

**Universidad ORT Uruguay**  
**Facultad de Ingeniería**

# **Caracterización de Microorganismos Eficientes Nativos para su potencial uso en procesos de compostaje y biorremediación**

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

**Joaquín Martínez – 200905**  
**Camila Henares – 199337**

**Tutores: Inés Tiscornia y Mariana Umpierrez**

**2023**

## Declaración de autoría

Nosotros, Camila Henares y Joaquín Martínez, declaramos que el trabajo que se presenta en esta obra es de nuestra propia mano. Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el Trabajo Final de Carrera;
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotros;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Camila Henares



Joaquín Martínez

13 de marzo del 2023

## Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a nuestras tutoras MSc. Inés Tiscornia y PhD. Mariana Umpierrez por el apoyo brindado durante el proyecto, su guía y su paciencia.

A Felipe Machado, quien junto con nuestra tutora Mariana Umpierrez comprendieron en reiteradas ocasiones nuestra necesidad de asistir al laboratorio durante la tarde y la noche y nos aguantaron hasta el último minuto para que pudiéramos completar nuestros ensayos.

A nuestros correctores Eliana Nervi y el mismo Felipe, por darnos su tiempo y contribuir con la calidad de este trabajo.

A todas las personas del Laboratorio de Biotecnología ORT por su generosidad y disposición ante todas nuestras dudas y al MSc. Carlos Sanguinetti por brindarnos el espacio para desarrollarnos profesionalmente durante el transcurso de nuestra carrera. En especial a nuestro compañero Facundo Rocha, por compartir con nosotros sus conocimientos en materia de compost, así como su informe de pasantía en la materia y evacuar todas nuestras dudas con profunda amabilidad.

A su vez, a la Cooperativa Entrebichitos por los recursos materiales y académicos aportados, cuyos destacables valores fueron el puntapié inicial a la idea de este proyecto.

A nuestros amigos, los de toda la vida y los que hemos hecho compartiendo nuestra formación, por su apoyo incondicional en buenos y malos momentos.

Finalmente, a nuestras familias, pilar fundamental de nuestra motivación para continuar avanzando cada día hasta lograr todo objetivo que nos proponemos. Por no dejarnos dudar de nosotros mismos, por prestarnos la energía que a veces no teníamos, y por brindarnos el cariño y aliento que los caracteriza.

## Resumen

Los Microorganismos Eficientes Nativos (MEN) son un producto basado en un consorcio de microorganismos, los EM o *Efficient Microorganisms* por sus siglas en inglés, desarrollados en 1982 en Japón (1, 2). Fueron originalmente diseñados para su uso en agricultura orgánica con el objetivo de reducir el uso de pesticidas y fertilizantes químicos, pero han demostrado tener numerosas aplicaciones, como ser, la biorremediación de hidrocarburos derivados del petróleo y la mejora del proceso de compostaje (3, 4).

En Uruguay se han reportado problemas ambientales a pequeña y mediana escala asociados a la disposición inadecuada de residuos. En particular, las estaciones de servicio utilizan arena para contener pequeños derrames de combustible y lubricantes. La toxicidad de este residuo y la falta de procesos para su tratamiento, así como de espacio para llevarlos a cabo, deriva en que sean dispuestos en rellenos de seguridad (5). Por lo tanto, es de interés desarrollar un método de gestión in situ para disminuir su toxicidad .

Por otro lado, el manejo de residuos orgánicos es un desafío a nivel mundial y nacional. En Uruguay, se generaron aproximadamente 36,3kg de desperdicios alimenticios per cápita durante el año 2022 (6). El mal manejo y disposición de estos residuos provoca contaminación atmosférica por emisión de gases de efecto invernadero, así como de aguas superficiales y subterráneas. La promoción del compostaje doméstico es de especial interés ya que reduce el transporte de los residuos y su consecuente huella de carbono, aunque las condiciones ideales para llevar a cabo este proceso no siempre se pueden alcanzar de forma domiciliaria, llevando a mayores tiempos de compostaje. La inoculación con microorganismos se presenta como una alternativa para su aceleración y obtención de compost de mejor calidad (7).

En el presente trabajo se caracterizó un consorcio de MEN producido por una cooperativa local mediante técnicas microbiológicas y moleculares y se evaluó su potencial uso en biorremediación de hidrocarburos derivados del petróleo en arena utilizada para contener derrames, y su efecto como inoculante en compostaje doméstico.

En la caracterización del consorcio se identificaron 13 especies de 10 géneros distintos sobre los cuales se realizó una búsqueda bibliográfica. Se detectaron microorganismos pertenecientes al grupo PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizoorganisms* por su sigla en inglés), así como con funciones de biocontrol en agricultura. A su vez, se detectaron microorganismos reportados como degradadores de hidrocarburos (*Microbacterium oxydans*) y microorganismos relevantes para el compostaje doméstico, destacándose los géneros *Acetobacter* y *Streptomyces*, así como *Bacillus subtilis*, *Bacillus thurgiensis* y *Acidisoma cellulosilytica*. La potencialidad de éstos fue apoyada con ensayos de actividad lipasa y celulasa, ambos con resultados positivos.

Tanto el tratamiento de la arena contaminada como el proceso de compostaje fueron evaluados por medio de ensayos de ecotoxicidad, utilizando los modelos de plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) y lombrices (*Eisenia fetida*) para el caso de la arena, y alfalfa y col china (*Brassica rapa pekinensis*) para el compostaje. En el último, también se monitoreó el proceso por medio de indicadores de maduración: pH, conductividad eléctrica, porcentaje de humedad y producción de CO<sub>2</sub>.

En el caso de la biorremediación de hidrocarburos, se observó un aumento en la ecotoxicidad de la arena tratada, posiblemente debida a una degradación parcial de los mismos.

Por otro lado, el proceso de compostaje no se vio acelerado por su inoculación con MEN, aunque se pudo ver una mejora en la calidad del producto final.

Se recomienda evaluar la biorremediación de hidrocarburos en diferentes condiciones de aireación y tiempo. Además, se recomienda realizar técnicas adicionales de seguimiento de la degradación. Para el compostaje, se recomienda realizarlo por un período de tiempo mayor de forma de alcanzar su completa maduración.

Estos resultados abren el a un camino para la sistematización de los estudios de MEN a nivel de laboratorio y su potencial uso en mejora de procesos ambientales.

## Palabras clave

Microorganismos Eficientes Nativos, hidrocarburos derivados del petróleo, biorremediación, compost, ecotoxicidad, residuos.

## Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNg: Ácido Desoxirribonucleico genómico

ANCAP: Administración Nacional de Combustibles Alcohol y Portland

BLASTn: por sus siglas en inglés, *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*

CDC: por sus siglas en inglés, *Centers for Disease Control and Prevention*

CE: Conductividad Eléctrica

CES: por sus siglas en inglés, *Capillary Electrophoresis Sequencing*

Chl a: Clorofila a

Chl b: Clorofila b

CMC: Carboximetilcelulosa

DO: Densidad Óptica

DRO: por sus siglas en inglés, *Diesel Range Organics*

EM: por sus siglas en inglés, *Effective Microorganisms*

EPA: por sus siglas en inglés, *Environmental Protection Agency*

GC: por sus siglas en inglés, *Gas Chromatography*

GRO: por sus siglas en inglés, *Gasoline Range Organics*

IAA: por sus siglas en inglés, *Indole Acetic Acid*

IG: Índice de Germinación

IIBCE: Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

ITS: por sus siglas en inglés, *Internal Transcribed Spacer*

LB: por sus siglas en inglés, *Lysogeny Broth*

MEN: Microorganismos Eficientes Nativos

MPM: Marcador de Peso Molecular

MS: por sus siglas en inglés, *Murashige & Skoog*

NCBI: por sus siglas en inglés, *National Center for Biotechnology Information*

OECD: por sus siglas en inglés, *Organisation for Economic Co-operation and Development*

OEMs: por sus siglas en inglés, *Oil Eating Microbes*

PAH: por sus siglas en inglés, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*

PCR: por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*

PDA: por sus siglas en inglés, *Potato Dextrose Agar*

PGPR: por sus siglas en inglés, *Plant Growth Promoting Rhizoorganisms*

PH: por sus siglas en inglés *Petroleum Hydrocarbons*

PSI: por sus siglas en inglés *Photosystem 1*

PSII: por sus siglas en inglés *Photosystem 2*

PSB: por sus siglas en inglés, *Phosphate Solubilizing Bacteria*

ROS: por sus siglas en inglés, *Reactive Oxygen Species*

TPH: por sus siglas en inglés, *Total Petroleum Hydrocarbons*

TSA; por sus siglas en inglés, *Tryptic Soy Agar*

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UV: Ultravioleta

YPD: por sus siglas en inglés, *Yeast Extract Peptone Dextrose Agar*

## Tabla de contenido

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Introducción .....   | 11 |
| 1.1   | Microorganismos Eficientes Nativos.....  | 11 |
| 1.2   | Biorremediación de hidrocarburos derivados del petróleo .....  | 14 |
| 1.2.1 | El mercado del combustible .....   | 14 |
| 1.2.2 | Contaminación con PH.....  | 15 |
| 1.2.3 | Tratamiento de residuos contaminados con PH .....  | 17 |
| 1.2.4 | Evaluación de la efectividad de métodos de tratamiento.....  | 19 |
| 1.3   | Compostaje de residuos domésticos.....   | 25 |
| 2     | Objetivos.....   | 33 |
| 2.1   | Objetivo general: Caracterización de la comunidad de Microorganismos Eficientes Nativos y evaluación de potenciales aplicaciones ..... | 33 |
| 2.2   | Objetivos específicos:.....  | 33 |
| 3     | Metodología.....   | 34 |
| 3.1   | Cepas y reactivos generales .....  | 34 |
| 3.2   | Caracterización de MEN.....  | 34 |
| 3.2.1 | Recuento en placa y aislamiento de colonias .....  | 34 |
| 3.2.2 | Identificación de las colonias aisladas por métodos moleculares.....   | 35 |
| 3.2.3 | Caracterización enzimática .....   | 38 |
| 3.2.4 | Ensayo de crecimiento en plantas de alfalfa.....   | 39 |
| 3.3   | Evaluación de la capacidad de biorremediación de hidrocarburos por MEN .....   | 38 |
| 3.3.1 | Tratamiento de arena contaminada en microcosmos .....  | 39 |
| 3.3.2 | Ensayo de ecotoxicidad de arena contaminada con hidrocarburos en plantas de alfalfa ..   | 39 |
| 3.3.3 | Ecotoxicidad en lombrices.....   | 41 |
| 3.3.4 | Ensayo de ecotoxicidad de arena postratamiento .....   | 42 |
| 3.4   | Evaluación de la capacidad de compostaje de los MEN en residuos domésticos .....   | 43 |
| 3.4.1 | Compostaje .....   | 43 |
| 3.4.2 | Armado de los reactores de compostaje en <i>batch</i> .....  | 44 |
| 3.4.3 | Muestreo y análisis de los compost .....   | 45 |
| 3.5   | Análisis Estadístico.....  | 48 |
| 4     | Resultados y discusión.....  | 49 |
| 4.1   | Caracterización de MEN.....  | 49 |
| 4.1.1 | Caracterización enzimática .....   | 58 |
| 4.1.2 | Efectos de MEN en el crecimiento vegetal .....   | 60 |

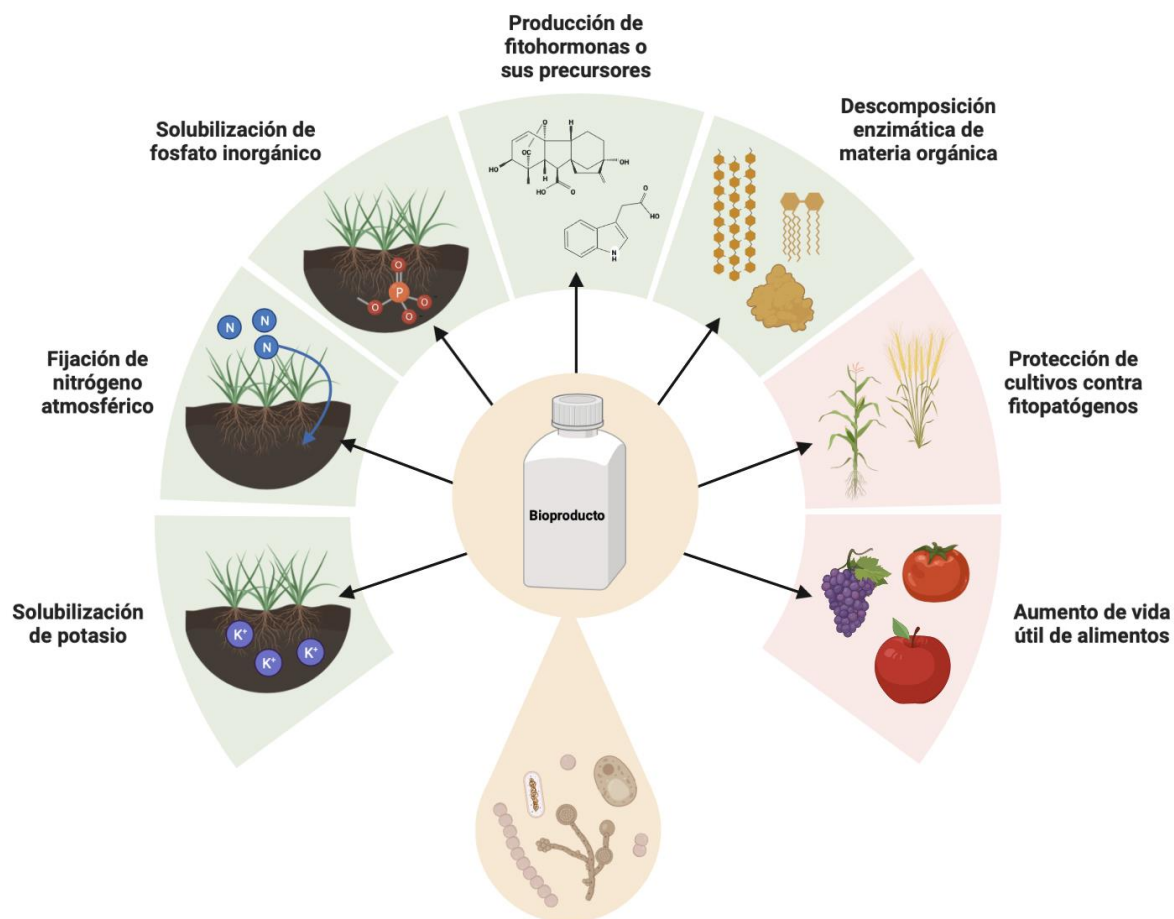
|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.2   | Evaluación de la capacidad de biorremediación de hidrocarburos con MEN .....                              | 60 |
| 4.2.1 | Evaluación de la ecotoxicidad de la arena contaminada en plantas de alfalfa.....                          | 63 |
| 4.2.2 | Ecotoxicidad de la arena tratada en microcosmos con MEN en plantas de alfalfa y lombrices de tierra ..... | 65 |
| 4.3   | Evaluación de la capacidad de compostaje de los MEN en residuos domésticos .....                          | 71 |
| 4.3.1 | Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> .....   | 71 |
| 4.3.2 | Evaluación del compost obtenido.....  | 72 |
| 5     | Conclusiones .....  | 78 |
| 6     | Referencias bibliográficas.....   | 79 |
| 7     | Anexos.....   | 85 |
| 7.1   | Anexo 1.....  | 85 |
| 7.2   | Anexo 2.....  | 86 |
| 7.3   | Anexo 3.....  | 86 |

# 1 Introducción

## 1.1 Microorganismos Eficientes Nativos

Los Microorganismos Eficientes (EM por su sigla en inglés) consisten en una mezcla simbiótica cepas de microorganismos naturales beneficiosos que se encuentran en suelos sanos. Fueron desarrollados por el Dr. Teruo Higa, microbiólogo y agricultor orgánico de la Universidad de las Ryūkyūs, Okinawa, Japón, en 1982 (2). Las primeras soluciones contenían unas 80 especies de 10 géneros diferentes, aislados de Okinawa y otros ambientes de Japón. Con el tiempo, la mezcla fue refinada para incluir únicamente bacterias ácidos lácticas, bacterias fotosintéticas, actinomicetos y levaduras. Estas son aisladas de suelos sanos para luego ser mezcladas en un medio basado en azúcar, que comúnmente consiste en melaza (8).

Fueron desarrollados en el marco de una investigación de microorganismos beneficiosos para encontrar métodos de agricultura más sostenibles. El Dr. Higa comenzó a promover el término agricultura natural, que no solo consiste en evitar el uso de fertilizantes químicos ni pesticidas, sino que lleva a la agricultura orgánica a un siguiente nivel con la dimensión agregada del uso de microorganismos benéficos que mejoren la calidad y salud del suelo (Figura 1) (9). El consorcio en cuestión basa su acción en la producción de metabolitos que pueden ser absorbidos por plantas circundantes, mejorar la calidad del suelo, o actuar como sustrato para incrementar la población de otros microorganismos benéficos en el mismo, logrando su cometido de forma directa e indirecta (10). Dichos metabolitos o la combinación de ellos resultan en la promoción del crecimiento vegetal y consecuente mejora de cultivos, así como en la protección de los mismos frente a fitopatógenos de diferentes niveles tróficos. Estas acciones se pueden traducir en que la función del consorcio EM puede ser la de biofertilizante, y también la de biopesticida (9).



**Figura 1:** Características funcionales de biofertilizantes y biopesticidas en un bioproducto comprendido por un consorcio microbiano. En verde, funciones biofertilizantes promotoras del crecimiento vegetal. En rosa, funciones biopesticidas.

Existen poblaciones de microorganismos con funciones específicas que se destacan en el campo de la agricultura natural, tales como los Rizoorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal o PGPR por su sigla en inglés. Los mismos promueven el crecimiento vegetal por medio de su asociación con el sistema radicular. Los PGPR se pueden subclasificar no excluyentemente dadas las 3 principales habilidades por las cuales son capaces de tener este efecto beneficioso: Microorganismos Fijadores de Nitrógeno, Bacterias Solubilizadoras de Fosfato (PSB por su sigla en inglés) y Rizobacterias Solubilizadoras de Potasio (11). Otra función destacable es la producción de hormonas vegetales tales como citoquinas, giberelinas, ácido indolacético y otras auxinas o sus precursores en el ambiente de la rizosfera (12).

Asimismo, el objetivo de eliminar el uso de pesticidas químicos se alcanza gracias a los llamados microorganismos de biocontrol. El funcionamiento se basa en el aprovechamiento de las interacciones microbianas de comensalismo, antagonismo y parasitismo encontradas en la naturaleza por medio de la bioestimulación o bioaumentación de los microorganismos en cuestión, de modo que contribuyan

con la prevención y eliminación de potenciales patógenos invasores mediante su capacidad de competencia (13).

Dentro de esta categoría se puede discernir entre microorganismos para biocontrol de patógenos pre y post cosecha. Los primeros tienen la función de proteger al cultivo desde su germinación, durante su etapa vegetativa y finalmente la fructificación (de corresponder), y los segundos son utilizados principalmente para la protección de frutas y granos luego de cosechados con el fin de extender su vida útil.

Además de sus aplicaciones en el campo de la agricultura natural, los EM han sido objeto de estudio en el campo de la biorremediación de variedad de residuos tanto orgánicos como inorgánicos.

La biorremediación se define como un proceso controlado de degradación de contaminantes ambientales por medio del uso de organismos vivos o sus derivados para lograr un producto estable (14). Suele ser más rentable, efectiva y socialmente aceptada que las remediaciones por métodos fisicoquímicos (15).

La simbiosis en la que convive el consorcio de EM les permite degradar materia orgánica de forma secuencial, siendo los productos del metabolismo de unos el sustrato de otros. La descomposición, según el objetivo de la aplicación, puede ser parcial o total. Los productos de degradación deseados pueden ser: materia orgánica biodisponible para otros organismos (en el caso de querer utilizar los residuos procesados en agricultura, jardinería, compostaje, alimento para animales), materia orgánica no contaminante (limpieza de fosas sépticas o graseras, residuos industriales con altos contenidos de materia orgánica), disminución de la concentración de un contaminante hasta alcanzar las cantidades permitidas para la liberación del material al ambiente (biorremediación de residuos contaminados con hidrocarburos) o una mineralización total del residuo inicial (biorremediación total sin valorización) (2).

En cuanto a residuos inorgánicos, como restos de metales pesados, la biorremediación apunta al uso de dichos metales como aceptores de electrones en su metabolismo o a la interconversión de las moléculas a formas más reducidas no tóxicas en el ambiente contaminado (15).

Existe una diferencia en la composición de diferentes preparaciones de EM que reside en el lugar donde se produzcan, ya que la vegetación, clima, y características del suelo varían. Es por esto, que se les agrega una letra N al final, para indicar que son nativos de un lugar: Microorganismos Eficientes Nativos (1).

En Uruguay, los MEN se comercializan desde principios de la década del 2000. La cooperativa Entrebichitos realiza producción y comercialización de MEN desde el 2015. Hoy en día cuentan con un catálogo de productos de soluciones ecológicas con aplicaciones en distintas áreas, como pueden ser la limpieza, el tratamiento de aguas, el hogar y el jardín. Desde el 2016 Entrebichitos ha trabajado con

investigadores y técnicos de Facultad de Agronomía y del Laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) en la caracterización de sus distintos productos (1). En estas caracterizaciones se compararon las distintas poblaciones encontradas en cada uno de los productos de la cooperativa con las poblaciones de EM originales, utilizando las técnicas de recuento en placa y secuenciación masiva de ADN. Según el informe realizado por el mencionado instituto, las comunidades microbianas presentes en los MEN de Entrebichitos están formadas principalmente por: bacterias heterótrofas, levaduras, lactobacilos, actinobacterias y una menor proporción de hongos filamentosos y bacterias fototróficas (16).

Tanto el desarrollo del producto a partir de hojas de un monte virgen utilizando y evaluando varios métodos de producción como su testeado se realizó junto a los niños de 6to año de la Escuela República Popular China, ubicada en el barrio de Casavalle, Montevideo, acercando a los niños a conceptos de agricultura sostenible y biotecnología de forma interactiva. Dentro del mismo barrio, el producto fue repartido entre vecinos para la solución de problemáticas frecuentes que estaban atravesando, como es el manejo y tratamiento de sus aguas residuales, también buscando fomentar la solidaridad, el respeto y la conciencia colectiva(1). Producto de estas acciones fue que nació la organización hoy llamada Entrebichitos. Sumado a las acciones sociales ya mencionadas, la cooperativa colaboró con el Plan Juntos, que aborda la situación de emergencia socio-habitacional de miembros de la población que se encuentran en estado de pobreza extrema con un enfoque de integración social y mejora de la calidad de vida, recorrió otras instituciones educativas compartiendo el conocimiento generado y visitó la Cárcel de Punta de Rieles con el mismo objetivo y brindando el producto para el uso en sus invernáculos (1, 17).

Dado que el proyecto de desarrollo y producción del consorcio por parte de los fundadores de la cooperativa tuvo desde su inicio en 2015 un abordaje social y ecológico destacable, el presente proyecto decidió ser enmarcado en el estudio de los MEN producidos por Entrebichitos.

## 1.2 Biorremediación de hidrocarburos derivados del petróleo

Los hidrocarburos derivados del petróleo (en adelante PH) son un grupo de compuestos obtenidos a través de la destilación del petróleo. Las moléculas de PH pueden ser volátiles o extraíbles según su peso molecular y su forma (alifáticas, monoaromáticas o poliaromáticas) (18).

### 1.2.1 El mercado del combustible

Los PHs se mezclan en distintas proporciones para lograr distintos tipos de combustibles fósiles, tales como la gasolina, el diésel, lubricantes, fuel-oil, etc., con adición de estabilizantes, refrigerantes, detergentes, dispersantes, inhibidores de la corrosión y más, dependiendo de la finalidad del producto (18). La composición de los combustibles varía según el crudo del que provienen y su proceso de refinado, pero comparten la presencia de todas las formas de PH (19).

Los combustibles fósiles se fabrican con el objetivo de generar energía por medio de combustión, la cual puede ser destinada a acondicionamiento térmico, generación de energía eléctrica, transporte y otros procesos industriales.

### 1.2.2 Contaminación con PH

Una contaminación no necesariamente lleva a la toxicidad del material contaminado. Una sustancia se considera tóxica cuando produce efectos adversos en un organismo vivo en función de la gravedad dichos efectos, la dosis requerida para producirlos, el tiempo de exposición y la vía de contacto (20). Es posible que un compuesto sea tóxico por una vía de contacto y no otra, o que el tiempo de exposición sea proporcional a la dosis incorporada al organismo.

En el caso de los suelos, los PH aromáticos son más tóxicos que los alifáticos, específicamente los de bajo peso molecular y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, por sus siglas en inglés). A su vez, dado que la toxicidad de un compuesto para un organismo es proporcional a su biodisponibilidad, las moléculas más hidrofílicas (o sea, las de menor peso molecular o cadena más corta) tienen una mayor toxicidad ya que se transportan junto con el agua consumida por organismos circundantes.

Por ejemplo, en humanos, los policíclicos (PAH) son considerados de alto riesgo, especialmente por inhalación. Por ejemplo, el CDC reporta que la inhalación de tolueno en concentraciones mayores a 100 ppm durante más de 7 horas puede causar daño permanente al sistema nervioso (19). Los efectos y niveles de toxicidad en otros organismos, especialmente de distintos niveles tróficos, varían dada su fisiología y metabolismo.

En Uruguay, las estaciones de servicio utilizan arena para absorber pequeños derrames de diésel, gasolina y lubricantes. Cada vez que se utiliza arena, se debe colocar en una tarrina de 200L hasta que dicha tarrina se llene, obteniendo así una mezcla de residuos de diferentes combustibles y aceites en la tarrina (5).

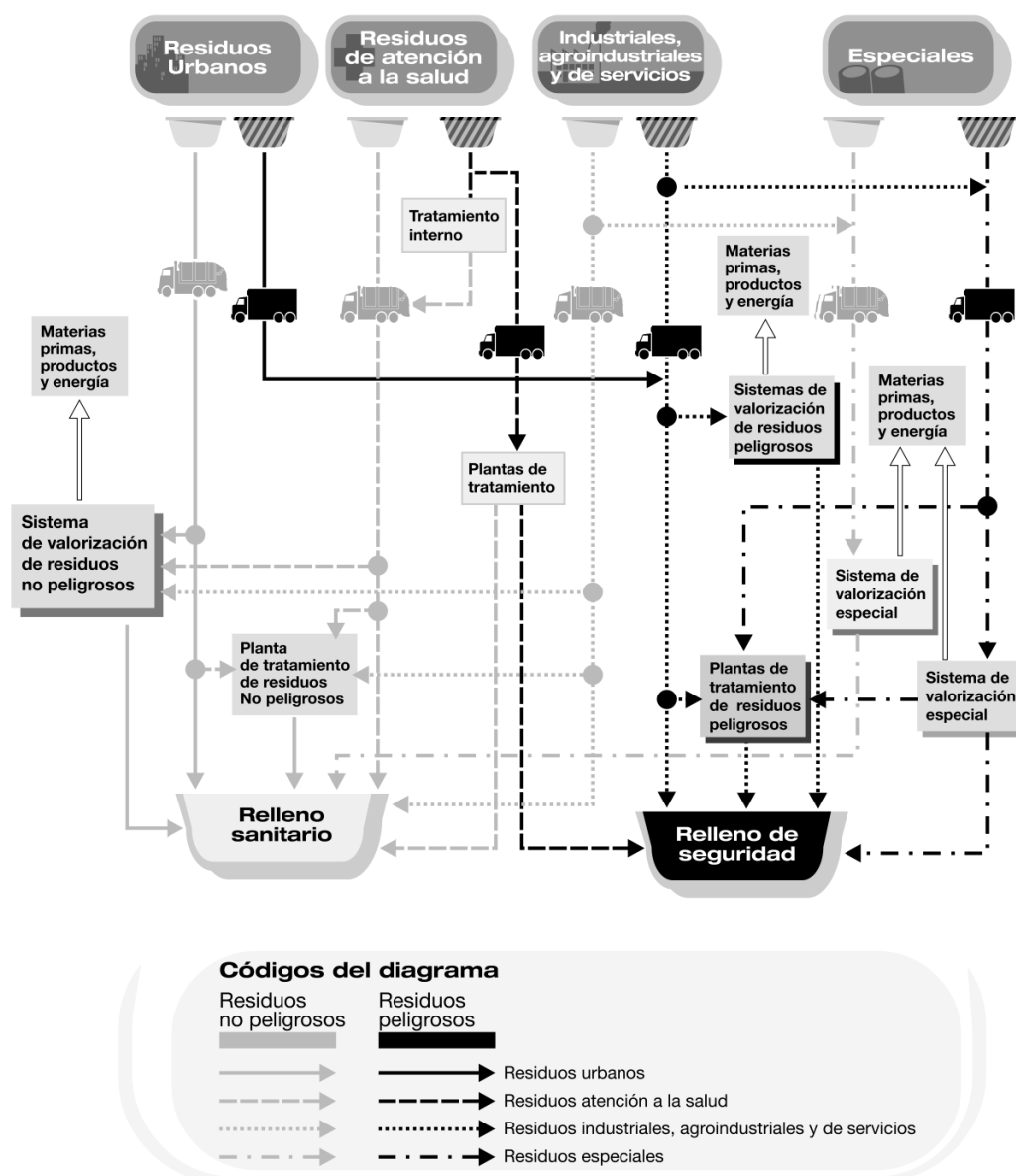
La arena contaminada con PH se considera un residuo Categoría I dada la clasificación del Decreto 182/013 (21). Según dicho decreto, todo generador de residuos sólidos de este tipo deberá contar con un plan de gestión de residuos sólidos que comprenda la generación, manejo interno, almacenamiento, transporte, reciclado, valorización, tratamiento y disposición final de la totalidad de los residuos sólidos generados por la actividad. En el caso de las gasolineras, la actividad es tercerizada a gestores autorizados con los debidos costos asociados (5).

A pesar de ser uno de los objetivos iniciales del Plan Nacional de Gestión de Residuos (5) para el 2027, la valorización de la mayoría de los residuos peligrosos y especiales en muchos casos no se encuentra lo suficientemente consolidada. Esta es una de las principales hipótesis que explican la razón por la

cual muchos residuos no se revalorizan: hasta la fecha de redacción de este trabajo se registran 114 empresas operadoras de residuos, y 172 empresas transportistas de residuos sólidos industriales y de servicios Categoría I, dispersando los residuos que, de ser tratados en mayores volúmenes, tendrían mejores márgenes de ganancia a la hora de valorizar y por tanto promoviendo la actividad. A su vez, no se observan los cambios esperados respecto al aumento de la eficiencia de la logística de transporte de residuos de Categoría I en el interior del país hacia las principales plantas de tratamiento ubicadas en el departamento de Montevideo, contribuyendo a la problemática previamente mencionada (6, 21).

