



Artículo Original

Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos

Isolation and selection of cellulolytic bacteria from compost organic waste

Luis A. Rodríguez Silva¹ y Luis Llenque Díaz²

¹Tesista EAP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

RESUMEN

Se aisló y seleccionó bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos de la Estación Experimental de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Trujillo (Perú). Para ello: se pesó 10 g de muestra y se colocó en 90 mL de agua peptonada 0.1%, se hicieron diluciones seriadas y siembras en agar CMC 1% que fueron incubadas a 35°C por 48 h, se resembró en agar CMC 1% y se seleccionaron colonias que presentaban los mayores halos de hidrólisis mediante la prueba con Rojo de Congo y, finalmente, se hicieron siembras por puntura en agar CMC 1% de los cultivos seleccionados: Col 1, C4 y C5, en tres repeticiones y se obtuvo el promedio de los halos netos de hidrólisis. Posteriormente, se realizó la bioquímica de los cultivos celulolíticos seleccionados y se determinó la fase logarítmica media de crecimiento bacteriano en 10 mL de caldo CMC 0.7% pH 6.5, a 37°C, con un mL de inóculo de 3×10^8 UFC/mL. Se encontró, en relación a los promedios de los halos netos de hidrólisis, que no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los halos de las bacterias C4 y C5, pero sí entre el cultivo Col 1 y los demás. Los cultivos correspondieron a *Paenibacillus* sp. (Col 1), *Bacillus firmus* (C4) y *Bacillus* sp. (C5) que alcanzaron su fase logarítmica media de crecimiento a las 6 h en las condiciones ensayadas.

Palabras clave: Compost, bacterias celulolíticas, *Paenibacillus*, *Bacillus*

ABSTRACT

It was isolated and selected cellulolytic bacteria from compost organic waste from the Experimental Station of Applied Biochemistry, National University of Trujillo (Peru). 10 g of sample were added to 90 mL of peptone-water 0.1% medium, serial dilution and crops were made in agar CMC 1%, then were incubated at 35 °C for 48 h, replanted in agar CMC 1%, and selected the colonies with highest halos hydrolysis. Testing were made with Red Congo technique by means puncture in agar CMC 1% medium of selected crops: Col 1 C4 and C5, three repetitions and the average was obtained net hydrolysis halos. Subsequently, the biochemistry of the selected cellulolytic cultures were performed and the average logarithmic phase of bacterial growth was determined in 10 mL of 0.7% CMC broth pH 6.5, at 37 °C with an inoculum of 3×10^8 mL CFU / mL. He found, in relation to the average net hydrolysis halos, no significant difference ($p > 0.05$) between the halos of the C4 and C5 bacteria, but between cultivation Col 1 and others. Cultures were for *Paenibacillus* sp. (Col 1), *Bacillus firmus* (C4) and *Bacillus* sp. (C5) which reached their mid-log phase growth at 6 h under the conditions tested.

Keywords: Comppost, cellulotyc bacteria, *Paenibacillus*, *Bacillus*.

INTRODUCCIÓN

En el proceso de compostaje los microorganismos participan por medio de secreciones de enzimas hidrolíticas que tienen un papel fundamental en la depolimerización de los componentes orgánicos de los diferentes residuos. Las más importantes son las celulasas, hemicelulasas, proteasas, lipasas fosfatasas y arilsulfatasas que hidrolizan moléculas grandes como almidón, celulosa, hemicelulosa, pectina, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que son asimilados por los microorganismos como fuente de carbono y energía^{1,2,3}. Moléculas como hemicelulosa y celulosa están presentes en gran cantidad en el compost proveniente de residuos agrícolas; los microorganismos celulíticos y en particular las bacterias aeróbicas convierten la celulosa en dos productos principales: CO₂ y biomasa; no existen acumulaciones significativas de intermediarios carbonados y la concentración de ácidos orgánicos raramente alcanza un nivel apreciable^{3,4,5,6,7}.

Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos⁷. Las bacterias celulolíticas más abundantes y conocidas son las aerobias, entre ellas: *Cellulomonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Cytophaga*. *Acetivibrio cellulolyticus*, *Clostridium cellulovorans*, *Ruminococcus albus*, *Butirivibrio* sp. *Clostridium thermocellum* destacan entre las anerobias y *Streptomyces drozdowiczii*, *S. cellulolyticus*, *Themomonospora curvata*, *T. chromogena*, *T. alba* y *Thermomobifida fusca*, entre los estreptomycetos^{8,9,10,11,12}.

