

Adrian Esteban

Ortega Torres

Adición de enzimas para la mineralización del
fósforo contenido en los residuos agroindustriales
destinados al uso agrícola.

2022



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Adición de enzimas para la mineralización del fósforo contenido
en los residuos agroindustriales orgánicos destinados al uso
agrícola.

Tesis

Que como parte de los requisitos para
obtener el Grado de
Doctor en Ingeniería de Biosistemas

Presenta

M. en Bio. Adrian Esteban Ortega Torres

Dirigido por:

Dr. Enrique Rico García

Querétaro, Qro., 2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

ADICIÓN DE ENZIMAS PARA LA MINERALIZACIÓN DEL FÓSFORO CONTENIDO
EN LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES ORGÁNICOS DESTINADOS AL USO
AGRÍCOLA.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

Presenta:

M. en Bio. Adrian Esteban Ortega Torres

Dirigido por:

Dr. Enrique Rico García

Dr. Enrique Rico García

Presidente

Dr. Ramón G. Guevara González

Secretario

Dr. Irineo Torres Pacheco

Vocal

Dr. Luis Miguel Contreras Medina

Suplente

Dra. Genaro Martín Soto Zarazua

Suplente


Firma


Firma


Firma


Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.

AGRADECIMIENTOS

A la vida y al conocimiento por permitirme compartir desahogado en este campus rodeado de excelentes seres humanos que son el reflejo del grupo sinodal que hoy me acompaña y que gracias a su compañía logró este objetivo.

A todos los pasos que se han realizado, con el cariño de mis padres, su ausencia, sus enseñanzas permanentes para afrontar los retos de la vida y el impulso de expandir el deseo del corazón para servir y aportar a las vidas.

A CONACYT y a la Universidad Autónoma de Querétaro que es el reflejo del gran país que somos y tenemos por lo cual estoy completamente agradecido de ser parte de estas instituciones que me albergaron y acompañaron para aportar y ser un mejor humano en el beneficio del país.

Agradezco a mi pareja que me ha acompañado, todo este tiempo; y con especial cariño a mis estudiantes amigos que se han formado en este período, gracias.

Namaste Adrianes.

RESUMEN

La Agricultura depende de los fertilizantes que proveen los nutrientes para las plantas, el Fósforo (P) es uno de estos nutrientes y el segundo necesario para el desarrollo de las plantas. La producción global de fertilizantes de P esta concentrada en Marruecos, China y Estados Unidos. Grandes cantidades de la fuente de P inicial se encuentran en los residuos orgánicos los cuales pueden ser transformados a través de los microorganismos solubilizadores de fosfato en el proceso de compostaje.

En esta investigación, primero se determino la actividad enzimática de fosfatasa y fitasa de *Pseudomonas aeruginosa* ATC 15442. En segunda parte , evaluamos la liberación de P disponible en composta madura después de la adición de *P. aeruginosa* ATC 15442 y un coctel enzimático de enzimas solubilizadoras de fosfato. Finalmente, se incrementó la concentración del tratamiento seleccionado del coctel enzimático para tratar 5t de liberar más P disponible en la composta.

Los resultados indicaron que *P. aeruginosa* exuda enzimas fosfatasa ácida, alcalina y neutra, como fitasa. El coctel enzimático aumentó el P disponible cuando fue adicionado en la composta madura, incrementando en 94% el P disponible al compararse con la composta tradicional. La actividad enzimática requerida para incrementar el P disponible en la composta se demuestra en los resultados.

Palabras clave: Bacteria solubilizadora de fosfatos, Nutrientes, Fosfatasas, Fitasasas, Compostaje.

SUMMARY

Agriculture depends on fertilizers to provide nutrients for plants; phosphorus (P) is one of these nutrient and is the second most necessary for plant growth. Global production of P fertilizer is concentrated in Morocco, China and the United States. A large amounts of P resources are found in organic wastes that can be transformed through phosphate-solubilizing microorganisms during the composting process.

In this study, we first determined the enzymatic activity of phosphatases and phytase from *Pseudomonas aeruginosa* ATC 15442. Second, we evaluated the P available in mature compost when inoculated with *P. aeruginosa* ATC 15442 and a cocktail of enzymes solubilizing phosphate. Finally, we increased the concentration of the optimal enzyme cocktail treatment to try to release more P available in the compost.

The results indicated that *P. aeruginosa* exuded alkaline phosphatases, acid phosphatase, neutral phosphatase and phytase. The enzymatic cocktail increased available P when added to the mature compost, and an increased concentration was able to release up to 94% more P available in the compost. The enzymatic activity required to increase P available in the compost was demonstrated by the results.

Key words: Phosphate-solubilizing bacteria, Nutrients, Phosphatase, Phytase, Composting.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 MOTIVACIÓN.	3
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	5
2.1 EL COMPOSTAJE.....	5
2.2 FASES DEL COMPOSTAJE.	6
2.2 VARIABLES FISICOQUÍMICAS DEL COMPOSTAJE.....	8
2.4 FÓSFORO EN LA AGRICULTURA.	8
2.3 FÓSFORO ORGÁNICO.	9
2.4 EL COMPOSTAJE RESPECTO AL FÓSFORO.....	10
2.5 AGENTES PARA EL FÓSFORO EN LA COMPOSTA.	11
2.6 MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO (PSM).....	12
2.7 FASES DE LA SOLUBILIZACIÓN DEL FÓSFORO.	14
2.8 ENZIMAS FOSFATASAS Y FITASAS.	15
2.9 ALGUNAS APLICACIONES DE ENZIMAS EN SUELO Y EN RESIDUOS ORGÁNICOS.....	17
3. HIPÓTESIS	17
4. . OBJETIVOS	18
4.1 OBJETIVO GENERAL.	18
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.	18
5. METODOLOGÍA	18
5.1 UBICACIONES EXPERIMENTALES	18
5.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE FOSFATASAS Y FITASAS DE LA PSB MEDIANTE UNA CINÉTICA CON DIFERENTES NIVELES DE AGITACIÓN.	19
5.2.1 Evaluación de cuatro cepas bacterianas como solubilizadoras de fósforo aisladas en el campus Amazcala.	19
5.2.2 Cinética con la Bacillus pumilus aislada de composta a diferentes, condiciones de agitación y fuentes de solubilización de fósforo orgánico.	20
5.2.3 Comparación entre bacterias solubilizadoras de fósforo en caldo de papa dextrosa..	20

5.2.4	Diseño experimental.....	21
5.3	METODOLOGÍA DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE LA MEZCLA DE ENZIMAS EN COMPOSTA MADURA.....	22
5.3.1	Proceso de Compostaje.....	22
5.3.2	Preparación de la Composta para la Adición de los Tratamientos Solubilizadores de Fosfato.....	22
5.3.3	Experimento para Evaluar la Actividad Solubilizadora de Fosfato en Composta.	23
5.3.4	Diseño Experimental.	24
5.4	METODOLOGÍA DE LA EVALUACIÓN DE LA COMPOSTA ENZIMÁTICAMENTE TRATADA EN EL CULTIVO DE PEPINO (<i>CUCUMIS SATIVUS</i>).....	24
5.4.1	Calidad del fruto, peso seco, contenido de azúcar, Nitrógeno y Fósforo total.....	26
5.4.2	Actividad de enzimas antioxidantes.....	27
5.4.3	Análisis estadístico.....	28
6.	6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
6.1	ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE FOSFATASAS Y FITASAS DE LA PSB EN LA CINÉTICA CON DIFERENTES NIVELES DE AGITACIÓN.....	29
6.1.1	Resultados de la evaluación de cuatro cepas bacterianas como solubilizadoras de fósforo aisladas en el campus Amazcala.....	29
6.1.2	Cinética con la <i>Bacillus pumillus</i> aislada de composta a diferentes, condiciones de agitación y fuentes de solubilización de fósforo orgánico.....	30
6.1.3	Comparación entre bacterias solubilizadoras de fósforo en caldo de papa dextrosa...	31
6.2	EFECTO DE LA ADICIÓN DE LA MEZCLA DE ENZIMAS EN COMPOSTA MADURA.....	34
6.2.1	Actividad Solubilizadora de Fosfato en Composta Madura.....	34
6.2.2	Incremento de la Actividad Solubilizadora de Fosfato en Composta Madura.....	36
6.3	CULTIVO DE PEPINO (<i>CUCUMIS SATIVUS</i>) COMPLEMENTADO EN FÓSFORO CON COMPOSTA TRATADA ENZIMÁTICAMENTE.....	38
6.3.1	<i>Calidad del fruta, peso seco, contenido de azúcar, nitrógeno y fósforo total.....</i>	38
6.3.2	Actividad enzimática.....	45
7.	CONCLUSIÓN.....	46

Índice de Tablas

Número de Tabla	Descripción	Número de Página
1	Variables físicas y biológicas en el proceso de compostaje (modificado de Sánchez <i>et al.</i> , 2017).	7
2	Microorganismos Solubilizadores de Fósforo (Khan <i>et al.</i> , 2009 y Behera <i>et al.</i> , 2017).	13
3	Diferentes tratamientos de <i>P. aeruginosa</i> ATC 15442 en composta.	24
4	Comparación de <i>B. pumillus</i> y <i>P. aeruginosa</i> en absorbancia a 420 nm para fosfatasa acida, alcalina y neutra	32
5	Actividad Especifica de Enzimas Solubilizadoras de Fosfato de <i>P. aeruginosa</i> ATC15442 en PDB	33

Índice de Figuras

Número de figura	Descripción	Número de página
1	Estructuras, Origen y Concentración de Po en los Residuos Orgánicos.	10
2	Microorganismo solubilizador de fosfatos y sus rutas metabólicas para liberar fósforo inorgánico.	14
3	Aplicación de tratamientos solubilizadores de fosfato en composta madura.	23
4	Invernadero del Campus Amazcala.	25
5	Cinética de solubilización de fósforo de cuatro cepas aisladas del campus Amazcala de la UAQ.	29
6	Actividad enzimática específica de <i>Bacillus pumillus</i> como solubilizadora de fósforo.	31
7	Cinética de crecimiento de bacterias solubilizadoras de fósforo	32

	en caldo de papa dextrosa.	
8	Conversión de Po a P Olsen en composta madura por el experimento de la solubilización de fósforo, con agua desionizada como control (W), fosfatasa ácida, alcalina y neutra y fitasa en PDB (PhoEnz), <i>P. aeruginosa</i> inoculada (<i>P. aeruginosa</i>), y enzima fitasa (Phy).	35
9	Olsen liberado en Composta Madura por Enzimas, Control (W), Coctel Enzimático en PDB (PhoEnz) y Coctel Enzimático Inactivo en PDB (InacPho).	37
10	Peso Fresco de los frutos de pepino cultivados con fertilización completa (FC), fertilización sin fósforo (FSP), fertilización sin fósforo con: Composta tradicional (CT), Composta con coctel enzimático solubilizador de fósforo (CE) y Composta con enzimas solubilizadoras de fósforo desnaturalizadas (CED).	39
11	Grados Brix de los frutos de pepino cultivados con Fertilización Completa (FC), Fertilización Sin Fósforo (FSP), fertilización sin fósforo con: Composta Tradicional (CT), Composta con Coctel Enzimático Solubilizador de Fósforo (CE) y Composta con Enzimas Solubilizadoras de Fósforo Desnaturalizadas (CED).	40
12	Grados Brix de los frutos de pepino cultivados con Fertilización Completa (FC), Fertilización Sin Fósforo (FSP), fertilización sin fósforo con: Composta Tradicional (CT), Composta con Coctel Enzimático Solubilizador de Fósforo (CE) y Composta con Enzimas Solubilizadoras de Fósforo Desnaturalizadas (CED).	42
13	Diagrama de Radar refleja el efecto de los frutos de pepino cultivados con fertilización completa (FC), fertilización sin	44

fósforo (FSP), fertilización sin fósforo con: Composta tradicional (CT), Composta con Coctel Enzimático Solubilizador de Fósforo (CE) y Composta con enzimas solubilizadoras de fósforo desnaturalizadas (CED).