En Uruguay, la empresa gestora de residuos Afrecor S.A. es la principal responsable del tratamiento acompañado de revalorización de residuos peligrosos Categoría I derivados del petróleo, principalmente provenientes de la industria química y del transporte terrestre y marítimo, incluyendo la gestión de residuos de estaciones de servicio. Aun así, el residuo en cuestión, de momento no se incluye en la operativa de revalorización de hidrocarburos. Esto sitúa a la arena contaminada como un residuo peligroso industrial, agroindustrial, o de servicios de Categoría I destinado a rellenos de seguridad como se puede observar en la Figura 2.

## Subsistemas de gestión integral de residuos



**Figura 2:** Subsistemas de gestión integral de residuos. Tomado de "Guía para la Gestión Integral de Residuos Peligrosos" (20).

Es, por tanto, de interés la desviación de estos materiales a otro destino dentro de su gestión mediante su tratamiento, logrando concentraciones de TPH consideradas como no tóxicas.

### 1.2.3 Tratamiento de residuos contaminados con PH

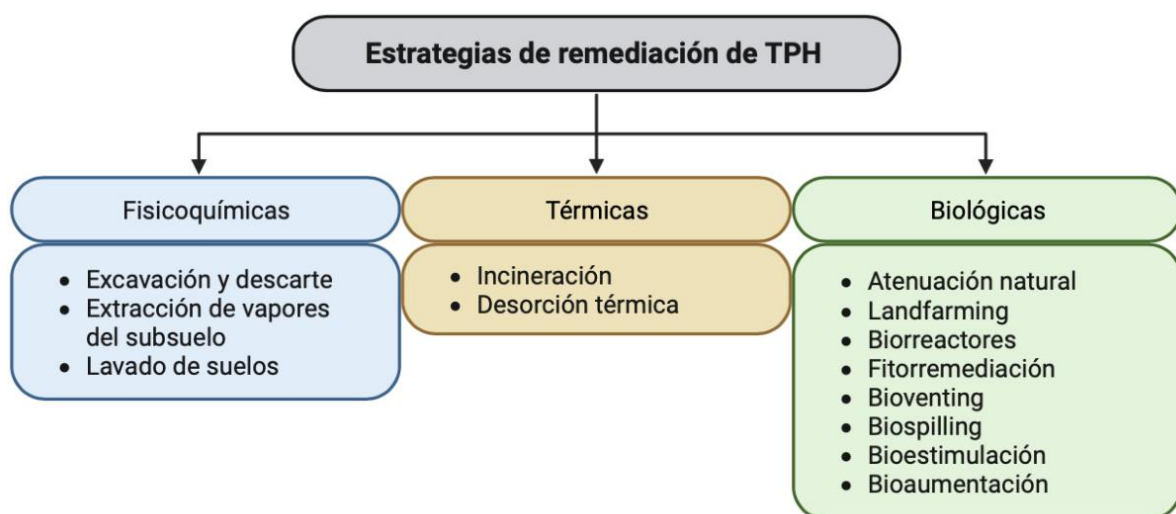
La degradación de hidrocarburos es un proceso oxidativo en el que tanto las moléculas alifáticas como aromáticas son transformadas en productos oxigenados, entre ellos: ácidos grasos, alcoholes, cetonas y fenoles. Posteriormente, sufren una segunda transformación por medio de alfa y beta oxidaciones sumadas al clivaje de anillos aromáticos restantes. De realizarse de forma completa, se puede alcanzar la mineralización total de ambas clases de hidrocarburos a dióxido de carbono y agua (22).

Existen numerosas formas de remediación de PH de un suelo contaminado. Éstas pueden clasificarse en 3 enfoques (físicoquímico, térmico o biológico), como se observa en la Figura 3, y a su vez pueden tener 2 objetivos: el tratamiento (que lleva a la degradación del contaminante) o la contención del material contaminado (23).

La principal estrategia de contención se considera de enfoque físicoquímico, y es conocida como “*Dig and Dump*”, traducida al español como “excavación y descarte”. Ésta no involucra la degradación del contaminante sino su traslado a un lugar considerado de menor riesgo o acondicionado para evitar su dispersión y consecuente contaminación del sitio. Es posible combinar esta estrategia con una posterior estrategia de tratamiento si la remoción del material contaminado es considerada urgente (23).

El enfoque térmico incluye las estrategias de incineración y desorción térmica, logrando una remediación total o parcial dependiendo de la concentración de hidrocarburos y las condiciones ambientales. El físicoquímico, por su parte, consta de las estrategias de extracción de vapores del subsuelo y lavado de suelos, también logrando una remediación de ambos tipos. Estos enfoques pueden ser no solo caros sino extremadamente perjudiciales para el medio ambiente, por ejemplo, por generación de productos secundarios en el aire (23).

Finalmente, dentro del enfoque biológico encontramos estrategias como la atenuación natural y el *landfarming* que, a pesar de ser efectivas, llevan mucho tiempo y se permiten para bajas concentraciones de contaminantes y en locaciones muy específicas, razones que llevan a algunos países a prohibirlas completamente. Luego podemos encontrar la remediación *ex situ* en biorreactores, efectiva pero costosa, la fitorremediación, *bioventing*, *biospilling*, bioestimulación y bioaumentación objeto de estudio en el presente trabajo (23).



**Figura 3:** Estrategias de remediación de TPH (hidrocarburos totales derivados del petróleo) (23).

La bioaumentación consta del agregado de un microorganismo o un consorcio de ellos con la capacidad, dado su metabolismo o la combinación de ellos, de acelerar la degradación que podría generarse por medio de atenuación natural en un medio contaminado (23).

A pesar de su eficiencia, es de suma importancia tener en cuenta la selección minuciosa de los microorganismos a utilizar, estudiando la interacción no solo entre ellos sino con los nativos del sustrato a remediar y su relación con las condiciones ambientales en las que van a actuar (temperatura, pH, disponibilidad de oxígeno, disponibilidad de agua y otros nutrientes necesarios para su crecimiento) de modo de resistir a posibles condiciones de estrés ambiental (23). A su vez, es también importante estudiar el ambiente en el que van a ser aplicados o al que el residuo contaminado sea liberado una vez finalizada la remediación, ya que en algunos casos puede haber limitaciones por microorganismos que resulten altamente eficientes como degradadores, pero sean patógenos en plantas, animales, o humanos, poniendo en peligro tanto al ecosistema como a la producción de alimentos, resultando en una amenaza para la salud.

Las bacterias capaces de degradar hidrocarburos y utilizarlos como fuente de carbono son, en ocasiones, llamadas bacterias oleofílicas u OEM por su sigla en inglés (*Oil Eating Microbes*). Se encuentran naturalmente en el ambiente, existiendo especies consumidoras de los 3 tipos básicos de hidrocarburos de forma no excluyente: alifáticos lineales, alifáticos ramificados y aromáticos (24).

La especificidad del proceso de degradación de cada microorganismo, dando lugar a capacidad de metabolizar los distintos tipos de PH, se relaciona con su metabolismo específico. Igualmente, tienen en común una característica de suma relevancia: la oxidación de las moléculas en presencia de oxígeno por medio de respiración aerobia. A su vez, suelen tener actividades enzimáticas lipasa, catalasa y deshidrogenasa (25).

A modo de ejemplo, en el trabajo de Feng et. al. del año 2022, se aisló un consorcio de bacterias a partir de suelo contaminado con PH, que posteriormente fue utilizado en la biorremediación del mismo suelo contaminado con un agregado de diésel. En dicho tratamiento alcanzaron una reducción de 44,5% de TPH tras un tratamiento de 30 días en comparación con una reducción de 12,2% por atenuación natural (sin el proceso de bioaumentación) (18).

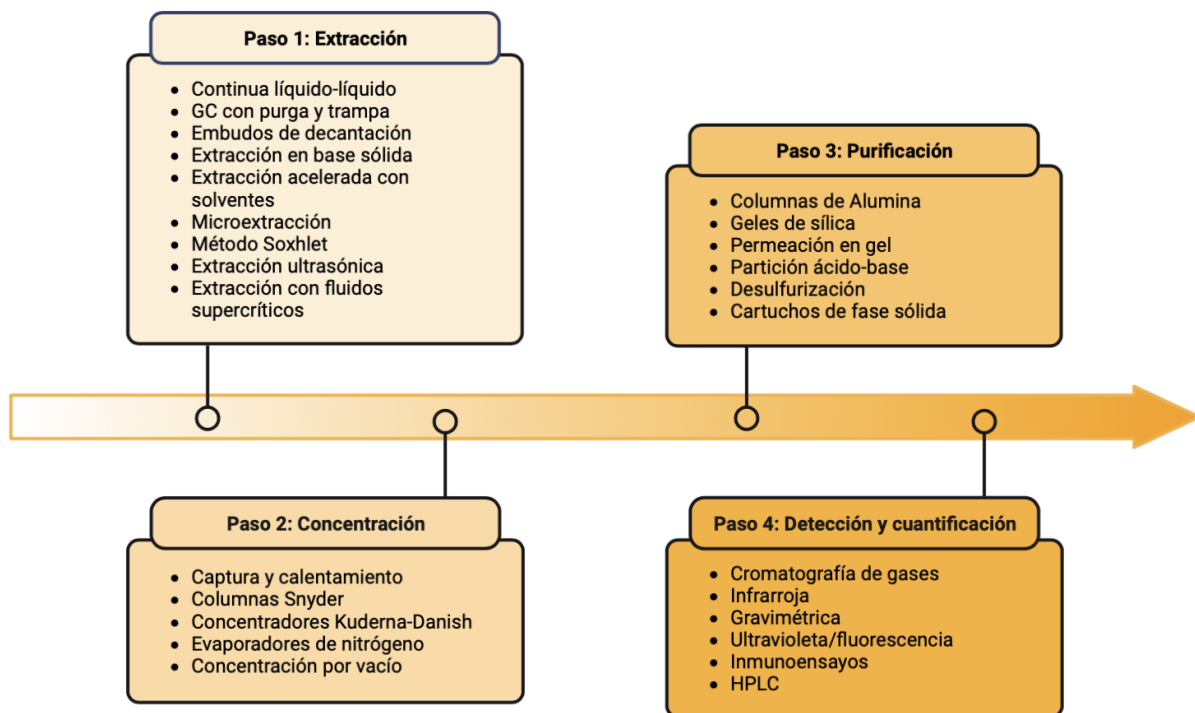
A su vez, existen reportes bibliográficos sobre microorganismos pertenecientes al consorcio de EM que presentan actividad degradadora de PHs. Estos resultados son alentadores para la biorremediación de hidrocarburos provenientes del petróleo por bioaumentación utilizando MEN como consorcio microbiano (26).

#### 1.2.4 Evaluación de la efectividad de métodos de tratamiento

En medios sólidos, específicamente suelos, este proceso puede ser monitoreado principalmente de 2 maneras: directa e indirecta.

#### 1.2.4.1 Evaluación directa de la efectividad de métodos de tratamiento

La forma directa consta de la toma de muestras del contaminante para la extracción de TPH y posterior cuantificación y/o caracterización de los mismos. Para esto se suelen combinar estrategias de extracción, concentración, purificación y detección o cuantificación dependiendo de cuán minucioso sea el estudio (Figura 4).



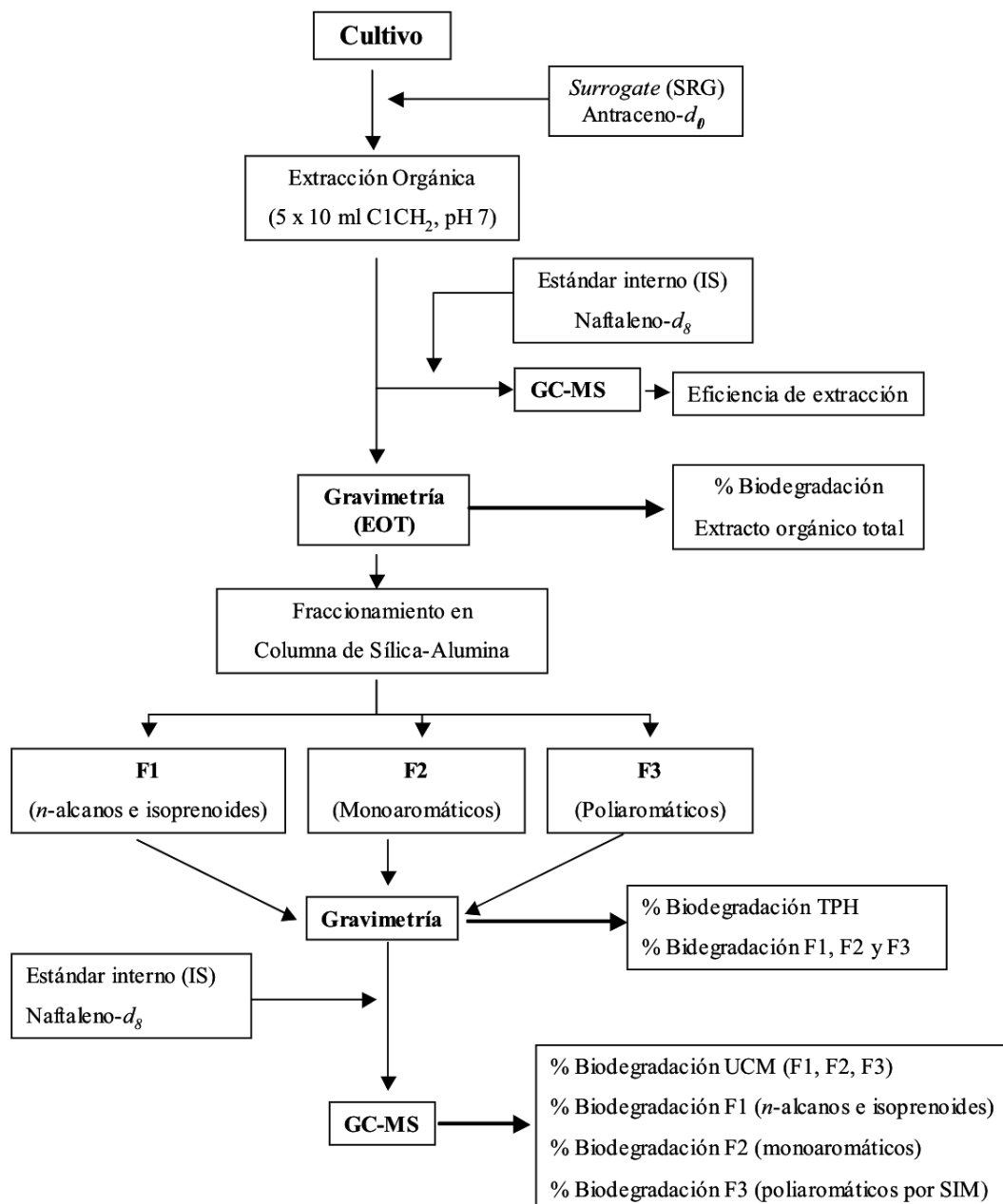
**Figura 4:** Métodos recomendados por la EPA-US para la extracción y caracterización de TPHs en muestras sólidas y acuosas (23).

La gravimetría suele ser elegida con el fin de cuantificar TPHs, ya que es la técnica más barata y sencilla, a pesar de que sus límites de detección son pobres y consume gran cantidad de tiempo en relación a las demás (23).

En cuanto a la caracterización, el *gold standard* es la cromatografía de gases (GC por su sigla en inglés), permitiendo no solo cuantificar el total sino identificar moléculas específicas de un rango entre C<sub>6</sub> y C<sub>36</sub>, además de separarlas en fracciones GRO (provenientes de gasolina) y DRO (provenientes de diésel). Este método es usualmente combinado con detectores de espectrometría de masas, conductividad térmica o ionización por llama (23). Una alternativa es la separación por otros tipos de cromatografías más sencillas, teniendo en cuenta la composición de las columnas utilizadas para lograr

el fraccionamiento deseado, que no es tan minucioso como el obtenido por GC (por ejemplo, fracción alifática y fracción aromática).

Un ejemplo de combinación de técnicas para lograr una caracterización parcial y cuantificación del producto de un proceso de biorremediación de TPH en suelo se puede observar en la Figura 5.



**Figura 5:** Diagrama de flujo de un protocolo de análisis químico para la cuantificación de porcentajes de degradación de diferentes fracciones de TPH. Tomado de “Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica” (27).

#### 1.2.4.2 Evaluación indirecta de la efectividad de métodos de tratamiento

Las formas indirectas de monitorear un proceso de remediación de TPH no involucran su cuantificación ni caracterización. Suelen ser más baratas, pero tienen la ventaja de aportar datos sobre el impacto del contaminante en el ecosistema, cosa que un método directo no logra. Esto se lleva a cabo mediante el análisis del efecto del contaminante en organismos habitantes del sitio contaminado utilizando ensayos de ecotoxicidad.

En el caso de los TPH suelen utilizarse métodos fisicoquímicos para la evaluación de niveles de contaminación de residuos o sitios donde ocurrieron derrames, aunque se sugiere que la implementación de ensayos de ecotoxicidad para el monitoreo de procesos de remediación puede ser más eficiente e informativa dado que los reglamentos que permiten la liberación del material remediado al ambiente suelen establecer niveles de TPH máximos, que no necesariamente significan una disminución de toxicidad en diferentes ecosistemas, dado el tipo de suelo, condiciones ambientales y fauna y flora que los habitan (28). Para tener resultados objetivos, es importante realizarlos en más de un organismo y apuntar a dos o más niveles tróficos (29).

Un ejemplo es el análisis de la evolución del microbioma del sustrato contaminado, que puede realizarse mediante cultivos microbianos a partir de muestras, o mediante la detección de metabolitos secundarios producidos por los microorganismos presentes (28).

Las enzimas predominantes en el proceso de descomposición biológica de hidrocarburos, producidas por los microorganismos circundantes, son la deshidrogenasa, principal responsable de procesos de oxidación de los compuestos orgánicos en el ambiente, la polifenol oxidasa, responsable de la degradación de hidrocarburos policíclicos específicamente, y la lipasa, cuya función es la hidrólisis de compuestos lipídicos para producir ácidos grasos libres y glicerol (30). La presencia de las mismas se utiliza frecuentemente como un indicador indirecto del proceso de degradación microbiana de compuestos derivados del petróleo en suelos contaminados, y la variación de su actividad evidencia la etapa de descomposición en la que el proceso se encuentra (25, 31, 32).

Por otro lado, son de destacar los ensayos de ecotoxicidad en organismos microscópicos. Los mismos constan de la observación del efecto del residuo en especies habitantes del ambiente donde se encuentra o se liberará el material contaminado.

Las técnicas se estandarizan dependiendo de las características del residuo y el contaminante en cuestión, evaluando la toxicidad de la muestra según distintos parámetros correspondientes al organismo utilizado, las cuales deben estar minuciosamente documentadas. En el caso de contaminaciones por hidrocarburos en suelo, destacan 2 organismos, de diferentes niveles tróficos: *Eisenia fetida* (lombriz de tierra) y *Medicago sativa* (alfalfa) (33, 34).

*Eisenia fetida* está ampliamente documentada como sensible a las contaminaciones por PH dado que puede interiorizarlo tanto a través de su cutícula externa como por ingesta acumulándose en sus tejidos. Es un organismo presente en variedad de locaciones, condiciones climáticas y tipos de suelo, siendo parte de la cadena trófica y la biósfera del mismo, por lo que su contaminación afecta directamente la disponibilidad de nutrientes y por tanto su correcto desarrollo. Concretamente, el efecto del contaminante ha sido estudiado tanto en diferentes concentraciones como tiempos, mostrando efectos macroscópicos como aumento de mortalidad, pérdida de peso y reducción parcial o total de la reproducción, útiles para su función en ensayos de ecotoxicidad. Dichos efectos fueron respaldados por estudios moleculares que mostraron inhibición de enzimas protectoras contra daño oxidativo por especies reactivas de oxígeno (ROS). En consecuencia, se origina daño en el material genético y por ende en la disminución de expresión de genes reguladores de oviposición y crecimiento y aumento en producción de proteínas involucradas en la diferenciación celular con potencial carcinogénico (33). A su vez, las lombrices de tierra suman un comportamiento diferencial en contacto con contaminantes en el que tienden a evitar el contacto con los mismos. Este tipo observaciones son estudiadas en los llamados *Avoidance behavior assays* por su nombre en inglés y también pueden ser clasificados como ensayos de ecotoxicidad (35). En conclusión, la medida de mortalidad, disminución de peso, capacidad de oviposición y test de *Avoidance behavior* resultan útiles como parámetros de ecotoxicidad en *Eisenia fetida*.

*Medicago sativa*, por su parte, está también profundamente caracterizada y su comportamiento frente a PH puede ser extrapolado a otras especies vegetales, ya que no solo muestran efectos por la internalización directa de PH (interacciones suelo-planta por absorción radicular y traslocación e interacciones aire-planta por volatilización de PHA e ingreso vía respiración) sino que también se observan efectos sumamente relacionados con la distorsión en el microbioma del suelo. Esto sucede dada la relación simbiótica entre los microorganismos circundantes y la planta en la rizosfera, que puede ser afectada por cambios fisicoquímicos del ambiente y tener consecuencias en el metabolismo vegetal (36).

La presencia de PH en suelo pueden cambiar su densidad, compactación, humedad, potencial emulsificante y viscosidad, alterando su porosidad y permeabilidad, por tanto, disminuyendo disponibilidad de agua y oxígeno, así como la biodisponibilidad de nutrientes como P y N. También aumentan el contenido de carbono, alterando la relación C:N y C:P, y provocan cambios en el pH, CE y salinidad del suelo. Todo esto afecta el comportamiento del sistema radicular, que tiende a extenderse en busca de agua y nutrientes biodisponibles con el objetivo de mantener la homeostasis en condiciones de estrés, así como el de toda la planta, limitando su crecimiento por falta de nutrientes y por tanto disminuyendo su biomasa (36).

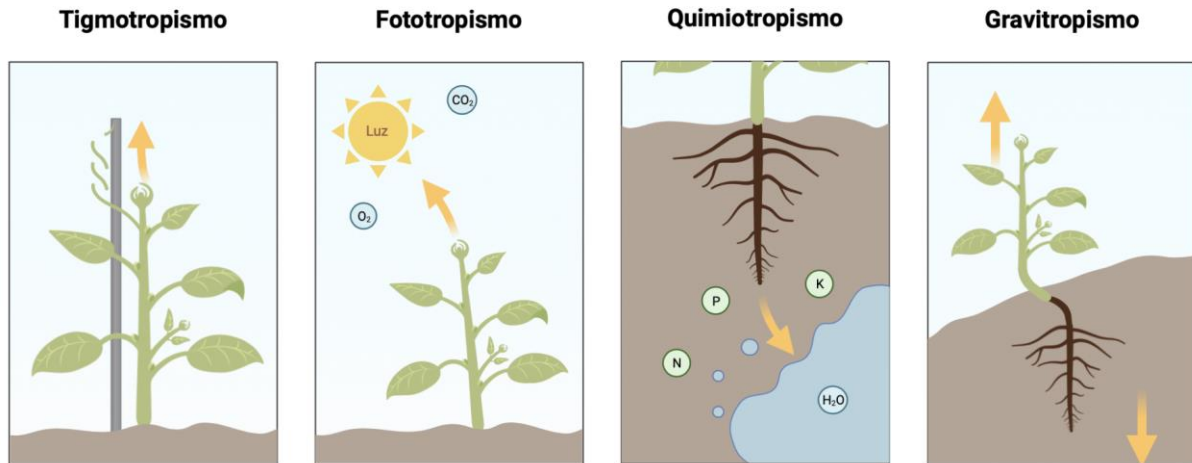
A todo esto, se suma la inducción de estrés oxidativo por exceso de ROS y disfunciones en la producción de las enzimas antioxidantes que las controlan y mantienen la homeostasis, llevando a crecimiento reducido, deformación foliar e inhibición de la germinación (36).

El sistema fotosintético es afectado tanto por estrés oxidativo como por PH hidrofóbicos acumulados en las membranas tilacoidales de los cloroplastos, deformándolos, afectando el funcionamiento del fotosistema II (PSII) y causando disrupciones en la ruta de transporte de electrones. Las ROS en concreto afectan la cantidad de pigmentos fotosintéticos tanto por daño a pigmentos preexistentes como por desregulación de la biosíntesis de clorofilas y carotenoides. Dentro del complejo antena del PSII, los carotenoides comprenden la primer barrera de protección de la planta contra estrés oxidativo provocado por exceso de luz, por lo que la presencia de ROS de otras procedencias puede inducir su producción. Los otros componentes de dicho complejo son las clorofilas a y b (Chl a y Chl b respectivamente), siendo su biosíntesis también desregulada por estrés oxidativo, así como por estrés hídrico, deficiencia de nutrientes o contaminación en el aire. A modo de evaluación de ecotoxicidad, es de relevancia no solo la cantidad total de clorofila (Chl a+b) sino también la relación cuantitativa de Chl a respecto de la Chl b (Chl a/b). Su alteración tiende a indicar una baja eficiencia de fotosíntesis, consecuente baja fijación dióxido de carbono y reducción en la generación de biomasa, así como aumento en la producción de etileno y etano llevando a necrosis en el tejido foliar (36, 37).

Los factores anteriormente mencionados llevan a diferentes análisis. Para empezar, se puede utilizar la biomasa total como un parámetro de rendimiento del crecimiento cuando se compara con la de un espécimen control, crecido en un medio sin contaminantes.

La relación cuantitativa de Chl a+b respecto de carotenoides (Chl a+b / Carotenoides) también es un indicador de senescencia, estrés y daño oxidativo del aparato fotosintético, ya que se puede traducir tanto en un aumento de la producción de carotenoides para protección contra ROS o destrucción de clorofila por los mismos (37).

También se pueden hacer deducciones más indirectas dado el tropismo de la planta (Figura 6): por ejemplo, la relación de masa de raíz: parte aérea. Esto da una idea de la biodisponibilidad de agua y nutrientes en el suelo, ya que la falta de estos promueve el quimiotropismo en el sistema radicular (36, 37). Por su parte, una inclinación al fototropismo puede indicar daño en el aparato fotosintético, observable a su vez en las relaciones entre pigmentos como la relación Chl a/b. Normalmente, la cantidad de Chl b tiende a disminuir si la fotoprotección de los carotenoides no es suficiente, de manera de disminuir la cantidad de electrones transferidos y proteger a la Chl a de toda la cadena fotosintética, tanto en el complejo antena del PSII, el centro de reacción del mismo y en todo el fotosistema I (PSI), aumentando dicha relación. En presencia de PH se ha observado, por otra parte, que un descenso en la misma puede ser un indicador del agrandamiento del complejo antena del PSII, que a su vez infiere que la planta está en necesidad de aumentar su tasa de fotosíntesis dado que su aparato fotosintético no cumple con sus necesidades, posiblemente frente a destrucción de Chl a por daños oxidativos (38).



**Figura 6:** Tipos de tropismo en plantas terrestres.

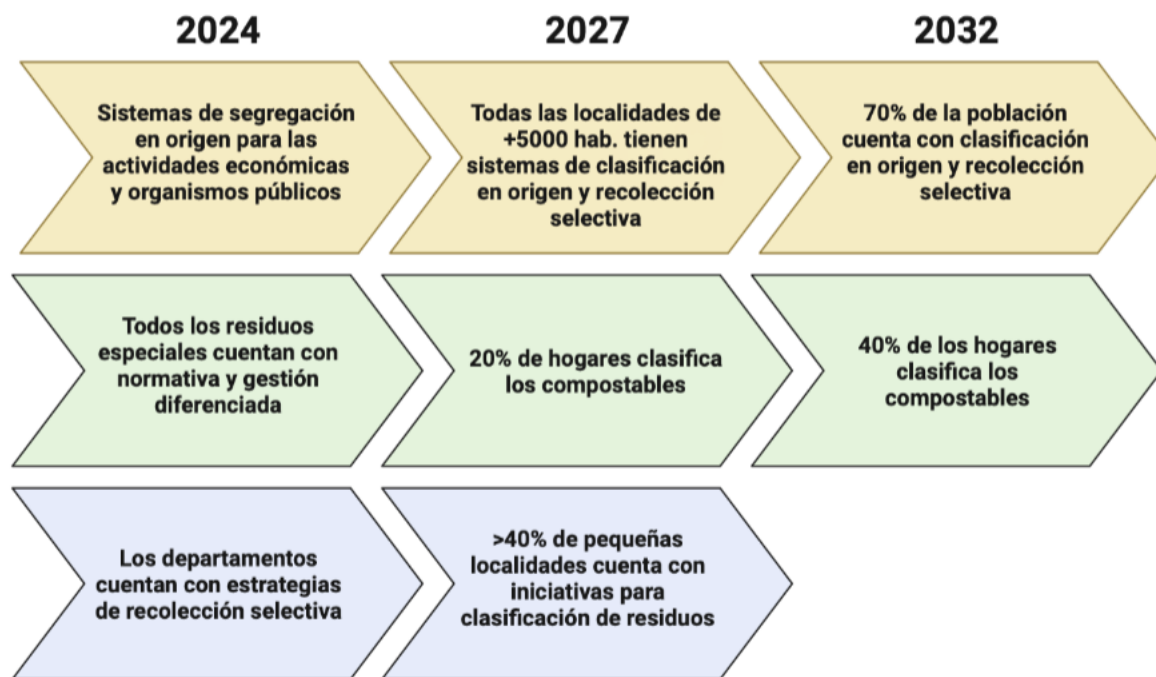
### 1.3 Compostaje de residuos domésticos

El manejo de residuos sólidos es un desafío importante a nivel mundial debido al crecimiento económico, al aumento de la población, la industrialización, el desarrollo del comercio y los nuevos modos de consumo y de vida, provocando un aumento de la cantidad de residuos sólidos generados (39).

Uruguay tiene una tasa de generación de residuos sólidos urbanos per cápita de 1kg/día, similar a los de países vecinos. Esto se traduce en un estimado de 4 millones de toneladas de residuos sólidos al año, de los cuales 1,5 millones de toneladas corresponden a residuos domiciliarios. De estos residuos, se estima que un 25% corresponde a desperdicios de alimentos, es decir, aproximadamente 375 mil toneladas. En el 2022, se estimaron 36,3kg de desperdicio de alimentos per cápita anual en los hogares (6).