Bacillus es reconocido industrialmente atractivo por sus altas tasas de crecimiento, gran capacidad para la secreción de enzimas extracelulares, así como su desarrollo bajo condiciones ambientales extremas⁸. Se sabe que naturalmente metaboliza una amplia variedad de azúcares incluyendo xilosa, arabinosa, celulosa, sacarosa, celobiosa y glucosa; sin embargo, a pesar del extenso conocimiento genético y bioquímico del género²⁵, existe poca información de aspectos bioenergéticos, metabólicos, de crecimiento y de formación de productos en condiciones aeróbicas para la utilización de carboximetildelulosa^{10,12}

Diferentes procedimientos han sido utilizados en la identificación y enumeración de los microorganismos capaces de utilizar la celulosa, siendo la base de éstos la hidrólisis de los sustratos celulósicos. Destaca dentro de ellos el Rojo de Congo porque permite evidenciar la hidrólisis de polisacáridos, debido a que el colorante forma complejos con las moléculas no hidrolizadas, facilitando así la diferenciación entre microorganismos celulolíticos y no celulolíticos mediante zonas de aclaramiento alrededor de la colonia^{13,14,15,16,17}.

La actividad del sistema enzimático en el complejo celulolíticos puede medirse determinando la cantidad de glucosa liberada mediante DNS; esta técnica demuestra la presencia del grupo carbonilo libre (C=O) de los azúcares reductores que implica la oxidación del grupo funcional aldehído de la glucosa^{18,19}. En este método el ácido 3,5-dinitrosalicílico es reducido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, mientras que los grupos aldehídos son oxidados a grupos carboxilos; la reducción del ácido genera un color amarillo el cual es proporcional a la concentración del azúcar reductor presente y se evidencia por medio de la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro lo que implica la aplicación de la ley de Lambert Beer²⁰.

Los azúcares liberados del proceso pueden ser usados en varios propósitos, como el incremento de azúcares asimilables en los forrajes y la producción de etanol^{21,22}. Además por ser un producto que posee diferentes características, entre ellas ser edulcorante, preservante humedad, inhibidor frente a levaduras y mohos, estabilizador de la viscosidad; tiene gran aplicación en la industria farmacéutica y alimentaria²³. Al mismo tiempo, el material lignocelulósico es atractivo por su bajo costo y alta disponibilidad en diversos climas y localidades, sin embargo, el principal impedimento para su utilización es la falta de una tecnología de bajo costo para degradar la fracción recalcitrante de la biomasa²⁴.

El compostaje es un proceso biológico aerobio en la que se transforman los residuos orgánicos degradables en un producto estable e higienizado, que es aplicable como mejorador de suelos y sustratos y es método eficiente en la eliminación de residuos orgánicos. En el presente trabajo se propuso el aislamiento y selección de microorganismos celulolíticos a partir de compost del centro de investigaciones bioquímicas de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú, a fin de ofrecer a la comunidad industrial y empresarial especies nativas de microorganismos celulolíticos, cuyas enzimas puedan ser utilizados como alternativa a las enzimas comerciales que tienen alto costo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

Compost de residuos orgánicos procedente de la Estación Experimental de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT), Perú.

Obtención y transporte de la muestra

Se obtuvieron 09 muestras de compost, en una cantidad de 200 g cada una y depositadas en recipientes plásticos, debidamente rotulados y posteriormente llevados al Laboratorio de Fisiología y Genética Bacteriana de la UNT.

Descripción de la composición de los residuos para la formación del compost

El compost obtenido presentó un alto contenido de residuos orgánicos vegetales tales como tallos y hojas de plantas herbáceas (Papaya, Fresa, Maracuyá, Alfalfa, Uva, etc.) y estiércol de ganado vacuno.

Aislamiento y selección primaria^{16,17}

Se pesó 10 g de la muestra homogeneizada y se colocó en 90 mL de agua peptonada 0.1%(P/V). Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} con el mismo diluyente; a partir de estas, se sembró 0.1 mL en placas con agar carboximetilcelulosa 1%³⁵ por la técnica de siembra en superficie. Las placas fueron incubadas a 37°C por 48 horas³⁶. Transcurrido el tiempo de incubación se hizo un subcultivo por puntura de los microbios que crecieron en las placas, por duplicado, y se incubó en las mismas condiciones. A una de las placas se adicionó la solución de Rojo de Congo al 1% (P/V), y luego de 15 minutos se retiró el exceso y se adicionó NaCl 1.0 M, dejándolo reposar por 15 minutos más y se retiró el exceso³⁷. La selección de los cultivos celulolíticos se hizo en base a la presencia de halos netos de hidrólisis³⁸ alrededor de cada colonia a partir de la segunda placa sembrada (Tabla 1). Este procedimiento se hizo por triplicado para cada muestra.