- 14 Actividad enzimática A) SOD y B) PAL de los frutos de de los 45
frutos de pepino cultivados con fertilización completa (FC),
fertilización sin fósforo (FSP), fertilización sin fósforo con:
Composta tradicional (CT), Composta con Coctel Enzimático
Solubilizador de Fósforo (CE) y Composta con enzimas
solubilizadoras de fósforo desnaturalizadas (CED).

1. INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es el segundo elemento más utilizado para la agricultura, es un fertilizante esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Haamedda *et al.*, 2008), el cual debe ser añadido físicamente (Rittmann *et al.*, 2011). El P proviene de los bancos de roca, los cuales están en problemas de escasez situación poco conocida en la actualidad (Cordell y Neset, 2014). Esta situación del P es una llave emergente del cambio global debido a que es una base para el sustento de la alimentación mundial (Cordell y Neset, 2014), por lo que es necesario buscar fuentes alternas de P para el bienestar de la sociedad.

Una gran fuente de nutrientes se encuentra en los residuos orgánicos que se producen en enormes cantidades, son renovables, de bajo costo (Amran Mohd Salleh *et al.*, 2011) y sus acumulaciones en el mundo son críticas (Khalid *et al.*, 2011). Algunos residuos orgánicos son derivados de las actividades de ganadería, agricultura y forestal o de su industrialización (Mejías-Brizuela *et al.*, 2016). Estos residuos tiene una gran importancia pues mantienen concentraciones de P cercanas al 40% que fue extraído de los depósitos de roca fosfórica (Rittmann *et al.*, 2011), por lo que se promueve aprovecharlos, y retornarlo en una forma asimilable para las plantas mediante la mineralización (Rittmann *et al.*, 2011), siendo probablemente la opción más ecológica y económica de disponerlo (Owen *et al.*, 2015).

La mineralización se puede definir como la degradación completa de un compuesto orgánico a sus constituyentes minerales, uno de los mejores métodos de mineralización es el compostaje; proceso biooxidativo en condiciones controladas de temperatura, humedad y aireación, que produce un material estable, rico en sustancias húmicas, ampliamente utilizado como acondicionador de suelos en la agricultura (Alavi *et al.*, 2017).

La mineralización en el compostaje principalmente es inducida por microorganismos que exudan enzimas (Frossard *et al.*, 2011), las cuales actúan específicamente sobre un sustrato particular y en ocasiones trabajan juntas generando rutas metabólicas. Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones bioquímicas en los seres vivos, las cuales configuran la

mineralización en los sistemas microbiológicos por medio de una variedad de reacciones y en las que intervienen fuerzas de unión para el sustrato y para otras moléculas (Voet et al., 2009). La complementariedad geométrica de las enzimas se refiere a que el sustrato tiene un sitio fijador en forma de hendidura o con una identificación en la superficie de la molécula única; y la complementariedad electrónica, se expone para los residuos aminoácidos que forman el sitio de unión los cuales se disponen para atraer específicamente un sustrato determinado, haciendo que las moléculas que difieran en forma o en distribución con grupos funcionales con el sustrato no se puedan unir a la enzima (Voet et al., 2009).

Numerosos estudios reportan que los residuos orgánicos mineralizados de diferentes materias primas pueden influir en el contenido y distribución del P como en sus fracciones (Wei et al., 2016); el ecosistema en las compostas contiene microorganismos solubilizadoras de fósforo (PSM por sus siglas en inglés) distribuidos asimétricamente por las capas de la composta y en sus fases (Wei et al., 2016). Es complicado mantener una cantidad estable de P derivada de los residuos agroindustriales, por las diferentes sucesiones en la población microbial determinadas por cada tipo de sustrato, así como depende del lugar en el mundo donde se desarrolle el compostaje (Khalid et al., 2011). La estrategia de inocular bacterias PSB en la composta, no ha tenido buenos resultados principalmente para mantener la supervivencia del inóculo (Feng et al., 2011).

Para lograr una cantidad de mineralización del P los microorganismos utilizan las enzimas fosfatasas y fitasas, donde las fitasas son de interés especial porque separan fosfatos de la molécula de fitato, que es la forma más abundante de P orgánico (Menezes-Blackburn et al., 2013). La comprensión del comportamiento catalítico de las enzimas en medios complejos como en el compostaje o en el suelo siendo de importancia estratégica para lograr la mejor nutrición de la planta (Menezes-Blackburn *et al.*, 2013).

En los trabajos reportados sobre el uso de enzimas en compostas; con el objetivo de degradar compuestos de ligninocelulosa se utilizó enzimas ligninolíticas añadidas de forma directa en la composta como biocatalizador y obtuvieron una sinergia positiva entre la

enzima y la utilización de carbono (C), que resultó en una mejor actividad microbiana y un incremento en la degradación de los compuestos ligninocelulosicos (Feng *et al.*, 2011). En López-Aispún *et al.* (2018) evaluaron la actividad enzimática (glucosidasas, nitrato reductasas, ureasas, proteasas, fosfatasas ácidas, deshidrogenasas), la biomasa microbiana y la respiración microbial en un suelo de bosque cercano a granjas de ganado, encontrando una saturación de N en el suelo, que provocó una inhibición en la actividad enzimática de la ureasa y un estímulo en las actividades enzimáticas de proteasas, fosfatasas y glucosidasas; esto demostró que las actividades enzimáticas son indicadores biológicos de la calidad del suelo. Se realizó un pretratamiento enzimático en productos agroindustriales por *Aspergillus niger* para una fermentación, obteniendo un mejor rendimiento de 3. a 3.6 veces más producción de metano que el control (Mlaik *et al.* 2019)

Por lo tanto, el presente trabajo será una opción para aportar fósforo inorgánico de fuentes residuales agroindustriales orgánicas, al disponerlo por la adición de enzimas que se encuentran de forma general en todos los PSM, de esta forma no competir con microorganismos nativos, y no depender de una mezcla de residuos (Wei *et al.*, 2016), si no al contrario que la investigación pueda solventar de forma general el aumento de P a cualquier tipo de residuo.

1.1 Motivación.

El aumento de la población requiere de mantener y aumentar la producción de alimentos en un 70 a 100% (Williams & Hedlund, 2013) cambio a (Godfray *et al.*, 2010), para lograr este objetivo la agricultura es la base (FAO, 2006; De Schutter, 2011), la cual debe disponer de recursos necesarios de una forma sostenible, tarea no fácil debido a la disminución de las áreas de cultivo, la limitación del agua (Keating *et al.*, 2010) y como una llave emergente, la escasez del fósforo.

El principal problema del P es que los mayores recursos de roca fosfórica están restringidos a tres países principales (China, EU, y Marruecos) (Childers *et al.*, 2011), esto puede provocar un alza en su costo como fue en el año 2008 del 800% (Rittman *et al.*, 2011; Cordell y Neset, 2014); así como su pronóstico de la escasez entre el 2030 al 2100 (Cordell *et al.*, 2011), este panorama presenta un desafío para la producción de alimentos a escala mundial (Keating *et al.*, 2010; Childers *et al.*, 2011) .

Se han buscado opciones para aportar P, encontrando una importante cantidad disponible en los residuos orgánicos donde se sabe que se tiene el 40% del que fue extraído inicialmente de los bancos de roca fosfórica y por ejemplo en los estiércoles se llega a tener concentraciones de 3 a 10 g/kg (Rittmann *et al.*, 2011).

El problema en el proceso de mineralización de los residuos orgánicos es que el P queda en su mayoría en formas orgánicas no disponibles para las plantas. Se han realizado esfuerzos para que pueda ser disponible el P por microorganismos, lo cual tiene la complicación de no poder mantener estable la cantidad de P total al final del proceso de compostaje debido a los cambios de la población de microorganismos de acuerdo al tipo de sustrato (Khalid *et al.*, 2011), de igual forma se han tratado de inocular microorganismos siendo difícil mantener la supervivencia por la competencia con la población microbiana nativa ó por la diferencia en los factores abióticos para su adecuado crecimiento (Feng *et al.*, 2011).

Con fundamento en lo reportado para el uso de enzimas aisladas de microorganismos que han sido añadidas de forma directa en un sistema, han logrado una mejor disponibilidad de nutrientes y una mayor degradación de residuos (Feng *et al.*, 2011); por lo tanto resulta necesario establecer si la aplicación de las enzimas fosfatasas y fitasas producirán un incremento en la cantidad de mineralización de fósforo proveniente de los residuos orgánicos agroindustriales.

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 El compostaje.

Se llama compostaje al tratamiento biológico para convertir residuos orgánicos en compostas que es una forma sostenible de fertilizantes orgánicos (Zhou & Selvam, 2014). El compostaje es un proceso biooxidativo en condiciones controladas de temperatura, humedad y aireación, que produce un material estable, rico en sustancias húmicas, ampliamente utilizado como acondicionador de suelos en la agricultura (Alavi et al., 2017).

El compostaje es una tecnología ambientalmente amigable por las siguientes razones: proporciona nutrientes para las plantas, retiene el carbono en la misma composta y suelos, elimina fitoparásitos y fitoenfermedades, reestructura y biorremedia suelos contaminados; estos beneficios pueden variar y dependen de las condiciones específicas de la producción de las compostas (Martínez-Blanco et al., 2013; Rawoteea et al., 2017). El factor más importante de la calidad de las compostas es la subproducción del humus que indica el estado maduro del producto, debido a la reorganización de la materia orgánica en moléculas estables que son: las sustancias húmicas, los ácidos húmicos, los ácidos fúlvicos y otros componentes como las huminas (Azim et al., 2018). El humus es producto de la transformación de la materia orgánica debido a la dinámica microbial y enzimática realizada en el proceso de compostaje, representado por una serie de polímeros policondensados con diferentes masas moleculares y amplios grupos funcionales entre los que destacan los fenólicos, carboxilos y citoquinas (Zhou & Selvam, 2014).