Los residuos alimenticios tienen características físicas y químicas especiales, como un alto contenido orgánico, una estructura física flexible, alto contenido de sales y aceites, alto contenido de nitrógeno y baja relación entre carbono y nitrógeno (C:N). Además, contiene altas concentraciones de sustancias orgánicas fáciles de degradar, como azúcares, almidones, lípidos y proteínas, por lo que son residuos aptos para el compostaje (40). Pero a su vez, al tener una baja relación C:N y un alto nivel de humedad, se clasifican los residuos alimenticios como residuos activos. La alta presencia de nitrógeno provoca olores desagradables por su mineralización en amonio. El alto nivel de humedad limita la movilidad del oxígeno, provocando condiciones anaeróbicas que también aportan al mal olor (39). Si estos residuos no se disponen adecuadamente, provoca la generación de metabolitos secundarios no deseados y contaminantes para el ambiente, lo que afecta la atmósfera, a fuentes de agua y el suelo. Dentro de estos, el principal problema es la generación de gases de efecto invernadero, entre ellos el metano ( $CH_4$ ) y el óxido nitroso ( $N_2O$ ), que tienen un alto potencial de calentamiento global (41). Por estas razones, es de interés realizar un tratamiento de este tipo de residuos. Hoy en día, en Uruguay, este

tipo de residuo es principalmente dispuesto en vertederos, pero desde la creación de la Ley de Gestión Integral de Residuos (n° 19829) del 2019 y el Plan Nacional de Gestión de Residuos (Figura 7) del 2021, se comenzó a promover y divulgar la revalorización de productos y las metodologías para lograrlo, entre ellas el compostaje para aquellos residuos que permitan llevar a cabo este proceso, entre los que se encuentran los residuos alimenticios (6). En este marco, surgen iniciativas departamentales como Rivera Composta y el Plan de Limpieza y Gestión de Residuos de Canelones, que impulsan el compostaje domiciliario.



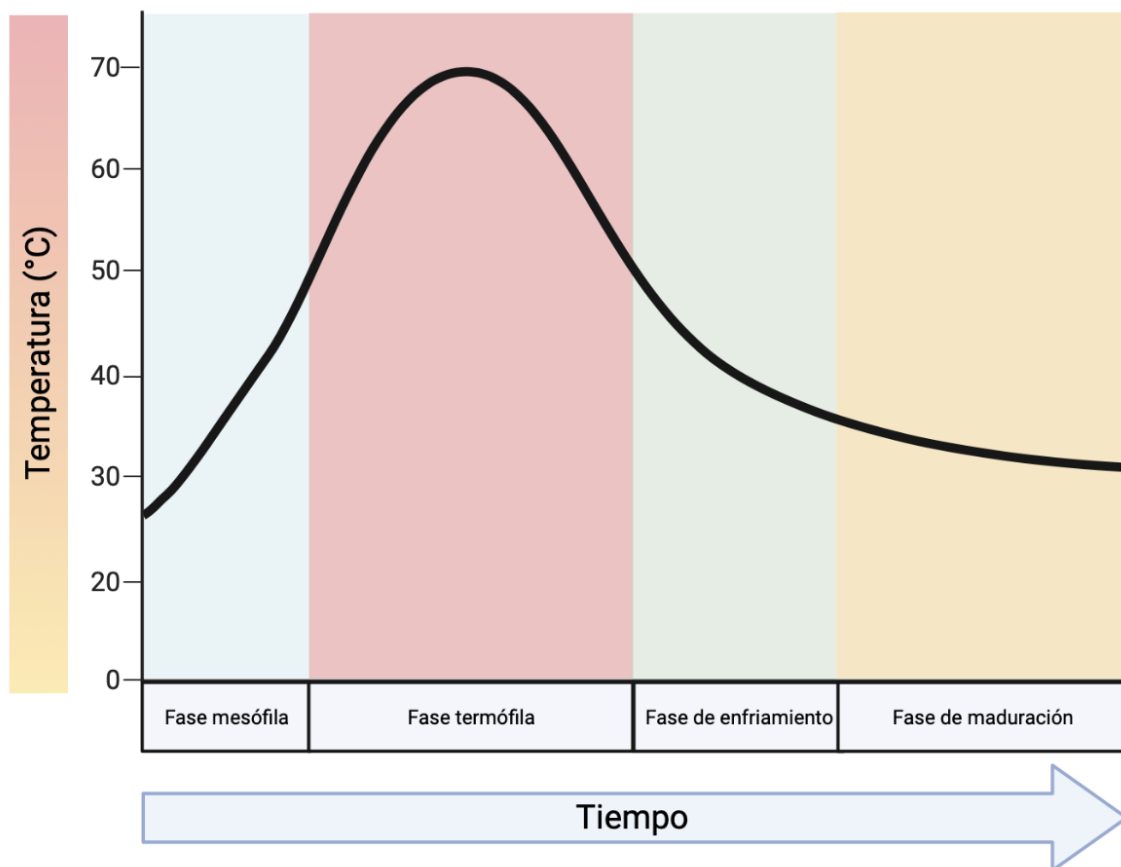
**Figura 7:** Objetivos del Plan Nacional de Gestión de Residuos en materia de valorización de residuos domiciliarios (6).

El compostaje es un proceso bioquímico, llevado a cabo por microorganismos, que convierte diversos compuestos de residuos orgánicos en sustancias relativamente estables que pueden utilizarse como enmienda del suelo o fertilizante orgánico. El proceso se realiza bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y aireación, para reducir al mínimo la emanación de gases contaminantes a la atmósfera (42). Es un método alternativo de eliminación de residuos que puede desviar los residuos de los vertederos, mitigar la contaminación de las aguas subterráneas, reducir la contaminación atmosférica y las emisiones de gases de efecto invernadero y generar productos útiles (40). El alto contenido de carbono orgánico y actividad biológica del compost lo hacen efectivo para aplicaciones como el control de la erosión y la revegetación (7). Pero, el uso de compost inmaduro o de baja calidad puede tener efectos adversos en plantas y el entorno del suelo (39).

En la agricultura sustentable, las prácticas de manejo promueven la recirculación de nutrientes por medio del compostaje de residuos orgánicos, lo cual minimiza los impactos en el medioambiente (42). El compostaje en el lugar donde se generan los residuos permite disminuir la emisión de gases de

efecto invernadero asociados al transporte de los residuos (39). Esto abarca no solo a granjas de producción, sino que a domicilios. Además, el compost puede ser utilizado para reemplazar fertilizantes minerales, lo cual reduce la huella de gases de efecto invernadero aún más. Además, el uso de fertilizantes minerales en el suelo durante un largo período de tiempo puede afectar su capacidad de mantener el crecimiento sano de las plantas y la producción de los cultivos (39).

El proceso de compostaje se da en cuatro fases consecutivas claramente marcadas a escala industrial (Figura 8): una fase mesofílica inicial, una fase termofílica, una fase mesofílica intermedia y una fase de finalización. Durante la primera fase, se inicia la descomposición de la materia orgánica y aumenta la temperatura, hasta superar los 42-45°C, iniciando la fase termofílica. Durante esta, se mantiene una alta temperatura debido a la alta actividad metabólica llevada por microorganismos endógenos. Cuando los compuestos biodegradables comienzan a mermar, la temperatura comienza a descender, para iniciar la fase mesofílica intermedia, la que permite el restablecimiento de las bacterias mesófilas. Cuando se alcanza una temperatura de 30°C aproximadamente, se inicia la fase de finalización, también conocida como de maduración. Durante esta última etapa el consumo de oxígeno cae y la materia orgánica continua en descomposición convirtiéndose en sustancias húmicas biológicamente estables, lo que representa el compost maduro o finalizado (43).



**Figura 8:** Cambios de temperatura durante el compostaje a nivel industrial.

En el compostaje domiciliario, a pequeña escala, es frecuente observar una pérdida de la temperatura durante el proceso. En un estudio realizado en compostaje doméstico en Inglaterra, se observa un aumento de temperatura en el inicio del proceso, que rápidamente decae y se mantiene en un rango mesófilo. Este efecto no impide el correcto compostaje, aunque sí provoca un tiempo de proceso más largo (44, 45).

Las condiciones favorables iniciales para un compostaje utilizando únicamente microorganismos incluyen: balance de nutrientes (expresado en la relación C:N), humedad y aireación (46). Por un lado, la relación C:N es uno de los factores más importantes, que no solo afecta el proceso de compostaje, sino que también tiene incidencia en las propiedades del producto final. El carbono sirve tanto como fuente de energía como componente elemental para los microorganismos, mientras que el nitrógeno es esencial para la síntesis de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. El rango óptimo para el compostaje de la mayoría de los casos es de entre 25 y 30:1. Esta relación asegura ingesta energética de carbono, mientras permite el rápido crecimiento de los microorganismos (46). Esta relación C:N se obtiene generando la mezcla correcta de residuos. En la Tabla 1 se muestran algunos valores representativos de ingredientes comunes del compost.

Por otro lado, la humedad es clave para que se dé el transporte de nutrientes a través de la membrana celular. Si los valores iniciales de humedad son muy bajos (menores a 30%), puede llevar a la rápida deshidratación del compost que pausa los procesos biológicos y se genera compost físicamente estable pero biológicamente inestable. Si los valores iniciales de humedad son muy altos (mayores a 80%), se pueden generar condiciones anaeróbicas. Si bien no hay un consenso universal de la humedad óptima del compost, ya que cada material tiene características físicas, químicas y biológicas únicas, se recomienda trabajar con una humedad en el entorno de 40-60%. Esto también se obtiene a partir de la mezcla original de ingredientes, aunque se puede ajustar mediante el agregado de agua (46). En la Tabla 2 se muestran valores representativos del contenido de humedad de algunos ingredientes comunes del compost.

**Tabla 1:** Relaciones de C:N de ingredientes comunes en el compost (45).

| <b>Materiales con alto contenido de carbono</b>   | <b>C:N</b> |
|---|------------|
| Hojas de otoño                                    | 40-80:1    |
| Aserrín   | 200-750:1  |
| Virutas de madera dura                            | 450-800:1  |
| Virutas de madera blanda                          | 200-1300:1 |
| Corteza de madera dura                            | 100-400:1  |
| Corteza de madera blanda                          | 100-1200:1 |
| Paja  | 50-150:1   |
| Papel mezclado                                    | 100-200:1  |
| Papel de periódico                                | 400-900:1  |
| Cartón corrugado                                  | 600:1      |
| <b>Materiales con alto contenido de nitrógeno</b> | <b>C:N</b> |
| Restos de vegetales                               | 10-20:1    |
| Restos de frutas                                  | 20-50:1    |
| Granos de café                                    | 20:1       |
|   |            |
| Pasto cortado                                     | 10-25:1    |
| Harina de algodón                                 | 10:1       |
| Sangre seca                                       | 3:1        |
| Estiércol de caballo                              | 20-50:1    |

**Tabla 2:** Contenido de humedad de ingredientes comunes del compost (45).

| <b>Materiales</b>    | <b>Contenido de Humedad<br/>(% de peso húmedo)</b> |
|----------------------|--|
| Frutas y vegetales   | 80-90  |
| Pasto cortado        | 80   |
| Hojas                | 40   |
| Aserrín              | 40   |
| Recortes de arbustos | 15   |

Por último, la aireación es otro parámetro clave, ya que la presencia de oxígeno es necesaria para que el proceso se de en condiciones aeróbicas. La aireación se ve afectada por la densidad aparente, la porosidad y la humedad de la mezcla. La densidad aparente es la medida de la masa de la mezcla en un volumen dado. Una densidad muy alta implica un incremento en la masa y un decrecimiento en la porosidad y el volumen de aire, mientras que una densidad baja significa un exceso en la aireación de

sustrato, que puede traducirse en un decremento de la fracción de agua disponible. La porosidad de la mezcla de compostaje debe permitir la degradación bajo condiciones aeróbicas. Se debe permitir un mínimo de 5% de oxígeno en la mezcla para mantener condiciones aeróbicas. Estas características pueden combinarse con una alta tasa de humedad para reducir el transporte de oxígeno y generar condiciones anaeróbicas no deseadas. No se recomienda el uso de partículas muy pequeñas, pues reducen el tamaño de los poros y se acomodan para compactarse más que partículas más grandes, provocando que la difusión de oxígeno por la mezcla sea más compleja. Se recomienda también evitar la compactación mecánica de la mezcla, para permitir que haya una porosidad suficiente. Aunque se tengan los recaudos necesarios, es posible que se generen compartimentos anaeróbicos durante el compostaje (46).

A su vez, hay parámetros que deben ser controlados durante el tiempo para asegurar que se esté dando correctamente el proceso y además conocer en que etapa del proceso se encuentra el compost. Entre estos parámetros se encuentran: la temperatura, el pH, la aireación y la humedad. Justamente, la generación de calor metabólico, de CO<sub>2</sub> y de agua son factores que evidencian la acción metabólica (46).

Por el lado de la temperatura, como ya se mencionó, esta cambia durante el proceso, aumentando al principio para luego de la etapa termofílica volver a descender. Aun así, se debe evitar las temperaturas muy altas, ya que esto puede ocasionar modificaciones químicas indeseadas en la materia orgánica. A su vez, como se mencionó, la temperatura no tiene por qué aumentar, muchas veces depende del sustrato que se esté compostando, pero la temperatura muy baja tampoco es deseable, ya que no se logra obtener la remediación deseada de los residuos. La temperatura alta se puede controlar por medio de la aireación o de la remoción de la mezcla (46).

El proceso del compostaje es relativamente indiferente al pH. Se ha visto que el proceso puede suceder en un rango muy amplio (con pH entre 3 y 11), sin embargo, el pH óptimo para la reacción es entre 5.5 y 8. Un pH cercano a la neutralidad es óptimo para el desarrollo de los microorganismos (40). Los cambios de pH dependen significativamente de los materiales originales y de posibles aditivos que se le agreguen a la mezcla. Es posible que se observe un descenso del pH en la primer etapa del proceso, debido a la generación de ácidos orgánicos y la volatilización del amonio inicial, y luego, tras la desaparición de materiales orgánicos fáciles de degradar y de la mineralización provocan un nuevo aumento del pH (46).

El objetivo final del proceso de compostaje es obtener un compost maduro y de calidad. La estabilidad y madurez del compost es esencial para su uso como una enmienda y fuente de nutrientes para plantas, ya que de no estar maduro puede provocar una serie de efectos indeseados tales como la disminución de la disponibilidad de oxígeno en raíces, aumento de temperatura en el sustrato y acumulación de ácidos orgánicos u otros metabolitos fitotóxicos en el mismo como puede ser el amonio (46).

Hay dos formas de definir la madurez de un compost. La primera es basada en la noción de la transformación de la materia orgánica inestable inicial en materia orgánica estable al finalizar el proceso. La segunda considera directamente el efecto del producto en plantas (46).

El grado de estabilidad está relacionado a la biodegradabilidad de la materia orgánica y el estado de humificación. Este puede ser estimado de varias formas. Una forma es mediante la medición de pH, el cual es característicamente bajo en compost inmaduro y tiende a valores entre 7 y 9 en compost maduro (46). Otra forma es la medida de la conductividad eléctrica (CE) que es un estimativo de los iones disponibles en el compost, el cual aumenta en el compost maduro debido a la liberación de sales solubles, alcanzando un aproximado de 2,19-9,32mS/cm (47). Y otra forma es la medida de la actividad biológica, la cual puede ser estimada por la producción de CO<sub>2</sub>, por ejemplo, el cual puede ser evaluado de diversas formas, y según la normativa actual en Uruguay (Resolución 141/018) alcanza la estabilidad cuando la generación de CO<sub>2</sub> es inferior a 8mg por día por gramo de materia orgánica (46, 48).

Como se mencionó, el grado de madurez también puede ser evaluado por el efecto del compost en las plantas. En este sentido, la madurez del compost está relacionado a la ausencia de daño en las plantas al utilizarlo en ellas. Es decir, el compost inmaduro tiene un efecto negativo en la germinación, crecimiento y desarrollo de las plantas. Se ha reportado incluso, que compost estable no necesariamente significa que esté maduro, ya que aún puede tener efectos inhibitorios o tóxicos en el crecimiento de las plantas (46). El efecto fitotóxico puede evaluarse utilizando especies modelo como pueden ser las plantas de alfalfa (*Medicago sativa*), como se describió en el punto 1.2.4, o en semillas de *Brassica rapa* (col china). Estas semillas son utilizadas en la determinación de la maduración del compost debido a su sensibilidad frente a compuestos fitotóxicos, siendo uno de los ensayos más sensibles y exactos para esto. Cuando el compost aún no es maduro y es fitotóxico, se observa un efecto inhibitorio en la germinación de las semillas, el cual puede ser dimensionado por el índice de germinación, que involucra la cantidad de semillas germinadas y el largo de las radículas obtenidas (49).

Si bien las comunidades microbianas presentes en los residuos pueden degradar satisfactoriamente los residuos si se les brindan las condiciones ambientales óptimas, no siempre se pueden lograr estas condiciones a nivel domiciliario llevando a mayores tiempos de proceso para alcanzar un compost maduro. Por esto, existen a nivel comercial diversos aceleradores de compostaje, siendo uno de estos la inoculación con microorganismos. La eficiencia de este método puede variar según las condiciones de compostaje. Se ha demostrado que los inoculantes microbianos muestran un aumento de la actividad enzimática del compost y promueven la degradación de materia orgánica, acelerando el proceso de compostaje (39).

Entre los inoculantes microbianos comerciales, se encuentran los EM, los cuales se han reportado que reducen el olor del compost, aumenta la tasa de degradación y producen un compost con mayor

contenido de nutrientes. Aunque se ha reportado que su efecto en compostaje de residuos domésticos a pequeña escala no es significativo (39).

Una especie que ha sido investigada como inoculante en el compost es *Bacillus subtilis*. Esta bacteria ha sido reportada como la especie dominante en el compost. Esto se debe gracias a que las esporas que produce logran sobrevivir en ambientes adversos como son altas temperaturas, pH bajos o altos. Además, secretan varias enzimas, como proteasas, celulasas, amilasas y fitasas, que compensan la falta de actividad enzimática de otros microorganismos presentes en el compost. En cuanto al compost generado, se reporta la obtención de este con ausencia de olores desagradables y descomposición más rápida, formando un compost puro y rico en nutrientes (50).

## 2 Objetivos

2.1 Objetivo general: Caracterización de la comunidad de Microorganismos Eficientes Nativos y evaluación de potenciales aplicaciones

2.2 Objetivos específicos:

- Caracterización de MEN: recuento e identificación de la comunidad microbiana y actividad enzimática.
- Evaluación de la capacidad de biorremediación de hidrocarburos por MEN mediante ensayos de ecotoxicidad.
- Evaluación de la capacidad de compostaje de MEN en residuos domésticos

### 3 Metodología

#### 3.1 Cepas y reactivos generales

Los Microorganismos Eficientes Nativos (en adelante referidos como MEN) se obtuvieron de la cooperativa Entrebichitos.

La cepa de *Bacillus subtilis* (en adelante referida como *B. subtilis*) se encontraba disponible en el laboratorio de biotecnología de la Universidad ORT. Esta había sido aislada previamente de un producto comercial utilizado para limpiar graseras.

Los reactivos generales se obtuvieron de Sigma (Saint Louis, EUA), Dorwill (Argentina) y de Merck (Alemania). Los reactivos de biología molecular se obtuvieron de New England Biolabs (EUA).

Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes: *Tryptic Soy Agar* (TSA, Sigma, preparado utilizando *Tryptic Soy Broth* 40g/L con agar 15g/L), *Potato Dextrose Agar* 39g/L (PDA, Milipore), *Yeast Extract Peptone Dextrose Agar* (YPD, compuesto por dextrosa 20g/L, peptona 20g/L, extracto de levadura 10g/L y agar 20g/L), *Murashige & Skoog* 4,4g/L (MS, Sigma), *Lysogeny Broth* (LB, compuesto por triptona 10g/L, NaCl 10g/L y extracto de levadura 5g/L), CMC sólido (compuesto por carboximetilcelulosa 10g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,2g/L, KNO<sub>3</sub> 0,75g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,02g/L, CaCl<sub>2</sub> 0,04g/L, extracto de levadura 2g/L, glucosa 1g/L y agar 1,5%(v/v)).

#### 3.2 Caracterización de MEN

Para la realización de los ensayos, se recibieron dos bidones de MEN cedidos por la cooperativa Entrebichitos ambos provenientes del mismo lote de producción.

##### 3.2.1 Recuento en placa y aislamiento de colonias

###### 3.2.1.1 Preparación de medios de cultivo

Previo al recuento en placa, se prepararon placas de Petri de los medios de cultivo TSA, PDA e YPD para abordar los distintos microorganismos que componen el consorcio de MEN. Dichos medios fueron previamente esterilizados en autoclave a 121°C por 21 minutos.

Se adicionó 1% de cloranfenicol (34mg/mL) al medio PDA para evitar el crecimiento bacteriano.

###### 3.2.1.2 Recuento en placa

Se realizó la metodología de recuento en placa, que consiste en realizar diluciones seriadas 1:10 y, en condiciones de esterilidad, extender 200µL de cada dilución en una placa. Dichas placas se incuban hasta que las colonias son apreciables para su recuento. Se utilizaron 3 medios distintos: TSA para bacterias, PDA con cloranfenicol para hongos filamentosos e YPD para levaduras.

En trabajos previos las concentraciones reportadas fueron de  $10^8$  UFC/mL para bacterias,  $10^4$  UFC/mL para hongos filamentosos y  $10^7$  UFC/mL para levaduras (16). Por ende, se realizaron diluciones en suero fisiológico estéril de: 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000 y 1:1.000.000 para bacterias, 1:10, 1:100 y 1:1.000 para hongos y levaduras. Todas las concentraciones se plaquearon por triplicado. Las incubaciones se realizaron en estufas de cultivo durante 48 horas a 30°C bacterias y a 25°C para levaduras, mientras que los hongos filamentosos se incubaron por 1 semana a 25°C.

### 3.2.1.3 Aislamiento y caracterización morfológica de colonias aisladas

Posterior al recuento en placa, se procedió al aislamiento de las colonias que se diferenciaban macroscópicamente unas de otras en cada medio utilizando la técnica de aislamiento por estriado para bacterias y levaduras, en medio TSA e YPD respectivamente; y tomando secciones de los hongos filamentosos observados en las placas de PDA, nuevamente en el mismo medio.

Las placas de colonias aisladas se mantuvieron en las mismas condiciones que las del recuento, es decir, 30°C aquellas de TSA y 25°C las de YPD y PDA. Una vez que se obtuvieron colonias visibles a simple vista, se observaron las mismas al microscopio. A su vez, se realizó una tinción de Gram a las colonias obtenidas en las placas del medio TSA.

Brevemente, la tinción de Gram se realizó fijando la muestra en un portaobjetos, con agua destilada, mediante la aplicación de calor. Luego se cubrió con cristal violeta y se incubó por 1 minuto. Posteriormente, se realizó un lavado con agua corriente y se cubrió la muestra con Lugol y se incubó por 1 minuto. Luego, se realizó un lavado con agua corriente y un lavado con etanol 95% durante 30 segundos. A continuación, se tiñó la muestra con safranina, mediante su aplicación e incubación por 1 minuto. Finalmente, se realizó un último lavado con agua corriente para luego secar la muestra y observarla al microscopio en aumento de 100X con aceite de inmersión.

Todas las colonias obtenidas se guardaron selladas con Parafilm en heladera para posteriores ensayos.

## 3.2.2 Identificación de las colonias aisladas por métodos moleculares

### 3.2.2.1 Extracción de ADNg de colonias aisladas utilizando kit comercial

La extracción de ADNg se realizó utilizando el kit *Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep* de *Zymo Research*, siguiendo el protocolo del fabricante, con la excepción de que la elución final se realizó en agua ultrapura libre de nucleasas, y no en el *buffer* correspondiente.

Brevemente, se colocaron entre 50 y 100mg de peso húmedo de cada muestra en tubos con perlas percutoras y se mantiene en agitación en un vortex de mesada durante 20 minutos. Luego, se centrifugó la mezcla obtenida y se tomaron 400µL de sobrenadante, que se colocaron en un filtro dentro de un tubo de recolección. Esto se centrifugó nuevamente y al líquido filtrado se le agregaron 1200µL de *buffer* de lisis. Esta mezcla se colocó en una columna para capturar el ADN y se centrifugó nuevamente. Luego se utilizó un *buffer* de prelavado y un *buffer* de lavado en la columna con el ADN capturado (se centrifugó la columna con ambos), para, finalmente, agregar 35µL de *buffer* de eluido a la columna y centrifugar la columna por última vez para obtener el ADN genómico puro.

### 3.2.2.2 Amplificación mediante PCR tiempo final de regiones de interés del ADNg

La identificación de las colonias aisladas se realizó amplificando regiones *barcoding* 16S, para bacterias, e ITS, para hongos y levaduras. Para esto se realizaron dos PCR a tiempo final.

Para la región 16S se utilizaron los *primers* 27F *forward* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R *reverse* (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

Para la región ITS se utilizaron los *primers* ITS1 *forward* (5'-TCCGTAGGTGAACCT-3') e ITS4 *reverse* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

La amplificación se llevó a cabo utilizando la enzima *Taq DNA Polymerase* de NEB (M0273S, 5U/µL) para la cual se preparó un *master mix*, cuya composición se detalla en la Tabla 3. Este *mix* se utilizó para ambos sets de *primers*.

**Tabla 3:** Composición del mix utilizado en la amplificación de las regiones 16S e ITS.

| Componentes              | X1 Reacción (µL) |
|--------------------------|------------------|
| Taq Buffer 10X           | 2.5              |
| dNTPs (10mM c/u)         | 0.5              |
| Primer forward (10mM)    | 0.5              |
| Primer reverse (10mM)    | 0.5              |
| MgCl <sub>2</sub> (25mM) | 1                |
| Taq (5U/µL)              | 0.25             |
| ADN molde                | 1                |
| H <sub>2</sub> O         | 18.75            |
| <b>Volumen total</b>     | <b>25</b>        |

El ciclado utilizado para la reacción consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos para desnaturalización, 55°C por 60 segundos para *annealing* y 68°C por 60 segundos para extensión. Finalmente se realizó una etapa de extensión final a 68°C por 5 minutos.

#### 3.2.2.3 Electroforesis en gel de agarosa

Se realizaron dos electroforesis en geles de agarosa. El primero se realizó para evaluar la calidad del ADN extraído en el punto 3.2.2.1. El segundo para confirmar el tamaño de los productos de la amplificación por PCR. Para eso se prepararon geles de agarosa 0.9% en buffer TAE 0.5X, con GoodView™ (SBS Genetech, HGV-2) como agente intercalante. Se utilizó el marcador de peso molecular *GeneRuler Ladder Mix* (*Thermo Scintific* #SM0331). Los geles se corrieron a 100V por 40 minutos en *buffer* TAE 0.5X y, una vez culminado, se visualizaron en transiluminador de luz UV.

#### 3.2.2.4 Secuenciación de colonias aisladas

El procedimiento utilizado se basó en el método de Sanger (51).

El mismo consiste en la realización de una reacción utilizando la muestra de ADN a secuenciar, una ADN polimerasa, nucleótidos de ADN y didesoxinucleótidos de ADN marcados. Se realiza una reacción similar a una PCR (con los mismos ciclos de desnaturalización, alineamiento, alargamiento) pero con la diferencia de que se obtienen fragmentos de ADN de distintos tamaños debido a que el alargamiento de los productos se corta prematuramente por los didesoxinucleótidos marcados. Una vez que finaliza la reacción, se corren los fragmentos obtenidos en una electroforesis capilar, donde los fragmentos más pequeños corren más rápido que los grandes. Al final del capilar, un detector reconoce el didesoxinucleótido marcado para cada fragmento y genera un cromatograma luego interpretado por un software que finalmente devuelve la secuencia.

Las muestras que presentaron una banda de amplificación del tamaño deseado en la electroforesis fueron enviadas a Macrogen Inc. para su secuenciación por electroforesis capilar (CES), obteniendo así las secuencias que fueron posteriormente analizadas.

#### 3.2.2.5 Análisis de las secuencias obtenidas

Las secuencias obtenidas mediante la secuenciación fueron descargadas y editadas utilizando el *software* BioEdit. Se depuraron los resultados en base a la calidad de las secuencias obtenidas. Posteriormente se realizó la alineación de la secuencia correspondiente al *primer forward* con el reverso complementario de la secuencia correspondiente al *primer reverse*, utilizando la función *ClustalW multiple alignment*. Por último, utilizando la herramienta *CAP contig assembly program*, se obtuvo la

secuencia consenso sin *gaps* ni nucleótidos degenerados. Finalmente, el *contig* obtenido fue utilizado para realizar un *BLASTn* en NCBI, para obtener así el organismo más aproximado a la secuencia obtenida.

### 3.2.3 Caracterización enzimática

#### 3.2.3.1 Actividad lipasa

Para comprobar la actividad lipasa de los MEN, se preparó un medio TSA  $\frac{1}{2}$  (20g/L) y se le agregó 1% de gliceril tributirato. Posteriormente se agitó hasta obtener una emulsión. Una vez obtenida la emulsión, se agregaron 15g/L de agar, se esterilizaron por autoclave por 21 minutos a 121°C, y, por último, se repartieron en placas de Petri.

Una vez obtenidas las placas de TSA con gliceril tributirato, se colocaron discos de papel de filtro de 1cm de diámetro, aproximadamente, embebidos en MEN y en MEN previamente concentrados al doble por centrifugación (10 minutos a 14000g). Las placas se mantuvieron en estufa de cultivo por 48 horas a 25°C. Como control positivo se utilizó al hongo *Acidomyces acidophilus*, del que se contaba con una colonia en el laboratorio y se había observado su actividad lipasa previamente.

#### 3.2.3.2 Actividad celulasa

Para comprobar la actividad celulasa de los MEN se prepararon placas de Petri con medio CMC sólido previamente esterilizado por autoclave por 21 minutos a 121°C en las que se colocaron discos de papel de 2cm de diámetro previamente esterilizados de la misma forma y posteriormente embebidos en MEN. Las placas se incubaron por 96 horas a 25 y 30°C. Ambas condiciones se evaluaron por duplicado.

A su vez, como control de actividad celulasa, se sembraron dos placas con medio CMC sólido en las que se colocaron discos de papel de 1 cm embebidos en una solución que contenía celulasa comercial (C1184, Sigma), preparada con 100mg de celulasa en un 1ml de buffer acetato (pH 5,0). Las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C.

Pasados los tiempos de incubación mencionados, se retiraron los discos de papel de cada placa y se inundaron las mismas con una solución de Rojo Congo 0,1% preparado con agua destilada durante 20 minutos. Luego de ese tiempo, las placas se lavaron con una solución de NaCl 1M por 20 minutos.

### 3.3 Evaluación de la capacidad de biorremediación de hidrocarburos por MEN

La arena contaminada por hidrocarburos se recibió por parte de la empresa Arocena S.R.L.. Se recibieron aproximadamente 15kg de arena que fue utilizada para absorber derrames tanto de diésel, gasolina y aceites de motor.