Selección secundaria^{16,17}

Cada cultivo que presentó halo de hidrólisis fue reactivado en Agar CMC 1%, pH 6.5, a 37 °C por 24 horas. Posteriormente se sembró por puntura en placas por duplicado e incubado en las mismas condiciones. A una de las placas se adicionó la solución de Rojo de Congo al 1% (P/V), y luego de 15 minutos se retiró el exceso y se adicionó NaCl 1.0 M, dejándolo reposar por 15 minutos más y se retiró el exceso. La selección secundaria de los cultivos celulolíticos se hizo en base al tamaño de los halos netos de hidrólisis alrededor de cada colonia a partir de la segunda placa sembrada. Este procedimiento se repitió tres veces.

Análisis de resultados

Las mediciones promedio de los halos netos de hidrolisis de los cultivos celulolíticos fueron sometidos al análisis estadístico Prueba de Tukey y Duncan para evaluar la diferencia significativa de los resultados.

Identificación bioquímica

A los cultivos bacterianos celulolíticos obtenidos de la selección secundaria se les hizo observaciones macro y microscópicas, en fresco y mediante coloración Gram. La identificación bioquímica de las bacterias seleccionadas se hizo mediante la evaluación de comportamiento metabólico de acuerdo a los manuales de Bergey's de bacteriología sistemática²⁵ y Mac Faddin²⁶.

Determinación de la curva de crecimiento de las bacterias celulolíticas seleccionadas

Cada bacteria fue reactivada en Agar CMC 1 % y se preparó una suspensión bacteriana en solución salina fisiológica estéril (SSFE), equivalente al tubo n°1 del nefelómetro de MacFarland y se inoculó 1 mL a un tubo conteniendo 10 mL de caldo CMC al 0.7%, pH 6.5 a 37°C y se hizo recuentos bacterianos en placa cada 4 h desde las 0 h hasta las 24 h por la técnica de siembra en superficie mediante diluciones seriadas crecientes en cada muestreo y se sembró en agar CMC 1% de 24 a 48 horas.

RESULTADOS

Siete de los 12 cultivos aislados mostraron ser celolocíticos, cuyos halos midieron entre siete y 17 mm (Tabla 1), con promedio de halo ascendente con significancia estadística ($p < 0,05$) entre el Col 1 y C5 (Fig. 1). Los cultivos celolocíticos mostraron ser bacilos Gram +, con colonias de diversa forma (Tabla 2)

Respecto al comportamiento bioquímico, mostraron ser catalasa+, glucosa+, manitol+ y degradadoras del almidón (Tabla 3). Las bacterias fueron identificadas como *Paenibacillus* sp., *Bacillus firmus* y *Bacillus* sp. y mostraron curvas de crecimiento similares en caldo carboximetilcelulosa 0.7%, pH 6.5 a 37°C (Fig 2)

Tabla 1. Comportamiento cualitativo de los 12 cultivos bacterianos aislados a partir de compost del campo experimental de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú, como Celulolítico (+) y No celulolítico (-) mediante la prueba de Rojo de Congo y tamaño de halo neto (mm).

Cultivo	Prueba del rojo de Congo	Halo neto (mm)
Col1	+	12
Col2	-	-
Col3	+	08
C4	+	15
C5	+	17
C6	-	-
C7	-	-
C8	+	08
C9	+	07
C10	+	09
C11	-	-
C12	-	-

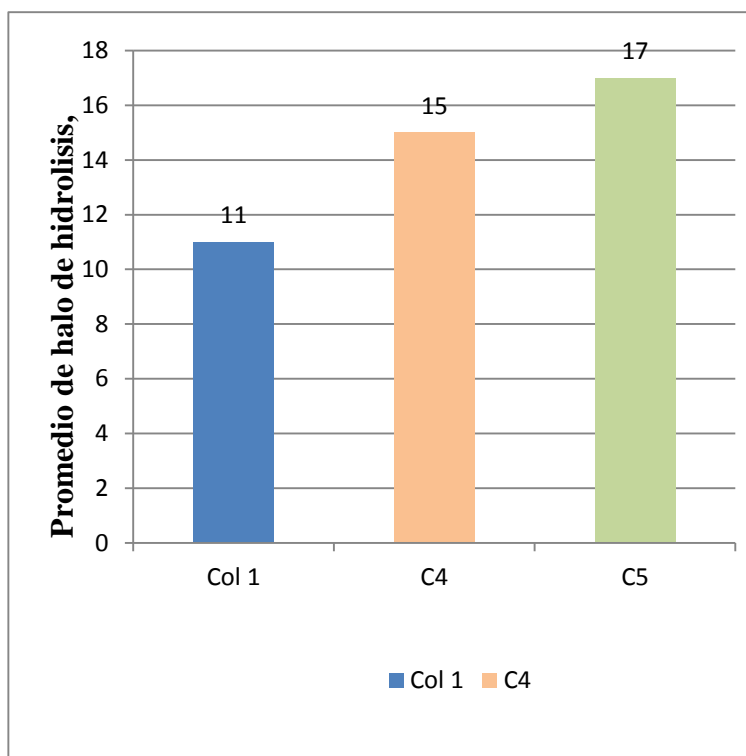


Fig. 1. Promedio de los halos netos de hidrólisis de las tres bacterias celulolíticas Seleccionadas por la técnica del Rojo de Congo del compost del campo experimental de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. ($p < 0,05$)