La principal materia prima para las compostas son los residuos agroindustriales, que presentan variación en sus propiedades, lo que implica conocer las fases y las variables del proceso para hacer un mejor manejo de las mismas y poder obtener un fertilizante nitrogenado, fosforado y otros, además de una fuente de microorganismos con actividad

mineralizadora (Félix-Herrán et al., 2010). Esto representa un potencial de desarrollo para fertilizantes de origen orgánico. El manejo de la composta permite restaurar los suelos con una importante fertilización de fondo, difiriendo por la calidad y estabilidad del producto (Azim et al., 2018) que está relacionado con los microorganismos involucrados. El compostaje reduce los compuestos tóxicos, el volumen y la humedad de los residuos y los transforma en materia orgánica disponible para la agricultura (González-Fernández et al., 2015). La estabilidad y maduración del compostaje depende de variables biológicas (ausencia de patógenos), físicas (densidad relativa, propiedades hídricas, olor) químicas (pH, relación C/N, contenido de nutrientes, metales pesados) y del tipo de residuo (González-Fernández et al., 2015). La composta busca principalmente aumentar el contenido nutrimental por medio del control de las variables, por diferentes mezclas de residuos (Kalemelawa et al., 2012) o por la adición de nutrientes o microorganismos (Phutela & Sahni, 2013).

2.2 Fases del compostaje.

Las fases principales del compostaje de acuerdo con Pergola et al. (2018) son: preparación de la mezcla, fase bio-oxidativa y fase de maduración; y de acuerdo con Azim et al. (2018) lo explican en dos fases principales; la primera, alta actividad microbial y la segunda, conversión de la materia orgánica a sustancias húmicas. Sin embargo, de forma general el proceso de compostaje se puede describir por cuatro fases bien diferenciadas: la mesofílica, la termofílica, de enfriamiento y de maduración. La fase mesofílica inicia con la conversión de la materia orgánica de fácil asimilación, como los azúcares, aminoácidos y lípidos (Bernal et al., 2009); algunos de los microorganismos que intervienen se encuentran en las familias *Pseudomonaceae*, *Erythrobacteraceae*, *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Sterptomycetaceae* (Sánchez et al., 2017). El cambio de fase, a termofílica, ocurre cuando la población microbial mesofílica disminuye y es reemplazada por los microorganismos termofílicos representados principalmente por las actinobacterias (Insam, 2007). En esta fase que se caracteriza por una alza de la temperatura, los

microorganismos, mediante la acción enzimática, degradan moléculas complejas como celulosa, lignina, hemicelulosa y proteínas (Bernal et al., 2009) y la alta temperatura elimina patógenos y la posibilidad de germinación de las semillas presentes en la materia orgánica (Vélez et al., 2008)(Vélez-Sánchez-Verín et al., 2008). La fase de enfriamiento ocurre cuando las fuentes de energía de las primeras dos fases de la composta se agotan, permitiendo la segunda colonización de microorganismos mesofílicos con una temperatura entre 15 y 35 °C, los cuales se alimentan de los remanentes de azúcares, celulosas y hemicelulosas. La última fase de maduración es donde se forman los precursores de las sustancias húmicas (Tabla 1) (Sánchez et al., 2017).

Tabla 1. Variables físicas y biológicas en el proceso de compostaje (modificado de Sánchez et al., 2017).

Fases del Compostaje	Microorganismos	Reacciones bioquímicas	Rangos de Temperatura (°C)	Rangos de pH
Mesofílica	Bacterias y hongos (Familias de Enterobacterias, Pseudomonas y Streptomicetos)	Hidrolisis de azúcares, lípidos y aminoácidos.	15 a 35°C	6.5 a 11
Termofílica	Proliferación de actinobacterias (Familias de Termoactinomicetos y Termomonosporás)	Hidrolisis de polímeros (celulosa, lignina, hemicelulosa y proteínas); eliminación de patógenos y semillas.	65 a 85°C	Arriba de 10
Enfriamiento	Segunda colonización de bacterias mesofílicas.	Restos de azúcares, celulosas y hemicelulosas.	35-15°C	Desciende a 8.
Maduración	Bacterias.	Formación de sustancias húmicas.	15°C	Mantiene entre 7.5- 8

2.2 Variables fisicoquímicas del compostaje.

Durante las fases del compostaje el control de las variables fisicoquímicas de pH, temperatura, contenido de humedad, aireación, y la relación C/N (Li et al., 2013; Fernández-Delgado Juárez et al., 2015) es importante para obtener un producto con niveles adecuados de nitrógeno y fósforo (Wang et al., 2015).

La temperatura reduce los patógenos presentes en la composta, el pH y la aireación se relaciona con la dinámica microbial y las emisiones de gases de efecto invernadero; el contenido de humedad afecta las propiedades fisicoquímicas y la relación de C/N (3/1) es significativa para el crecimiento microbial (Kalemelawa et al., 2012). La variación de las variables fisicoquímicas se refleja en la calidad nutrimental final de la composta, la cual está ligada a la estructura química de la materia orgánica (Wang et al., 2015). En general, el requerimiento promedio de las plantas en cuanto a nutrientes se estima en: 1.5% de N, 0.2% de Fósforo y 1.0 % de Potasio, por lo que es importante tener un manejo adecuado de las variables fisicoquímicas del proceso de compostaje para garantizar que el producto final cuente con los niveles indicados de nutrientes (Sánchez et al., 2017) .

2.4 Fósforo en la agricultura.

Del P producido mundialmente, el 80% se aplica en la agricultura (Rittman et al., 2011) en fertilizantes fosfatados (Wei et al., 2016) de los cuales solo entre el 5-30% es aprovechado por la planta, lo demás es inmovilizado rápidamente debido a el metabolismo de los microorganismos o por los cationes presentes en el suelo promoviendo su inviabilidad para las plantas (Mander et al., 2012). La posible carencia de P puede limitar la producción agrícola en este siglo, por lo cual alternativa se encuentra en los residuos orgánicos agroindustriales que mantiene el 40 % del recurso de P en forma orgánica, este P orgánico requiere conversiones a P inorgánico (Rittmann et al., 2011). El ion ortofosfato es la forma principal del P inorgánico y la disponibilidad para las plantas es en el siguiente orden, primero el fosfato (PO_4), seguido por hidrogeno de fosfato (HPO_4) y por último el dihidrogeno de fosfato (H_2PO_4).El ortofosfato es derivado de los depósitos de rocas

minerales como la apatita, el cual se aplica en la fertilización y puede retornarse de su forma orgánica a inorgánica por los microorganismos por medio de la mineralización que ocurre en el compostaje (Nash et al., 2014).

2.3 Fósforo orgánico.

El Fósforo orgánico (Po) es proveniente de los procesos biológicos derivados de la asimilación del ortofosfato y que es liberado a través de los residuos de microorganismos, plantas y animales en los procesos de degradación y madurez, representando un importante depósito de Po; que es mayor del 50% del P total que existe en los sistemas agrícolas en suelo(Stutter et al., 2012; Nash et al., 2014). La mayor cantidad en que se encuentra el Po es en monoésteres de fosfato y diésteres de fosfato y en menores cantidades como polifosfatos (adenosina de trifosfato) y fosfonatos (compuestos con un enlace de C-P)(Turner & Engelbrecht, 2011). El diéster de fosfato es la forma de Po de más fácil conversión a Pi y por otra parte el monoéster de fosfato es el de mayor limitación por la fuerte asociación con minerales presentes en los sustratos(Turner & Engelbrecht, 2011); de igual manera Behera et al., (2017)Behera et al.(2017) clasifica al Po en 4 fracciones: lábil, moderadamente lábil, moderadamente resistente (P ácido fúlvico) y altamente resistente (P ácido húmico) (Figura 1).

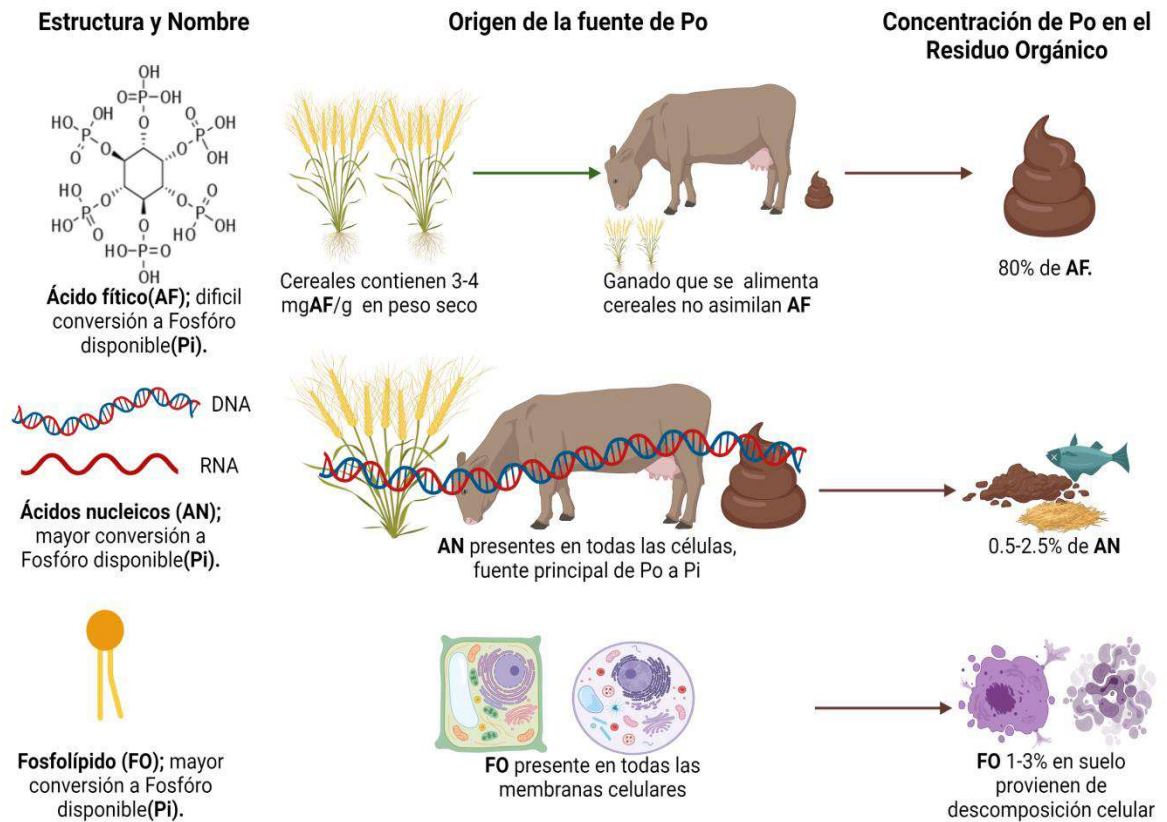


Figura 1. Estructuras, Origen y Concentración de Po en los Residuos Orgánicos.