### 3.3.1 Tratamiento de arena contaminada en microcosmos

Los microcosmos se realizaron utilizando matraces de vidrio y tapones de goma para sellado hermético. Tanto los matraces como los tapones de goma fueron esterilizados por autoclave. Se evaluaron 3 condiciones de tratamiento, estas fueron: 80g de arena con 20mL de MEN (MEN 1/5), 80g de arena con 10mL de MEN y 10mL de agua destilada (MEN 1/10), y 80g de arena, 20mL de agua (Blanco de microcosmos)

Todas estas condiciones fueron mantenidas en estufa de cultivo, a 25°C, por 14 y 28 días. Cada condición fue evaluada por triplicado. Pasado este período se procedió a evaluar la ecotoxicidad en alfalfa y lombrices.

### 3.3.2 Ensayo de efecto de MEN en plantas de alfalfa

Como modelo de estudio para observar el efecto de la aplicación de MEN en cultivos vegetales, se utilizaron plantas de alfalfa (*Medicago sativa L.*).

#### 3.3.2.1 Medición de pH de MEN y turba

Previo a la realización del cultivo, se realizó una medición de pH del MEN, teniendo en cuenta que este podría afectar el crecimiento de las plantas. Para ello se agitó el bidón durante 5 minutos de manera manual y luego se tomaron 3 muestras de 30mL. Estas muestras fueron medidas con pHímetro.

A su vez, se realizó una medición de pH de la turba que posteriormente se utilizaría para sembrar las semillas de alfalfa. Para realizar esta medición se siguió el método 9045D de la EPA. Este método aplicado a suelos consiste en tomar 20 gramos de muestra, agregar 20mL de agua destilada y mantener en agitación continua por 5 minutos. Posteriormente, se deja sedimentar la muestra por 1 hora, para luego realizar la medida de pH del sobrenadante.

#### 3.3.2.2 Ajuste de pH

Previo a realizar el cultivo, se tomaron 20mL de MEN y se les ajustó el pH a 7 mediante el agregado de hidróxido de sodio (NaOH) 1M.

#### 3.3.2.3 Germinación

Por un lado, se esterilizaron las semillas de alfalfa utilizando una solución de hipoclorito de sodio 1%. Se colocaron las semillas y la solución de hipoclorito en un tubo cónico, y se mantuvieron en agitación durante 4 minutos. Posteriormente, se removió el hipoclorito y se realizaron 5 lavados con agua destilada previamente esterilizada por autoclave durante 21 minutos a 121°C.

Por otro lado, se preparó un medio MS con agar 9g/L. Este medio se esteriliza por autoclave durante 21 minutos a 121°C, para luego colocarlo en placas de Petri.

Finalmente, se colocaron 15 semillas esterilizadas en cada placa de Petri y se mantuvieron en zona de cultivo vegetal durante 48hs, protegidas de la luz.

#### 3.3.2.4 Cultivo

Se realizaron cultivos en 4 condiciones, utilizando macetas de 150 gramos de turba. Las condiciones evaluadas fueron: MEN 1/25 (2mL de MEN diluidos en 48mL de agua destilada), MEN 1/50 (1mL de MEN diluido en 49mL de agua), MEN 1/25 con pH ajustado a 7 (2mL de la solución preparada en el punto 3.1.6.3 diluidos en 48mL de agua). Además, se mantuvo un control de crecimiento, al que no se le aplicó MEN en ningún momento. Cada condición fue evaluada por triplicado.

Se plantaron 10 plántulas germinadas en el punto 3.3.2.3 en cada maceta. Posteriormente se realizó el riego con las condiciones mencionadas anteriormente. Las plantas se mantuvieron en sala de cultivo vegetal durante 14 días, a temperatura ambiente, 40-60% de humedad, con ciclos de luz/oscuridad de 16/8 horas.

Pasado este período de incubación, se midió largo de raíz y tallo de cada planta y biomasa, promediándose en “pool” por recipiente. Finalmente, se realizó el cálculo de la relación raíz: parte aérea y el rendimiento en base a la biomasa obtenida.

#### 3.3.2.5 Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

Posterior a la obtención de la biomasa aérea de cada “pool” de plantas, se procedió a la extracción y posterior cuantificación de pigmentos fotosintéticos de las mismas. Para esto, se colocó la biomasa en tubos de vidrio con tapa rosca y se les agregó 3mL de acetona 90%, macerando para ayudar al proceso de extracción de los pigmentos. Este preparado se mantuvo en heladera a 5°C por 24 horas y posteriormente se trasvasan 2mL del sobrenadante a tubos de 2mL. Finalmente se midió la absorbancia del sobrenadante a 662, 645 y 470nm, para obtener los valores de Chl a, Chl b y carotenoides, respectivamente. Las cantidades de Chl a, Chl b, y carotenoides se calcularon con las siguientes ecuaciones (52):

$$\begin{aligned}Chl a \left( \frac{mg}{L} \right) &= (11.75 \times A_{662}) - (2.35 \times A_{645}) \\Chl b \left( \frac{mg}{L} \right) &= (18.61 \times A_{645}) - (3.96 \times A_{662}) \\Chl a + b \left( \frac{mg}{L} \right) &= (7.79 \times A_{662}) + (16.26 \times A_{645}) \\Carotenoides \left( \frac{mg}{L} \right) &= \frac{1000 \times A_{470} - 2.27 \times Chl a - 81.4 \times Chl b}{227}\end{aligned}$$

Finalmente, se normalizó la concentración de cada pigmento obtenida en cada caso por la biomasa correspondiente, obteniéndose la concentración de pigmento por gramo de biomasa.

### 3.3.3 Ensayo de ecotoxicidad de arena contaminada con hidrocarburos en plantas de alfalfa

Inicialmente, se evaluó la toxicidad de la arena contaminada frente a plantas de alfalfa, para esto las plantas se expusieron a la arena al momento del crecimiento.

En primer lugar, se realizó una germinación de semillas de alfalfa siguiendo el mismo protocolo descrito en el punto 3.3.2.3.

Luego de la germinación, se realizaron diferentes mezclas de turba con arena contaminada. En una se armó una relación 80:20 masa: masa (turba: arena contaminada). En otra, la relación fue 80:10:10 (turba: arena contaminada: arena limpia). Finalmente, con el fin de tener un control de crecimiento, se hizo una mezcla de turba con arena limpia en relación 80:20 (turba: arena limpia). Posteriormente, se armaron macetas de 150g de sustrato en total, en las que se plantaron 10 plántulas por maceta. Cada condición fue evaluada por triplicado.

Las plantas se mantuvieron en sala de cultivo vegetal durante 14 días, a temperatura ambiente, 40-60% de humedad, con ciclos de luz/oscuridad de 16/8 horas.

Pasado este período de incubación, se midió largo de raíz y tallo de cada planta y biomasa, promediándose en "pool" por recipiente. Con los datos obtenidos, se realizó el cálculo de la relación raíz: parte aérea y el rendimiento en base a la biomasa obtenida. Además, se realizó la extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos como se describe en el punto 3.3.2.5.

### 3.3.4 Ecotoxicidad en lombrices

El método utilizado fue una adaptación del método "*Earthworm, Acute Toxicity Tests*" del año 1984 de la OECD (53). La especie de lombrices utilizada fue *Eisenia foetida*, más conocida como lombriz californiana.

El método requiere lombrices adultas, con un peso individual de entre 300 y 600mg. Para obtener dichos especímenes, se adquirieron dos núcleos de aproximadamente 250 lombrices, y se colocaron en un recipiente al que se le agregó la misma tierra que sería utilizada posteriormente para los ensayos. Al recipiente se le realizaron agujeros en la parte superior para permitir el intercambio de aire y en la parte inferior para permitir que lixivie el exceso de agua.

Las lombrices fueron alimentadas 1 vez por semana utilizando avena. Además, se mantuvo la humedad del sustrato en 35% aproximadamente mediante el agregado de agua destilada. Este reservorio de lombrices se mantuvo durante la realización de los ensayos.

Para el ensayo se utilizaron frascos de vidrio transparente, en los que se integró arena contaminada con la turba que fue utilizada para la granja de lombrices. La relación utilizada fue 1:5 (arena contaminada: turba). Por otro lado, se mantuvo, como control, un ensayo sin utilizar arena, únicamente turba. Cada condición fue evaluada por triplicado.

Se colocaron 10 lombrices por contenedor, que fueron previamente pesadas en *pool* para conocer la biomasa inicial total por frasco. Los contenedores se cubrieron con gasa, para permitir el intercambio de aire con el exterior, y se mantuvieron en otra contención más.

Los frascos se mantuvieron a temperatura ambiente, con ciclo de iluminación de 16:8 (luz: oscuridad), por 14 días. Pasado este período, se evaluó la mortalidad de las lombrices, contando cuantas lombrices vivas se encontraron. Para evaluar si una lombriz está viva, esta debe responder a un estímulo mecánico en uno de sus extremos. Si una lombriz no está presente, esta se considera como muerta. A su vez, se pesó la biomasa de las lombrices sobrevivientes en *pool*, para obtener así la pérdida porcentual de biomasa por lombriz al compararlo con la biomasa inicial.

### 3.3.5 Ensayo de ecotoxicidad de arena postratamiento

Se realizaron estos ensayos de ecotoxicidad, en ambos modelos biológicos, tras los dos tiempos de tratamiento, es decir, tras 14 y 28 días de tratamiento.

Se tomó la arena de cada microcosmos, y se mezcló con turba, en relación 1:5 masa: masa (arena contaminada: turba). Estas mezclas fueron utilizadas posteriormente en ambos ensayos de ecotoxicidad.

Además, se prepara una mezcla con arena no utilizada para absorber hidrocarburos y turba, que sirve como control de crecimiento, ya que iguala la permeabilidad del agua en el sustrato.

#### 3.3.5.1 Ensayo en plantas de alfalfa

En primer lugar, se realizó una germinación de semillas de alfalfa siguiendo el mismo protocolo descrito en el punto 3.3.2.4.

Luego, se utilizaron las mezclas descritas en el punto anterior para preparar una maceta por mezcla. Además, se prepararon 3 macetas de control de crecimiento con la mezcla descrita en el punto anterior. Se plantaron 10 plántulas por macetas, las cuales se mantuvieron en sala de cultivo vegetal, a

temperatura ambiente y 40-60% de humedad, con ciclo de luz: oscuridad de 16:8 horas, durante 14 días.

Finalmente, se midió largo de raíz y tallo de cada planta y biomasa, promediándose en “pool” por recipiente. Con los datos obtenidos, se realizó el cálculo de la relación raíz: parte aérea y el rendimiento en base a la biomasa obtenida. Además, se realizó la extracción y cuantificación de pigmentos fotosintéticos como se describe en el punto 3.3.2.5.

### 3.3.5.2 Ensayo en lombrices

Para el ensayo en lombrices, se siguieron los lineamientos del punto 3.3.4, utilizando las mezclas preparadas en el punto 3.3.5, además de 3 frascos con mezcla de control de crecimiento.

## 3.4 Evaluación de la capacidad de compostaje de los MEN en residuos domésticos

### 3.4.1 Compostaje

El compostaje se llevó a cabo utilizando residuos orgánicos domésticos, turba comercial y papel sin tinta. Se evaluó la capacidad de mejora del proceso de compostaje de los MEN y se la comparó frente a *Bacillus subtilis*, cuya capacidad está documentada en bibliografía (54), y al método tradicional de compostaje, sin el agregado de microorganismos.

#### 3.4.1.1 Curva de crecimiento de *Bacillus subtilis*

Para trabajar con *B. subtilis* se utilizó el medio LB líquido y, a su vez, se preparó LB agar 15g/L. Ambas preparaciones se esterilizaron por autoclave a 121°C durante 21 minutos.

Se recibió una placa de *B. subtilis* en placa de Petri, que se repicó a placas de LB agar para su cultivo en estufa a 25°C durante 48 horas. Posteriormente, al confirmar el crecimiento en las nuevas placas estas fueron guardadas en heladera a 4°C hasta el momento de su uso.

Posteriormente, a partir de las placas recuperadas, se prepararon preinóculos en medio LB líquido, utilizando tubos cónicos de 15mL estériles, que se dejaron en agitación continua a 200rpm, 25°C por 24 horas. Pasado este período, se le midió la densidad óptica a 600nm (DO<sub>600</sub>) para calcular el volumen necesario para inocular 100mL de medio con una DO<sub>600</sub> de 0.05. Hecho este cálculo, se realizó el inóculo y se inició el cultivo, utilizando un matraz de 500mL esterilizado previamente por autoclave. El cultivo se realizó con agitación continua a 180rpm, a 25°C, durante 24hs. Se tomaron muestras de 1mL cada 1 hora para medir la DO<sub>600</sub>. La curva se realizó por duplicado, y las medidas de DO<sub>600</sub> fueron realizadas utilizando celdas de 500µL en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1800.

Una vez que se obtuvo la curva de crecimiento, al conocerse la fase exponencial del cultivo, se realizó un nuevo cultivo de *B. subtilis* en LB líquido, y se tomaron muestras de 2mL en dicha fase. A dichas muestras se les midió la  $DO_{600}$  y se las sembró en placas de LB agar para realizar un recuento en placa. En base a la bibliografía consultada, se realizaron diluciones para plaquar y tener cantidades de colonias apreciables para el conteo. Estas fueron de 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000.

#### 3.4.1.2 Pre-inóculo de *Bacillus subtilis*

El pre-inóculo de *B. subtilis* fue realizado utilizando medio LB líquido. Se inició en tubos cónicos de 15mL, a partir de una colonia provenientes de las placas previamente obtenidas. Se mantuvo en agitación constante a 200rpm y 25°C *overnight*. Posteriormente, utilizando este pre-inóculo, se inocularon 4 matraces de 500mL que contenían 200mL de medio. Estos se colocaron en agitador orbital, a 200rpm y 25°C por 9 horas. Finalmente, estos cultivos fueron utilizados para inocular uno de los reactores de compostaje.

#### 3.4.2 Armado de los reactores de compostaje en *batch*

Se preparó una mezcla inicial de 7500 gramos que luego fue seccionada en 3 reactores, cada uno con 2500 gramos, que fueron tratados de 3 maneras distintas. El primero de los reactores fue tratado utilizando un inóculo de *B. subtilis*, el segundo con inóculo de MEN y el tercero no fue tratado con ningún microorganismo.

La relación C:N ideal para el compostaje es de 30:1, por lo que se realizaron cálculos para determinar las proporciones de residuos a incorporar. Con los datos de la Tabla 1, se realizó un cálculo aproximado de la cantidad de residuos de frutas, verduras y papel que se debía agregar. Se utilizó un 92% de residuos de frutas y verduras, lo que aporta un 18:1 (C:N), a la mezcla y un 8% de papel, lo que aporta un 12:1 (C:N). Estos valores se alcanzan al multiplicar la relación de C:N de cada residuo con el porcentaje de este agregado al compost. Se considera que la tierra no aporta en esta relación. Los residuos orgánicos fueron procesados utilizando una procesadora de cocina, mientras que el papel fue triturado utilizando una trituradora de papel de oficina.

Por otro lado, la humedad debe mantenerse en el rango de 40-60%. Si bien hay valores de referencia mostrados en la Tabla 2, este parámetro depende mucho más del estado de los residuos que se utilizan. Por esto, la humedad se midió en el momento y fue ajustada mediante la aplicación de turba comercial hasta alcanzar valores menores al máximo ideal de 60%.

Se realizaron inóculos concentrados del cultivo de *B. subtilis* descrito en el punto 3.4.1.2 y de 800mL de MEN, para no agregar líquido que aumente la humedad de los reactores. Para obtener los concentrados, se separaron los cultivos en tubos cónicos de 50mL para realizar una centrifugación a

3000rpm durante 5 minutos. Posteriormente, los pellets obtenidos fueron resuspendidos en 100mL de los mismos medios en los que se encontraban previamente.

Los reactores se mantuvieron por 30 días, mezclando diariamente para favorecer la aireación, y se les realizaron controles fisicoquímicos y de madurez que se detallan a continuación.

### 3.4.3 Muestreo y análisis de los compost

Se tomaron muestras de cada uno de los reactores cada 5 días. A todas las muestras se les determinó humedad, pH y CE. Y a las muestras de 10, 20 y 30 días además se les realizaron los ensayos de madurez descritos en esta sección.

#### 3.4.3.1 Determinación de humedad

La determinación de humedad de los reactores de compost se realizó a partir del agua presente en los mismos. Esto se realizó tomando 10g de muestra que se colocan en un tubo cónico de 50mL. Se registra el peso inicial y se mantiene en estufa de secado a 75°C hasta la obtención de un peso uniforme. La humedad relativa se calcula como el cociente entre el agua libre perdida y la masa inicial de sustrato. El ensayo se realiza por triplicado en cada reactor.

#### 3.4.3.2 Determinación de pH y Conductividad Eléctrica (CE)

Tanto la determinación de pH como de CE se realizaron en base al protocolo del manual "Métodos de Análisis de Compost", con algunas modificaciones (55).

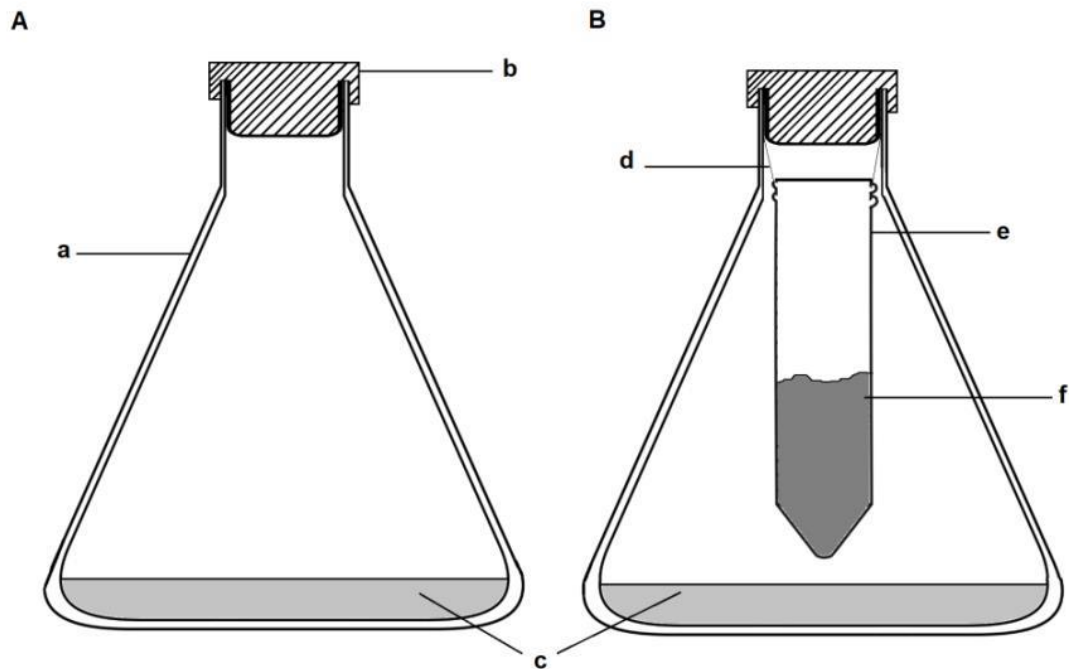
Se tomaron 5g de compost en base seca, utilizando como relación la humedad de la muestra previamente determinado en el punto 3.4.3.1, y se realizó una dilución 1:5 (masa: volumen) en agua destilada. La mezcla se agitó durante 20 minutos en agitador y posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 5000G. Finalmente, se registró la medida de pH utilizando un pHímetro, mientras que para la de CE se empleó un conductímetro. Ambos aparatos fueron calibrados previamente. El muestreo y medición se realizaron por triplicado.

#### 3.4.3.3 Evaluación de producción de CO<sub>2</sub>

Para la determinación de la producción de CO<sub>2</sub> de cada muestra se utilizó el principio de captura con hidróxido de sodio (NaOH) por respirometría descrito en "*Test methods for the examination of composting and compost*", basado a su vez en Anderson (56).

Empleando un matraz Erlenmeyer de 500mL y un tapón de goma, se construyó una trampa de CO<sub>2</sub>. Dentro del matraz se colocaron 20mL de NaOH 1M y 25g de compost contenida en un tubo cónico de

50mL suspendido por un hilo y sin tapar. La concentración del NaOH se determinó por titulación contra patrón primario, siendo este ftalato ácido de potasio. Como blanco y control, se utilizó el mismo sistema sin el agregado de compost. Todos los sistemas se realizaron por duplicado, y se incubaron en estufa a 34°C durante 96hs. Los sistemas son diagramados en la Figura 9.



**Figura 9:** Trampa diseñada para la determinación de la producción de CO<sub>2</sub> en las muestras analizadas. **A.** Blanco. **B.** Trampa con muestra. **a.** Matraz Erlenmeyer. **b.** Tapón. **c.** Solución de NaOH 1M. **d.** Hilo. **e.** Tubo cónico. **f.** Muestra de compost. Tomado de Rocha, F (2022) (57).

Al culminar el período de incubación, se retiraron los tubos cónicos que contenían el compost y se añaden 20mL de cloruro de bario dihidrato 0.5M (BaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O) a la solución de NaOH. Luego, se titula la mezcla utilizando ácido clorhídrico 0.1M (HCl), cuya concentración fue previamente determinada por titulación contra patrón secundario siendo este el NaOH 1M titulado en primera instancia. Se añadieron 3 gotas de fenolftaleína como indicador de pH para la titulación.

Finalmente, el CO<sub>2</sub> producido se calcula en relación con el gasto de HCl como miligramos de CO<sub>2</sub> producido por día por gramo de compost en base seca, utilizando la siguiente ecuación:

$$CO_2(mg \cdot g_{ps}^{-1} \cdot d^{-1}) = \frac{(B - M) \cdot C \cdot 2.2 \times 10^4}{Pi \cdot \%Hum \cdot t}$$

Donde:

- B = Gasto de HCl en el blanco (L)
- M = Gasto de HCl en la muestra (L)
- C = Concentración del HCl utilizado en la titulación

- $2.2 \times 10^4$  = Factor de conversión en mg de CO<sub>2</sub> por mol de HCl
- Pi = Peso inicial de la muestra
- %Hum = Porcentaje de humedad de la muestra
- t = Número de días que se incubo la muestra

#### 3.4.3.4 Ensayos de fitotoxicidad para evaluar la madurez del compost

La madurez del compost fue evaluada en el tiempo mediante ensayos de fitotoxicidad en plantas. Para esto se utilizaron dos especies con objetivos distintos: col china (*Brassica rapa subsp. pekinensis*) para evaluar el efecto en la germinación y alfalfa (*Medicago sativa L.*) para evaluar el efecto en el crecimiento.

##### 3.4.3.4.1 Ensayo de germinación en semillas de col china

El protocolo utilizado fue adaptado de Gariglio et al. (49). Primeramente, se toman 25g de compost y se diluyen en 50mL de agua destilada. Esta mezcla se agita por 6 horas en agitador automático. Pasado este período, se centrifuga la mezcla a 8000rpm durante 10 minutos y se extrae el sobrenadante. A partir de este se preparan diluciones equivalente al 0, 50 y 100% en agua destilada. Se inoculan 5mL de cada solución en placas de Petri en las que se colocaron previamente 10 semillas de col china sobre un disco de papel de filtro. Cada concentración fue evaluada por duplicado.

Las placas se incuban durante 48 horas a temperatura ambiente y en oscuridad total. Posterior a este período, se cuentan las semillas germinadas y se mide el largo de la radícula de cada una. Esta información se utiliza para calcular el índice de germinación (IG), relacionando las semillas germinadas en la dilución y en el control (G y G<sub>0</sub>), con el largo promedio de la radícula en la dilución y en el control (L y L<sub>0</sub>), mediante la siguiente ecuación:

$$IG = \frac{G}{G_0} \times \frac{L}{L_0} \times 100$$

##### 3.4.3.4.2 Ensayo de crecimiento en plantas de alfalfa

En primer lugar, se realizó una germinación de semillas de alfalfa siguiendo el mismo protocolo descrito en el punto 3.3.2.3.

Posteriormente, se tomaron 75g de compost y se mezclaron con 75g de turba, para obtener una relación 1:1, y se colocaron en macetas de 250mL de volumen. Posteriormente se sembraron 10 plántulas por maceta y se cultivaron a temperatura ambiente, a 40-60% de humedad, con ciclos de luz: oscuridad de 16:8 horas durante 14 días en sala de cultivo vegetal. Cada compost fue evaluado por triplicado.

Pasado este período se procedió a medir el largo y biomasa de raíz y tallo de cada planta, promediándose en *pool* por recipiente. Con esta información se calculó la relación raíz: parte aérea y el rendimiento en base a la biomasa obtenida. A su vez, se procedió a la extracción y cuantificación de la biomasa siguiendo el protocolo detallado en el punto 3.3.2.5.

### 3.5 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos en los ensayos descritos anteriormente se analizaron estadísticamente utilizando el análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa *GraphPad Prism 8*, y posteriormente se aplicó la prueba de medias Tukey HST considerando diferencias significativas a aquellas con un valor menor a 0.05.

## 4 Resultados y discusión

### 4.1 Caracterización de MEN

Con el objetivo de conocer la concentración de microorganismos en la preparación comercial de MEN, se realizó un recuento en placa de bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Luego, a partir de las colonias obtenidas, fueron aisladas aquellas que se diferenciaban morfológicamente y se observaron al microscopio realizando tinción de Gram para bacterias y frescos para hongos filamentosos y levaduras. A estas colonias se les realizó una extracción de ADN para posteriormente amplificar y secuenciar las regiones codificantes para el ADN ribosomal 16S para bacterias o región espaciadora interna transcrita (ITS) para hongos o levaduras, según el caso.

Se utilizaron placas de TSA para detectar bacterias, PDA con cloranfenicol para detectar colonias fúngicas e YPD para detectar levaduras. Como se muestra en la Tabla 4, se obtuvo un recuento de  $2,3(\pm 0,6) \times 10^6$  UFC/mL en las placas de TSA,  $5,0(\pm 0,1) \times 10^3$  UFC/mL en placas de PDA y  $2,9(\pm 0,1) \times 10^4$  UFC/mL en placas de YPD. En comparación al informe de caracterización realizado previamente en el IIBCE (16), se obtuvo un recuento similar, en el mismo orden, de bacterias heterótrofas ( $3,0 \times 10^6$  UFC/mL) y de hongos filamentosos ( $1,0 \times 10^3$  UFC/mL), que fueron las evaluadas en este ensayo. Pero, en cuanto a las levaduras, los valores obtenidos son de un orden menor con respecto al informe citado ( $2,6 \times 10^5$  UFC/mL), esto puede deberse a una menor viabilidad de las levaduras al momento del recuento.

Además, se realizaron ensayos de screening para evaluar posible actividad lipasa y celulasa (sección 4.1.4) de los microorganismos presentes en los MEN, ya que estas enzimas son de interés para las aplicaciones probadas en el presente trabajo.

En el Anexo 1 se pueden observar los datos de diluciones utilizadas, UFC obtenidas por dilución y el cálculo llevado a cabo para obtener los resultados finales expuestos en la Tabla 4 para cada medio de cultivo. La desviación estándar se calculó a partir de cada una de las concentraciones por réplica.

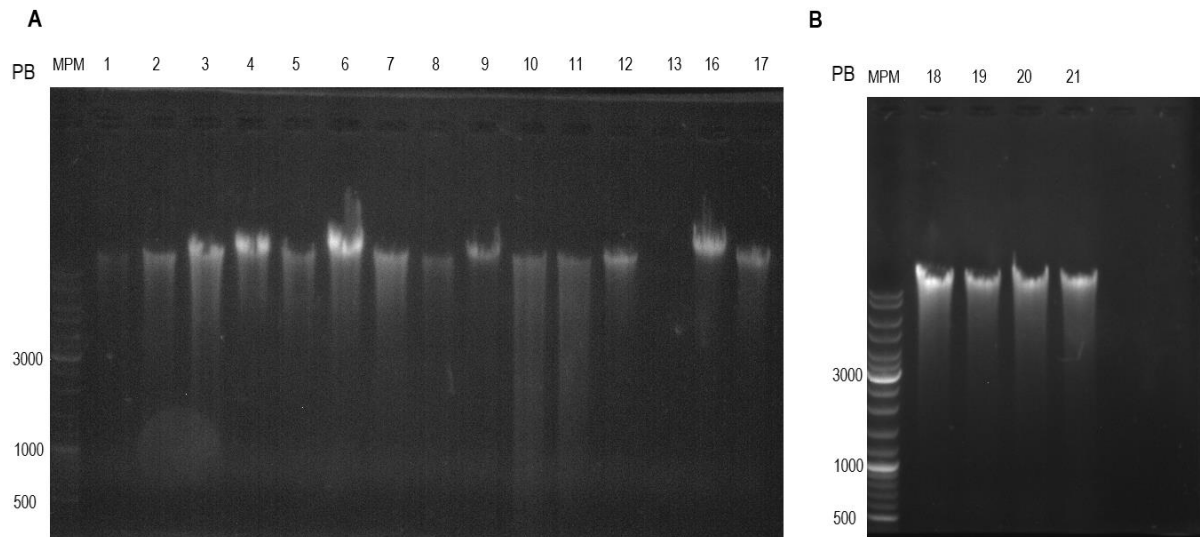
**Tabla 4:** Resultados del recuento en placa.

| Medio de cultivo      | Recuento (UFC/mL)                     |
|-----------------------|---------------------------------------|
| TSA                   | $2,3 \times 10^6 \pm 0,6 \times 10^6$ |
| PDA con cloranfenicol | $5,0 \times 10^3 \pm 0,1 \times 10^3$ |
| YPD                   | $2,9 \times 10^4 \pm 0,1 \times 10^4$ |

De las placas anteriores, se aislaron 20 colonias con morfologías y colores diferentes con la técnica de estriado (Anexo 2). 16 de las colonias correspondieron a bacterias (2 de las cuales no pudieron ser aisladas, las colonias 14 y 15), 1 a hongos y 4 a levaduras. Luego, se les realizó tinción Gram a las

colonias bacterianas y se observaron al microscopio. De las 14 colonias bacterianas, 7 fueron Gram positivas y 7 Gram negativas.

