennon, W. y Burton, A. (1960). Measurement of carboxymethylcellulase
549 activity. *Analytical Biochemistry* 2, 127-132.
- 550 Lung, A.J., Lin, C.M., Kim, J.M., Marshall, M.R., Nordstedt, R., Thompson, N.P. y Wei, C.I. (2001).
551 Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in cow manure composting.
552 *Journal of Food Protection* 64, 1309–1314.
- 553 Mclean, E.O. (1982). Soil pH and lime requirements. En: *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical*
554 *and Microbiological Properties*. Agronomy Monograph No. 9. Pp. 199-224, American Society of
555 Agronomy, Soil Science Society of America.
- 556 Mengel, K., Kirkby, E., Kosegarten, H. y Appel, T. (2001). Nutrient uptake and assimilation. En:
557 *Principles of Plant Nutrition* 5th ed. Pp. 161-175, Springer Netherlands.
- 558 Nannipieri, P. (2006). Role of stabilised enzymes in microbial ecology and enzymes from soil whit
559 potential applications in soil proteomics. En: *Nucleic Acid and Proteins in Soil of the Series Soil*
560 *biology*, (Nannipieri, P. y Smalla, K., eds.). Chapter 4, Springer.
- 561 Ugwu, S. y Apte S. (2004). The effect of buffers on protein conformational stability. *Pharmaceutical*
562 *Technology March* 2004, 86-113.
- 563 Pan, I. y Sen, S.K. (2013). Microbial and physico-chemical analysis of composting process of wheat
564 straw. *Indian Journal of Biotechnology* 12, 120-128.
- 565 Pathma, J. y Sakthivel, N. (2012). Microbial diversity of vermicompost bacteria that exhibit useful
566 agricultural traits and waste management potential. *SpringerPlus* 2012, 1-19.
- 567 Quinn, G. y Keough M. (2002). Randomized blocks and simple repeated measures: unreplicated two
568 factor designs. En: *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Pp. 262-300,
569 Cambridge University Press.
- 570 Quintana, O.C., Mejía, O.B. y Martínez, D.V. (2006). Efecto del pH sobre el crecimiento de
571 microorganismos durante la etapa de maduración en pilas estáticas de compost. *Producción +*
572 *Limpia* 1, 87-98.
- 573 Raut, M.P., Prince-William, S.P., Bhattacharyya, J.K., Chakrabarti, T. y Devotta, S. (2008). Microbial
574 dynamics and enzyme activities during rapid composting of municipal solid waste: a compost
575 maturity analysis perspective. *Bioresource and Technology* 99, 6512-6519.
- 576 Saquib, A. y Whitney, P. (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent
577 towards mono and disaccharide sugars. *Biomass and Bioenergy* 35, 4748-4750.
- 578 Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales. *Revista de la Sociedad Mexicana de*
579 *Biotecnología y Bioingeniería A.C.* 16, 14-46.
- 580 Sen, B. y Chandra T. (2009). Do earthworms affect dynamics of functional response and genetic
581 structure of microbial community in a lab-scale composting system?. *Bioresource Technology*
582 *100*, 804-811.
- 583 Sukharnikov, L., Cantwell, B., Podar, M., y Zhulin, I. (2011). Cellulases: Ambiguous nonhomologous
584 enzymes in a genomic perspective. *Trends in Biotechnology* 29, 473-479.
- 585 Sundberg, C., Smärs, S. y Jönsson, H. (2004). Low pH as an inhibiting factor in the transition from
586 mesophilic to thermofilic phase in composting. *Bioresource Thechnology* 95, 145-150.