2.4 El compostaje respecto al Fósforo.

El compostaje es un proceso de descomposición biológica controlada de materia orgánica, que acompaña a una actividad dinámica de diversas poblaciones microbianas (Xi et al., 2016). En el compostaje la distribución de las fracciones de P varían, por lo que una gran cantidad de estudios han orientado a utilizar fosfatos minerales unidos a la inoculación de PSB obteniendo una poca disponibilidad (Wei et al., 2016). La inoculación durante el compostaje de PSB puede tener diferentes rendimientos debido a diversos factores como la escala de compostaje, la etapa de inoculación, etc. (Zhu et al., 2019); un estudio con buen resultado fue la inoculación de PSB en composta de residuos orgánicos domésticos; que

afectó el pH por los cambios en la acidez total por la producción de ácidos orgánicos que resultó en una gran solubilización de fosfato tricálcico y disponibilidad de P, mostrando una correlación positiva de la composición bacteriana con las fracciones de P y la función cooperativa relacionada con la transformación de P entre las especies microbiales durante el compostaje (Wei et al., 2018). Estos resultados en múltiples ocasiones no resultan de forma adecuada por la necesidad de factores abióticos distintos para que sobreviva el inoculo y las dinámicas microbiales en el compostaje. Por lo cual se propone utilizar uno de los dos principales mecanismos para solubilizar el fósforo las enzimas del grupo de bacterias (PSB) presentes en el compostaje (Alavi et al., 2017), que determinan la cantidad y distribución del P (Wei et al., 2016) en la parte final del fertilizante orgánico.

2.5 Agentes para el Fósforo en la Composta.

Numerosos estudios muestran que los residuos orgánicos composteados de diferentes materias primas pueden influir en el contenido y distribución de las fracciones de P (Wei *et al.*, 2016; Duan et al., 2019), así como se puede afectar la solubilidad de los diferentes compuestos de P por la materia húmica, por la capacidad de quelación o el cruce de metales considerados en ocasiones como forma de fijación biológica de fosfatos .

El ecosistema de las compostas contiene PSB entre las que se reportan estadios de sucesión y distribución en las capas de composta, identificadas por el uso de técnicas moleculares (Wei *et al.*, 2016). Se evaluaron PSB de distintos residuos donde se obtuvo la presencia de PSB termotolerantes y multifuncionales (celulolíticos, ligninolíticos, actividad solubilizadoras de fosfatos, etc.), (López-González et al., 2015), de 3 phyllos: ***Firmicutes***, ***Proteobacterias*** y ***Bacteroidetes***; dentro de las cuales el género ***Bacillus*** se reportó como solubilizador de P en suelos y constituyó el 33.33% de la comunidad de PSB en estas compostas.

En el 2017 Avali *et al.*, estudiaron un compostaje seguido con lombriz (*Eisenia foetida*) donde sus resultados muestran un aumento en el P total, debido a la presencia de las enzimas fosfatasa existentes en el tracto digestivo de las lombrices (Donohoe, 2018).

Se sabe que la inoculación de PSB ha provocado un aumento en la disponibilidad de P a las plantas en experimentos en macetas, en condiciones de campo y en vermicomposta (Wei et al., 2018).

2.6 Microorganismos Solubilizadoras de Fosfato (PSM).

El compostaje es rico en Microorganismos Solubilizadores de Fósforo (PSM) que lo transforman a formas viables para las plantas por acidificación, quelación, reacciones y formación de sustancias poliméricas (Wei et al., 2016).

Por lo general, un gramo de suelo fértil contiene entre 10¹ y 10¹⁰ bacterias, y su peso vivo puede exceder los 2,000 kg ha⁻¹. Las bacterias del suelo tienen formas de cocos (esfera, 0.5 µm), bacilos (barra, 0.5-0.3 µm) o espirales (1-100 µm). Los PSB son ubicuos con variaciones en las formas y la población en diferentes suelos. La población de PSB depende de las diferentes propiedades del suelo (propiedades físicas y químicas, materia orgánica y contenido de P) y actividades culturales (Khan et al., 2009). La actividad de solubilización del fósforo está determinada por la capacidad de los microbios para liberar metabolitos como los ácidos orgánicos, que a través de sus grupos hidroxilo y carboxilo quelatan el catión unido al fosfato, estos últimos se convierten en formas solubles. Procesos / mecanismos que incluyen la producción de ácidos orgánicos y la extrusión de protones.

Las especies de plantas, la etapa de desarrollo de la planta y el tipo de suelo se han indicado como factores principales que determinan la composición de los biofertilizantes (Khan et al., 2009)

Los PSM se dividen en Bacterias Solubilizadoras de Fósforo (PSB) con un porcentaje de 1-50% y en Hongos Solubilizadores de Fósforo (PSA) con solo un 0.1-0.5% (Tabla 2)(Khan et al., 2009).

Tabla 2. Microorganismos Solubilizadores de Fósforo (Khan et al., 2009 y Behera *et al.*, 2017)

Tipo de Microorganismos Solubilizador de Fósforo (PSM)	Género
Bacterias Solubilizadoras de Fósforo (PSB)	Achromobacter, Aereobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Arthrobacter, Aspergillus, Azotobacter, Bacillus, Bradyrhizobium, Burkholderia, Chromobacterium, Enterbacter, Erwinia, Escherichia, Flavobacterium, Klebsiella, Micrococcus, Pantoea agglomerans, Pseudomonas, Rhizobium, Salmonella, Serratia, Thiobacillus
Actinomycetos Solubilizadores de Fósforo (PSA)	Streptomyces, Nocardia
PSM mayor efecto.	Pseudomonas, Bacillus, Rhizobium, Enterobacter, Penicillium y Aspergillus.
PSM más importantes.	Bacillus circulans, B. megaterium, B. subtilis, B. polymyxa, B. sircalmous, Enterobacter y Pseudomonas striata.

Las reacciones de las PSM intervienen en los ciclos de oxidación y reducción de los componentes del P, mediante reacciones de transferencia de electrones en la oxidación de

fosfito (-3) a fosfato (+5) forma asimilable por las plantas, la mayoría de la mineralización es debida a las enzimas fosfatasas (Wei et al., 2016) y fitasas que el fitato, otra forma de P orgánico, obtienen fosfato (Menezes-Blackburn et al., 2013).

2.7 Fases de la solubilización del Fósforo.

En la Figura 2 se muestran las fases de la mineralización y la liberación de acidos orgánicos para solubilizar el P (Khan et al., 2009; Mander et al., 2012).

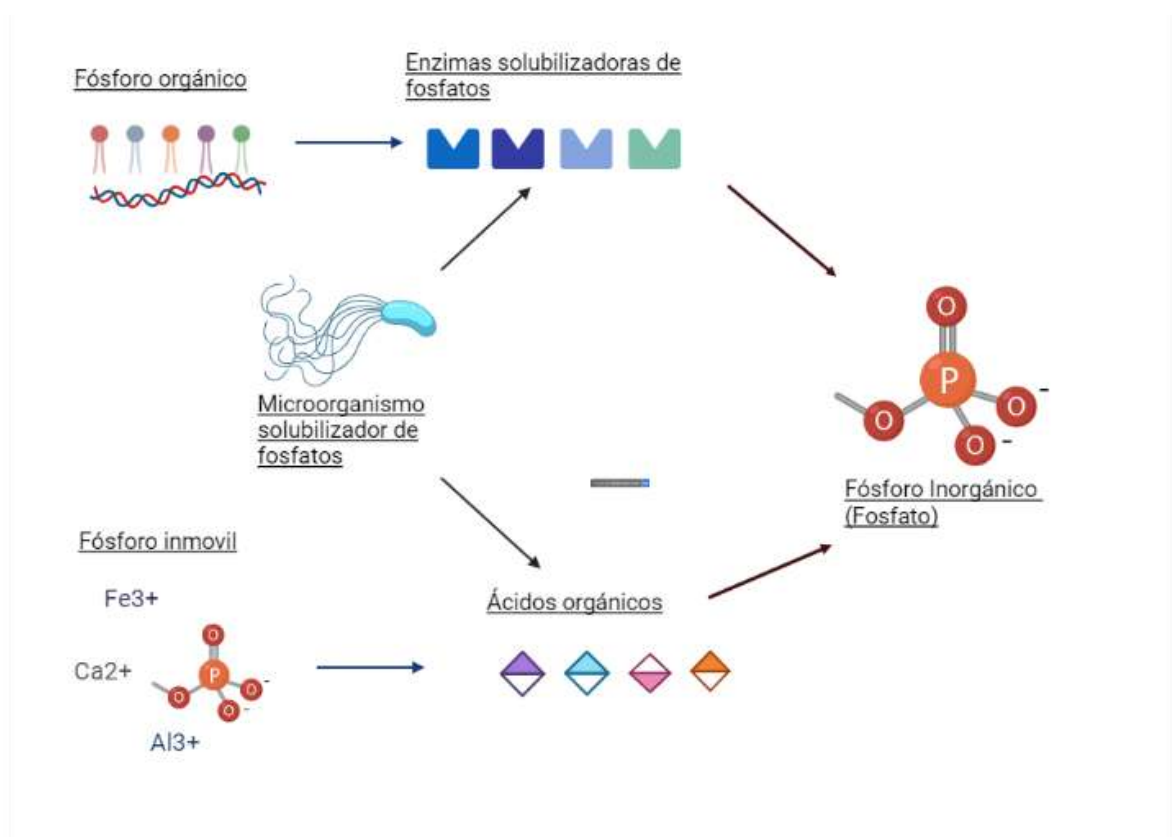


Figura 2. Microorganismo solubilizador de fosfatos y sus rutas metabólicas para liberar fósforo inorgánico.

La liberación del P insoluble e inmóvil (quelatado) en los sustratos se debe a las PSM, principalmente bacterias que están asociadas a los procesos con las formas de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$), fosfato de aluminio ($AlPO_4$) que liberan el P soluble por cambios de

pH (Yan et al., 2014), el fosfato de hierro (FePO₄) libera el P por reacciones de condiciones redox estas conversiones son propiciadas por la liberación de ácidos de bajo peso molecular por las PSB (Khan et al., 2014). Los ácidos orgánicos liberados por las PSB pueden ser ácido oxálico, ácido cítrico, ácido acético, ácido succínico los cuales a través de sus grupos hidroxilos o carboxilos incrementan la solubilidad y disponibilidad de fosfato mineral (Mander et al., 2012). Los ácidos orgánicos para solubilizar el P utilizan un intercambiando de ligandos (Eq.1) ó por un ligando promotor de los óxidos de Fe o Al (Teng et al., 2020):



El incremento de la solubilidad del P está relacionada con la disminución del pH y el efecto de la producción de ácidos en la composta (Wei et al., 2018). Las PSM pueden solubilizar el P mediante la vía del NH₄⁺, del dióxido de carbono CO₂ y el ácido sulfhídrico H₂S, y la propia liberación del P de la degradación de la materia prima (Rouphael et al., 2018). En el proceso de nitrificación se contribuye a la solubilización de P durante la amonificación en presencia de NH₄ que resulta en el descenso del pH y la liberación de ácidos (Cáceres et al., 2018).