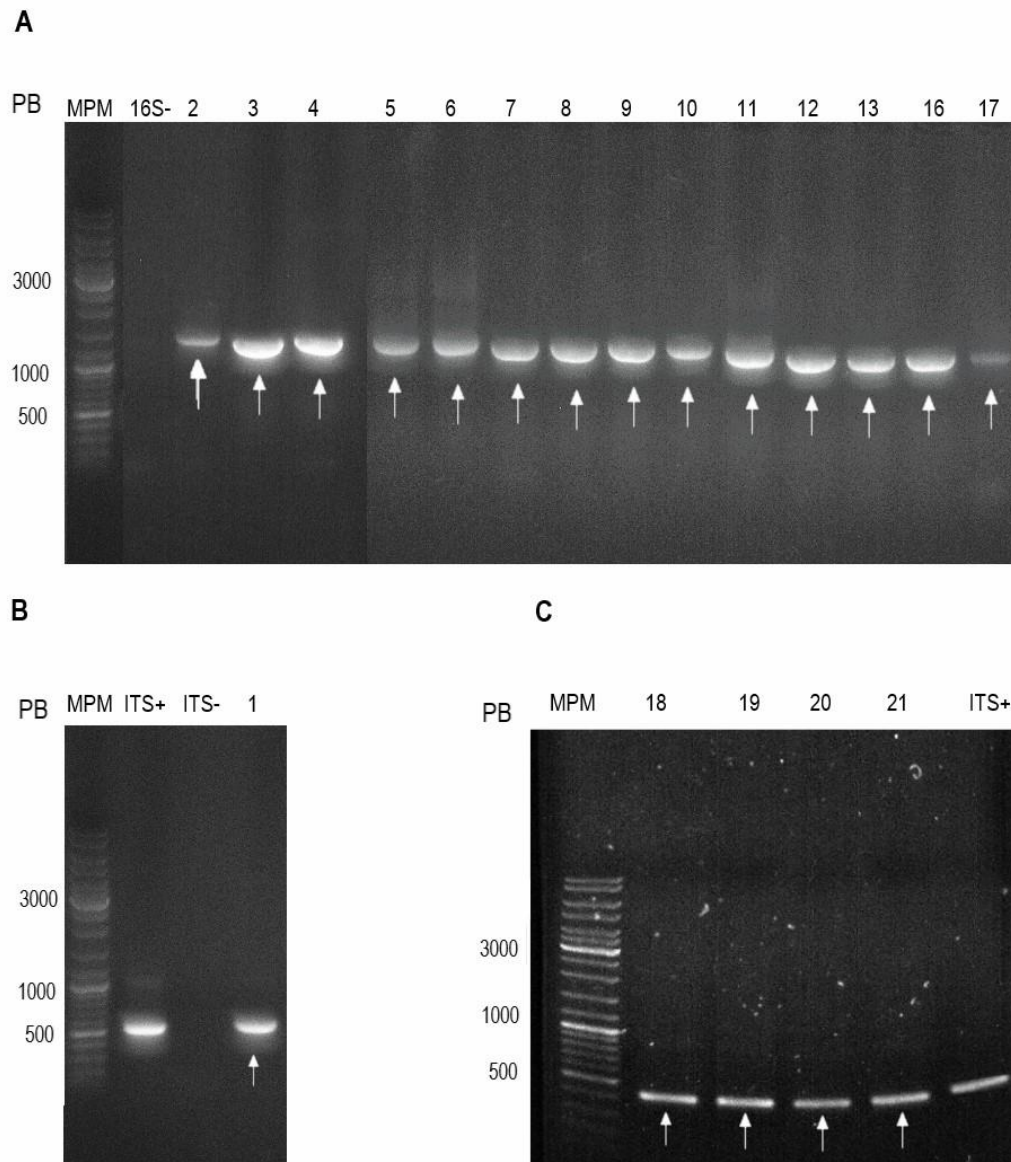
Como siguiente paso se realizó una extracción del ADN genómico (ADNg) a cada colonia aislada y se realizó una electroforesis en gel de agarosa para evaluar la calidad del ADN extraído (Figura 10).



**Figura 10:** Electroforesis en gel de agarosa 1% de la extracción de ADN genómico de las colonias aisladas a partir de la preparación comercial de MEN. **A:** Gel correspondiente a la extracción de ADN de bacterias y hongos. **B:** Gel correspondiente a la extracción de levaduras. En cada imagen, de izquierda a derecha se indica a qué colonia corresponde cada carril y al marcador de peso molecular de cada gel. Se obtuvo un ADN de buena calidad en todas las muestras a excepción de la colonia 13 que no se visualiza banda de ADN.

Si bien no se observa una banda en la colonia 13, lo cual podría deberse a una baja eficiencia de extracción, igualmente se utilizó la muestra en los ensayos posteriores, pudiéndose realizar la identificación.

Posteriormente se realizó la amplificación de las regiones ITS y 16S, según correspondiera, mediante una PCR tiempo final y los resultados de la electroforesis para visualizar los productos de PCR se visualizan en la Figura 11.



**Figura 11:** Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR de las regiones ITS y 16S de las colonias aisladas a partir de la preparación comercial de MEN. **A:** Gel correspondiente a las colonias bacterianas. **B:** Gel correspondiente a los hongos. **C:** Gel correspondiente a las colonias de levaduras. De izquierda a derecha se indican los número de colonia correspondiente a cada carril. Se visualiza amplificación en todas las muestras analizadas.

Como se observa en la Figura 11, se logró amplificación en todas las colonias aisladas, incluida la colonia 13, por lo que se procedió a la secuenciación de la totalidad de los productos de amplificación. Los resultados de dicha secuenciación fueron analizados como se describió en el punto 3.1.2.6. Los resultados de BLAST se muestran en la Tabla 5. Se seleccionaron aquellos alineamientos de BLAST que presentaron el mayor score y un porcentaje de identidad mayor a 90%. Además, en esta tabla se presentan los tipos de

microorganismos. brevemente las características morfológicas de las colonias y sus posibles aplicaciones de interés para este trabajo.

**Tabla 5:** Especies identificadas por secuenciación de la región 16S o ITS de colonias aisladas de la preparación comercial de MEN. Comparación con la morfología observada y potencialidad de los microorganismos en las aplicaciones probadas en este trabajo.

| N° de identificación de colonia | Identidad                           | Tipo de organismo               | Potencialidad   |
|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---|
| 1                               | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | Hongo                           | Biocontrol en agricultura (58)  |
| 2                               | <i>Escherichia coli</i>             | Bacteria, bacilo, Gram negativo |   |
| 3                               | <i>Acetobacter fabarum</i>          | Bacteria, bacilo, Gram negativo | PGPR (59, 60), Mejora del proceso de compostaje (43)  |
| 4                               | <i>Micrococcus sp.</i>              | Bacteria, coco, Gram positivo   | PGPR (61, 62), Biocontrol en agricultura (63, 64), Degradación de hidrocarburos (63, 65, 66)  |
| 5                               | <i>Acetobacter indonesiensis</i>    | Bacteria, bacilo, Gram negativo | Mejora del proceso de compostaje (43)   |
| 6                               | <i>Streptomyces sp.</i>             | Bacteria, Gram positivas        | PGPR (67), Biocontrol en agricultura(62, 68), Degradación de hidrocarburos (27, 69–72), mejora del proceso de compostaje (62, 67)     |
| 7                               | <i>Acetobacter fabarum</i>          | Bacteria, bacilo, Gram negativo | Mejora del proceso de compostaje (43)   |
| 8                               | <i>Acetobacter garciniae</i>        | Bacteria, bacilo, Gram negativo | Mejora del proceso de compostaje (43)   |
| 9                               | <i>Streptomyces parvus</i>          | Bacteria, cocos, Gram positivo  | Mejora del proceso de compostaje (62)   |
| 10                              | <i>Bacillus thuringiensis</i>       | Bacteria, bacilo, Gram positivo | PGPR (61, 73–75), Biocontrol en agricultura (27, 76–79)   |
| 11                              | <i>Microbacterium oxydans</i>       | Bacteria, bacilo, Gram positivo | PGPR (12), Biocontrol en agricultura (80, 81), Degradación de hidrocarburos (31)  |
| 12                              | <i>Acetobacter fallax</i>           | Bacteria, bacilo, Gram negativo | Mejora del proceso de compostaje (43)   |
| 13                              | <i>Bacillus subtilis</i>            | Bacteria, bacilo, Gram positivo | PGPR (61, 82, 83), Biocontrol en agricultura (84–86), Degradación de hidrocarburos (87–91), Mejora del proceso de compostaje (50, 92) |

|                |                                   |                                    |                                       |
|----------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 16             | <i>Kocuria palustris</i>          | Bacteria, coco,<br>Gram positivo   | Biocontrol en agricultura (93)        |
| 17             | <i>Acidisoma cellulosilyticum</i> | Bacteria, bacilo,<br>Gram negativa | Mejora del proceso de compostaje (94) |
| 18, 19, 20, 21 | <i>Candida ethanolica</i>         | Levadura                           | Biocontrol en agricultura (95–98)     |

En las 20 colonias aisladas, de las que se reconocieron 10 géneros diferentes, en particular se obtuvieron 13 especies. Se realizó una búsqueda bibliográfica de cada una de las especies para identificar su potencialidad dirigida a este trabajo.

A su vez, estos resultados fueron comparados con el último informe realizado por el IIBCE (16). En dicho informe se realizó una secuenciación masiva además del recuento en placa mencionado previamente. La técnica de secuenciación masiva permite detectar e identificar las secuencias de todos los microorganismos que se encuentren presentes en el consorcio, incluso de aquellos no viables y ADN libre que se encuentre en la mezcla. Además, esta técnica permite conocer la abundancia relativa de cada una de las secuencias. Por otro lado, como ya se mencionó, en este trabajo se secuenciaron aquellas colonias que lograron ser aisladas en condiciones aeróbicas, ya que las aplicaciones que se probaron en este trabajo se realizaron en estas condiciones. Por esto era de interés evaluar los microorganismos viables en condiciones aeróbicas. Las diferencias observadas entre el informe de caracterización del IIBCE y este trabajo puede que se deban principalmente a las distintas aproximaciones utilizadas en cada trabajo.

La principal diferencia observada con este informe es la ausencia del género *Lactobacillus* en los resultados obtenidos ya que se reporta como género mayoritario (94 a 98%) de las secuencias obtenidas en la secuenciación masiva, mientras que en el presente trabajo no se observaron colonias viables de este género. Esto puede deberse a varios factores. Uno de ellos es el constante dinamismo en el que se encuentra el consorcio luego de producido y comercializado. El mismo se genera a partir de cultivos estacionales variantes y condiciones climáticas diferentes dependiendo de la estación del año en que se produzca, por lo que es esperable que las proporciones de microorganismos que lo componen sea distinta en cada lote producido. Además, los requerimientos para el crecimiento del género pueden ser afectados luego de la recepción del contenedor en el que son comercializados, siendo que estos microorganismos se reportan como microaerofílicos, anaeróbicos facultativos o anaeróbicos y, posiblemente, con la aireación provocada por su permanente apertura durante los 6 meses de vigencia que reporta el fabricante (99). No se descarta la competencia por parte de microorganismos aerobios frente a este cambio. Finalmente, teniendo en cuenta los factores previamente abordados, la técnica de recuento en placa con los medios utilizados puede haber tenido un límite de detección por debajo del necesario para su detección en menores proporciones a las reportadas en el informe proporcionado por la cooperativa.

Tampoco se encontraron colonias de *Gluconobacter*, *Komagataeibacter*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Acetobactaracae* ni *Leuconostoc*, pero estos géneros se reportan en porcentajes muy bajos en el informe del IIBCE, por lo que es factible que el límite de detección del método utilizado no haya sido suficiente.

Por otro lado, en este trabajo se encontraron especies de los géneros *Micrococcaceae*, *Streptomyces*, *Kocuria*, *Microbacterium* y *Acidisoma* que no fueron reportados en el informe, mientras que se hallaron especies pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Acetobacter* y *Bacillus*, que fueron reportados en el informe.

A nivel fúngico, el reporte informa a nivel clase, siendo la principal de estas *Saccharomycetes*, dentro de la cual se encuentra *Candida ethanolica*, especie reportada en este trabajo. No se encontraron colonias de *Saccharomyces cerevisiae* ni *Kazachstania bulderi*, reportadas como especies predominantes en el informe, aunque sí se encontró una no reportada: *Cladosporium cladosporioides*.

A pesar de las diferencias encontradas con los resultados de secuenciación masiva, la mayor parte de los microorganismos identificados en el presente estudio tienen respaldo bibliográfico de potencialidad para los objetivos abordados.

#### 4.1.1 Microorganismos encontrados con potencial aplicación en la agricultura orgánica

Microorganismos populares en el campo de la agricultura orgánica fueron detectados, apoyando la base sobre la cual los EM fueron inicialmente promovidos y utilizados. Un gran número de colonias correspondieron al grupo PGPR, incluyendo fijadores de nitrógeno y PSB.

Dentro de la clasificación de microorganismos fijadores de nitrógeno, el principal género observado fue *Acetobacter*, ampliamente utilizado como biofertilizante focalizando su acción en variedad de gramíneas tales como la caña de azúcar y el maíz, aunque también se reporta su exitoso uso en cultivos de mijo (61–64). También forma parte de este grupo *Bacillus subtilis*, reconocido por la disminución de la pérdida de nitrógeno por escurrimiento y lixiviado en suelos además de actuar como un agente protector en condiciones de sequía, así como *Bacillus thuringiensis*, *Microbacterium oxidans*, *Micrococcus luteus* y cepas del género *Streptomyces* (12, 62, 67, 73, 74).

Dentro del grupo PSB se pueden encontrar cepas del género *Micrococcus*, y variedad de *Bacillus*, incluido *Bacillus thuringiensis* específicamente y *Microbacterium oxidans*. Su función es la conversión de fosfato inorgánico a sus formas solubles por medio de la secreción de ácidos orgánicos tales como el succínico, oxálico, cítrico, tartárico y málico, y en ocasiones cianuro de hidrógeno (HCN por sus siglas en inglés) en el suelo circundante, haciendo biodisponible el fosfato a la rizosfera (12, 61, 73).

Cepas de *Micrococcus* y *Microbacterium oxidans* han sido identificadas como positivas para la producción fitohormonas, potenciando el desarrollo radicular y por tanto la incorporación de nutrientes del suelo. Cepas de *Micrococcus* también han presentado la capacidad de producir la hormona ACC-deaminasa, atacando al precursor del etileno ACC (ácido carboxílico 1-amino-ciclo-propano) reduciendo sus niveles y por tanto permitiendo un mayor crecimiento, así como elongación radicular (12, 73, 75).

En cuanto a microorganismos para biocontrol y protección de cultivos, se destacan *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Microbacterium oxydans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Micrococcus luteus* perteneciente al género *Micrococcus* y variedad de especies pertenecientes a los géneros *Streptomyces*.

*Bacillus thuringiensis*, presente en el consorcio microbiano estudiado en el presente trabajo e inicialmente aislado en 1901 de gusanos de seda infectados (77). Posee actividad biopesticida (específicamente entomopatogénica, principalmente en lepidópteros y dípteros) destacándose su producción de la toxina peptídica de estructura cristalina *Cry* en su etapa de esporulación. Dicha proteína actúa como un insecticida natural, atacando principalmente a patógenos en su período larvario sin tener efectos significativos en otros organismos beneficiosos tales como nemátodos o coleópteros (76–79).

Recientemente se han descrito cepas de *Bacillus subtilis* capaces de controlar fitopatógenos en cultivos. Algunos ejemplos son la enfermedad conocida como “*Take All*” por su nombre en inglés, provocada por la infección con *Gaeumannomyces tritici* en trigo y cebada, y las infecciones por tizón de la hoja en maíz, tizón del trigo y tizón del arroz (84, 85).

Se han aislado compuestos antifúngicos a partir de cultivos de *Cladosporium cladosporioides*, dentro de los cuales destaca la cladosporina. Estos compuestos han demostrado efectos inhibitorios en patógenos de plantas tales como *Phomopsis viticola* y especies del género *Colletotrichum* (58).

*Microbacterium oxydans*, por su parte, ha demostrado su capacidad de actuar de forma antagonista contra *Acidovorax citrulli*, una bacteria causante de la enfermedad *Bacterial Fruit Blotch*, la cual infecta semillas en cucurbitáceas afectando a la planta desde la germinación, durante el crecimiento vegetativo hasta la fructificación (80). También se ha documentado su acción insecticida contra *Palomena prasina* L., una especie de hemíptero polífago presente en numerosas partes del mundo, siendo frecuentemente problemática en Europa (81).

Se ha reportado que la cepa *Micrococcus luteus* específicamente posee fuerte actividad antibacteriana contra patógenos alimentarios como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, así como una más leve contra *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* (63). También se han observado cepas de *M. luteus* útiles como organismos de biocontrol por producción

de HCN y sideróforos, además de proteasas, celulasas y quitinasas mostrando actividad antifúngica protectora contra organismos del género *Curvularia sp.*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y cepas de *Cladosporium sp.* (64).

Microorganismos pertenecientes al género *Streptomyces* han sido utilizados como agentes de control biológico ya que producen metabolitos secundarios bioactivos que controlan efectivamente fitopatógenos mediante la mejora de la colonización endofítica o de la rizosfera (62, 68).

*Kocuria palustris* por su parte mostró tener actividad fungicida contra *Fusarium oxysporum*, un fitopatógeno conocido por provocar pérdidas en cultivos de cereales y, en ocasiones, plátanos, presuntamente provocada por su producción de benzimidazoles inhibitorios del crecimiento del hongo (93).

P. Lawrence Pusey describe, en 1989, el descubrimiento de proteínas fungicidas producidas por *Bacillus subtilis* que resultaron útiles para la protección de frutas postcosecha y la posterior formulación de una combinación del microorganismo con ceras utilizadas para recubrir la fruta al momento de ser comercializada, observando protección contra numerosas especies de hongos aceleradores de la descomposición de manzanas y moho gris en uvas, por tanto aumentando su vida útil y tiempo de almacenamiento (86). Más adelante se descubrió que el moho gris podía ser prevenido también en tomates, y se observó la protección contra otros patógenos fúngicos invasivos postcosecha del género *Penicillium* causantes del rápido deterioro de cítricos (84).

Cepas de *Candida ethanolica* también han sido reportadas como agentes de control biológico de hongos, como *Aspergillus* y *Penicillium* en granos de cacao (algunos de los cuales producen micotoxinas que significan un riesgo a la salud del consumidor, así como acelerando la descomposición y consecuentemente afectando las propiedades organolépticas del chocolate final) en sinergia con bacterias ácido lácticas. La hipótesis principal es que su capacidad antifúngica reside en la producción de dos toxinas, así como proteasas (95). A su vez, una cepa aislada de una solución de EM resultó ser antagonista de *Ralstonia solanacearum*, un patógeno bacteriano que afecta a la familia de las solanáceas provocando marchitamiento de los frutos. Probado con éxito en tomates *in* y *ex situ* (96, 97).

Un mecanismo menos conocido de control biológico por microorganismos es el uso de los mismos para la atracción de otros organismos patógenos. *Candida ethanolica* ha sido estudiada en su capacidad de actuar como “carnada” para *Pomacea canaliculata* también llamado “caracol manzana”, un molusco que ataca cultivos de gramíneas (98).

Dada la investigación bibliográfica realizada, el consorcio se condice con la hipótesis de que, al igual que los EM originales diseñados por el Dr. Higa, los MEN tienen gran potencial en el ámbito de la agricultura orgánica.

#### 4.1.2 Microorganismos encontrados con potencial aplicación en la biorremediación de hidrocarburos

Por otro lado, se detectaron varios microorganismos reportados como degradadores de hidrocarburos dentro de los MEN, dentro de los cuales se encuentran *Microbacterium oxydans*, y variedad de especies de los géneros *Micrococcus* y *Streptomyces*.

*Microbacterium oxydans*, del cual se halló una cepa en un suelo contaminado con petróleo de larga data que demostró la capacidad de degradación total de cadenas de entre C11 y C18 de largo, y degradación parcial de cadenas de entre C19 y C24. Esta cepa demostró tener tanto actividad deshidrogenasa como lipasa (31).

*Bacillus* está entre los géneros bacterianos degradadores de hidrocarburos aromáticos policíclicos, debido a que algunas cepas presentan actividad polifenol oxidasa además de deshidrogenasa. Especialmente *Bacillus subtilis* tiene una amplia variedad de reportes de su utilización en degradación de hidrocarburos de este tipo. Se ha reportado su uso tanto dentro de consorcios microbianos como individualmente, aunque los resultados más prometedores fueron en consorcios (87–91).

*Micrococcus* es un género bacteriano ampliamente encontrado en suelo y agua, existiendo evidencia de que numerosas cepas aisladas de ambientes contaminados poseen la capacidad de crecer en sustratos poco comunes, entre ellos los hidrocarburos y aceites utilizándolos como fuente de energía e incluso tolerando la presencia de metales pesados, los cuales suelen estar presentes en pequeñas cantidades en la mayoría de los productos derivados del petróleo. Se sugiere que su actividad emulsificante mediante la producción de biosurfactantes, así como su capacidad degradadora de lípidos se correlacione con el aumento en la biodisponibilidad de los hidrocarburos, en ocasiones logrando una mineralización total de los mismos (63, 65). En un ensayo realizado por Alam Khan et. al., *Micrococcus varians* se aisló de suelos contaminados con aceite de motor y se comprobó tanto su crecimiento, un aumento en su perfil proteico y finalmente una degradación del mismo contaminante correspondiente al 84,41%, por tanto, sugiriendo actividad lipasa y sosteniendo la anterior hipótesis (66).

*Microbacterium* está dentro de los géneros bacterianos degradadores de hidrocarburos aromáticos policíclicos, así como *Streptomyces* (27, 69). Se ha reportado el uso del último también para degradar BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos), como también su capacidad de crecer con diésel como única fuente de carbono (70, 71). En suma, se han detectado cepas capaces de crecer exclusivamente en hexadecano, exhibiendo otra actividad enzimática relevante: la del complejo alcano-deshidroxilasa (72).

En suma, es factible que los MEN sean capaces de degradar hidrocarburos derivados del petróleo, tanto en sus fracciones alifáticas como aromáticas.

#### 4.1.3 Microorganismos encontrados con potencial aplicación en la mejora del compostaje

En lo que respecta a microorganismos relevantes para el compostaje doméstico, se destacan los géneros *Acetobacter* y *Streptomyces*, así como *Bacillus subtilis*, *Bacillus thurgiensis* y *Acidisoma cellulosilytica*.

*Acetobacter*, uno de los géneros más prevalentes en este estudio, tiene un rol importante en la etapa inicial del compostaje, produciendo ácidos orgánicos en la primer etapa mesofílica. Este rol lo comparte junto a *Lactobacillus*, que como fue mencionado anteriormente, se reporta como un género predominante en estudios previamente realizados sobre los MEN, a pesar de no haber sido detectado con los métodos de aislamiento utilizados en el presente estudio (43).

Por su parte, *Streptomyces* ha sido utilizado como parte de un consorcio microbiano que se utilizó como inóculo en el compostaje de residuos domésticos, con el cual se observaron resultados exitosos, obteniéndose un compost potencialmente promotor del crecimiento vegetal (62).

*Bacillus subtilis* reporta un amplio set de actividades enzimáticas identificadas en variedad de cepas, las cuales intervienen en la degradación de los componentes principales de la materia orgánica presente en residuos domésticos de origen vegetal. Dichas actividades incluyen carboximetilcelulasa, lipasa, proteasa, pectinasa, amilasa y gelatinasa (92). *Bacillus thurgiensis* presenta, también, la mayoría de ellas con excepción de la pectinasa y la lipasa. Se ha reportado que el agregado de *Bacillus subtilis* al compostaje de estiércol bovino y tallos de trigo acelera su maduración, retiene carbono y mejora la calidad final del compost (50). Además, se ha reportado que su actividad celulasa y xilanasa conducen a una mejora en la degradación de materia vegetal (92). La mencionada actividad celulasa también se encuentra reportada en bibliografía en *Acidisoma cellulosilytica* (94).

En conclusión, es de esperar que la comunidad microbiana del consorcio de MEN colabore con el proceso de compostaje gracias al amplio set de actividades enzimáticas que se han reportado en los microorganismos encontrados y a la mejora de la degradación de materia orgánica, especialmente la vegetal, que se ha reportado con estos microorganismos.

#### 4.1.4 Caracterización enzimática

Según la búsqueda bibliográfica, los microorganismos encontrados como parte de los MEN podrían ser usados potencialmente en la biorremediación de hidrocarburos derivados del petróleo y en la mejora del proceso de compostaje. Para confirmarlo se realizó un ensayo de actividad lipasa, considerada de

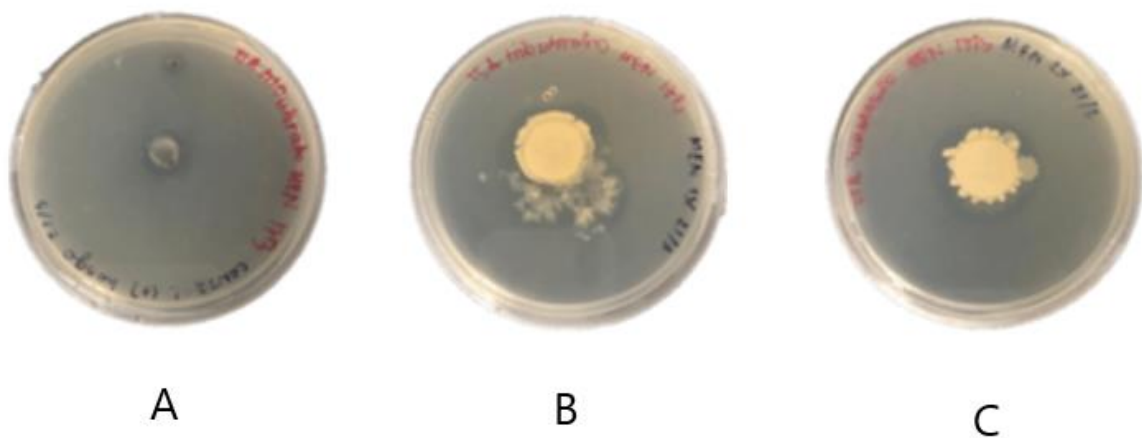
importancia para la biorremediación de hidrocarburos, y un ensayo de actividad celulasa, importante en el proceso de compostaje.

La lipasa se encuentra entre las enzimas predominantes en el proceso de descomposición biológica de hidrocarburos, siendo el nivel de actividad lipasa un indicador del proceso de su degradación en suelos.

A su vez, la actividad celulasa es una de las más importantes en las primeras fases del compostaje, donde se descomponen las macromoléculas más complejas de los residuos como lo es la celulosa, y por tanto es de interés su presencia en el consorcio. Está presente mayoritariamente en hongos y levaduras, por lo que la ausencia de estos microorganismos en la caracterización realizada condujo al interés de realizar un ensayo que confirmara dicha actividad en los MEN utilizados.

#### 4.1.4.1 Actividad lipasa

Se realizó un ensayo de actividad lipasa según el protocolo descrito en el punto 3.2.3.1 en 2 condiciones: MEN toma directa y MEN concentrados al doble por medio de centrifugación. Se compara frente a un control positivo de *Acidomyces acidophilus*, productor de lipasas.

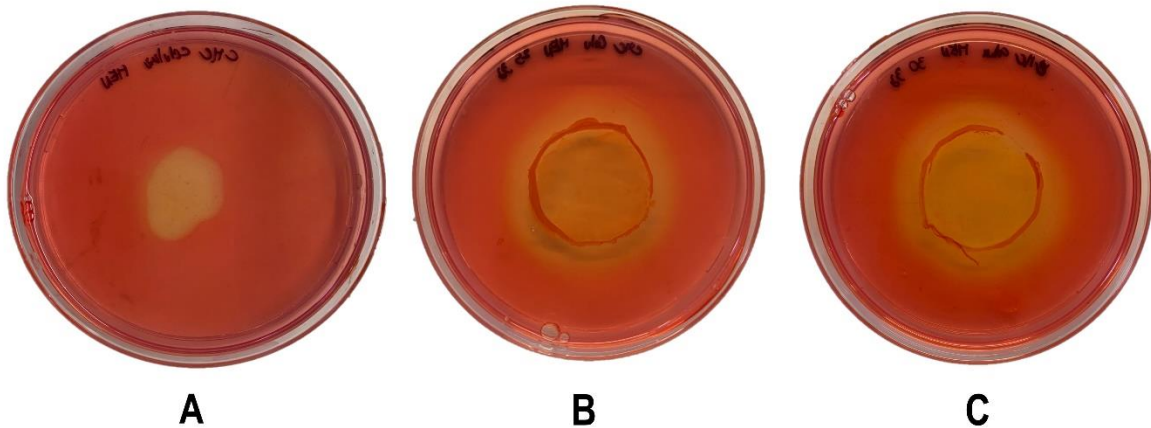


**Figura 12:** Placas de ensayo actividad lipasa. **A:** Control positivo (*Acidomyces acidophilus*, productor de lipasas), **B:** MEN 1X, **C:** MEN 2X.

Como se observa en la Figura 12, se genera un halo de degradación (zona transparente alrededor de la colonia de microorganismos) en el medio en ambas placas, similar al del control, lo que permite afirmar que los MEN cuentan con actividad lipasa. Esto se condice no solo con la bibliografía, sino con otros usos recomendados del consorcio, como es la limpieza de graseras domésticas. A su vez, este resultado es prometedor tanto para la biorremediación de PH, ya que los hace más biodisponibles a los microorganismos degradadores, como para la mejora del compostaje, ya que los residuos alimenticios contienen lípidos.

#### 4.1.4.2 Actividad celulasa

Se realizó un ensayo de actividad celulasa según el protocolo que se describe en el punto 3.2.3.2 en dos temperaturas, 25 y 30°C. Se compara el resultado frente a un control realizado con celulasa comercial.



**Figura 13:** Placas de ensayo de actividad celulasa. **A:** Control positivo (celulasa comercial), **B:** Placa incubada a 25°C, **C:** Placa incubada a 30°C.

En la Figura 13 se observa un halo de degradación (zona amarilla) alrededor de donde se encontraban los discos de papel, del mismo color que el control positivo. Esto permite afirmar que los MEN cuentan con actividad celulasa, se condice con la bibliografía y con uno de los usos recomendados del consorcio que es la adición en el compostaje. Gran parte de los residuos compostables, incluyendo a los alimenticios, papel y residuos de poda tienen un alto contenido de celulosa, una macromolécula altamente estable y difícil de degradar para la mayoría de los organismos, generando un cuello de botella en el proceso. Es por esto que la bioaumentación con microorganismos con actividad celulasa resulta prometedora para la aceleración del compostaje.

## 4.2 Evaluación de la capacidad de biorremediación de hidrocarburos con MEN

### 4.2.1 Efectos de MEN en el crecimiento vegetal

Para comenzar se procedió a analizar el efecto del agregado de MEN al sustrato de siembra de las plantas de alfalfa, realizando el ensayo de ecotoxicidad descrito en el punto 3.2.3.2. El objetivo de este análisis fue determinar una línea de base del efecto de los MEN en alfalfa utilizando las concentraciones en las que llegarían a los ensayos de ecotoxicidad posterior al tratamiento de los hidrocarburos. Por esto, se utilizan concentraciones de MEN 2 y 4% volumen: masa.