- 587 Tripathi, G. y Bhardwaj, P. (2004). Comparative studies on biomass production, life cycles and
588 composting efficiency of *Eisenia fetida* (Savigny) and *Lampito mauritii* (Kinberg). *Bioresource*
589 *Technology* 92, 275-283.
- 590 Turpenien, B., Maijala, P., Toumela, M., Hofrichter, M. y Hatakka, A. (2005). Endoglucanase activity
591 of compost-dwelling fungus *Paecilomyces inflatus* is stimulated by humic acids and other low
592 molecular mass aromatics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21, 1603-1609.
- 593 Ugwu, S. y Apte, S. (2004). The effect of buffers on protein conformational stability. *Pharmaceutical*
594 *Technology* 28, 86-109.
- 595 Van Soest, P.J. y McQueen, R.W. (1973). The chemistry and estimation of fibre. *Proceedings of*
596 *Nutrition Society* 32, 123-130.
- 597 Wilson, D. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology* 14,
598 259–263.
- 599 Yami, K., Bhattarai, S. y Adhikari, S. (2003). Vermicomposting and microflora analysis of
600 vermicompost, vermicast and gut of red earthworm. *Journal of Science and Technology* 5(1).
- 601 Zhou, X., Chen, H. y Li, Z. (2004) CMCase activity assay as a method for cellulase adsorption analysis.
602 *Enzyme and Microbial Technology* 35, 455–459.

3.- Tablas y figuras.

Tabla 1. Actividad enzimática de cada uno de los tratamientos en los diferentes días de estudio. La actividad esta expresada en UI \pm EE (Error Estándar).

Tratamiento	pH	0	15	30	45	60
Compostaje	3.6	17.11 \pm 0.400	1.40 \pm 0.220	2.37 \pm 0.017	1.48 \pm 0.285	1.54 \pm 0.050
Compostaje	4.6	21.90 \pm 0.172	0.55 \pm 0.084	1.04 \pm 0.023	1.28 \pm 0.144	1.07 \pm 0.038
Compostaje	5.6	32.86 \pm 0	1.65 \pm 0.017	1.40 \pm 0.665	2.43 \pm 0.161	2.48 \pm 0.188
Compostaje	5.8	33.31 \pm 0.542	1.41 \pm 0.080	1.38 \pm 0.020	1.87 \pm 0.105	1.92 \pm 0.066
Compostaje	6.8	31.21 \pm 0.855	0.90 \pm 0.042	1.69 \pm 0.067	2.22 \pm 1.840	2.28 \pm 0.046
Compostaje	7.8	30.06 \pm 0.238	0.09 \pm 0.043	1.81 \pm 0.020	2.103 \pm 0.128	2.7 \pm 0.064
Lombricompostaje	3.6	1.63 \pm 0.495	1.21 \pm 0.059	2.16 \pm 0.027	1.02 \pm 0.087	2.48 \pm 0.188
Lombricompostaje	4.6	5.33 \pm 0.261	1.36 \pm 0.031	1.68 \pm 0.289	1.95 \pm 0.115	2.49 \pm 0.134
Lombricompostaje	5.6	4.99 \pm 0.171	1.61 \pm 0.031	3.91 \pm 0.644	3.16 \pm 0.303	3.09 \pm 0.161
Lombricompostaje	5.8	6.20 \pm 0.299	1.07 \pm 0.039	4.23 \pm 0.771	3.59 \pm 0.302	2.82 \pm 0.083
Lombricompostaje	6.8	5.94 \pm 0.910	1.45 \pm 0.005	5.46 \pm 0.075	6.25 \pm 0.276	6.26 \pm 0.096
Lombricompostaje	7.8	4.21 \pm 0.664	1.16 \pm 0.012	4.60 \pm 0.068	5.27 \pm 0.190	5.13 \pm 0.112

Figura 1. Dinámica de los parámetros físico-químicos en ambos procesos a lo largo del tiempo, Temperatura ($^{\circ}$ C), pH, Conductividad eléctrica (mS/cm^{-1}). Línea roja, Compostaje; línea verde, Lombricompostaje.