2.8 Enzimas Fosfatasas y Fitasas.

El interés en los microorganismos ha ido incrementándose debido a sus potenciales aplicaciones para el comercio, que incluye la biodegradación y la producción de compuestos bioactivos tales como antibióticos y enzimas. Las enzimas son importantes en la degradación de los residuos al tener ventajas de incrementar la solubilidad de los sustratos (Acevedo et al., 2014). Recientemente se han utilizado enzimas como biocatalizadoras para propósitos medio ambientales, siendo promisorio (Feng *et al.*, 2011); sin embargo existe poca información acerca del uso de las enzimas en el proceso de compostaje para la degradación ó mineralización (Yu et al, 2012).

Existe un amplia información sobre el uso de las enzimas en avances de biotecnología, lo cual ha permitido tener producciones más baratas y más enzimas disponibles, con mejores

procesos de aislamiento y purificación (Feng et al., 2011). Las ventajas potenciales de utilizar las enzimas comparado con los tratamientos convencionales incluye: aplicaciones a materiales recalcitrantes, amplia operación sobre mayores contaminantes o específicos, rangos pH, temperatura y sustratos, menores necesidades para el desarrollo de biomasa y fácil control de los procesos entre otros .

La solubilización de compuestos ricos en fosfatos se lleva a cabo por la acción de las enzimas fosfatasas que catalizan la hidrólisis en diferentes pH, el ecosistema de las compostas es rico en biomasa bacteriana con alta diversidad de capacidades enzimáticas, entre las que destacan las PSB (Wei et al., 2016).

Las PSB intervienen en los ciclos de oxidación y reducción de los componentes de P, con reacciones de transferencia de electrones en la oxidación de fosfito (-3) a fosfato (+5) forma asimilable por las plantas por medio de la enzima fosfatasa . La fitasa es capaz de separar el P orgánico del fitato (ácido fítico) (Menezes-Blackburn *et al.*, 2013; (L. Zhu et al., 2019), se sabe que las bacterias que producen las fitasas son por lo general mesofílicas, y tiene presencia en las compostas en los últimos días del compostaje, sugiriendo que es cuando se presentan los mecanismos bacterianos para acceder a compuestos de P recalcitrantes como el fitato. La comprensión del comportamiento catalítico del uso de las enzimas fitasas y fosfatasas en la mineralización como un medio complejo es de importancia estratégica para promover de mejor nutrición para la planta de P (Menezes-Blackburn *et al.*, 2013).

Las PSB poseen las enzimas en la pared celular bacteriana, en la sustancia polimérica extracelular (EPS) que las rodea (Behera *et al.*, 2017), esta membrana tiene propiedades físicas que determinan las secreciones. La temperatura tiene una influencia directa sobre la actividad enzimática que difiere entre organismos. Para desarrollar aplicaciones en la ciencia aplicada y en la industria de las enzimas, es necesario su purificación y caracterización (Behera *et al.*, 2017).

Se definirá como una unidad de actividad enzimática a la cantidad de enzima requerida para liberar 1 / μmol de fosfato inorgánico por minuto en condiciones de ensayo. Para determinar las actividades enzimáticas de las fosfatasas y fitasas se tiene el registro de una región singular en la espectrofotometría (Rocky-Salimi et al., 2016).

2.9 Algunas aplicaciones de enzimas en suelo y en residuos orgánicos.

En (Zhu et al.,(2018) encontró enzimas que funcionan como eliminadores de fosfoesteres orgánicos, liberando fosfato inorgánico a partir de nucleótidos y fosfatos de azúcar. Probablemente los PSM sean la opción más ecológica y económica para mejorar la disponibilidad de P para la producción alimenticia (Owen et al., 2015), con una aplicación en ciencia e industria las enzimas que poseen en común para mineralizar el Po las fosfatasas y fitasas , requieren de su caracterización (Behera *et al.*, 2017; Zhu et al., 2019).

En el trabajo realizado por Feng et al., en el 2011 se tiene una homología sobre el uso de enzimas en composta, la diferencia es que ellos añadieron enzimas ligninolíticas, menciona como en el sustrato de composta no se utilizo ningún cambio para la adición de las enzimas ligninolíticas y en donde se obtuvo un aumentó la proporción de degradación de lignina y hemicelulosa en un 5,24% y 11,74%, respectivamente, en comparación con el resultado del control.

3. HIPÓTESIS

La adición de enzimas fosfatasas y fitasas en la mineralización de los residuos agroindustriales orgánicos incrementará significativamente el contenido de fósforo inorgánico en relación a los sistemas convencionales, debido a la acción catalizadora sobre el fósforo orgánico.

4. . OBJETIVOS.

4.1 Objetivo General.

Determinar el efecto que tiene la mineralización del fósforo en composta madura mediante la adición de las enzimas fosfatasas y fitasas y su uso asociación con la producción agrícola

4.2 Objetivos particulares.

Evaluar la actividad específica de fosfatasas y fitasas de *Pseudomonas aeruginosa ATC1544* y *Bacillus pumillus* en Caldo de Papa Dextrosa.

Cuantificar el efecto de la adición de fosfatasas y fitasas en el proceso de compostaje en cuanto a la concentración de fósforo inorgánico disponible.

Evaluar el efecto de la composta enzimáticamente tratada para incrementar fósforo inorgánico en el cultivo de pepino (*Cucumis sativus*).

5. METODOLOGÍA

5.1 Ubicaciones experimentales

El área donde se desarrolló el experimento fue en los Laboratorios de Microbiología y Biología Molecular del Campus Amazcala de la Facultad de Ingeniería, de la Universidad Autónoma de Querétaro Se mandaron a analizar muestras al Laboratorio de Suelos del

Instituto Nacional de Investigación Agrícola, Pecuaria y Forestal(INIFAP) del Bajío. Se utilizo en la etapa de cultivo un invernadero del campus Amazcala de 108 m².

5.2 Evaluación de la actividad específica de fosfatasas y fitasas de la PSB mediante una cinética con diferentes niveles de agitación.

5.2.1 Evaluación de cuatro cepas bacterianas como solubilizadoras de fósforo aisladas en el campus Amazcala.

Se evaluaron cuatro cepas bacterianas aisladas en el campus Amazcala como solubilizadoras de fósforo en medios selectivos. Las cepas fueron *Bacillus cereus* "Amazcala" aislada de la rizosfera y tres cepas aisladas de composta madura *Stenotrophomonas rhizophila* (A y B) y *Bacillus pumillus*.

La prueba consistió en sembrar en agar nutritivo las bacterias para su activación metabólica y colocar en caja petri por la técnica de punteo en los medios mínimos. El medio mínimo para fosfatasas se preparó de acuerdo con M. A. Tabatabai and J. M. Bremner (1969), que contiene una solución modificada universal buffer (MUB) con H₂O destilada, Tris, ácido maleico (C₄H₄O₄), ácido cítrico (C₆H₈O₇) y ácido bórico (H₃BO₃). Se ajustó el pH, con hidróxido de sodio (0.5 M) en 6.5, 7 y 11; para fosfatasas ácidas (PHOA), fosfatasas neutras (PHON) fosfatasas básicas (PHOB).

Para las fitasas se usaron dos formulaciones (PHY):

La primer formulación fue con fitato de calcio a un pH de 5.5(Neevel et al., 2007).

La segunda fue modificada sin dextrina, utilizando fitato de sodio de acuerdo a Rocky-Salimi et al. (2016).

A todos los medios se les añadió agar al 3% y se evaluaron en una cinética de 12 horas por fotografía con muestreos cada 3 horas, para identificar la bacteria que exudó las diferentes fosfatasas y fitasas. Todo muestreo se realizó por triplicado.

5.2.2 Cinética con la *Bacillus pumilus* aislada de composta a diferentes, condiciones de agitación y fuentes de solubilización de fósforo orgánico.

Bacillus pumilus fue la bacteria que resulto exudar la presencia de todas las enzimas PHOA, PHON, PHOB y PHY.

La cinética de la producción de enzimas se realizo por triplicado, durante de 16 horas, bajo las diferentes condiciones:

- Muestréos 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12,14 y 16 horas.
- Temperatura de 30° C.

Velocidades de revolución por minuto de 0, 100 y 200 rpm.

Cada tratamiento consistió en colocar los medios mínimos en líquido para PHOA, PHON, PHOB, en cada muestreo se centrifugo a 10,000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante que se considero como enzima cruda (Feng et al., 2011) se le midió la absorbancia a 420 nm con un espectrofotómetro UV-Vis y se extrapolaron los valores en la curva estándar determinada usando las soluciones diluidas en serie de p-nitrofenol. De esta forma se obtuvo la unidad (U) de enzima que se definió como la cantidad requerida para liberar 1 μmol de ortofosfato inorgánico / ml / min bajo las condiciones del ensayo.

5.2.3 Comparación entre bacterias solubilizadoras de fósforo en caldo de papa dextrosa.

El cultivo en caldo de papa dextrosa permite escalar el proceso a industrial por la facilidad de a materia prima y evita el alto costo de reactivos como de enzimas puras; solo reside en la evaluación de que por alto contenido de almidón presente en la papa los PSM exuden enzimas deseadas para mineralizar el P orgánico en la composta.

Como primer parte experimental, se evaluó la presencia enzimática solubilizadora de fosfato a *Pseudomonas aeruginosa* ATC 15442 brindada por el Instituto Politécnico Nacional, se colocó en los medios mínimos a 200 rpm y 30°C se le analizo a la 9 horas para de fosfatasas (PHOA, PHON, PHOB) de acuerdo a Tabatai y Bremner (1969) y (PHY) de acuerdo a Rocky-Salimi et al., (2016), para conocer su tipo de exudación enzimática. Conociendo que *P. aeruginosa* exuda las enzimas fosfatasas y fitasas se prosiguió en comparar con *B. pumilus*, por ser ambas PSB. Se activaron en incubación en LB por 24 horas y se inocularon en caldo de papa dextrosa (PDB) para evaluar su actividad específica de PHOA; PHON, PHOB, y PHY a las mismas condiciones constantes de 9 hrs, 200 rpm y 30°C. Solo a *P. aeruginosa* se inoculo en el medio de acido fitico para evaluar su unidad enzimática en PHY y comparar con el resultado ya obtenido de *B. pumillus*. Se midió un mililitro de sobrenadante a 420 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis para determinar Pi. Se utilizó una curva estándar de p-nitrofenol para determinar la unidad de actividad enzimática (U) expresada como U por mg de proteína(Behera et al., 2017). El contenido de proteínas se determinó mediante el método de Bradford. Una unidad (U) de enzima se definió como la cantidad de enzima requerida para producir 1 μmol de ortofosfato inorgánico por mililitro por minuto en las condiciones del ensayo.