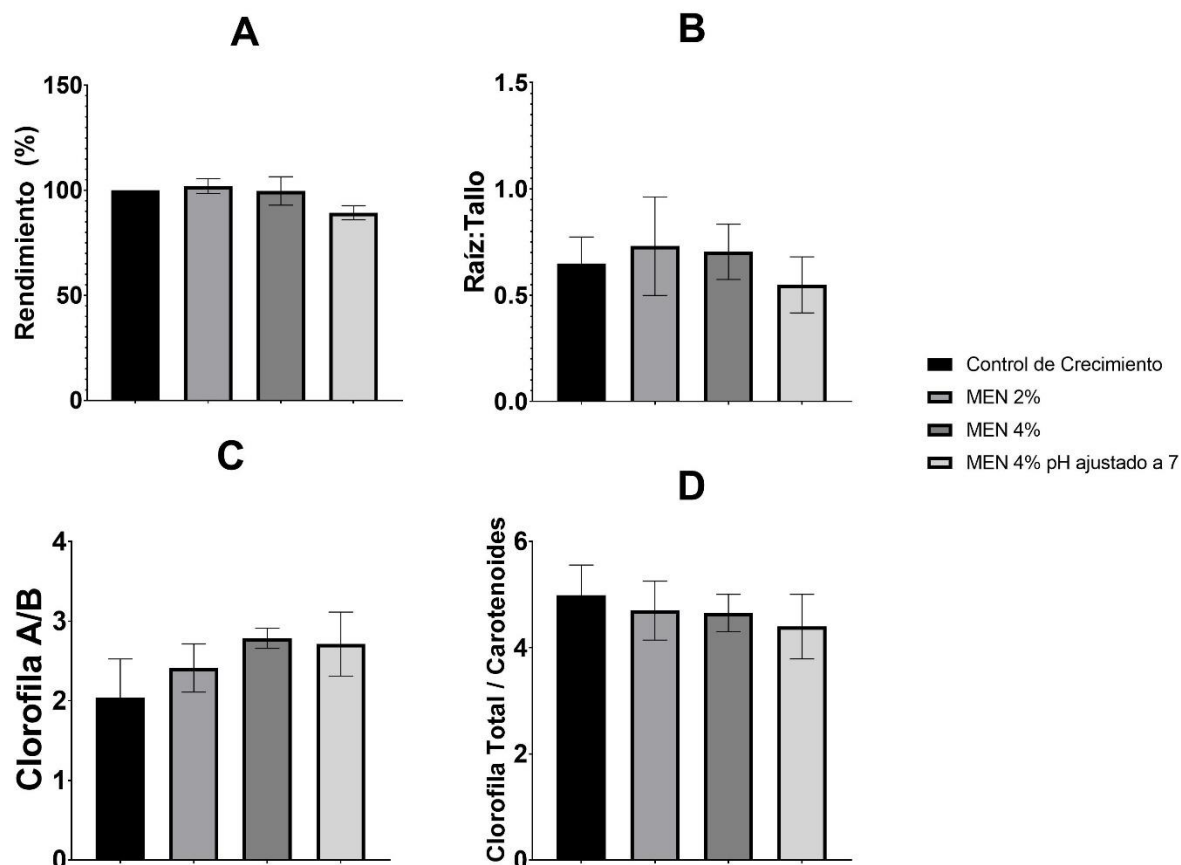
Se midió el pH del sustrato de siembra a utilizar para los ensayos de ecotoxicidad en plantas de alfalfa (Tabla 6). Dado que pH reportado de la solución de MEN es de entre 3,5 y 4 se incorporó una condición de solución de MEN ajustada a pH = 7.

**Tabla 6:** pH de los sustratos de cultivo en presencia de MEN.

| Muestra |         | pH        |
|---------|---------|-----------|
| Turba   |         | 6.3 ± 0.1 |
|         | MEN     | 4.1 ± 0.1 |
| Turba   | 2%      | 5.7 ± 0.1 |
|         | 4%      | 5.5 ± 0.1 |
|         | 4% pH 7 | 6.3 ± 0.1 |

En las condiciones con MEN (2 y 4%) se observó un pH levemente ácido en comparación con el control de Turba (Tabla 6). Se seleccionó la condición de MEN 4% para la realización de los ensayos posteriores.

Se realizó el ensayo de efecto de crecimiento en plantas de alfalfa descrito en el punto 3.3.2.4. A las plantas obtenidas se les midió biomasa y largo, tanto de raíces como de tallo, y se les llevó a cabo una extracción de pigmentos fotosintéticos. A partir de estos datos obtenidos, se calculó el rendimiento en base a la biomasa, la relación largo de raíz con respecto al largo del tallo, la relación Chl a/b y la relación Chl a+b / Carotenoides. Los resultados obtenidos se compararon frente al crecimiento de las plantas en turba (Control) y se visualizan en la Figura 14.



**Figura 14:** Efectos de MEN en el crecimiento de plantas de alfalfa. **A:** Rendimiento en base a la biomasa generada. **B:** Relación Raíz: Tallo. **C:** Relación de Chl a/b. **D:** Relación Chl a+b / Carotenoides. No se observan diferencias significativas en ninguna de las condiciones evaluadas. (Diferencia significativa cuando el valor  $p < 0.05$ )

El porcentaje de rendimiento es calculado en base a la biomasa de las plantas frente al control de crecimiento, y se correlaciona con el crecimiento de éstas (37). Este parámetro permite dimensionar si el agregado de una sustancia tiene algún efecto sobre las plantas, sea fitonutriente si es positivo o fitotóxico si es negativo. Al evaluar el efecto de MEN en el crecimiento vegetal, se considera como fitonutrientes a los MEN cuando el rendimiento de las plantas es mayor a 100% con respecto al grupo control de crecimiento sin MEN o fitotóxico si el rendimiento es menor a 80%, siempre que el p-valor de Tuskey HST indique una diferencia significativa (100). Como se observa en la Figura 14 A, los MEN no alcanzaron a ser fitonutrientes para las plantas de alfalfa en las condiciones evaluadas, aunque sí consiguieron rendimientos similares. Las diferencias respecto del control tanto de las diferentes concentraciones como de la solución cuyo pH fue ajustado a 7 no fueron significativas.

Las plantas priorizan el crecimiento de su sección que obtendrá el recurso más limitante en el ambiente. Es decir, cuando la planta encuentre un suplemento de agua o nutrientes limitado, optimizará el crecimiento de sus raíces en detrimento del crecimiento de su tallo y hojas, mientras que, si la luz es

un recurso limitante en el ambiente, la planta optimizará el crecimiento de su tallo y hojas. Esto se puede dimensionar con la relación Raíz: Tallo, con 3 escenarios posibles: en caso de que no haya una optimización de una de las secciones, la relación tenderá hacia 1, mientras que si la raíz es optimizada esta relación será mayor a 1, y si el tallo es mayor a la raíz, el número será menor a 1 (101). Como se observa en la Figura 14 B, no hay diferencias significativas entre las condiciones evaluadas. En todas las condiciones se observan relaciones Raíz: Tallo menores a 1, por lo que se está viendo una optimización del crecimiento del tallo, lo que indica que el recurso más limitante en el ambiente de crecimiento es la luz y no los nutrientes ni el agua.

En la Figura 14 C se muestra la relación de Chl a/b, la cual es un indicador de salud de la planta que describe la salud de su aparato fotosintético. Según la bibliografía consultada (102), que una relación esté por debajo de la relación del control sería un indicador de que el aparato fotosintético estaría siendo afectado por algún tipo de estrés oxidativo que lo obliga a aumentar su actividad en los PSII. En este caso, no se observan diferencias significativas frente al control de crecimiento y tampoco se observan cambios significativos al ajustar el pH.

En la Figura 14 D se grafica la relación Chl a+b / Carotenoides. Esta relación sirve como un indicador de senescencia, estrés y daño de la planta y de su aparato fotosintético. Cuanto menor es la tasa, mayor el estrés que recibe la planta, evidenciado por una degradación más rápida de las clorofilas que de los carotenoides o de la producción de los segundos a modo de aumentar la fotoprotección (102). Como se puede observar en la Figura 14 D, no hay diferencias significativas al agregar MEN a los cultivos frente al control de crecimiento.

Si bien se esperaba observar un efecto fitonutriente en el crecimiento tanto por los reportes bibliográficos como por la confirmación de la presencia de especies bacterianas promotoras del crecimiento detectadas en la secuenciación, este no fue observado. Por tanto, se puede afirmar que, en las concentraciones evaluadas, el consorcio no tiene un efecto positivo significativo en el crecimiento de las plantas de alfalfa. Este resultado era esperable puesto que se utilizaron concentraciones menores a las recomendadas por el fabricante, quien recomienda un uso de 5-10% en plantas. En estas concentraciones si se esperaría una mejora del crecimiento vegetal. Esto se realizó de esta manera porque la concentración de MEN que se colocan en plantas posterior al tratamiento de la arena contaminada es de 2 y 4%. Por otro lado, estos resultados indican que la adición de MEN en estas concentraciones no presentan cambios en el crecimiento en plantas de alfalfa, lo que sirve como línea de base para ensayos de ecotoxicidad posteriores.

#### 4.2.2 Evaluación de la ecotoxicidad de la arena contaminada en plantas de alfalfa

Luego se realizó un ensayo de ecotoxicidad de la arena contaminada con hidrocarburos en plantas de alfalfa tal como se describe en el punto 3.3.3. Se evaluaron 2 condiciones, en las que un sustrato de siembra contuvo un 20% de arena contaminada y otro con un 10% de arena contaminada, agregándose

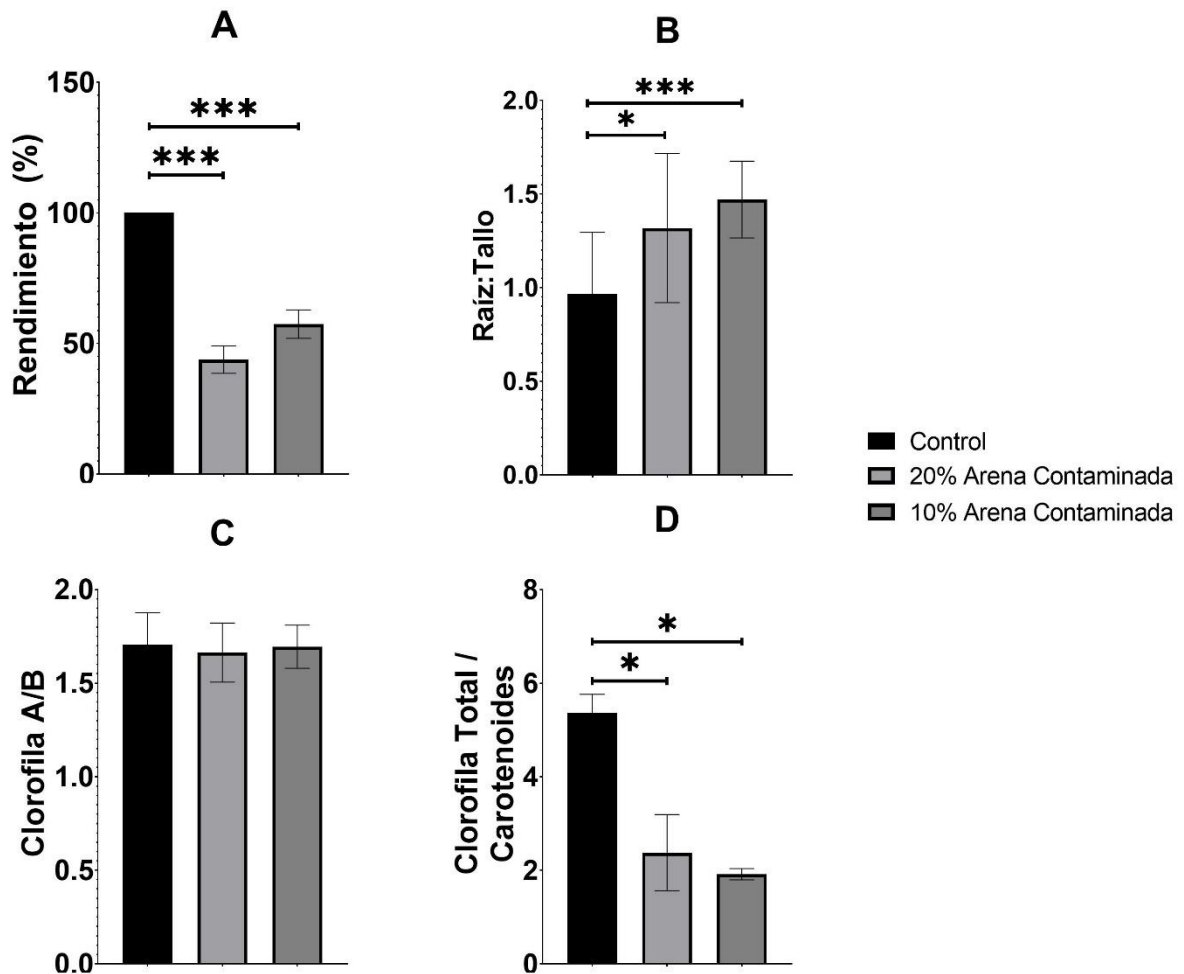
al último otro 10% de arena limpia con el fin de descartar desviaciones provocadas por mayor drenaje en el primero. El control contuvo un 20% de arena limpia. A las plantas obtenidas se les midió biomasa y largo, tanto de raíces como de tallo, y se les extrajeron y cuantificaron pigmentos fotosintéticos. A partir de estos datos obtenidos, se calculó el rendimiento en base a la biomasa, la relación largo de raíz con respecto al largo del tallo, la relación Chl a/b y la relación Chl a+b / Carotenoides. Los resultados obtenidos se compararon frente al crecimiento de las plantas en turba con 20% de arena limpia, que se consideraron como un control de crecimiento y se observan en la Figura 15.

Se consideraron como condición no fitotóxica cuando el rendimiento en base a la biomasa es mayor a 80% con respecto al control, fitotóxica cuando dicho rendimiento es menor a 80% y muy fitotóxica cuando es menor a 50% (37). Como se observa en la Figura 15 A, ambas condiciones evaluadas mostraron rendimientos de nivel fitotóxico, para 10%, y muy fitotóxico para 20%.

En la Figura 15 B se grafica la relación entre raíz y tallo. Se observa un aumento significativo en la relación mencionada, indicando que las plantas están priorizando el crecimiento de sus raíces y por ende identificando como recurso limitante al agua o nutrientes biodisponibles. Es posible que esto se deba a una baja disponibilidad de agua, en cuyo caso se consideran 2 opciones no excluyentes como causa: por un lado, la arena agregada a la mezcla de turba puede causar un mayor drenaje en el sustrato de siembra disminuyendo su humedad.

En la Figura 15 C no se observan diferencias significativas en la relación Chl a/b con respecto al control, no indicando un cambio en la cantidad relativa de estos pigmentos en la estructura del PSII ni la consecuente necesidad de una mayor tasa de fotosíntesis. Sin embargo, en la Figura 15 D, se observa una diferencia significativa en la relación Chl a+b / Carotenoides cuando se comparan ambas condiciones frente al control de crecimiento. Esta tasa, como se mencionó anteriormente, es un indicador de senescencia, estrés y daño del aparato fotosintético de las plantas. Al observarse una disminución significativa en ambas concentraciones, se puede deducir que las plantas se encuentran en estrés al estar expuestas a la arena contaminada con hidrocarburos y estén priorizando su producción de carotenoides fotoprotectores en respuesta a la presencia de ROS.

En síntesis, en la Figura 15 se expone como la arena contaminada es fitotóxica para las plantas en las condiciones de crecimiento evaluadas. A su vez, al observarse que el rendimiento de las plantas determinó que la arena al 20% es muy fitotóxica, se seleccionó esta relación para los posteriores ensayos de ecotoxicidad realizados con arena contaminada.



**Figura 15:** Ensayo de ecotoxicidad de la arena contaminada con hidrocarburos sobre plantas de alfalfa. **A:** Rendimiento en base a la biomasa generada. **B:** Relación Raíz: Tallo. **C:** Relación Chl a/b. **D:** Relación Chl a+b / Carotenoides. Se observa fitotoxicidad en el rendimiento en base a la biomasa al llegar a valores menores de 50%. También se ve diferencias significativas en la relación entre las raíces y el tallo, con preferencia hacia el largo de las raíces. (Diferencia significativa cuando el valor  $p < 0.05$ )

#### 4.2.3 Ecotoxicidad de la arena tratada en microcosmos con MEN en plantas de alfalfa y lombrices de tierra

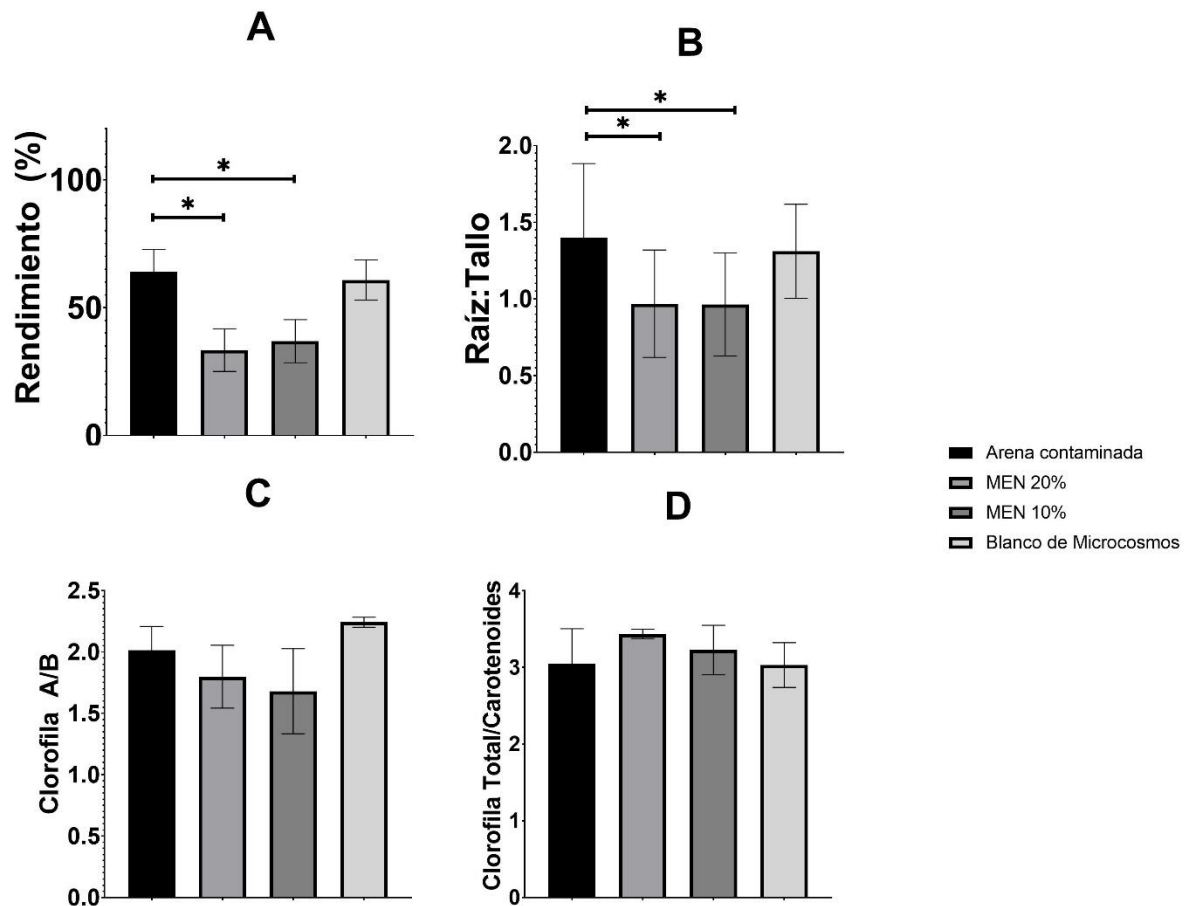
El tratamiento de la arena contaminada fue realizado empleando microcosmos como se describe en el punto 3.3.1. Posteriormente, el tratamiento fue evaluado mediante ensayos de ecotoxicidad en plantas de alfalfa y lombrices de tierra como se describió en los puntos 3.3.2 y 3.3.3.

Se realizaron mezclas de turba con arena postratamiento con MEN en una relación turba: arena de 80:20 para todas las condiciones evaluadas. Dichas mezclas se utilizaron para los ensayos de ecotoxicidad tanto en plantas como lombrices.

Se obtuvieron y analizaron los datos de las plantas de la misma forma que en la sección 4.1.3. mientras que el análisis de las lombrices se realizó comparando el peso de las lombrices previa y posteriormente al tratamiento para finalmente contar el número de lombrices viables y evaluar la pérdida porcentual de biomasa en cada condición.

Tanto los resultados de las plantas obtenidas como los resultados de las lombrices fueron comparadas frente a plantas y lombrices cultivadas en turba con arena contaminada en la misma proporción para comparar la toxicidad con y sin tratamiento, y con arena del blanco de microcosmos, que no fue inoculado con microorganismos, pero se mantuvo en las mismas condiciones que los demás, con el objetivo de evaluar el comportamiento del contaminante en el ambiente de tratamiento y la posibilidad de que exista atenuación natural. A su vez, los cálculos de rendimiento fueron realizados contra un control de crecimiento con turba y arena limpia en relación 80:20.

En la Figura 16 y en la Figura 17 se exponen los resultados obtenidos en los ensayos de ecotoxicidad en plantas con la arena tratada por 14 y 28 días respectivamente. En la Tabla 7 se expone el resultado de los ensayos de ecotoxicidad en lombrices.



**Figura 16:** Ensayo de ecotoxicidad en plantas de alfalfa utilizando arena tratada con MEN durante 14 días. **A:** Rendimiento en base a la biomasa generada de plantas de alfalfa. **B:** Relación Raíz: Tallo de plantas de alfalfa. **C:** Relación Chl a/b de plantas de alfalfa. **D:** Relación Chl a+b / Carotenoides. Se observa fitotoxicidad en todas las condiciones evaluadas en cuanto al rendimiento de biomasa, aunque con una diferencia significativa en las arenas tratadas con MEN con respecto a la arena contaminada. También se observa una diferencia significativa en la relación entre las raíces y el tallo. En las otras dos características evaluadas no se observan diferencias significativas. (Diferencia significativa cuando el valor  $p < 0.05$ ).

En la Figura 16 A se muestra el efecto sobre el rendimiento del crecimiento de las plantas de la arena tratada durante 14 días. Como se puede observar, ambas arenas tratadas en los microcosmos tuvieron un rendimiento significativamente menor que la arena contaminada y que la arena de microcosmos sin tratar. A su vez, como se mencionó anteriormente, un rendimiento menor al 50%, como el que alcanzaron las condiciones, se considera como muy fitotóxico (37). Esto se traduce en que la arena contaminada, tras el tratamiento con MEN por 14 días, resultó ser más fitotóxica que sin ser tratada.

En la Figura 16 B se grafica la relación entre raíz y tallo obtenida en cada una de las condiciones. En cuanto a la arena contaminada sin tratar, se observa una relación similar a las detectadas en los

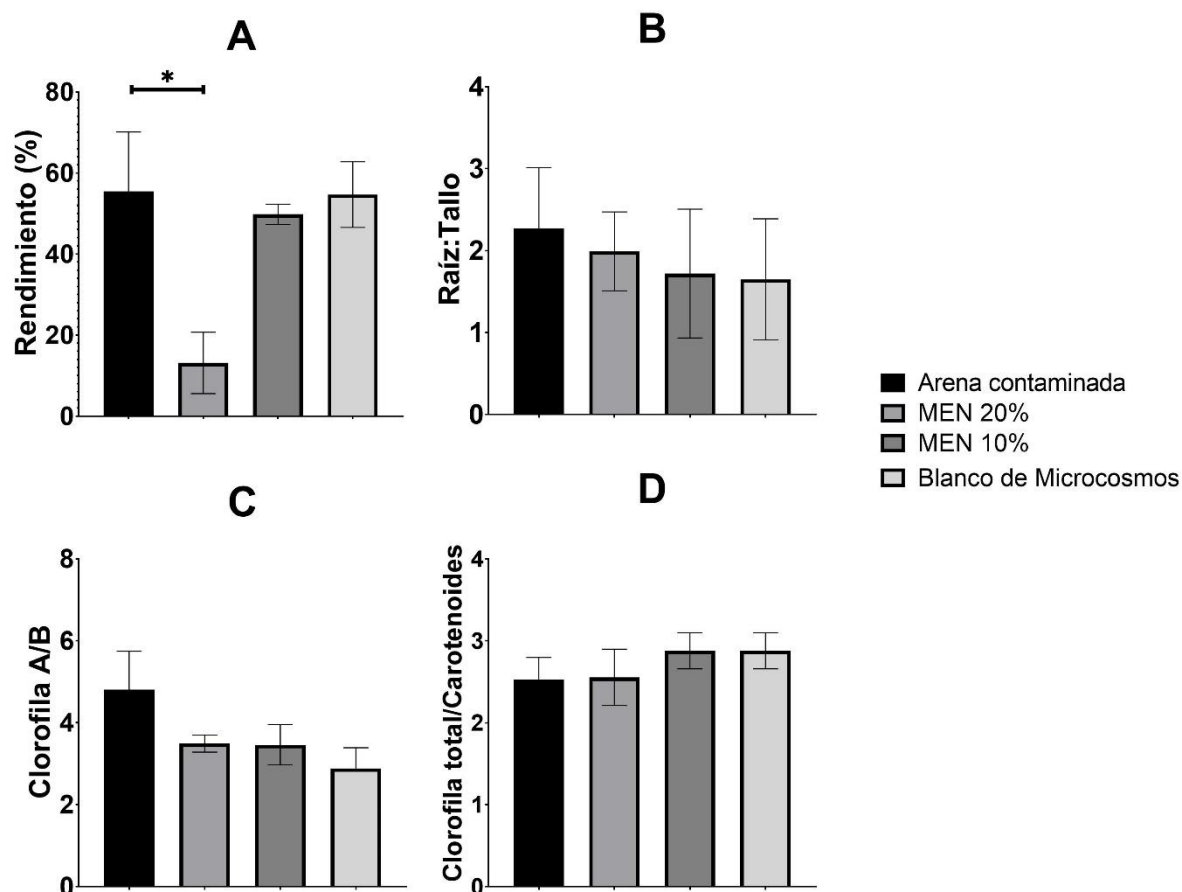
primeros ensayos de ecotoxicidad realizados con esta arena. Sin embargo, cuando se utilizó la arena contaminada, se observó una relación más equilibrada entre raíces y tallos, probablemente debido al poco crecimiento que lograron esas plantas. Es posible que el efecto sobre el rendimiento fue tan fitotóxico que provocó que, al realizar la relación entre raíz y tallo, no haya mucha diferencia entre ambas secciones.

Como se observan en las Figura 16 C y D, no hay diferencias significativas entre la arena tratada y sin tratar. Esto quiere decir que no hubo un cambio en la cantidad relativa de estos pigmentos en la estructura del PSII ni la consecuente necesidad de una mayor tasa de fotosíntesis y que, al observar la relación entre Chl a+b / Carotenoides, las plantas se encuentran bajo estrés.

En la Figura 17 A se muestra el efecto sobre el rendimiento del crecimiento de las plantas de la arena tratada durante 28 días. A diferencia del rendimiento de la arena tratada durante 14 días, solo la que fue tratada en una relación 20% de MEN presenta un rendimiento significativamente menor que la arena contaminada sin tratar. La arena tratada con un 10% de MEN obtuvo una ecotoxicidad muy similar a la arena contaminada.

En la Figura 17 B, que grafica la relación de las raíces frente a los tallos, no se observan diferencias significativas entre las condiciones y se sigue observando la tendencia de las plantas a priorizar el crecimiento de las raíces sobre los tallos, demostrando lo complejo que es obtener agua y nutrientes biodisponibles del sustrato en el que están sembradas las plantas al agregar la arena contaminada.

A su vez, en las Figura 17 C y D, que muestran las relaciones Chl a/b y Chl a+b / Carotenoides, respectivamente, no se observan diferencias significativas en las condiciones evaluadas. En la relación Chl a+b / Carotenoides se observa la misma tendencia a la ecotoxicidad descrita anteriormente, al encontrarse en un rango característico de plantas bajo estrés.



**Figura 17:** Ensayo de ecotoxicidad en plantas de alfalfa utilizando arena tratada con MEN durante 28 días. **A:** Rendimiento en base a la biomasa generada de plantas de alfalfa. **B:** Relación Raíz: Tallo de plantas de alfalfa. **C:** Relación Chl a/b de plantas de alfalfa. **D:** Relación Chl a+b / Carotenoides. Se observa un efecto fitotóxico en cuanto al rendimiento en base a la biomasa en todas las condiciones evaluadas. En la arena tratada con MEN 20% se observa un efecto altamente fitotóxico, teniendo una diferencia significativa frente a la arena contaminada. En las demás características evaluadas no se observan diferencias significativas. (Diferencia significativa cuando el valor  $p < 0.05$ ).

En la Tabla 7 se muestran los resultados de ambos ensayos de ecotoxicidad en lombrices de tierra. Se indican, por un lado, el porcentaje de lombrices muertas cuando se expusieron a la arena contaminada y tratada por 14 y 28 días. Y por otro, la pérdida porcentual de biomasa de cada lombriz sobreviviente. Esto último se calcula realizando una medida en pool de la biomasa inicial y final, y calculando un peso promedio por lombriz.

Como se puede observar en la Tabla 7, todas las condiciones tratadas alcanzaron un porcentaje de mortalidad similar o superior a la arena contaminada. En el caso de la arena tratada con MEN 20%, se observa una disminución de la mortalidad en el tratamiento por 28 días con respecto a la arena tratada por 14 días. A su vez, se ve una reducción significativa en la pérdida porcentual de biomasa en las lombrices sobrevivientes entre un tiempo de tratamiento frente al otro. Por otro lado, no se observan

cambios significativos entre los tiempos de tratamiento con MEN 10%, los cuales se mantuvieron en los mismos niveles de mortalidad y pérdida porcentual de biomasa que la arena contaminada.

Parte del ensayo de ecotoxicidad en lombrices es evaluar el comportamiento de estas frente al contaminante. Un cambio en el comportamiento normal de los organismos es un efecto a nivel sistémico del organismo. Se observó una tendencia de las lombrices a evadir la mezcla de turba con arena contaminada en todos los tratamientos, incluso intentando escapar del hábitat. Esto ha sido reportado previamente en bibliografía en diversos organismos, incluyendo a las lombrices de tierra que responden de esta manera a suelos con contaminantes (35).

**Tabla 7:** Ensayo de ecotoxicidad en lombrices de arena contaminada postratamiento con MEN.

| <b>Condición</b>             | <b>Tiempo de tratamiento</b> | <b>% de mortalidad</b> | <b>% de pérdida de biomasa</b> |
|------------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| <b>Arena contaminada</b>     | 14 días                      | 40%                    | 36%                            |
|                              | 28 días                      | 40%                    | 47%                            |
| <b>MEN 20%</b>               | 14 días                      | 55%                    | 72%                            |
|                              | 28 días                      | 45%                    | 36%                            |
| <b>MEN 10%</b>               | 14 días                      | 35%                    | 33%                            |
|                              | 28 días                      | 40%                    | 35%                            |
| <b>Blanco de Microcosmos</b> | 14 días                      | 65%                    | 39%                            |
|                              | 28 días                      | 30%                    | 50%                            |

A partir de los estudios de ecotoxicidad presentados en esta sección, se puede concluir que el tratamiento con MEN no es suficiente para reducir la toxicidad de los PH presentes en la arena, llegando incluso a provocar una toxicidad mayor al contaminante original en algunos casos.