Tabla 2. Características macroscópicas y microscópicas de los cultivos bacterianos celulíticos aislados y seleccionados de compost del campo experimental de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

Cultivo	Características macroscópicas	Características microscópicas	
		Reacción Gram	Forma
Col 1	Colonias pequeñas, secas, planas, opacas, bordes irregulares y en forma rizoide	Positivo	Bacilos pequeños, espora central, extremos ovalados
C4	Colonias pequeñas, cremosas, planas, bordes irregulares	Positivo	Bacilos pequeños, extremos ovalados, espora central
C5	Colonias pequeñas, cremosas, planas, bordes irregulares	Positivo	Bacilos medianos, extremos ovalados, espora central

Tabla 3. Características bioquímicas (reacción positiva, + o negativa, -) de los cultivos bacterianos celulíticos aislados de compost de residuos orgánicos del campo experimental de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

Prueba	Cultivos		
	Col 1	C4	C5
Catalasa	+	+	+
Glucosa	+	+	+
Hidrolisis del almidón	+	+	+
Citrato	-	-	-
Ureasa	+	-	-
Voges Proskauer	-	-	-
Licuação de la Gelatina a 22°C	-	+	++
Manitol	+	+	+
Movilidad	+	+	+
Indol	-	-	-
Crecimiento en Na Cl 7.5%	++	+	+

Tabla 4. Identificación de los cultivos bacterianos celulíticos aislados y seleccionados a partir del compost de residuos orgánicos del campo experimental de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

Cultivo	Bacteria
Col 1	<i>Paenibacillus</i> sp.
C4	<i>Bacillus firmus</i>
C5	<i>Bacillus</i> sp.

DISCUSIÓN

La selección de los microorganismos celulíticos se logró determinar por los halos de hidrólisis en el medio Agar Carboximetilcelulosa alrededor de la colonia. El método se basó en la capacidad del colorante Rojo de Congo de adherirse a la carboximetilcelulosa tornándose la placa de color rojo, al ser degradado este sustrato por el complejo enzimático celulasa; el área hidrolizada toma un color amarillo

lo cual indica que el colorante no se pudo adherir al polímero que se ha disgregado, lo cual permitió conocer de manera cualitativa la utilización del sustrato carbonado; además fue posible observar el crecimiento de microorganismos que no generan halos alrededor de su colonia, debido posiblemente a que ha utilizado, para su crecimiento, algunos otros componentes como son el extracto de levadura, peptona, o bien los azúcares formados por los microorganismos celulolíticos, en un proceso denominado sinergismo el cual es muy común en los consorcios microbianos^{22,23}.