La bacteria con mayor actividad específica se hizo un recuento en PDA y PHY por número más probable.

5.2.4 Diseño experimental

Se analizaron los datos en S Statgraphics Plus, versión 5.1 (1992), los efectos experimentales se determinaron con un análisis de varianza de una vía (ANOVA), con una

comparación de medias por Tukey ($p < 0.05$) Los diseños experimentales fueron completamente al azar,

5.3 Metodología del efecto de la adición de la mezcla de enzimas en composta madura.

5.3.1 Proceso de Compostaje.

El proceso de compostaje se realizó con los residuos de estiércol del establo lechero, en el área de transformación de residuos orgánicos a abonos del campus Amazcala. Durante el proceso de compostaje la aireación se realizó de forma manual mezclando periódicamente una vez por semana (Alavi et al., 2017). El contenido de humedad de la composta se ajustó al rango óptimo de 45-55% mediante riego del agua requerida, y se mantuvo este contenido de humedad).

Se seleccionó un lote maduro de composta al cual se evaluó su maduración por la prueba de temperatura (Azim et al., 2018).

5.3.2 Preparación de la Composta para la Adición de los Tratamientos Solubilizadores de Fosfato.

Se le separó material extraño a la composta y se cribó en una malla de $0.29 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$ para obtener un composta homogénea, de este material de composta se tomaron 50 g para cada sucesivo tratamiento. Las muestras se extendieron en platos para lograr una mejor uniformidad de aplicación de los tratamientos que se basaron en porcentaje de humedad a saturación, siguiendo la regla de 1:1 donde 1g peso de composta es igual a 1 ml de solución de tratamiento. En la siguiente figura 3 se muestra el proceso en general:

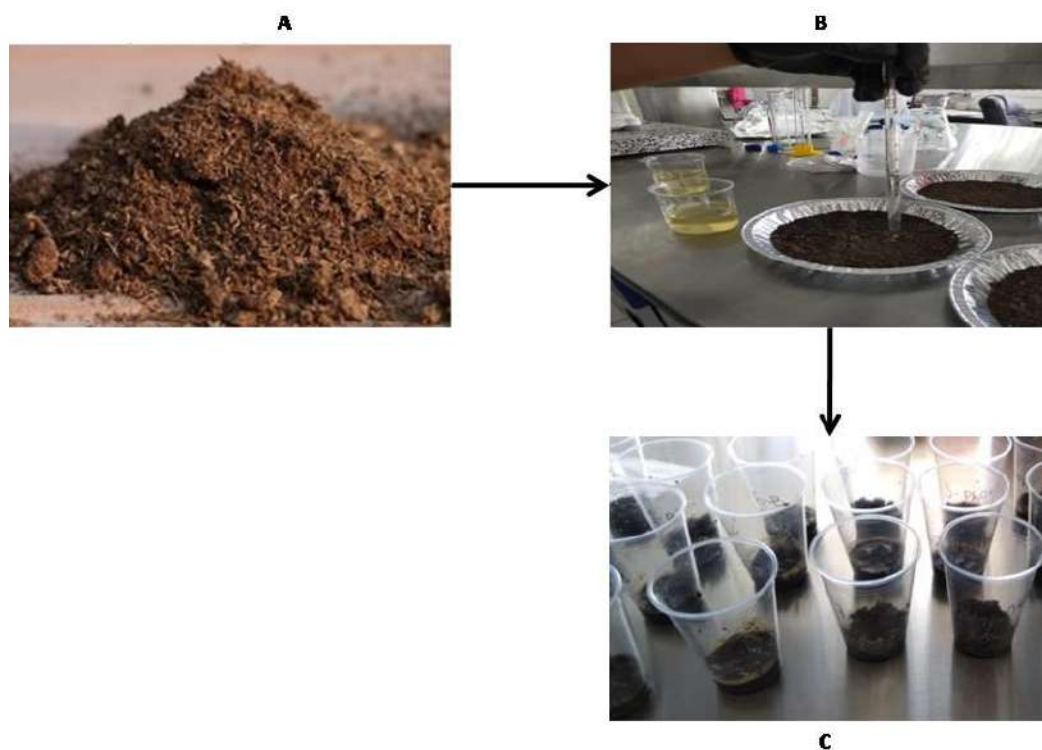


Figura 3. Aplicación de tratamientos solubilizadores de fosfato en composta madura.

5.3.3 Experimento para Evaluar la Actividad Solubilizadora de Fosfato en Composta.

El experimento con sitio en incrementar el contenido de humedad de la composta a nivel de saturación con los tratamientos de solubilización de fosfato. Los tratamientos se describen en la Tabla 3. El control se estableció con agua desionizada (W). Las muestras de composta por triplicado se obtuvieron a las 24, 48 y 72 hrs se cuantificó P_i por el método Olsen y P total se determinó por digestión en ácido nítrico.

Tabla 3. Diferentes tratamientos de *P aeruginosa* ATC 15442 en composta

Tratamiento	Descripción de la composición
PhoEnz	Sobrenadante (enzima cruda) con fitasa y fosfatasa acida , alcalina y neutra en PDB (Enzimas solubilizadoras de fosfato (PhoEnz))
PSB	<i>P. aeruginosa</i> ATC15442 como bacteria solubilizadora de fosfato en PDB
Phy	Sobrenadante (Enzima cruda) con fitasas (Phy)
PhoEnz+PSB	Combinación de PhoEnz (5%) y PSB (5%)
PhoEnz+PSB+Phy	Combinación de PhoEnz (3.3%), PSB (3.3%) y Phy (3.3%)

5.3.4 Diseño Experimental.

Los datos se analizaron utilizando S Statgraphics Plus, version 5.1 (1992). Los efectos experimentales se determinaron con análisis de varianza de una vía (ANOVA). La comparación de las medias se realizaron con la prueba Tukey ($p < 0.05$). La evaluación de cada ensayo experimental de la solubilización de fosfato en composta, fue con un diseño experimental factorial incompleto.

5.4 Metodología de la evaluación de la composta enzimáticamente tratada en el cultivo de pepino (*Cucumis sativus*).

El cultivo de pepino se llevó a cabo en uno de los invernaderos del campus Amazcala, este ocupa un área de 180 m². El material del que está construido es de tubería de PTR, cubierta plástica, con ventanas laterales con malla antiáfidos y ventana cenital (Fig.4).



Figura 4. Invernadero del Campus Amazcala.

El sistema de riego constó de tres tinacos para la preparación de la solución nutritiva, dos bombas de ½ HP, dos sistemas de tuberías de PVC, mangueras, emisores, estacas y tubines.

El diseño experimental fue completamente al azar por bloques centrales con 5 tratamientos y 5 replicas. Los tratamientos consistieron en fertilización Completa de Steiner (FC) y con fertilización incompleta de Steiner Sin P, de los cuales se desprenden los siguientes tratamientos: Fertilización sin P (FSP), complemento de fertilización en sustrato con composta tradicional (CT), complemento de fertilización en sustrato con InacPho y complemento de fertilización en sustrato con Composta (PhoEnz)

Se realizo una fórmula para evaluar el requerimiento de P por planta durante el tiempo de experimentación y con la concentración de P en la solución nutritiva Steiner:

$$RP = (P_{disp\ en\ SN}) \times (riego) \times (tiempo)$$

Donde:

RP= Requerimiento de P por planta (mg).

P_{disp en SN}= Concentración de P disponible en solución nutritiva (mg/L).

riego= Cantidad de agua por día por planta (L/día planta).

tiempo= Duración del cultivo (días).

Conociendo el valor de RP, y conociendo la concentración en PhoEnz de Pi se realizo la siguiente relación:

$$PhoEnzFp = \frac{(RP)(x)}{[P]}$$

Donde:

PhoEnzFp= Cantidad de Composta PhoEnz hasta el final del cultivo (mg).

RP= Requerimiento de P por planta (mg).

x= Cantidad de Composta analizada para la concentración de P determinada (mg).

P= Concentración de P en la composta (mg/L)

El requerimiento de P para los tratamientos sin P, utilizando como modelo PhoEnz, fue de 25.6 g de composta por planta al día.

5.4.1 Calidad del fruto, peso seco, contenido de azúcar, Nitrógeno y Fósforo total.

Se evaluó el peso fresco al tercer corte de pepinos siendo un total de 3 frutos por planta y para la determinación del porcentaje de peso seco, se tomó 25 g de cada replica que se corto en una rodaja y se puso en estufa a 55°C.

Se realizo una evaluación sensorial con 18 panelistas (9 hombres y 9 mujeres en un rango de 18-45 años de edad). Cada participante se le pregunto la evaluación sensorial de los frutos con una puntuación con los rangos de 1 a 5, siendo 1= baja aceptación, y 5= excelente

aceptación (dulzura, aroma, textura, apariencia, sabor y aceptación general) (Motamedi et al., 2018).

Se evaluaron los grados Brix tomando un corte de la parte central del pepino, y dividiéndolo en semillas, contorno y total, con los grados Brix se evalúa el contenido de sacarosa que presentan los frutos .

Se evaluó el contenido de N y P total en fruto para lo que se enviaron triplicados del último corte de cada tratamiento al INIFAP Bajío, para su análisis en el Laboratorio de Suelos.

5.4.2 Actividad de enzimas antioxidantes.

Se evaluó del último corte la capacidad de enzimas antioxidantes, triturando y homogeneizando un corte del fruto con nitrógeno líquido. El extracto enzimático se preparó tomando una muestra de 0.3 g de fruto que se homogeneizó con 1 ml del buffer de extracción en frío, y se vorteece por 2 minutos y se centrifuga a 12, 000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se utilizó como extracto de enzima crudo (CEE). La concentración de proteína se realizó al extracto enzimático de acuerdo al método de Bradford.

El protocolo para medir actividad de la enzima superóxido dismutasa(SOD) fue adaptado a partir del reportado por Hayat et al. (2018) descrito a continuación. Inicialmente, 1.5mL de Buffer de extracción (Fosfato de potasio 0.05mM, pH 7.8), 0.3mL de buffer EDTA-Na₂ 0.1mM, 0.3mL de metionina 0.13M, 0.3mL de NBT 0.75mM, 0.3mL de Riboflavina 0.02mM, 0.05mL de CEE y 0.25mL de agua destilada fueron mezclados por inversión en un tubo de ensayo y expuestos a luz fluorescente durante 30 minutos. Posteriormente, la absorbancia fue medida a una longitud de onda de 560 nm en un espectrofotómetro modelo. Asimismo, se realizaron mediciones de soluciones control que contenían todas las soluciones mencionadas excepto CEE.