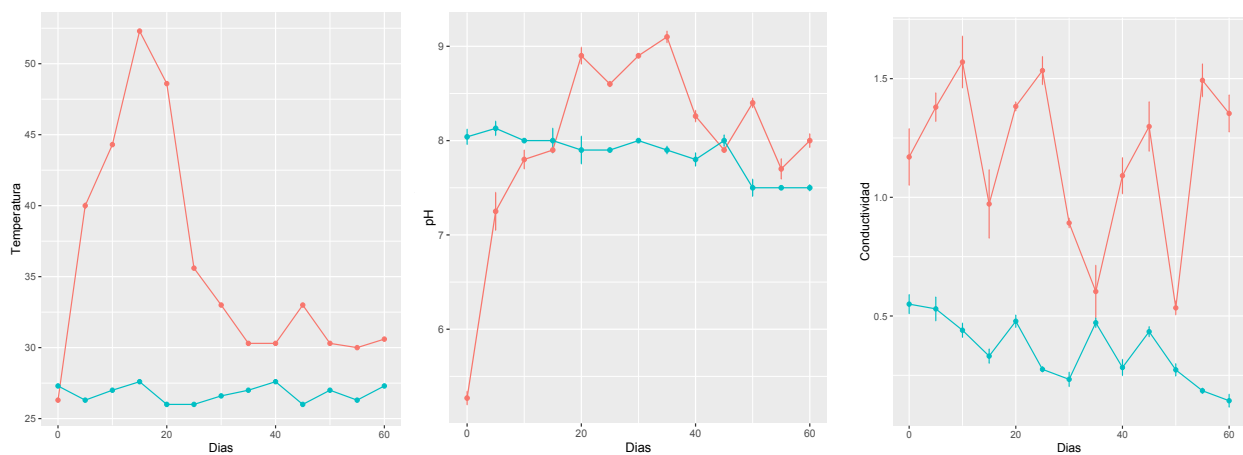


Figura 2. Promedio de contenido de celulosa (%). Línea roja, Compostaje; línea verde, Lombricompostaje.