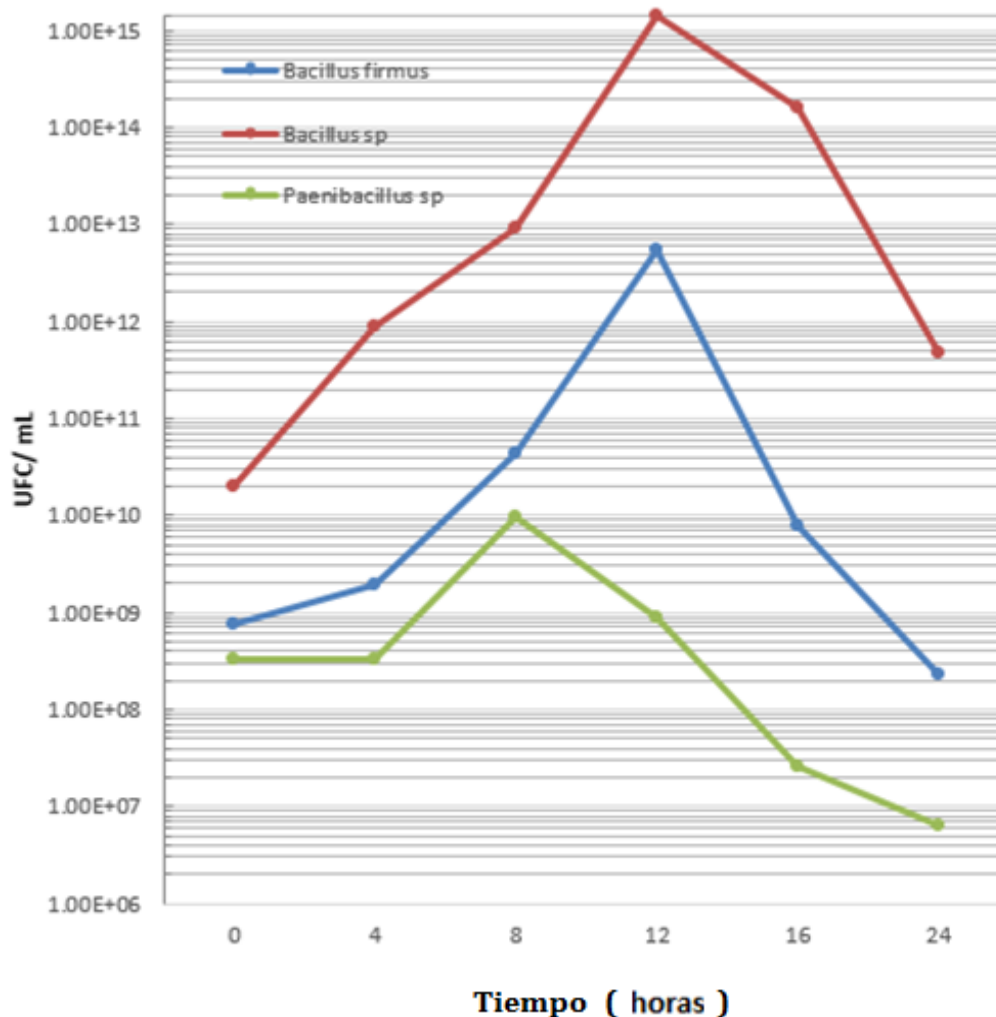


Fig. 2. Curvas de crecimiento de las tres bacterias celulolíticas del campo experimental de Bioquímica Aplicada de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. seleccionadas en caldo carboximetilcelulosa 0.7%, pH 6.5 a 37°C, en relación al tiempo de incubación.

El tamaño de los halos netos de hidrólisis de carboximetilcelulosa 1 % fue diferente para cada cultivo seleccionado. El cultivo C5 fue quien presentó el mayor halo de hidrólisis de 17 mm mientras que el cultivo C9 presentó el menor halo de hidrólisis de 9 mm. Esto es porque hay microorganismos que producen más enzimas celulasas que otras, esto puede deberse al complejo enzimático o al mecanismo de hidrólisis que poseen para degradar este sustrato como es el caso de las bacterias del género *Bacillus* que aparte de producir enzimas termoestables debido a su capacidad de crecer en temperaturas muy elevadas presentan actividad endo β -1,4 glucanasa y exo β -1,4 glucanasa, pero tienen una característica en particular y es la resistencia a ser inhibida por la propia glucosa o celobiosa que producen lo que la convierte en una excelente bacteria productora de enzimas celulasas. Asimismo

actividades elevadas de endoglucanasas se correlacionan con la formación de mayores halos de hidrólisis como lo reportado por Ceroni⁴⁵ que hizo un estudio de correlación entre la actividad enzimática y el halo de hidrólisis obtenido en la selección primaria semicuantitativa en placas^{24,27,28}.

Los cultivos seleccionados fueron Col 1, C4 y C5 quienes mostraron los mayores halos netos de hidrólisis de 11, 15 y 17 mm respectivamente. En tanto que Acharya et al.²³ obtuvieron bacterias termófilas y termotolerantes de una pila de compost, donde *Bacillus subtilis* fue quien mostró la más alta zona de hidrólisis en medio CMC 1% que fue de 21 mm al octavo día de incubación. En un estudio realizado por Ling²⁴ demostró la actividad celulolítica de cepas de *Bacillus thuringiensis* mediante la detección de su capacidad para formar halos en placas de CMC, y como resultado se obtuvo un valor de H / C mayor que 2 (H: halo de hidrólisis diámetro; C: diámetro de la colonia) lo que sugiere que las cepas de *Bacillus* podrían producir celulasas con alta actividades, al tener la capacidad potencial para liberar glucosa a partir de celulosa.

Mediante la prueba de Tukey y Duncan se analizaron las diferencias entre las medias de los halos de netos de hidrólisis de las bacterias sobre el sustrato carboximetilcelulosa al 1.0% en placa, donde se obtuvo que los halos netos de hidrólisis de 15,3 y 16,7 mm de los cultivos C4 y C5 respectivamente no se diferencian significativamente por lo cual presentan el mismo poder degradativo sobre este sustrato. Ambos cultivos fueron los que presentaron los mayores halos netos de hidrólisis pero obtienen el mismo efecto sobre este sustrato; mientras que, el cultivo Col 1 si muestra una diferencia significativa sobre los otros 2 cultivos pero este fue quien presentó el menor halo de hidrólisis entre las tres bacterias seleccionadas.