Con el fin de medir la actividad enzimática de la catalasa (CAT) presente en fruto se realizó el CEE con el búfer de extracción Tris-HCl 100mM (pH 8) de acuerdo con Cakmak y Horst (1991). Una vez obtenido el CEE, se transfirieron 0.1mL de este a una celda de cuarzo, a esto fue añadido 0.2mL de buffer de reacción (Fosfato de potasio 50mM, pH 8) y 0.2mL de H₂O₂ 100mM. La actividad enzimática fue determinada indirectamente por la velocidad de descomposición de H₂O₂ medido a 240nm a los 20, 40, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 segundos en el mismo espectrofotómetro utilizado anteriormente.

Por su parte, la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) fue determinada siguiendo la metodología reportada por Toscano et al. (2018) con algunas modificaciones. El CEE fue obtenido con búfer de extracción (Borato 0.1 M, 2-Mercaptoetanol 0.1 % v/v, pH 8.8), 20µL de extracto fueron mezclados con 230µL de búfer de reacción (Borato 0.1M, L-Fenilalanina 10mM, pH 8.8) y se incubaron a 40°C durante 60 minutos. Posteriormente, se añadió 50 µL de HCl 1N para detener la reacción y se dejó reposar 10 minutos. Se midió la absorbancia de la solución resultante a una longitud de onda de 290nm. El blanco consistió en 250µL de búfer de reacción.

5.4.3 Análisis estadístico.

Los datos se analizaron utilizando S Statgraphics Plus, version 5.1 (1992). Los efectos experimentales se determinaron con análisis de varianza de una vía (ANOVA). La comparación de las medias se realizaron con la prueba Tukey (p<0.05).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Actividad específica de fosfatasas y fitasas de la PSB en la cinética con diferentes niveles de agitación.

6.1.1 Resultados de la evaluación de cuatro cepas bacterianas como solubilizadoras de fósforo aisladas en el campus Amazcala

La bacteria *Bacillus pumillus* aislada de composta mostró crecimiento en los diferentes medios mínimos de cultivo, resultando que exuda enzimas fosfatasas acida, neutra, alcalina y fitasa, como se puede observar en la Figura 5.

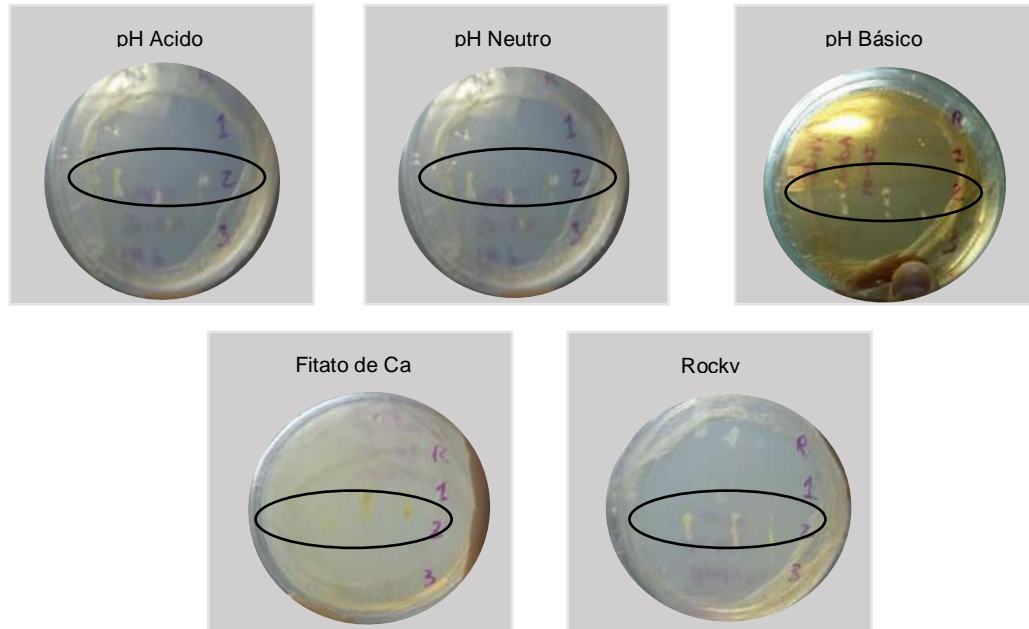


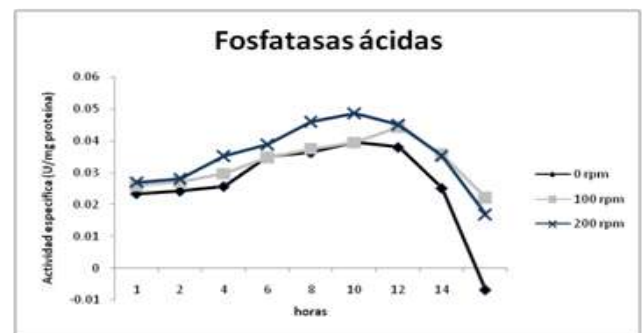
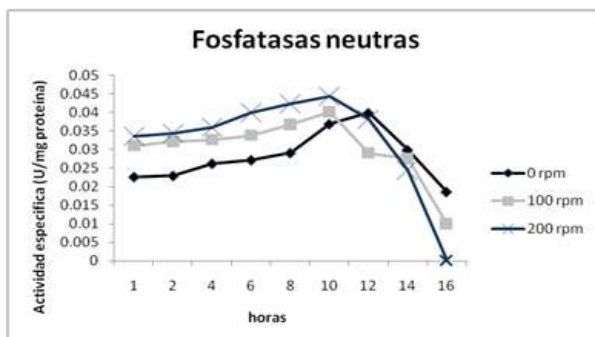
Figura 5. Cinética de solubilización de fósforo de cuatro cepas aisladas del campus Amazcala de la UAQ.

Las pruebas enzimáticas en el medio NBRIP sugieren que es un medio correcto para identificar microorganismos solubilizadores de fósforo (Behera *et al.*, 2017). La prueba de

fitasa es importante debido a que los suelos tienen alrededor del 50% de formas derivadas de ácido fítico y la importancia para la producción bovina donde se utilizan las enzimas fitasas como prebióticos para aumentar la degradación de los compuestos lignocelulóticos en su rumen, y de ahí en los procesos de transformación de residuos orgánicos pues quedan en los estiércoles concentraciones cercanas al 80% de ácido fítico.

6.1.2 Cinética con la *Bacillus pumillus* aislada de composta a diferentes, condiciones de agitación y fuentes de solubilización de fósforo orgánico.

Los resultados para *B. pumillus* para las enzimas fosfatasa mostraron mayor actividad específica a las 200 rpm y a las 10 hrs de cultivo, con valores para PHOA de 0.15 U mg⁻¹ proteína, para PHOB de 0.138 U mg⁻¹ proteína y para PHON de 0.128 U mg⁻¹ proteína. En el caso de las fitasas la mayor actividad específica fue a las 100 rpm y a la hora 12 de cultivo, con un valor de 0.131 U mg⁻¹ proteína (Fig. 6).



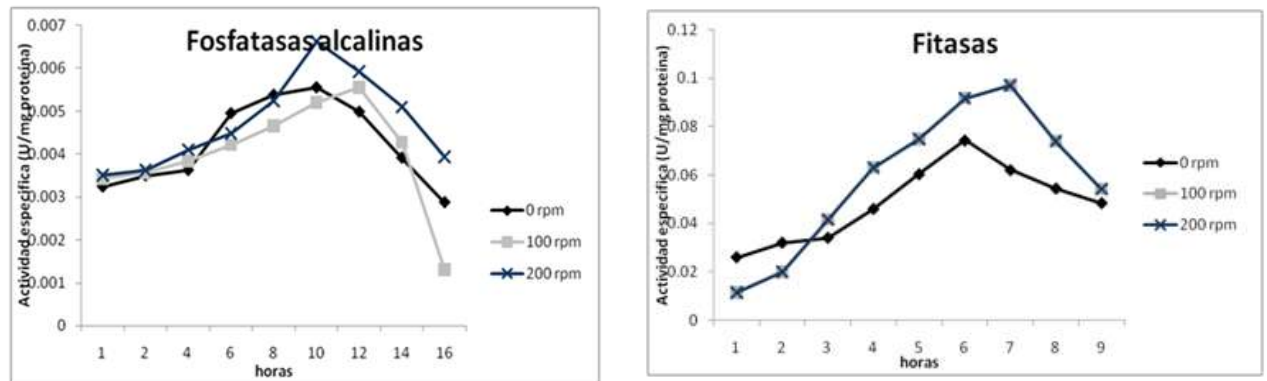


Figura 6. Actividad enzimática específica de *Bacillus pumillus* como solubilizadora de fósforo.

Bacillus pumillus presentó la exudación bioquímica in vitro de todo el conjunto de enzimas solubilizadoras de fósforo y como lo comento Li et al., (2019) que existen bacterias en la composta con esta vía enzimática y ahora obtuvimos este resultado del aislado en el campus Amazcala. Esta bacteria *B. pumillus* se puede encontrar ampliamente distribuida en los suelos y en la rizosfera de los cultivos, lo que esta información sugiere que esta ruta enzimática puede presentarse con un buen manejo y protección de la microbiota de los cultivos para aumentar la disponibilidad de P (Shahid & Hameed, 2012; Zhu et al., 2018).

6.1.3 Comparación entre bacterias solubilizadoras de fósforo en caldo de papa dextrosa.

P. aeruginosa presentó solubilización por la vía enzimática en los medios mínimos de PHOA, PHON, PHOB y PHY. Los resultados de la comparación entre *B. pumillus* aislada de composta y *P aeruginosa* respecto al crecimiento en el medio de PDB se muestran en la Fig 7 con un comportamiento normal.