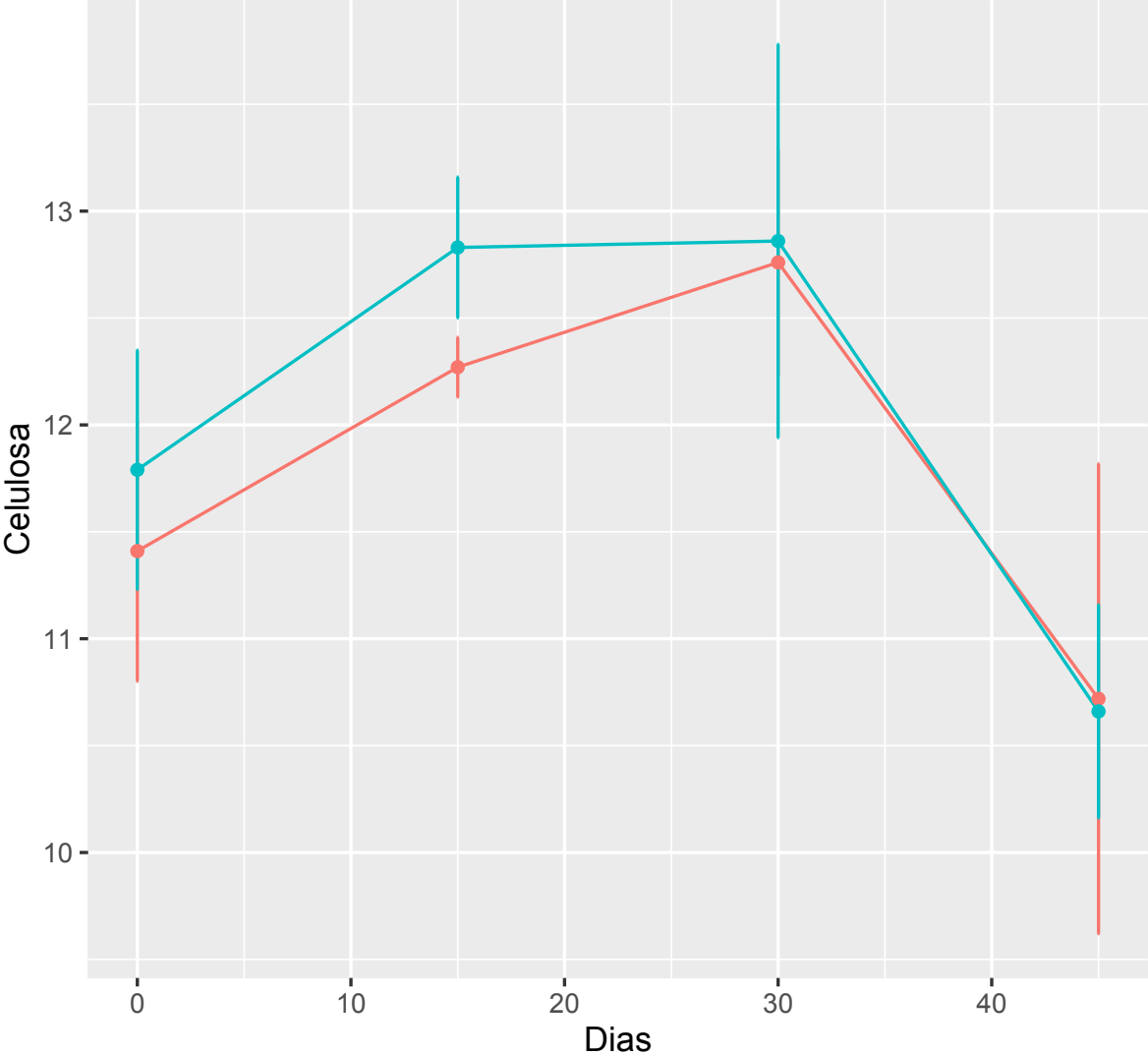
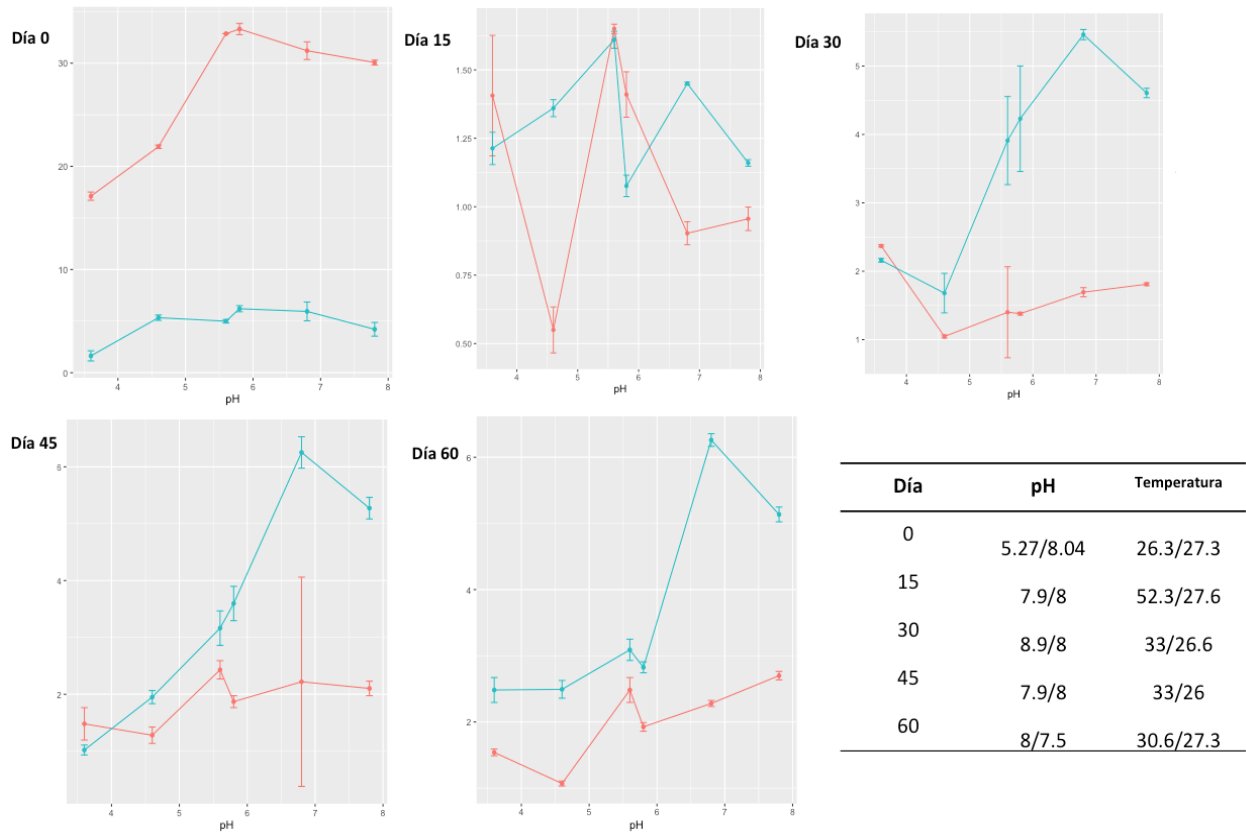