Los microorganismos aislados y seleccionados Col 1, C4 y C5 en el presente estudio fueron identificados en el laboratorio mediante características morfológicas y pruebas bioquímicas. Así tenemos que se logró describir las características macroscópicas de los cultivos, coloración Gram, y además se realizaron pruebas bioquímicas necesarias de acuerdo al manual de Beryey's²⁵ y Mac Faddin²⁶, determinado así su género y especie, los cuales fueron identificados como *Paenibacillus sp.*, *Bacillus firmus* y *Bacillus sp.*, respectivamente.

Paenibacillus sp. (Col 1) presentó tinción de Gram positiva, glucosa y manitol positivo, hidrolizó el almidón, no licuó la gelatina, tuvo un crecimiento rápido en NaCl al 7.5%, sin reducción del citrato y la prueba de urea fue positiva, en condiciones de aerobiosis. Similares resultados fue encontrado en pruebas bioquímicas realizado por Rodriguez⁴⁹ para la identificación de *Paenibacillus* aisladas de los nódulos de *Lupinus angustifolius* (altramuz azul) para estudios de colonización junto con la bacteria Micromonospora. *Paenibacillus* presenta gran versatilidad en cuanto a su adaptación a diferentes medios; debido a su variabilidad genética ya que presenta segmentos de ADN de distintos microorganismos^{27,28,29}.

Con respecto al género *Paenibacillus* son pocos los estudios sobre su actividad celulolítica como los trabajos que permitieron el aislamiento de *Paenibacillus sp.* de bagazo de caña de azúcar en agar CMC 1% y evaluó su actividad catalítica de enzimas celulasas y de suelos nativos forestales como constituyentes puros de consorcios microbianos y mostró un alto potencial de endoglucanasa en medio sólido y líquido. Este consorcio tuvo un completo potencial de degradación de celulosa ya que mostró altas actividades de endocelulasas, xilanasas y degradación de papel de filtro. Mientras que trabajos realizados por Valenzuela⁵² utilizó a *Paenibacillus barcinonensis* para la purificación, caracterización y clonación de tres enzimas degradadoras de xilano para el empleo industrial³⁰.

Por otra parte, se ha descrito que algunas especies del género *Paenibacillus* actúan como promotoras del crecimiento vegetal, ya que influyen de manera directa en el crecimiento de las plantas al producir fitohormonas, nutrientes, fijar nitrógeno y actuar contra microorganismos patógenos. Un ejemplo lo constituye el empleo de *Paenibacillus polymyxa*, el cual se ha encontrado en la rizófera de diferentes cultivos y en la que tienen la habilidad de secretar sustancias que mejoran el crecimiento de la planta, de fijar nitrógeno y solubilizar los fosfatos⁵³.

Con respecto a su curva de crecimiento *Paenibacillus sp.* muestra que la bacteria desde las 0 hasta las 4 horas tuvo una fase de latencia, en esta fase no hay variaciones en el número de microorganismos; sin embargo, las células no están inactivas ya que se están adaptando al medio, para lo cual sintetizan enzimas. Si bien el número de células no varió, puede ser que éstas aumenten algo de tamaño debido a que se va a producir la división²⁴. Un hallazgo similar se obtuvo en un trabajo realizado por Ghio et al.²⁷ donde evaluó la cinética de crecimiento de *Bacillus thuringiensis* en agar nutritivo donde observó que la fase de latencia se mantenía constante hasta las ocho horas de crecimiento.

Después de las 4 horas ocurrió un crecimiento exponencial de *Paenibacillus* sp. que finalizó a las 8 horas, alcanzando su fase logarítmica media a las 6 horas. A partir del cual se observa un declive en su crecimiento. Una posible causa por la que este microorganismo dejó de crecer en este medio de cultivo fue la inhibición que se presenta como consecuencia de la acumulación de productos ácidos del metabolismo que cambian el pH del medio de cultivo. Se sabe que los iones H⁺ en numerosas reacciones enzimáticas pueden actuar como inhibidores no competitivos^{29,30}, pero en el presente trabajo no se tuvo en cuenta la influencia del pH, por lo que se recomienda monitorear el valor de pH durante el crecimiento de esta bacteria.

En un estudio que permitió estimar la curva de crecimiento de la bacteria *Paenibacillus lentimorbus* se observó un crecimiento exponencial en donde la concentración de bacilos permanece constante las primeras 24 horas de incubación, después de las cuales se inicia la reproducción exponencial de la bacteria, alcanzando su máxima concentración aproximadamente 62 horas después de inoculado el medio. Se necesitan más estudios sobre esta bacteria ya que son pocos los trabajos realizados para la producción de celulasas y crecimiento en agar CMC.