La causa de este efecto puede tener varias explicaciones. Por un lado, los PH pueden haber sido degradados parcialmente o no haber sido degradados en absoluto dada la baja disponibilidad de oxígeno, ya que la mayoría de los microorganismos llevan a cabo el proceso de manera aeróbica (103).

En caso de no haber sido degradados, los hidrocarburos de cadena corta y los aromáticos, más polares y por ende solubles, tendrían fácil acceso tanto a las plantas de alfalfa por absorción y traslocación en las raíces, como a las lombrices a través de su epidermis. En caso de haber tenido actividad, pero degradación parcial, es posible que productos intermedios de degradación, por ejemplo, fenoles, hayan sido los causantes de la toxicidad observada.

A su vez es posible que en todo el tiempo del ensayo los microorganismos hayan consumido el P y N presente en la arena, el cual es escaso, y hayan muerto, dado que los PHs son puramente una fuente

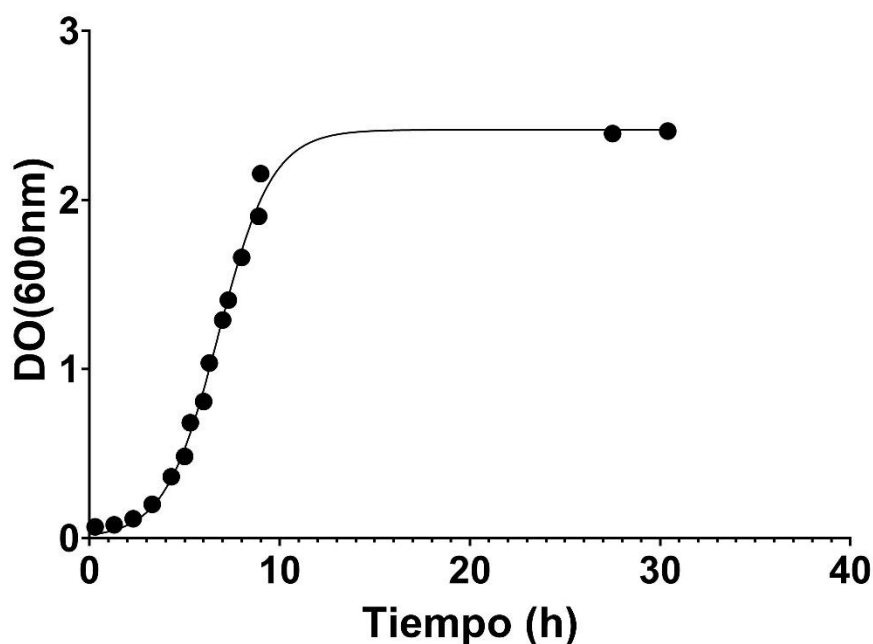
de C. Lo mismo puede haber sucedido con algunas sales y cofactores. Como solución a esta problemática, se podrían realizar recuentos en placa durante el proceso para evaluar la viabilidad de los microorganismos durante el mismo. Además, realizar secuenciaciones sobre los microorganismos viables para identificarlos sería también beneficioso para la creación de un consorcio específico con estos microorganismos para esta aplicación.

#### 4.3 Evaluación de la capacidad de compostaje de los MEN en residuos domésticos

##### 4.3.1 Crecimiento de *Bacillus subtilis*

Con el objetivo de comparar los MEN con otro acelerador del proceso de compostaje, se inoculó una de las composteras con *Bacillus subtilis*, microorganismo utilizado como inoculante modelo para la aceleración y mejora del proceso de compostaje (50). Para esto es necesario conocer su crecimiento para obtener un cultivo en fase exponencial con el cuál realizar dicho inóculo. Para esto se realizó un estudio de su crecimiento en matraz, a 25°C con agitación a 200rpm, durante 30 horas. Los datos obtenidos se ajustaron utilizando el modelo de Gompertz, uno de los ajustes sigmoidales más utilizados en la biología, que permite predecir el comportamiento del crecimiento bacteriano (104). La curva obtenida se muestra en la Figura 18. En esta se observa cómo el cultivo ingresa en la fase exponencial de crecimiento a las 5 horas de cultivo y culmina a las 14 horas aproximadamente.

Dados estos resultados, se decide realizar un cultivo de 10 horas en 800mL de medio LB para generar la biomasa suficiente para inocular la compostera con 0,5% m/m.

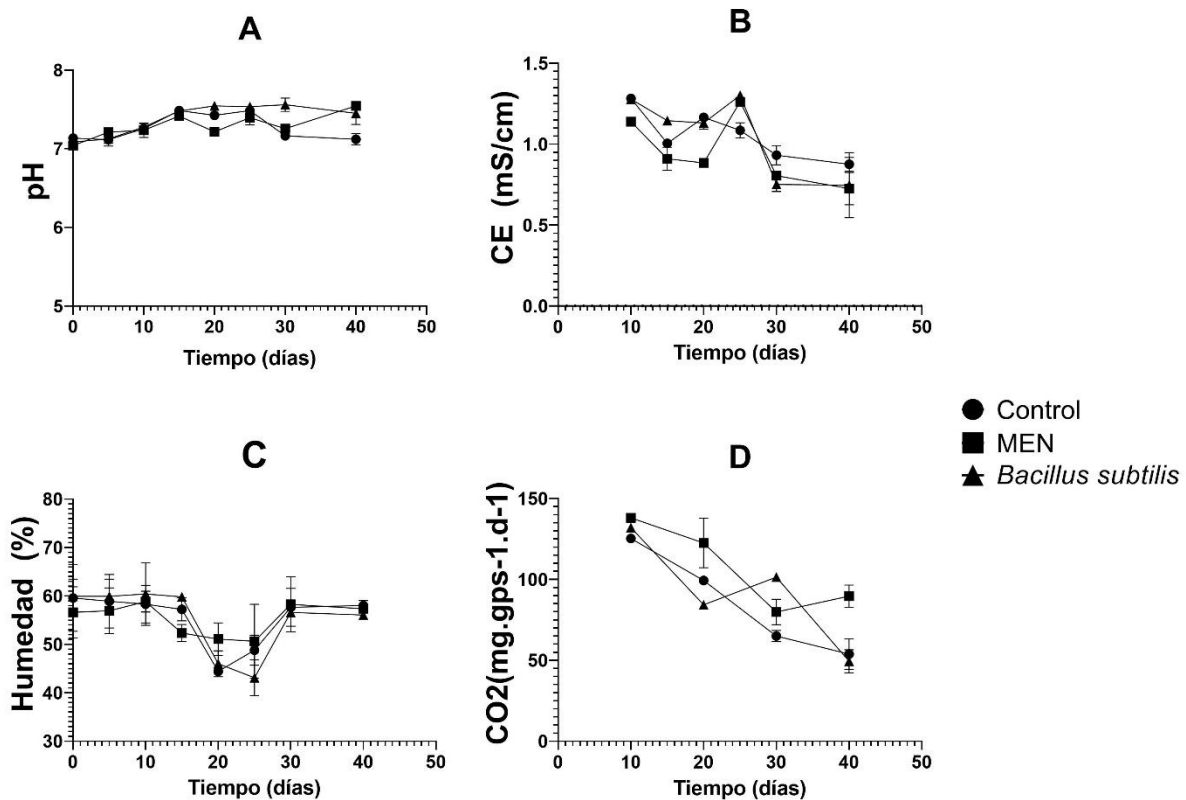


**Figura 18:** Curva de crecimiento de *Bacillus subtilis* a 25°C, 200 rpm, durante 30 horas en medio LB.

#### 4.3.2 Evaluación del compost obtenido

Se evaluó la capacidad de acelerar o mejorar el proceso de compostaje en residuos domésticos mediante el agregado de MEN. Se comparó el proceso frente a un control sin agregado de microorganismos y frente al agregado de *Bacillus subtilis*, microorganismo cuyo efecto promotor del compostaje se encuentra documentado (50). El proceso se realizó durante 40 días. El objetivo final del ensayo fue obtener compost maduro, listo para su aplicación en plantas y observar cuál de las composteras alcanzaba este estado con mayor rapidez, además de evaluar diferencias en la calidad del compost final. Para esto se realizaron diversos ensayos de madurez del compost, los cuales incluyen medición de pH, humedad, conductividad eléctrica, producción de CO<sub>2</sub>, efectos en germinación de col china y efectos en el crecimiento de plantas de alfalfa.

En la Figura 19 A se muestra la evolución del pH durante el tiempo. Como se puede observar, el pH se mantuvo entre valores de 7,0 y 7,6 durante todo el proceso, aceptables dentro del rango de variación de entre 4,9 y 8,3 reportado en bibliografía. No se observa la acidificación inicial característica del compost causada por la generación de ácidos orgánicos de cadena corta y amonio (40). Esto puede deberse a la composición inicial del compost, que incluía restos de frutas, verduras y café, residuos para cuyo compostaje se han reportado niveles en el orden de lo neutro, o incluso tendiendo a básico. Otra explicación podría ser que cuando el pH del suelo es superior a 7,2, el ion amonio se convierte en gas amonio, el cual puede perderse ya que la compostera no se encuentra sellada herméticamente (47). Igualmente, se ha reportado que el rango de pH óptimo para el compostaje de restos de comida es de 7-8, ya que, tanto en niveles altos como bajos de pH, se pueden observar efectos inhibitorios en la actividad microbiana (40).



**Figura 19:** Parámetros fisicoquímicos del compost durante el tiempo. Parámetros fisicoquímicos del compost durante el tiempo. **A:** pH. **B:** Conductividad Eléctrica. **C:** Porcentaje de humedad. **D:** Dióxido de carbono. Los niveles de pH se mantuvieron constantes en el tiempo en valores cercanos al neutro. Por su parte, la CE presenta valores menores a los esperados según bibliografía. La humedad se mantiene en los niveles recomendados. El CO<sub>2</sub>, por su parte, presenta la tendencia descendiente esperada, sin alcanzar los valores reportados para condiciones de madurez.

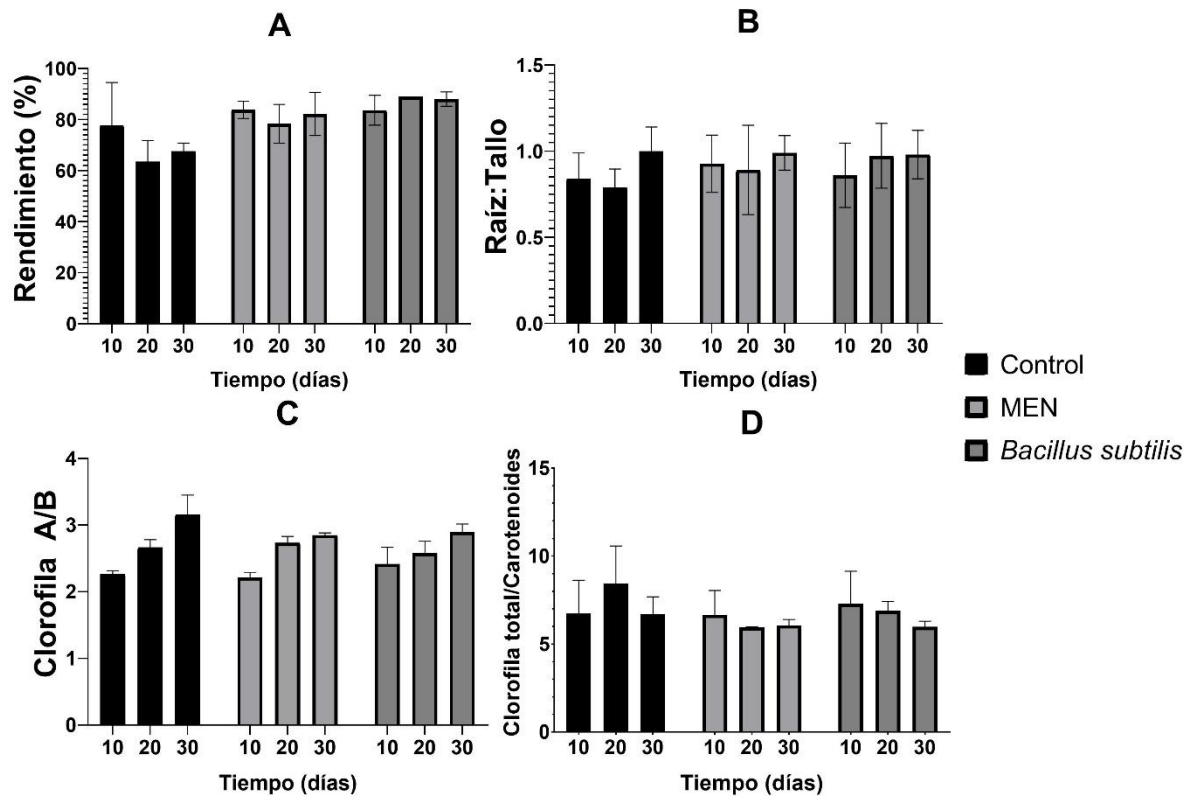
Los valores de CE son un indicador de los iones disponibles en el compost. En general se observa un aumento de este parámetro durante el compostaje, para luego disminuir sobre la maduración, alcanzando finalmente valores estables de entre 2,19 y 9,32mS/cm (47). Esta variación no se observa en la Figura 19 B, pero como se reporta en bibliografía, puede deberse a la volatilización del amonio y/o a precipitación y lixiviación de sales minerales (47). La volatilización del amonio se corresponde con el resultado del pH ya mencionado, y se observó lixiviación durante todo el proceso, por lo que es posible que se haya lixiviado una parte de las sales minerales generadas.

La humedad es uno de los factores más significantes del compostaje de residuos. Es importante para el transporte de nutrientes disueltos que son requeridos para la actividad metabólica y fisiológica de los microorganismos (40). Se recomienda que la humedad se mantenga entre 40 y 60%, valores por debajo de este rango reducen la velocidad de compostaje, mientras que valores por encima provocan condiciones anaeróbicas y mal olor (45, 105). La humedad se mantuvo en el rango mencionado, como se puede observar en la Figura 19 C. Durante el proceso de compostaje se produce agua a partir de la degradación, por lo que es importante mantener la humedad por debajo de 60% (106). Esto se logró

gracias a los drenajes colocados por debajo de la compostera, que permitieron el lixiviado de agua. Igualmente, esto provocó que en el agua lixiviada también lixivien las sales minerales generadas, provocando que baje la CE, como se mencionó anteriormente.

La producción de CO<sub>2</sub> es un parámetro que permite evaluar la actividad microbiana, puesto que es uno de los productos del proceso de compostaje (106). A su vez, se relaciona con el consumo de oxígeno, clave en la degradación aeróbica de la materia orgánica (107). Así como se observa en la Figura 19 D, la producción de CO<sub>2</sub> aumenta al inicio del proceso del compostaje, para luego disminuir y estabilizarse durante la maduración del compost. Finalmente, esta producción se reduce cuando el compost se encuentra maduro, por la disminución de la actividad microbiana causada por la reducción de la materia orgánica disponible para los microorganismos (41). Esta reducción final no fue alcanzada en el tiempo de compostaje evaluado, considerándose un nivel de producción de 8mg de CO<sub>2</sub> por gramo de materia orgánica por día en un compost maduro según la Resolución 141/018 del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (48).

Si bien no se observaron signos de madurez del compost, posiblemente debido al tiempo de proceso ya que en general se necesitan alrededor de 3 meses, se evaluó su efecto en el crecimiento de plantas de alfalfa y en la germinación de semillas de col china. Esto permite conocer si es segura la aplicación de los compost obtenidos en cultivos vegetales. En la Figura 20 se muestran los efectos sobre el crecimiento de las plantas de alfalfa, mientras que en la Figura 21 se muestran los resultados en el Índice de Germinación (IG) alcanzado en las semillas de col china.



**Figura 20:** Resultados de los ensayos de ecotoxicidad en plantas de alfalfa en cada compostera en el tiempo. **A:** Rendimiento en base a la biomasa generada de plantas de alfalfa. **B:** Relación Raíz: Tallo de plantas de alfalfa. **C:** Relación Chl a/b de plantas de alfalfa. **D:** Relación Chl a+b / Carotenoides. Se observa un valor de rendimiento menor al 80% de la condición Control sobre las plantas de alfalfa. (Diferencia significativa cuando el valor  $p < 0.05$ )

Dados los valores de referencia de experimentos previamente descritos, se consideró como fitonutriente a una condición cuando alcanzaba un rendimiento mayor a 100%, mientras que se consideraron como fitotóxicas aquellas que obtuvieran un rendimiento menor a 80%, siempre comparando el crecimiento frente a un control de crecimiento (37). Por esto se puede considerar como fitotóxico al compost obtenido de la condición Control al observarse un rendimiento menor al 80% durante las 3 etapas evaluadas, como se observa en la Figura 20 A, mientras que no se observa un efecto fitotóxico en las composteras inoculadas con MEN y *B. subtilis*, pudiendo sugerir una mejora en la calidad del compost resultante de las mismas respecto del Control a pesar de no haber alcanzado la madurez.

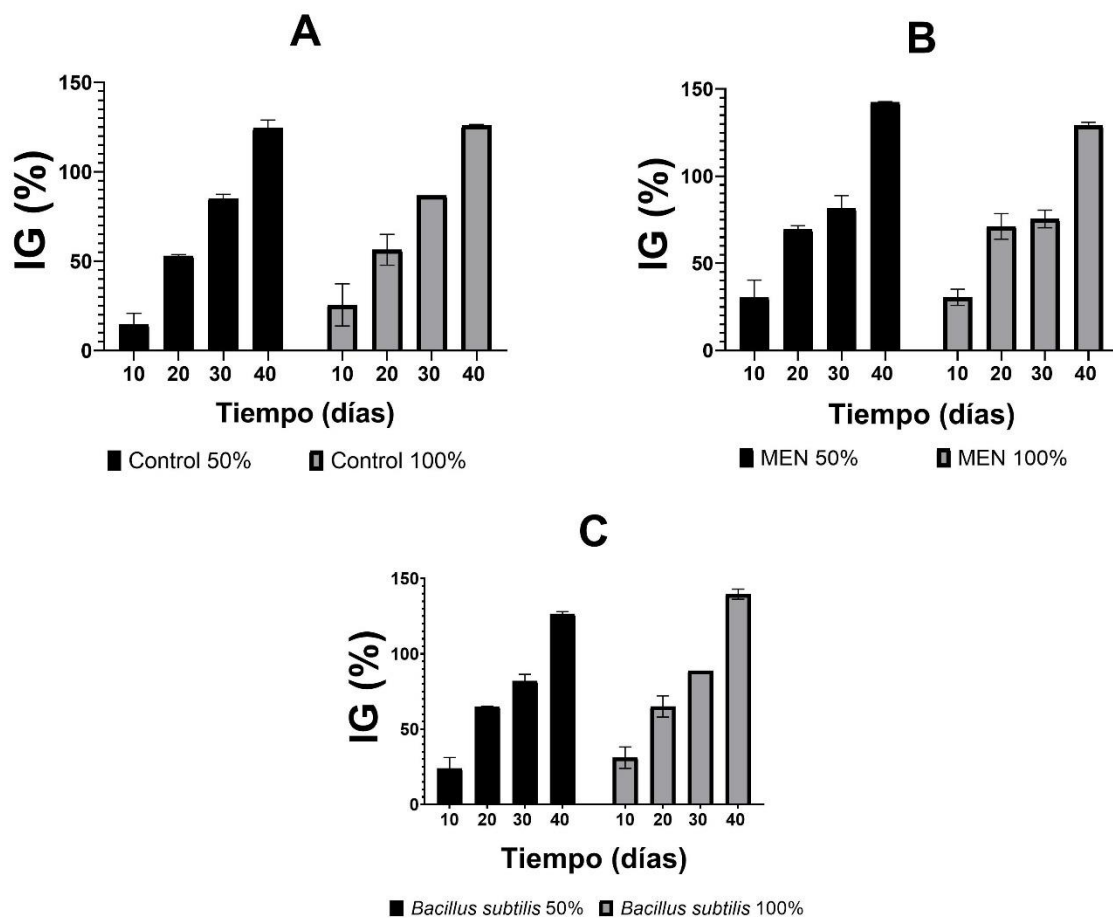
Por otro lado, en la Figura 20 B se puede observar cómo las plantas no mostraron una tendencia clara para priorizar una sección de la planta, siendo que las relaciones entre las raíces y el tallo tienen a 1. En las raíces de gran parte de las plantas se observó el desarrollo de nódulos típicos de rizobios. Esto se observó en plantas de las 3 composteras evaluadas.

Al observar las Figura 20 C y D, que muestran los resultados con respecto a pigmentos fotosintéticos, no se observan diferencias significativas entre las condiciones ni entre las etapas evaluadas. Tampoco muestran diferencias significativas frente a los controles de crecimiento de sus respectivos tiempos (datos no mostrados), por lo que se infiere que las plantas expuestas a los tres compost no estarían bajo condiciones de estrés (102).

En suma, de este conjunto de experimentos se puede ver un efecto levemente fitotóxico del compost Control a los 20 y 30 días debido al rendimiento en base a la biomasa obtenida, mientras que en los compost inoculados no, sugiriendo una posible mejora en su calidad a pesar de no estar aún maduro.

Finalmente, en la Figura 21 se observa la evolución del IG de las semillas de col china. Esta especie susceptible a compuestos fitotóxicos es una de las más relevantes en este tipo de ensayo, que es considerado como el más sensible y exacto para detectar la presencia de compuestos fitotóxicos en compost o suelos (100). Un sustrato se considera como altamente fitotóxico una condición con un IG menor a 50%; moderadamente fitotóxico un IG entre 50 y 80%; no fitotóxico un IG de 80 a 100% y como fitonutriente un IG mayor a 100% (100). Como se puede observar, las 3 condiciones pasaron por las 4 etapas durante los 40 días de compostaje, iniciando como muy fitotóxicas y llegando a ser fitonutrientes. La fitotoxicidad inicial puede estar causada por la presencia de amonio, que obstaculiza la germinación y el crecimiento de raíces (100).

En comparación con los resultados obtenidos en las plantas de alfalfa, se observó una fitotoxicidad en las semillas de col china que no se observó en alfalfa a los 10 y 20 días de las 3 condiciones, aunque los niveles de rendimiento de alfalfa en esos momentos fueron muy cercanos a la fitotoxicidad. Esto se puede deber a la sensibilidad de la col china a compuestos fitotóxicos, que puede ser mayor que la de las plantas de alfalfa. También se puede deber a que la alfalfa se encontraba en turba, y se encontraban ya germinadas, por lo que su sistema radicular estaba más desarrollado y, como se observó, generando interacción con el microbioma de la rizosfera, que puede contrarrestar el efecto fitotóxico de compuestos como los metales pesados (108). A los 30 días, estos resultados se corresponden, y no se observan efectos fitotóxicos en ninguna de las dos especies evaluadas.



**Figura 21:** Índice de germinación de semillas de col china. **A:** Compostera Control. **B:** Compostera inoculada con MEN. **C:** Compostera inoculada con *B. subtilis*. Se observa una evolución en el tiempo durante el compostaje en todas las condiciones, comenzando en valores correspondientes a fitotoxicidad y finalizando en valores reportados como fitonutrientes. (Diferencia significativa cuando el valor  $p < 0.05$ )

En conjunto, los resultados obtenidos de los análisis de compost demuestran que, en el marco del período de tiempo contemplado en el presente estudio, no se obtuvo un compost maduro, así como tampoco una aceleración en el proceso en los reactores inoculados.

Igualmente, el compost demostró no ser fitotóxico a los 30 días en las condiciones inoculadas mientras que en el control sí. Asimismo, los resultados de IG en col china a los 40 días indican que el compost alcanzó a ser fitonutriente en todos los casos, con valores más altos de IG en las composteras correspondientes a MEN y *B. subtilis* sugiriendo una mejora en la calidad a pesar de la inmadurez del producto.

## 5 Conclusiones

En conclusión, se encontraron microorganismos en el preparado de MEN que tienen potencialidad de PGPR, de biocontrol, de degradación de hidrocarburos y de compostaje según la bibliografía consultada. La potencialidad de degradación de hidrocarburos fue confirmada por la presencia de actividad de la enzima lipasa de estos microorganismos, importante en dicho proceso de degradación.

En cuanto a la biorremediación de PH, es posible afirmar que se logró el diseño exitoso de un ensayo de ecotoxicidad en *Eisenia fetida* a escala laboratorio en el que el comportamiento evasivo de las lombrices fue observable pero no interfirió con las medidas de pérdida de biomasa y mortalidad. Respecto a los estudios de ecotoxicidad en plantas y lombrices, en la mayoría de los casos, los productos de los tratamientos fueron más tóxicos que el contaminante original. En los demás casos, la toxicidad fue similar al contaminante original. Esto puede deberse a una falta de degradación o a una degradación parcial de los PH. Para futuros ensayos, se recomendaría que los tratamientos se realicen en condiciones con mayor disponibilidad de oxígeno, puesto que la mayoría de los microorganismos degradadores de PH presentes entre los MEN presentan un metabolismo aeróbico. Otra recomendación es el agregado de nutrientes como P y N, dado que la arena presenta bajos niveles de estos y los PH no los aportan, por lo que se pueden haber agotado durante el tiempo de tratamiento. A su vez, realizar en paralelo un ensayo de medición de producción de CO<sub>2</sub> sería muy informativo, ya que es uno de los productos de la mineralización total de los PH o realizar la medición de TPH a distintos tiempos por Cromatografía Gaseosa (109).

Por otra parte, en lo que refiere a los procesos de compostaje, es posible decir que se pudo poner a punto un sistema de compostaje en *batch* a escala de laboratorio funcional para ensayos de evaluación de compostaje doméstico. De todos modos, en el marco del período de tiempo en el que se llevó a cabo el proceso, no se obtuvo un compost completamente maduro y estable. No se observó una aceleración del proceso en las composteras inoculadas con MEN ni *B. subtilis* con respecto al control sin inocular. Esto se corresponde con bibliografía consultada, donde se remarca que el tiempo de compostaje fue corto para un compostaje de escala domiciliaria. Aun así, el compost Control resultó ser fitotóxico a los 20 y 30 días en el ensayo de ecotoxicidad en alfalfa mientras que el obtenido de los reactores inoculados no y, a los 40 días en el ensayo de fitotoxicidad en col china, el compost alcanzó niveles fitonutrientes en todos los casos con valores mayores de IG en las composteras inoculadas. Por esto, se recomienda realizar el proceso de compostaje por un período de tiempo mayor, no menor a dos meses, para poder observar los posibles efectos aceleradores de los inóculos.