Figura 3. Actividad CMCasa en los dos tratamientos, y con los distintos pH evaluados. La actividad es expresada en UI, en donde 1 UI se define como la cantidad de enzima en 1 ml de solución que producirá una cantidad de azúcar reductor equivalente a 1.0 mg de glucosa, cuando se incuba por 30 min a 30 °C con 1 ml de Carboximetilcelulosa al 1%. Compostaje, Rojo; Lombricompostaje, Verde.



4. - CONCLUSIÓN

En este estudio, utilizando una mezcla de residuos constituidos por Residuos orgánicos de mercado con cascabillo de café, los procesos de compostaje y lombricompostaje tuvieron comportamientos físico-químicos similares a lo que se describe en la literatura, obviando que las características ambientales y geográficas de la región soconusco son diferentes.

Las actividades enzimáticas CMCasas mostraron mayor actividad en el proceso de lombricompostaje específicamente en extractos con pH neutro y ligeramente alcalino, asumimos que la presencia de lombrices tiene influencia directa sobre los residuos en transformación y las actividades enzimáticas, probablemente aumentando el número de comunidades microbianas con capacidad celulolítica, ó al exponer los componentes de los residuos a los consorcios microbianos cuando atraviesan el tubo digestivo de las lombrices.

Los complejos enzimáticos celulolíticos de ambos sistemas parecen tener mayor actividad a pH neutro o ligeramente alcalino. No obstante la actividad celulolítica en ambos procesos fue diferente, debido a factores bióticos, como la presencia de lombrices y la diversidad microbiana correspondiente; así como factores abióticos, como la temperatura y el pH que influyen en el curso de ambos procesos.

Los procesos de compostaje y lombricompostaje presentan atractivas ventanas de bioprospección de enzimas con utilidades biotécnicas deseadas, siendo las de mayor

actividad las obtenidas del lombricompostaje, mientras que las provenientes del compostaje parecen ser más tolerantes a cambios de temperatura y de pH.

5.- REFERENCIAS

Aira, M., Monroy, F. y Domínguez, J. (2007). Earthworms strongly modify microbial biomass and activity triggering enzymatic activities during vermicomposting independently of the application rates of pig slurry. *Science of the Total Environment*. 385, 252–261.