Bacillus firmus (C4) presentó tinción de Gram positiva, glucosa y manitol positivo, hidrolizó el almidón, tuvo un crecimiento lento en NaCl al 7.5%, produce una lenta licuación de la gelatina (+), no reduce el citrato y la prueba urea fue negativa, en condiciones de aerobiosis. Resultado similar se obtuvo en un trabajo realizado previamente para el aislamiento de microorganismos solubilizadores de fosfato orgánico y evaluar su capacidad como fijadora biológica de nitrógeno. Esta especie se ha utilizado para la decoloración del poliéster y otras telas, además produce sustancias antimicrobianas activas contra diferentes cepas de *Bacillus* y son capaces de inhibir bacterias sulforeductoras. Esta especie tiene una capacidad de absorción de metales y algunas cepas forman carotenoide²⁹. No se han reportado trabajos de *B. firmus* como degradadora de celulosa pero si se ha reportado como solubilizador de fosfatos en el suelo mediante la producción de ácidos como 2-cetoglucónico lo cual promueve el crecimiento vegetal^{28,29,30}.

Con respecto a *Bacillus* sp. (C5) seleccionado este presentó una bioquímica muy similar a *B. firmus* con la única diferencia que tuvo una rápida licuación de la gelatina (++), y no se pudo identificar la especie según el manual de Bergey's²⁵ por las limitaciones de algunas pruebas bioquímicas adicionales. El género *Bacillus* se caracteriza por ser un bacilo Gram positivo, reconocido industrialmente por sus altas tasas de crecimiento y producción de enzimas hidrolíticas; este género ha sido reclasificado muchas veces y algunas de sus especies han sido transferidas al género *Paenibacillus*⁶¹. Estudios realizados con cepas nativas, aisladas de un bosque pantanoso, muestran que *Bacillus*, en condiciones de agitación a 50, 100 y 200 rpm, no presenta actividad sobre su sustrato; es decir no secreta una cantidad considerable de celulasas para ser detectadas por los métodos analíticos²².

Con respecto a las curvas de crecimiento, en la se observa que la fase logarítmica de crecimiento de *Bacillus* sp. y *Bacillus firmus* finaliza a las 12 horas alcanzando su fase logarítmica media a las 6 horas a partir del cual se produce un declive en su crecimiento debido probablemente al consumo total del sustrato carboximetilcelulosa. En esta fase logarítmica la proporción carbono: nitrógeno (C: N) probablemente haya sido la más adecuada, puesto que este es un factor decisivo en la tasa de aprovechamiento del sustrato⁶³. Resultado similar se obtuvo anteriormente en el que se evaluó la fase logarítmica de crecimiento de *Bacillus* sp la cual fue mayor a las 12 horas de crecimiento usando diferentes concentraciones de carboximetilcelulosa en un birreactor agitado. Asimismo la estimulación o inhibición del crecimiento y metabolismo de un microorganismo depende de la disponibilidad y concentración de nutrientes (carbono y nitrógeno principalmente) y de las condiciones ambientales adecuadas; sin embargo, con frecuencia la concentración de fuente de carbono actúa de forma limitante²⁵. En conclusión: (i) se aislaron y seleccionaron 3 bacterias celulolíticas (Col 1, C4 y C5) a partir de compost de residuos orgánicos en agar carboximetilcelulosa 1.0%. y mediante la prueba de Rojo de Congo, (ii) no hubo diferencia significativa entre los cultivos bacterianos C4 y C5 pero si entre los cultivos Col 1 y los demás, mediante la prueba estadística de Tukey y Duncan, (iii) los cultivos bacterianos, productores de celulasas, seleccionados a partir de compost de residuos orgánicos fueron *Paenibacillus* sp., *B. firmus* y *Bacillus* sp. y (iv) los géneros bacterianos celulolíticos seleccionados e identificados alcanzaron su fase logarítmica media de crecimiento a las 6 horas en caldo carboximetilcelulosa 0.7 %, pH 6.5 a 37°C. Se recomienda: (i) estandarizar el inóculo de los cultivos celulolíticos para evaluar el halo neto de hidrólisis sobre agar carboximetilcelulosa, (ii) determinar los halos de hidrólisis de las bacterias en carboximetilcelulosa a diferentes temperaturas de incubación, (iii) filtrar la solución de rojo de Congo 1% y mantenerlo en frasco ámbar, (iv) monitorear y controlar el pH