## 6 Referencias bibliográficas

- (1) Bellenda B, Faroppa S, Linari G. Entre Bichitos: Microorganismos Eficientes Nativos en 6° Año A y 6° Año B, Escuela República Popular China. Casavalle, Montevideo, Uruguay; 2016.
- (2) Higa T, Parr JF. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture. Atami: International Nature Farming Research Center; 1994.
- (3) Sekeran V, Balaji C, Bhagavathi Pushpa T. Evaluation Of Effective Microorganisms (EM) In Solid Waste Management. Electronic Green Journal (UCLA). 2005. <https://escholarship.org/content/qt56q5g376/qt56q5g376.pdf>
- (4) Che Jusoh ML, Abd Manaf L, Abdul Latiff P. Composting of rice straw with effective microorganisms (EM) and its influence on compost quality. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering. 2013;10(17).
- (5) Ministerio de Ambiente. Plan Nacional de Gestión de Residuos. 1er edició. Ministerio de Ambiente, editor. Montevideo, Uruguay; 2021.
- (6) García Sánchez J. Gestión de residuos en Uruguay. Montevideo; 2022. <http://uruguay.oficinascomerciales.es>
- (7) Pan I, Dam B, Sen SK. Composting of common organic wastes using microbial inoculants. 3 Biotech. 2012;2:127–134. doi:10.1007/s13205-011-0033-5
- (8) Sangakkara UR. The Technology of Effective Microorganisms. Peradeniya, Sri Lanka; 2001.
- (9) Higa T, Wididana GN. The concept and theories of Effective Microorganisms. Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming. 1991:118–124.
- (10) Higa T. Effective microorganisms: A biotechnology for mankind. Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming. 1991:8–14. [http://www.infrc.or.jp/english/KNF\\_Data\\_Base\\_Web/PDF\\_KNF\\_Conf\\_Data/C1-2-001.pdf](http://www.infrc.or.jp/english/KNF_Data_Base_Web/PDF_KNF_Conf_Data/C1-2-001.pdf)
- (11) Reyes Castillo A. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) y su aporte en la nutrición mineral de tomate (*Lycopersicon sculentum* L.). Chillan, Chile: Universidad de Concepción; 2019.
- (12) Siraj S, Khan MA, Hamayun M, Ali S, Khan SA, Hussain A, Iqbal A, Khan H, Kang SM, Lee IJ. Microbacterium oxydans Regulates Physio-Hormonal and Molecular Attributes of Solanum lycopersicum under Drought Stress. Agronomy. 2022;12(3324). doi:10.3390/agronomy12123224
- (13) Feichtmayer J, Deng L, Griebler C. Antagonistic microbial interactions: Contributions and potential applications for controlling pathogens in the aquatic systems. Frontiers in Microbiology. 2017;8(NOV):1–14. doi:10.3389/fmicb.2017.02192
- (14) Vidali M. Bioremediation. An overview. Pure and Applied Chemistry. 2001;73(7):1163–1172.
- (15) Garbisu C, Alkorta I. Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection. 2003;3(1):58–66.
- (16) Bajsa N, Aziz G, García S, Tazante T, Piccini C. Informe de Caracterización de Microorganismos Eficientes Nativos (MEN) Elaborados por la Cooperativa de Trabajo Entrebichitos. Montevideo, Uruguay; 2021.
- (17) Ley N° 18829: Declaración de Interés General. Ejecución del Plan Nacional de Integración Socio-Habitacional Juntos. Montevideo, Uruguay, Uruguay: Registro Nacional de Leyes y Decretos; 2011.
- (18) Feng L, Jiang X, Huang Y, Wen D, Fu T, Fu R. Petroleum hydrocarbon-contaminated soil bioremediation assisted by isolated bacterial consortium and sophorolipid. Environmental Pollution. 2021;273(116476). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116476>. doi:10.1016/j.envpol.2021.116476
- (19) Adipah S. Introduction of Petroleum Hydrocarbons Contaminants and its Human Effects. Journal of Environmental Science and Public Health. 2018;03(01). doi:10.26502/jesph.96120043
- (20) Martínez J, Mallo M, Lucas R, Álvarez J, Salvarrey A, Gristo P. Fundamentos: Tomo I. In: Guía para la Gestión Integral de Residuos Peligrosos. Centro Coordinador del Convenio de Basilea para América Latina y el Caribe; 2005.
- (21) Ministerio de Ambiente. Empresas transportistas de residuos sólidos industriales y asimilados. Uruguay: Ministerio de Ambiente; 2023.
- (22) Ifeanyi VO, Ihenatuoha. Effects of the Consortium of Pseudomonas, Bacillus and Micrococcus Spp on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Crude Oil. Nig J. Biotech. 2011;22:28–33. [www.biotechsocietynigeria.org](http://www.biotechsocietynigeria.org). doi:10.2.10
- (23) Kuppusamy S, Maddela NR, Megharaj M, Venkateswarlu K. Total Petroleum Hydrocarbons: Environmental Fate, Toxicity, and Remediation. Cham: Springer Nature Switzerland AG; 2020.
- (24) Sathis Kumar K, Sridevi Dhanarani T, Thamaraiselvi K. Utilization of petroleum hydrocarbons by

- Micrococcus and Streptococcus sps. isolated from contaminated site. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 2013;3(1):71–78. [www.scholarsresearchlibrary.com](http://www.scholarsresearchlibrary.com)
- (25) Ogbolosingha AJ, Ohiri RC. Variation of Lipase, Catalase and Dehydrogenase Activities during Bioremediation of Crude Oil Polluted Soil. *Journal of Environment and Earth Science*. 2015;5(14):128–141. [www.iiste.org](http://www.iiste.org)
  - (26) Ahmad J. Bioremediation of petroleum sludge using effective microorganism (EM) technology. *Petroleum Science and Technology*. 2017;35(14):1515–1522. <http://dx.doi.org/10.1080/10916466.2017.1356850>. doi:10.1080/10916466.2017.1356850
  - (27) Viñas M. *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*. Barcelona: Universitat de Barcelona; 2005. <http://www.tdx.cesca.es/TDX-0920105-085623/>
  - (28) Sheppard PJ, Adetutu EM, Makadia TH, Ball AS. Microbial community and ecotoxicity analysis of bioremediated, weathered hydrocarbon-contaminated soil. *Soil Research*. 2011;49(3):261–269. doi:10.1071/SR10159
  - (29) Čvančarová M, Křesinová Z, Cajthaml T. Influence of the bioaccessible fraction of polycyclic aromatic hydrocarbons on the ecotoxicity of historically contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*. 2013;254–255:116–124. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.03.060
  - (30) Arafa R. Immobilization and Characterization of Lipase Loaded on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles and Produced From Haloalkalophilic *Kocuria Polaroides* WRS3. *International Journal of Information Research and Review*. 2017;4(2):3662–3676.
  - (31) Yan S, Wang Q, Qu L, Li C. Characterization of Oil-Degrading Bacteria from Oil-Contaminated Soil and Activity of their Enzymes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 2013;27(4):3932–3938. doi:10.5504/BBEQ.2013.0050
  - (32) Millán Ordóñez E. *Evolución de la Actividad Enzimática de un Suelo Contaminado con Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos*. Sevilla, España: Universidad Pablo de Olavide; 2015.
  - (33) Li Y, Wang X, Sun Z. Ecotoxicological effects of petroleum-contaminated soil on the earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of Hazardous Materials*. 2020;393. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122384
  - (34) Gainer A, Hogan N, Siciliano SD. Soil invertebrate avoidance behavior identifies petroleum hydrocarbon contaminated soils toxic to sensitive plant species. *Journal of Hazardous Materials*. 2019;361:338–347. doi:10.1016/j.jhazmat.2018.08.086
  - (35) Candello FP, Guimarães JR, Nour EAA. Earthworm avoidance behavior to antimicrobial sulfadiazine on tropical artificial soil. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. 2018;13(2):69–75. doi:10.5132/eec.2018.02.09
  - (36) Haider FU, Ejaz M, Cheema SA, Khan MI, Zhao B, Liqun C, Salim MA, Naveed M, Khan N, Núñez-Delgado A, et al. Phytotoxicity of petroleum hydrocarbons: Sources, impacts and remediation strategies. *Environmental Research*. 2021;197. doi:10.1016/j.envres.2021.111031
  - (37) Di Benedetto A, Tognetti J. Técnicas de análisis de crecimiento de plantas: su aplicación a cultivos intensivos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 2016;42(3):258–282.
  - (38) Tanaka R, Koshino Y, Sawa S, Ishiguro S, Okada K, Tanaka A. Overexpression of chlorophyllide a oxygenase (CAO) enlarges the antenna size of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 2001;26(4):365–373.
  - (39) Fan Y Van, Lee CT, Klemeš JJ, Chua LS, Sarmidi MR, Leow CW. Evaluation of Effective Microorganisms on home scale organic waste composting. *Journal of Environmental Management*. 2018;216:41–48. doi:10.1016/j.jenvman.2017.04.019
  - (40) Li Z, Lu H, Ren L, He L. Experimental and modeling approaches for food waste composting: A review. *Chemosphere*. 2013;93(7):1247–1257. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.06.064
  - (41) Chen H, Awasthi SK, Liu T, Duan Y, Ren X, Zhang Z, Pandey A, Awasthi MK. Effects of microbial culture and chicken manure biochar on compost maturity and greenhouse gas emissions during chicken manure composting. *Journal of Hazardous Materials*. 2020;389. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121908>. doi:10.1016/j.jhazmat.2019.121908
  - (42) Garcia D, Lima L, Ruiz L, Calderon P. Métodos y parámetros para determinar la madurez en el compost a nivel de fincas. *Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente*. 2014;14(26). [https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/36573604/Metodos\\_y\\_parametros\\_para\\_determinar\\_la\\_madurez\\_en\\_el\\_compost\\_a\\_nivel\\_de\\_fincas-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1626311166&Signature=WN5MUfuzqq2nlw1dL~WQorqebhj4J-9r2CA4ewa~SkHmjmXaej-rw8~CeldGV6HxYI4qgrZfKwg](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/36573604/Metodos_y_parametros_para_determinar_la_madurez_en_el_compost_a_nivel_de_fincas-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1626311166&Signature=WN5MUfuzqq2nlw1dL~WQorqebhj4J-9r2CA4ewa~SkHmjmXaej-rw8~CeldGV6HxYI4qgrZfKwg)
  - (43) Papale M, Romano I, Finore I, Giudice A Lo, Piccolo A, Cangemi S, Meo V Di, Nicolaus B, Poli A. Prokaryotic diversity of the composting thermophilic phase: The case of ground coffee compost. *Microorganisms*. 2021;9(218):1–19. doi:10.3390/microorganisms9020218
  - (44) Smith SR, Jasim S. Small-scale home composting of biodegradable household waste: overview

- of key results from a 3-year research programme in West London. *Waste Management and Research*. 2009;27(10):941–950. doi:10.1177/0734242X09103828
- (45) Trautmann NM, Krasny ME. Composting in the Classroom: Scientific Inquiry for High School Students. 2012.
- (46) Azim K, Soudi B, Boukhari S, Perissol C, Roussos S, Thami Alami I. Composting parameters and compost quality: a literature review. *Organic Agriculture*. 2018;8(2):141–158. doi:10.1007/s13165-017-0180-z
- (47) Dadi D, Daba G, Beyene A, Luis P, Van der Bruggen B. Composting and co-composting of coffee husk and pulp with source-separated municipal solid waste: a breakthrough in valorization of coffee waste. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*. 2019;8(3):263–277. <https://doi.org/10.1007/s40093-019-0256-8>. doi:10.1007/s40093-019-0256-8
- (48) Ministerio de Ganadería A y P. Resolución N° 141/018 DGSA Requisitos Técnicos para el Registro de Enmiendas Orgánicas. 2018. p. 3–4.
- (49) Gariglio NF, Buyatti MA, Pilatti RA, Russia DEG, Acosta MR. Use of a germination bioassay to test compost maturity of willow (*Salix* sp.) sawdust. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 2002;30(2):135–139. doi:10.1080/01140671.2002.9514208
- (50) Duan M, Zhang Y, Zhou B, Qin Z, Wu J, Wang Q, Yin Y. Effects of *Bacillus subtilis* on carbon components and microbial functional metabolism during cow manure–straw composting. *Bioresource Technology*. 2020;303(122868). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122868>. doi:10.1016/j.biortech.2020.122868
- (51) Hagemann IS. Overview of Technical Aspects and Chemistries of Next-Generation Sequencing. In: *Clinical Genomics*. Elsevier Inc.; 2015. p. 3–19. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-404748-8.00001-0>. doi:10.1016/B978-0-12-404748-8.00001-0
- (52) Asma M, Lingakumar K. Jasmonate Foliar Spray Induced Vegetative Growth and Pigment Composition in *Vigna radiata* L. Wilczek. *International Journal of Advanced Research*. 2015;3(1):664–669.
- (53) OECD. Earthworm, Acute Toxicity Tests. 1984. p. 1–9.
- (54) Grgić DK, Domanovac M V., Domanovac T, Šabić M, Cvetnić M, Bulatović VO. Influence of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* BSW and Clinoptilolite Addition on the Biowaste Composting Process. *Arabian Journal for Science and Engineering*. 2019;44(6):5399–5409. doi:10.1007/s13369-018-03692-8
- (55) Sadzawka A, Carrasco MA, Grez R, Mora M de la L. Métodos de Análisis de Compost. Revisión 2. (INIA) I de IA, editor. Santiago de Chile, Chile: Gobierno de Chile, Ministerio de Agricultura, INIA; 2005. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/8431>
- (56) Robert O. Miller. Test methods for the examination of composting and compost (TMECC). Compost Analysis Proficiency (CAP) Testing Program. 2002;(December 1995). [https://compostingcouncil.org/wp-content/plugins/wp-pdfupload/pdf/34/TMECC Purpose, Composting Process.pdf](https://compostingcouncil.org/wp-content/plugins/wp-pdfupload/pdf/34/TMECC_Purpose, Composting Process.pdf) <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Test+Method+s+for+the+Examination+of+Composting+and+Compost#0>
- (57) Rocha F. Análisis de la Calidad de Vermicompost Producido a Partir de Residuos Domésticos en Sistema Fed-batch. Montevideo, Uruguay: Universidad ORT Uruguay; 2022.
- (58) Wang X, Radwan MM, Taráwneh AH, Gao J, Wedge DE, Rosa LH, Cutler HG, Cutler SJ. Antifungal Activity against Plant Pathogens of Metabolites from the Endophytic Fungus *Cladosporium cladosporioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61:4551–4555. doi:10.1021/jf400212y
- (59) Pandey V, Chandra K. Agriculturally Important Microorganisms as Biofertilizers: Commercialization and Regulatory Requirements in Asia. In: Singh HB, Sarma BK, Keswani C, editors. *Agriculturally Important Microorganisms*. Springer Science. Springer Singapore; 2016. p. 133–145. doi:10.1007/978-981-10-2576-1\_8
- (60) Pathak D V., Kumar M. Microbial Inoculants as Biofertilizers and Biopesticides. In: *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Springer India; 2016. p. 197–209. doi:10.1007/978-81-322-2647-5\_11
- (61) Saritha M, Prasad Tollamadugu NVKV. The Status of Research and Application of Biofertilizers and Biopesticides: Global scenario. In: *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. Elsevier Inc.; 2019. p. 195–207. doi:10.1016/B978-0-12-816328-3.00015-5
- (62) Al-Dhabi NA, Esmail GA, Mohammed Ghilan AK, Arasu MV. Composting of Vegetable Waste Using Microbial Consortium and Biocontrol Efficacy of *Streptomyces* Sp. Al-Dhabi 30 Isolated from the Saudi Arabian Environment for Sustainable Agriculture. *Sustainability*. 2019;11(6845). doi:10.3390/su11236845

- (63) Akbar A, Sitara U, Ali I, Muhammad N, Khan SA. Isolation and Characterization of Biotechnologically Potent *Micrococcus luteus* Strain From Environment. *Pakistan J. Zool.* 2014;46(4):967–973.
- (64) Sharma N, Singh Saharan B. Role of *Micrococcus luteus* SNSr7 strain NH54PC02 in Sustainable agriculture by behaving as Biocontrol agent. *International Journal of Microbiology and Allied Sciences.* 2016;3(1):1–13.
- (65) Sajani S, Rani M. Screening of *Micrococcus* Sp from Oil Contaminated Soil with Reference to Bioremediation. *Botany Research International.* 2009;2(4):248–252. <https://www.researchgate.net/publication/338979818>
- (66) Alam Khan J, Singh S. Evaluation of Oil Degradation Potential of *Micrococcus varians*. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology.* 2011;2(4):75–80. [www.ijabpt.com](http://www.ijabpt.com)
- (67) Sun B, Gu L, Bao L, Zhang S, Wei Y, Bai Z, Zhuang G, Zhuang X. Application of biofertilizer containing *Bacillus subtilis* reduced the nitrogen loss in agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry.* 2020;148. doi:10.1016/j.soilbio.2020.107911
- (68) Wang H, Shi Y, Wang D, Yao Z, Wang Y, Liu J, Zhang S, Wang A. A Biocontrol Strain of *Bacillus subtilis* WXCDD105 Used to Control Tomato *Botrytis cinerea* and *Cladosporium fulvum* Cooke and Promote the Growth of Seedlings. *International Journal of Molecular Sciences.* 2018;19(1371). doi:10.3390/ijms19051371
- (69) Duteu D, Blaga AC, Zaharia C. The action of microorganisms on chemical pollutants from water and soil. *Current topics, concepts and research priorities in environmental chemistry.* 2013;2741(October 2016).
- (70) Hocinat A, Boudemagh A, Ali-Khodja H, Medjemadj M. Aerobic degradation of BTEX compounds by *Streptomyces* species isolated from activated sludge and agricultural soils. *Archives of Microbiology.* 2020;202(9):2481–2492. doi:10.1007/s00203-020-01970-4
- (71) Saadoun I, Alawawdeh M, Jaradat Z, Ababneh Q. Growth of *Streptomyces* spp. from hydrocarbon-polluted soil on diesel and their analysis for the presence of alkane hydroxylase gene (*alkB*) by PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2008;24:2191–2198. doi:10.1007/s11274-008-9729-z
- (72) Radwan SS, Barabas G, Sorkhoh NA, Damjanovich S, Szabo I, Szollosi J, Matko J, Penyige A, Hirano T, Szabo IM. Hydrocarbon uptake by *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters.* 1998;169:87–94. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb13303.x
- (73) Dubey A, Kumar A, Khan ML, Payasi DK. Plant Growth-promoting and Bio-control Activity of *Micrococcus luteus* Strain AKAD 3-5 Isolated from the Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Rhizosphere. *The Open Microbiology Journal.* 2021;15:188–197. doi:10.2174/1874285802115010188
- (74) Armada E, Probanza A, Roldán A, Azcón R. Native plant growth promoting bacteria *Bacillus thuringiensis* and mixed or individual mycorrhizal species improved drought tolerance and oxidative metabolism in *Lavandula dentata* plants. *Journal of Plant Physiology.* 2016;192. doi:10.1016/j.jplph.2015.11.007
- (75) Dastager SG, Deepa CK, Pandey A. Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2010;48:987–992. doi:10.1016/j.plaphy.2010.09.006
- (76) George Z, Crickmore N. *Bacillus thuringiensis* Applications in Agriculture. In: *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Springer Science+Business; 2013. p. 19–39. doi:10.1007/978-94-007-3021-2\_2
- (77) Sansinenea E. Discovery and Description of *Bacillus thuringiensis*. In: *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Vol. 9789400730212. Springer Netherlands; 2012. p. 3–18. doi:10.1007/978-94-007-3021-2\_1
- (78) Sanchis V, Bourguet D. *Bacillus thuringiensis*: Applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agronomy for Sustainable Development.* 2008;28:11–20. doi:10.1051/agro:2007054
- (79) Sauka DH, Piccinetti CF, Vallejo DA, Onco MI, Pérez MP, Benintende GB. New entomopathogenic strain of *Bacillus thuringiensis* is able to solubilize different sources of inorganic phosphates. *Applied Soil Ecology.* 2021;160(103839). doi:10.1016/j.apsoil.2020.103839
- (80) Horuz S, Aysan Y. Biological Control of Watermelon Seedling Blight Caused by *Acidovorax citrulli* Using Antagonistic Bacteria from the Genera *Curtobacterium*, *Microbacterium* and *Pseudomonas*. *Plant Protection Science.* 2018;54(3):138–146. doi:10.17221/168/2016-PPS
- (81) Ozsahin E, Sezen K, Demir I, Demirbag Z. Bacterial isolates from *Palomena prasina* (Hemiptera:

- Pentatomidae) include potential microbial control agents. *Biocontrol Science and Technology*. 2014;24(9):1039–1051. doi:10.1080/09583157.2014.918584
- (82) Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C. Comparison of Benefit to Sugarcane Plant Growth and 15 N 2 Incorporation Following Inoculation of Sterile Plants with *Acetobacter diazotrophicus* Wild-Type and Nif – Mutant Strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions* MPMI. 2001;14(3):358–366.
- (83) Sivasakthi S, Usharani G, Saranraj P. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) -*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African Journal of Agricultural Research*. 2014;9(16):1265–1277. <http://www.academicjournals.org/AJAR>. doi:10.5897/AJAR2013.7914
- (84) Wang XQ, Zhao DL, Shen LL, Jing CL, Zhang CS. Application and Mechanisms of *Bacillus subtilis* in Biological Control of Plant Disease. In: *Role of Rhizospheric Microbes in Soil*. Springer Nature Singapore; 2018. p. 225–250. doi:10.1007/978-981-10-8402-7\_9
- (85) Arrebola E, Sivakumar D, Korsten L. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biological Control*. 2010;53:122–128. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.11.010
- (86) Pusey PL. Use of *Bacillus subtilis* and Related Organisms as Biofungicides. *Journal of Pesticide Science*. 1989;27:133–140.
- (87) Jingchun T, Xiaowei N, Qing S, Rugang W. Bioremediation of petroleum polluted soil by combination of rye grass with effective microorganisms. In: *2009 International Conference on Environmental Science and Information Application Technology*. Vol. 2. 2009. p. 51–54. doi:10.1109/ESIAT.2009.381
- (88) Xu X, Liu W, Tian S, Wang W, Qi Q, Jiang P, Gao X, Li F, Li H, Yu H. Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9(2885). doi:10.3389/fmicb.2018.02885
- (89) Olubunmi M. Biodegradation of diesel-polluted soil using *Penicillium* sp and *Bacillus subtilis*. *International Journal of Contemporary Applied Researches*. 2018;5(11):17–25.
- (90) Nwaogu LA, Onyeze GOC, Nwabueze RN. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. *African Journal of Biotechnology*. 2008;7(12):1939–1943. doi:10.5897/ajb07.889
- (91) Christova N, Tuleva B, Nikolova-Damyanova B. Enhanced Hydrocarbon Biodegradation by a Newly Isolated *Bacillus subtilis* Strain. *Zeitschrift fur Naturforschung C*. 2004;59(3–4):205–208. doi:10.1515/znc-2004-3-414
- (92) Meddeb-Mouelhi F, Moisan J, Beaugard M. Characterization of Bacteria Community Isolated from Wood Decay. *British Biotechnology Journal*. 2016;10(1):1–14. doi:10.9734/bbj/2016/21512
- (93) Setiawan A, Setiawan F, Juliasih NLGR, Widyastuti W, Laila A, Setiawan WA, Djailani FM, Mulyono M, Hendri J, Arai M. Fungicide Activity of Culture Extract from *Kocuria palustris* 19C38A1 against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Fungi*. 2022;8(280). doi:10.3390/jof8030280
- (94) Mieszkin S, Pouder E, Uroz S, Simon-Colin C, Alain K. *Acidisoma silvae* sp. nov. and *Acidisoma cellulositytica* sp. nov., Two Acidophilic Bacteria Isolated from Decaying Wood, Hydrolyzing Cellulose and Producing Poly-3-hydroxybutyrate. *Microorganisms*. 2021;9(2053). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102053>. doi:10.3390/microorganisms
- (95) Ruggirello M, Nucera D, Cannoni M, Peraino A, Rosso F, Fontana M, Cocolin L, Dolci P. Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. *Food Research International*. 2019;115:519–525. doi:10.1016/j.foodres.2018.10.002
- (96) Nguyen MT, Hannaway D, Ranamukhaarachchi SL, Hannaway DB. Efficacy of Antagonist Strains of *Bacillus megaterium*, *Enterobacter cloacae*, *Pichia guilliermondii* and *Candida ethanolica* against Bacterial Wilt Disease of Tomato. *Journal of Phytopathology*. 2011;3(2):1–10. <https://www.researchgate.net/publication/319990367>
- (97) Nguyen MT, Ranamukhaarachchi SL. Soil-Borne Antagonists for Biological Control of Bacterial Wilt Disease Caused by *Ralstonia solanacearum* in Tomato and Pepper. *Journal of Plant Pathology*. 2010;92(2):395–405.
- (98) Chan GF, Othman F, Zulkiffli H, Yousif RH, Yusof AM, Aini N, Rashid A, Corresponding -----\*. Yeasts as the Novel Attractant of *Pomacea canaliculata*. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)* *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research*. 2014;18(2):51–60. <http://gssrr.org/index.php?journal=JournalOfBasicAndApplied>
- (99) Slover CM. *Lactobacillus*: a Review. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2008;30(4):23–27. doi:10.1016/j.clinmicnews.2008.01.006
- (100) Mamo M, Kassa H, Ingale L, Dondeyne S. Evaluation of compost quality from municipal solid

- waste integrated with organic additive in Mizan–Aman town, Southwest Ethiopia. *BMC Chemistry*. 2021;15(43). <https://doi.org/10.1186/s13065-021-00770-1>. doi:10.1186/s13065-021-00770-1
- (101) Bonifas KD, Walters DT, Cassman KG, Lindquist JL. Nitrogen supply affects root:shoot ratio in corn and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). *Weed Science*. 2005;53(5):670–675. doi:10.1614/ws-05-002r.1
- (102) Lichtenthaler HK, Buschmann C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement And Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In: *Handbook of Food Analytical Chemistry*. Vol. 1. 2001. p. 171–178. doi:10.1002/0471709085.ch21
- (103) Nuñez M. *Micrococcus*. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Vol. 2. Elsevier Inc.; 2014. p. 627–633. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00206-8
- (104) Tjørve KMC, Tjørve E. The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLoS ONE*. 2017;12(6). doi:10.1371/journal.pone.0178691
- (105) Zakarya IA, Khalib SNB, Mohd Ramzi N. Effect of pH, temperature and moisture content during composting of rice straw burning at different temperature with food waste and effective microorganisms. *E3S Web of Conferences*. 2018;34(02019). doi:10.1051/e3sconf/20183402019
- (106) Castro-Aguirre E, Auras R, Selke S, Rubino M, Marsh T. Insights on the aerobic biodegradation of polymers by analysis of evolved carbon dioxide in simulated composting conditions. *Polymer Degradation and Stability*. 2017;137:251–271. <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2017.01.017>. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2017.01.017
- (107) Barrena Gómez R, Vázquez Lima F, Sánchez Ferrer A. The use of respiration indices in the composting process: A review. *Waste Management and Research*. 2006;24(1):37–47. doi:10.1177/0734242X06062385
- (108) Redouane EM, Mugani R, Lahrouni M, Martins JC, El Amrani Zerrifi S, Oufdou K, Campos A, Vasconcelos V, Oudra B. Role of Rhizospheric Microbiota as a Bioremediation Tool for the Protection of Soil-Plant Systems from Microcystins Phytotoxicity and Mitigating Toxin-Related Health Risk. *Microorganisms*. 2021;9(1747). doi:10.3390/microorganisms9081747
- (109) ISO 113581. Soil quality — Determination of content of hydrocarbon in the range C10 to C40 by gas chromatography. 2015. p. 1–18.

## 7 Anexos

### 7.1 Anexo 1

**Tabla 8:** Resultados del recuento en placas de TSA.

| Dilución                   | UFC contadas    | Réplica | UFC/mL   |
|----------------------------|-----------------|---------|----------|
| 1/10000                    | 42              | 1       | 2,10E+06 |
| 1/10000                    | 63              | 2       | 3,15E+06 |
| 1/1000                     | 365             | 1       | 1,83E+06 |
| 1/1000                     | 421             | 2       | 2,11E+06 |
| <b>Promedio</b>            | <b>2,30E+06</b> |         |          |
| <b>Desviación estándar</b> | <b>5,85E+05</b> |         |          |

**Tabla 9:** Resultados del recuento en placas de PDA con cloranfenicol.

| Dilución                   | UFC contadas   | Réplica | UFC/mL  |
|----------------------------|----------------|---------|---------|
| 1000                       | 1              | 1       | 5,0E+03 |
| 1000                       | 1              | 2       | 5,0E+03 |
| <b>Promedio</b>            | <b>5,0E+03</b> |         |         |
| <b>Desviación estándar</b> | <b>0</b>       |         |         |

**Tabla 10:** Resultados del recuento en placas de YPD.

| Dilución                   | UFC contadas    | Réplica | UFC/mL   |
|----------------------------|-----------------|---------|----------|
| 10                         | 376             | 1       | 1,88E+04 |
| 10                         | 552             | 2       | 2,76E+04 |
| 10                         | 744             | 3       | 3,72E+04 |
| 100                        | 72              | 1       | 3,60E+04 |
| 100                        | 41              | 2       | 2,05E+04 |
| 100                        | 70              | 3       | 3,50E+04 |
| <b>Promedio</b>            | <b>2,92E+04</b> |         |          |
| <b>Desviación estándar</b> | <b>1,32E+03</b> |         |          |

## 7.2 Anexo 2

**Tabla 11:** Caracterización morfológica de las colonias aisladas.

| Medio | Colonia | Tipo de MO | Tamaño  | Forma      | Color       | Borde            | Superficie | Elevación | Gram | Tipo        |
|-------|---------|------------|---------|------------|-------------|------------------|------------|-----------|------|-------------|
| PDA   | 1       | Hongo      | Mediana | Redondeada | Gris oscuro | Completo y claro |            |           |      | Filamentoso |
| PDA   | 2       | Bacteria   | Mediana | Redondeada | Blanca      | Completo         | Suave      | Elevada   | -    | Bacilo      |
| PDA   | 3       | Bacteria   | Chica   | Redondeada | Amarillenta | Completa         | Suave      | Convexa   | -    | Bacilo      |
| TSA   | 4       | Bacteria   | Mediana | Redondeada | Amarilla    | Completa         | Suave      | Plana     | +    | Coco        |
| TSA   | 5       | Bacteria   | Mediana | Redondeada | Blanca      | Completa         | Suave      | Elevada   | -    | Bacilo      |
| TSA   | 6       | Bacteria   | Mediana | Redondeada | Amarillenta | Ondular          | Suave      | Plana     | +    | Bacilo      |
| PDA   | 7       | Bacteria   | Chica   | Redondeada | Amarillenta | Completa         | Suave      | Convexa   | -    | Bacilo      |
| PDA   | 8       | Bacteria   | Chico   | Redondeado | Marrón      | Ondular          |            |           |      | Bacilo      |
| TSA   | 9       | Bacteria   | Chica   | Redondeada | Amarilla    | Completa         | Suave      | Plana     | +    | Coco        |
| TSA   | 10      | Bacteria   | Grande  | Redondeada | Amarillenta | Ondular          | Opaco      | Elevado   | +    | Bacilo      |
| TSA   | 11      | Bacteria   | Mediana | Redondeada | Amarilla    | Completa         | Suave      | Plana     | +    | Coco        |
| PDA   | 12      | Bacteria   | Chica   | Redondeada | Amarillenta | Completa         | Suave      | Plana     | -    | Bacilo      |
| PDA   | 13      | Bacteria   | Chica   | Redondeada | Amarillenta | Completa         | Suave      | Plana     | +    | Bacilo      |
| TSA   | 14      | Bacteria   | Mediana | Redondeada | Amarillenta | Ondular          | Suave      | Elevada   |      |             |
| TSA   | 15      | Hongo      | Chico   | Redondeada | Gris        | Completo         | Opaco      | Plano     |      |             |
| TSA   | 16      | Bacteria   | Mediana | Redondeada | Amarilla    | Completo         | Suave      | Plana     | +    | Coco        |
| PDA   | 17      | Bacteria   | Mediana | Redondeada | Blanca      | Ondulado         | Suave      | Plana     | -    | Bacilo      |
| YPD   | 18      | Levadura   |         |            |             |                  |            |           |      |             |
| YPD   | 19      | Levadura   |         |            |             |                  |            |           |      |             |
| YPD   | 20      | Levadura   |         |            |             |                  |            |           |      |             |
| YPD   | 21      | Levadura   |         |            |             |                  |            |           |      |             |

## 7.3 Anexo 3

**Tabla 12:** Resultados de la secuenciación

| N° de identificación de colonia | Especie                             | Porcentaje de identidad | Largo de secuencia (pb) | Número de acceso |
|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|
| 1                               | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | 93.72%                  | 520                     | MG457823.1       |
| 2                               | <i>Escherichia coli</i>             | 93.55%                  | 1430                    | MH656756.1       |
| 3                               | <i>Acetobacter fabarum</i>          | 96.06%                  | 1389                    | MT611597.1       |
| 4                               | <i>Micrococcus sp.</i>              | 96.06%                  | 1484                    | EU196472.1       |
| 5                               | <i>Acetobacter indonesiensis</i>    | 92.31%                  | 1413                    | AB052715.1       |
| 6                               | <i>Streptomyces sp.</i>             | 94.64%                  | 1165                    | MN173061.1       |
| 7                               | <i>Acetobacter fabarum</i>          | 95.97%                  | 1389                    | MT611597.1       |
| 8                               | <i>Acetobacter garciniae</i>        | 96.03%                  | 1415                    | NR_181659.1      |
| 9                               | <i>Streptomyces parvus</i>          | 96.88%                  | 1516                    | OM530231.1       |
| 10                              | <i>Bacillus thuringiensis</i>       | 96.06%                  | 1208                    | OQ152053.1       |
| 11                              | <i>Microbacterium oxydans</i>       | 100.00%                 | 1477                    | MW386591.1       |
| 12                              | <i>Acetobacter fallax</i>           | 96.12%                  | 1476                    | NR_180984.1      |
| 13                              | <i>Bacillus subtilis</i>            | 96.88%                  | 693                     | JQ686665.1       |
| 16                              | <i>Kocuria palustris</i>            | 95.76%                  | 1375                    | MT386201.1       |
| 17                              | <i>Acidisoma cellulosilyticum</i>   | 100.00%                 | 1371                    | NR_181602.1      |
| 18                              | <i>Candida ethanolica</i>           | 96.77%                  | 414                     | OP418406.1       |
| 19                              | <i>Candida ethanolica</i>           | 96.85%                  | 526                     | OW988282.1       |
| 20                              | <i>Candida ethanolica</i>           | 96.80%                  | 390                     | LN613149.1       |