Anastasi, A., Varese, G.C., Marchisio, V.F. (2005). Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia*. 97 (1), 33-44

Antil, R., Raj, D., Abdalla, N. y Inubushi K. (2014). Physical, Chemical and Biological Parameters for Compost Maturity Assessment: A Review. “In Composting for Sustainable Agriculture”. Maheshwari, D. Springer

Bath, M.K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18, 355–383.

Batelaan J. G., Van Ginkel C.G. y Balk, F. (1992). Carboxymethylcellulose (CMC). In “The Handbook of environmental Chemistry”. 3F, 329-336. Springer.

Bayer, E., Chanzyt, H., Lamed, R. y Shoham, Y. (1998). Cellulose, Cellulases and Cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*. 8, 548-557.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2002). The Amino Acid Sequence of a Protein Determines Its Three-Dimensional Structure. In "Biochemistry 5th. Ed" 3, 195-234. W.H. Freeman, 2002.

Bhattacharya, A. y Pletchke, B. (2014) Thermophilic Bacilli and their Enzymes in Composting. . "In Composting for Sustainable Agriculture". Maheshwari, D. Springer

Brown, G.G., (1995). How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity?. "in The Significance and Regulation of Soil Biodiversity". Collins, H.P., Robertson, G.P. y Klug, M.J. Kluwer Academic Publishers. 247-269.

Butler, T. A., Sikora, L. J., Steinhilber, P. M. y Douglass, L. W. (2001). Compost Age and Sample Storage Effects on Maturity Indicators of Biosolids Compost. Journal of Environmental Quality. 30:2141–2148.

Caldwell, B. (2005). Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. Pedobiología. 49, 637—644.

Carbohydrate Active Enzymes database, CAZy, [<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>]

Claus, H. (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. Micron. 35, 93–96.

Copeland, R. A. (2000). Structural Components of Enzymes. In "Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism and data analysis" 3, 42-75. Wiley.VCH inc.

Di Blasi, C., Tanzi, V. y Lanzetta, M. (1997). A study on the production of agricultural residues in Italy. *Biomass and Bioenergy*. 12 (5), 321-331.

Domínguez, J., Edwards, C.A., Subler, S. (1997). A comparison of composting and vermicomposting. *Biocycle* (4), 57-59.

Domínguez, J. y Edwards, C. (2010). Biology and Ecology of Earthworm Species Used for Vermicomposting. "in *Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management*" by Edwards, C., Arancon, N. y Sherman, R. CRC Press. 27-40.

Drake, H. L. y Horne, M. A. (2007). As the worm turns: The Earthworm Gut as a Transient Habitat for Soil Microbial Biomes. *Annual Review of Microbiology*. 61, 169-189.

Edwards, C. y Bohlen, P.J. (1996). The Biology of Earthworms. "in *Biology and Ecology of Earthworms*". Chapman and Hall.

Epstein, E. (1997). Oxygen and Aeration. in "The Science of Composting". CRC Press. 22-32.

Finstein, M.S. y Morris, M.L. (1975). Microbiology of Municipal Solid Waste Composting. *Advances in Applied Microbiology*. 19, 113-151.

Fioretto, A., Di Nardo, C., Papa, S. y Fuggi, A. (2005). Lignin and cellulose degradation and nitrogen dynamics during decomposition of three leaf litter species in a Mediterranean ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*. 37, 1083–1091.

Forsyth, W. y Webley, D. (1948). The Microbiology of Composting II. A study of the aerobic thermophilic bacterial flora developing in grass compost. *Journal of Applied Microbiology*. 11 (1), 34-39.

Gan, Q., Allen, S. y Taylor G. (2003). Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling. *Process Biochemistry*. 38, 1003-1018.

Garg, P., Gupta, A. y Satya, S. (2006). Vermicomposting of different types of waste using *Eisenia foetida*: A comparative study. *Bioresource Technology*. 97, 391-395.

Hafiz A. (2005); Extraction of a protein. In “Principles and reactions of protein extraction, purification and characterization” CRC Press, 1-5.