del medio de cultivo durante el crecimiento de las bacterias celulolíticas y (v) relacionar el crecimiento de las bacterias con la producción de celulasas en escala de laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cariello M, Castañeda L, Riobo I, Gonzales J. Inoculante de microorganismos endógenos para acelerar el proceso de compostaje de residuos sólidos urbanos. *J Soil Scie & Plant Nutrit.* 2007; 7(3): 26-37.
2. Nivedita S, Preeti B, Divya T, Richa K. Comparative study of potencial cellulolytic and xylanolytic bacteria isolated from compost and their optimization for industrial use. *J Agroalimentary Processes & Technol.* 2013; 19(3): 284-297.
3. Ryckeboer J, Mergaert J, Vaes K, Klammer S, De Clercq D, Coosemans J, Insam H, Swings J. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Ann. Microbiol* 2003; 53(4): 349-410.
4. Cruz N, Castellanos D, Argüello H. Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la sabana de Bogotá. *Rev. Colomb. Cienc. Hortic* 2009; 3(2): 237-249.
5. Fan L, Lee Y. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose in enzymatic hydrolysis. *Biotech & Bioeng.* 1980; 22: 177-199.
6. Dongowski G, Sembries S, Bauckhage K, Will F, Dietrich H. Degradation of apple cell wall material by commercial enzyme preparations. *Nahrung/Food.* 2002; 46: 105-111.
7. Castellanos J, Sandoval A, Urtiz N. Obtención de variantes hiperactivas e inactivas de la endocelulasas cel9 de *Myxobacter* sp. *Acta universitaria* ed. Guanajuato, México; 2006: 22-26.
8. Lynd L, Van Zyl W, MacBride J. Consolidated bioprocessing of cellulose on biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol.* 2005; 66: 506-577.
9. Ramirez P, Cocha J. Degradación de celulosa por actinomicetos termófilos: Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Rev. Perú. Biol.* 2003; 10: 67-77.
10. Bonilla J, Rivas N. Aislamiento y caracterización de una cepa de actinomiceto celulolítico, termófilo moderado y acidófilo. *Revista Científica FCV-LUZ.* 2004; 14(5): 412-418
11. Prasertsan P, Oi S. Production of cellulolytic enzymes from fungi and use in saccharification of palm cake and palm fibre. *World J. Microbiol. & Biotech.* 1992; 8: 536-538
12. Teather R, Wood P. Use of Congo red-polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ. Microbiol.* 1982; 43: 777-780.
13. Hendricks C, Doyle J, Hugley B. A new Solid Medium for Enumerating Cellulose-Utilizing Bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61: 2016-2019.
14. Zhang Y, Himmel M, Mielenz J. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biothecnology Advances.* 2006; 24: 452-481.
15. Esterbauer H, Steiner W, Labudova I, Hemann A, Hayn M. Production of *Trichoderma cellulase* in laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology* 1991; 36:51-65.
16. Lynd L, Weimer P, Van Zyl W, Pretorius I. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002; 3: 506-577.
17. Sazci A, Radford A, Erenler K. Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with dinitrosalicylic acid reagent method. *Journal of Applied Bacteriology.* 1986; 61: 559-562.
18. Ferrer Y, León M, Michelena G, Dustet J.C, Duque A, Ibáñez- M, Tortoló K. Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales. 2011; 45(1): 3-12.
19. Gaitán D. Aislamiento e identificación de microorganismos celulolíticos aislados a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 2007.
20. Kasana R., Salwan D., Dhar H., Dutt S., Gulati A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using grams iodine. *Springer Science.* 2008; 57(5): 503-507.
21. Monsalve J, Medina V, Ruiz A. Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca. Medellín. Universidad Nacional de Colombia, DYNA 2006; 73 (150): 21-27.
22. Teather R, Wood P. Use of Congo red-polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ. Microbiol.* 1982;43: 777-780
23. Acharya A, Joshi D, Shrestha K, Battha D. Isolation and screening of thermophilic cellulolytic bacteria from compost piles. *Scientific World.* 2012; 10(10): 43-46.
24. Lin L, Kan X, Yhan H, Wang D. Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Elect J Biotechnol.* 2012; 15(3): 1-7.

25. Bergeys D. Manual of the Determinative Bacteriology 1989 - 2000. Eight Edition. Philadelphia 2000; 2: 540-589
26. Weimer P, Van Zyl, W, Pretorius I. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2002; 66(3): 506-577.
27. Ghio S, Sabaris G, Lia V, Talia P, Cataldi A, Grasso D, et al. Isolation of *Paenibacillus* sp. and *Variovorax* sp. strains from decaying woods and characterization of their potential for cellulose deconstruction. Biochem Mol Biol. 2012; 3(4): 352-364.
28. Fernández G, Hidalgo E, Badilla F. Reproducción y esporulación in vitro de la bacteria *Paenibacillus* (= *Bacillus*) *lentimorbus* para el control de larvas de *Phyllophaga elenans*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. 2005; 75: 38-42.
29. Alexander M. Introducción a la Microbiología del suelo. 3^{ra} ed. Manual-moderno. México. 1999: 359.
30. Acuña A. Estudio de la diversidad de hongos y bacterias asociados al intestino de larvas de coleópteros y determinación de sus propiedades lignocelulíticas. Instituto Nacional de Biodiversidad. Costa Rica. 2009.

Correspondencia: Luis Llenque Díaz. Email: lullenque@unitru.edu.pe