He, Y., Xie, K., Xu, P., Huang, X. Gu, W., Zhang, F. y Tang, S. (2012). Evolution of microbial community diversity and enzymatic activity during composting. *Research in Microbiology* 164, 189-198.

Indicadores Estatales Agroeconómicos, Chiapas, 2011. SAGARPA.

Juturu, V. y Wu, J. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 33, 188–203.

Lung, A.J., Lin, C.M., Kim, J.M., Marshall, M.R., Nordstedt, R., Thompson, N.P. y Wei, C.I. (2001). Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in cow manure composting. *Journal of Food Protection*. (64), 1309–1314.

Lal, R. (2005). World crop residues production and implications of its use as a biofuel. *Environmental International*. 31, 575-584.

Laverack, M.S. (1963). Digestion and Metabolism. “in *The Physiology of Earthworms*”. International Series of Monographs on Pure and Applied Biology: Zoology. McMillan.

Lazcano, C., Gómez-Brandón, M. y Domínguez J. (2008). Comparison of the effectiveness of composting and vermicomposting for the biological stabilization of cattle manure. *Chemosphere*. 72, 1013–1019.

Ley general para la prevención y gestión integral de los residuos. (2003). Diario Oficial de la Federación. Consultado [23/11/2015]

Li, H., Xu, X., Chen, Y., 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 β -glucosidase. *Bioresource Technology*. 134, 51–58.

López-Méndez, C., Ruelas-Ayala, R., Sañudo-Torres, R., Armenta-López, C., y Félix-Herrán, J. (2013) Influencia de diferentes sustratos orgánicos en la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*). *Tecnociencia Chihuahua*. 7 (2), 81-87.

Lores, M., Gómez, M., Pérez, D., y Domínguez, J. (2006). Using FAME profiles for the characterization of animal wastes and vermicomposts. *Soil Biology and Biochemistry*. 38, 2993-2996.

Malacinski, G. M. y Freifelder, D. (1998). The Physical Estructure of Protein Molecules. In “Essentials of Molecular Biology, 4th Ed. 4, 56-75. Jones and Bartlett Publishers.

Meltzer, D. E. (2003). The Molecules from which we are made. In “Biochemistry: The chemical reactions of living cells”. 2, 47-150. Academic Press.

Raut, M.P., Prince-William, S.P., Bhattacharyya, J.K., Chakrabarti, T. y Devotta, S. (2008). Microbial dynamics and enzyme activities during rapid composting of municipal

solid waste: a compost maturity analysis perspective. *Bioresource and Technology*. 99, 6512-6519.

Reynolds, J.W. and M.J. Wetzel. 2004. Terrestrial Oligochaeta in North America north of Mexico. *Megadrilógica* 9(11): 71-98.

Rubin, E. (2008) Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454: 841-845.

Sanderson, E., Jaiteh, M., Levy M.A., Redford, K.H., Wannebo, A.V. y Woolmer, G. (2002). The Human Footprint and the Last of the Wild. *BioScience*. 52 (10), 891- 904.

Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.* 16(2), 14-46.

Ugwu, S. y Apte S. (2004). The effect of buffers on protein conformational stability. *Pharmaceutical Technology* (March) 86-113.

Vaclavik, V. (1998). Hortalizas y Frutas. "in *Fundamentos de Ciencia de los Alimentos*". Kluwer Academic.

Wilson, D. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*. 14, 259–263

Weaver, R.F. (2012). Proteomics. in Molecular Biology fifth edition, Chapter 25.2. McGraw Hill.

Yepes, M. S., Montoya, N. L. Y Orozco ,S. F. (2008). Valorización de Residuos Agroindustriales-Frutas-En Medellín y el sur del Valle del Aburrá, Colombia. Revista de la Facultad Nacional Agrónoma de Medellín. 61 (1), 4422-4431.

Zhu, N. (2007). Effect of low initial C/N ratio on aerobic composting of swine manure with rice straw. Bioresource Technology. 98, 9-13.