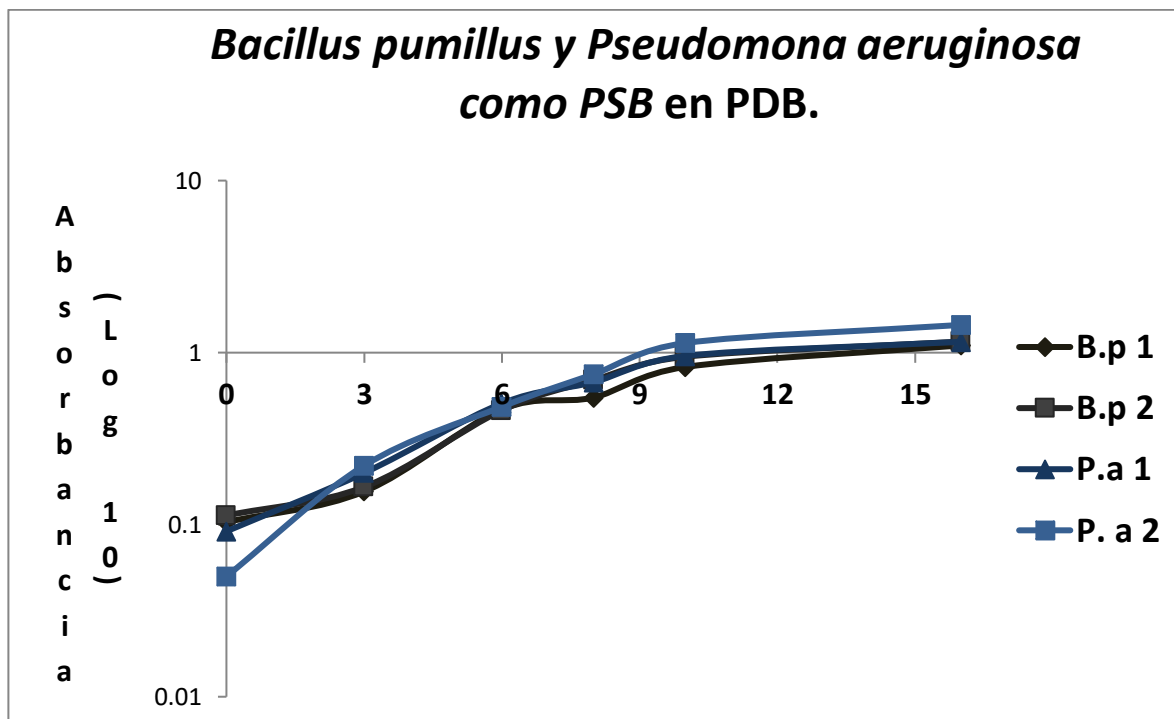


Figura 7. Cinética de crecimiento de bacterias solubilizadoras de fósforo en caldo de papa dextrosa.

El resultado para *B. pumillus* en PDB para la absorbancia de fosfatasa acida, alcalina, neutra y fitasa fue cercano al cero en comparación al resultado encontrado para *P. aeruginosa* se muestran los valores en la tabla 4.

Tabla 4. Comparación de *B. pumillus* y *P. aeruginosa* en absorbancia a 420 nm para fosfatasa acida, alcalina y neutra.

		9 hrs		
		PHOB	PHON	PHOA
<i>P. aeruginosa</i>	0,9625	0,7745	1,0335	
<i>B. pumillus</i>	0	0	0,0285	

De acuerdo con estos datos se continuo los sucesivos experimentos con *P. aeruginosa*, donde la unidad formadora de colonias (UFC) en PHY fue de 1×10^7 y la actividad enzimática de 0.113 U/mg proteína. La UFC *P. aeruginosa* en PDB fue de 1×10^8 y los valores de la actividad enzimática se presentan en la tabla 5

Tabla 5. Actividad Especifica de Enzimas Solubilizadoras de Fosfato de *P. aeruginosa* ATC15442 en PDB

Tipo de Enzima	Actividad Especifica (U/mg proteína)
Fosfatasa Alcalina	0.242
Fosfatasa Ácida	0.259
Fosfatasa Neutra	0.161
Fitasa	0.005

Los resultados obtenidos de *P. aeruginosa* ATC 15442 para fitasas en PHY y en PDB (0.113 U/ mg proteína, 0.005 U/mg proteína) bajo las condiciones experimentales fueron bajas comparadas con *P. aeruginosa* P6 con la cantidad de 31.88 U/mg proteína para enzima cruda reportada por Sasirekha et al. ,(2012) y Rocky-salimi et al.,(2016) maximizaron la actividad enzimática de fitasa de *B. subtilis* 46 al 137% obteniendo 4.627 U/ml. Se sugiere que nuestros datos difieren debido al método de enzima cruda que es diferente al método de actividad específica, donde el primero de obtiene al purificar la enzima y el segundo es el contenido de enzima entre el total de proteína.

Para el medio PDB se encontraron todas las enzimas solubilizadoras de fosfato, mientras que en otros estudios no se informa esta actividad completa. Behera et al., (2017) encontraron solo fosfatasa ácida en concentraciones de 76,8 U / ml para *Serratia sp.* aislada de un mangle, Ghorbanzadeh et al., (2020) encontraron fosfatasa alcalina en concentraciones de

aproximadamente 22 mg de PNP en gramos de suelo por hora para *Pseudomonas sp* combinado con cobertura vegetal.

Por último, Safari et al., (2020) informaron para fosfatasa a pH 6,5 de forma general en nanoportadores con *Pseudomonas* PK11, la combinación con nanoarcilla + alginato tuvo la mayor actividad de fosfatasa de 33 U / ml.

Los resultados de las investigaciones registradas de PSB informaron la presencia de una única fosfatasa en unidades enzimáticas, los resultados presentados en este estudio son más descriptivos en presencia de enzima en el medio de cultivo del contenido total de proteína. Este trabajo es uno de los primeros en reportar la presencia de todas las enzimas solubilizantes de fósforo, fosfatasas ácidas, neutras, alcalinas y fitasas. Se asume que el medio de cultivo activó los genes de modo que *Pseudomonas aeruginosa* ATC 15442 activó su metabolismo la exudación de todas las enzimas antes mencionadas.

6.2 Efecto de la adición de la mezcla de enzimas en composta madura.

6.2.1 Actividad Solubilizadora de Fosfato en composta madura.

Los resultados de la adición del cultivo de *P. aeruginosa* ATC 15442 en PDB, su fitasa, su cóctel enzimático solubilizante de fósforo en PDB y sus combinaciones en composta madura se muestran en la Fig. 8. Los resultados muestran una adición por cada tratamiento y su evaluación fue durante 24, 48 y 72 horas.

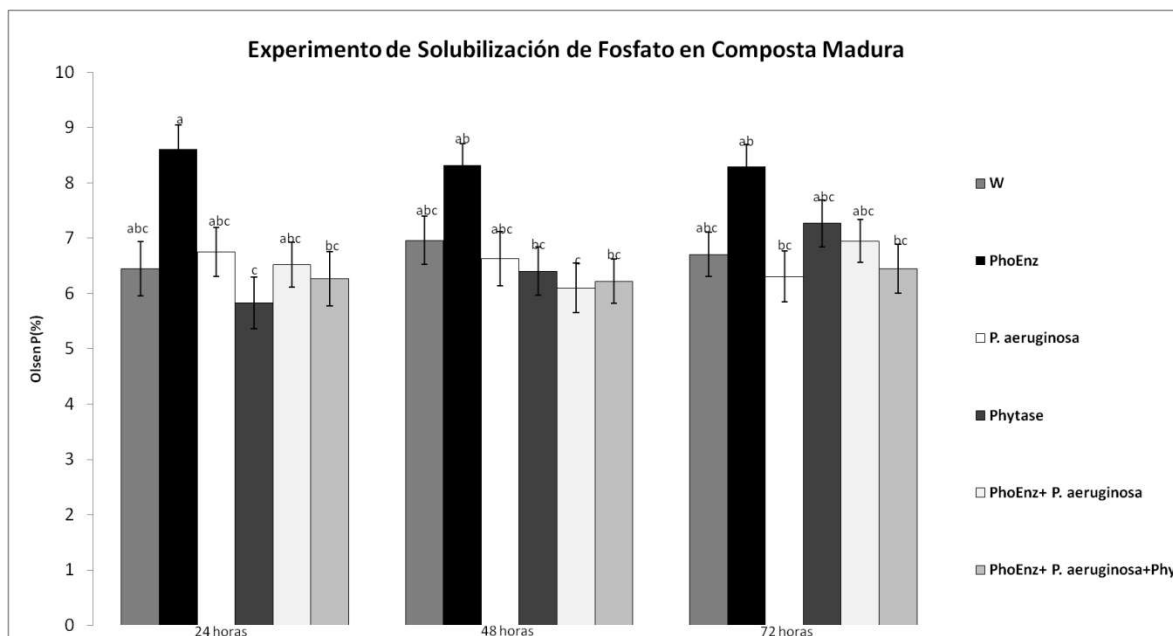


Figura 8. Conversión de Po a P Olsen en composta madura por el experimento de la solubilización de fósforo, con agua desionizada como control (W), fosfatasa ácida, alcalina y neutra y fitasa en PDB (PhoEnz), *P. aeruginosa* inoculada (*P. aeruginosa*), y enzima fitasa (Phy). Las Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas entre las medias de $p < 0.05$.

PhoEnz 24 aumentó P Olsen en 20% en la composta madura en comparación con todos los tratamientos, PhoEnz + *P. aeruginosa* y PhoEnz + *P. aeruginosa* + Phy no mostraron diferencias con W, lo que sugiere una interferencia entre PSB que consumió el fósforo liberado. Este resultado está respaldado por Phy 72 y todos los PhoEnz (24,48 y 72), que mostraron los porcentajes más altos de P Olsen. Este experimento según el marco de referencia es uno de los primeros experimentos reportados de la adición en comparación de PSB, enzima fitasa y el coctel enzimático, como sus combinaciones para el aumento de P inorgánico en composta madura de estiércol de vaca.

El análisis diacrónico sugiere sobre el aumento de P inorgánico en la composta se ha centrado en la inoculación con PSB o la adición de fertilizantes fosforados. En el primer caso, los resultados de la inoculación pueden variar debido a las diferentes composiciones de

los residuos utilizados como materia prima, que inducen diferentes actividades microbianas, además de la competencia entre los microorganismos endógenos y el PSB inoculado resultando en una actividad de PSB disminuida o nula, así como las variables abióticas que también afectan los resultados.

Nuestros resultados mostraron que el uso de enzimas para solubilizar el fósforo aumentó el P inorgánico en comparación con la inoculación de PSB. Estos resultados están de acuerdo con *Bacillus sp.* MQH-19 que produce fitasas y generó un incremento de 8-13% en P inorgánico en estiércol bovino (Zhao et al., 2016).

Por otra parte, existen reportes de la presencia inicial de enzimas y los cambios enzimáticos debido a la inoculación de PSB en el compost (Safari et al., 2020; Zhu et al., 2018). Wan et al., (2020) estudiaron los rangos de enzimas en el compostaje y al final encontraron una alta presencia de fosfatasa alcalina (4.7 a $12.07 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) y fitasa (12.78 a $44.48 \mu\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$), lo que respalda nuestros resultados debido a la actividad microbiana de la enzima que se había producido, por lo que PhoEnz actuó sobre el P_o residual, logrando un aumento del 20% de P inorgánico.

6.2.2 Incremento de la Actividad Solubilizadora de Fosfato en Composta Madura.

La liberación de P no fue proporcional a la adición de PhoEnz. PhoEnz al 40% mostró la mayor liberación de P Olsen, donde por ejemplo el incremento de PhoEnz provocó una caída de P Olsen, la hipótesis que se sugiere es que las altas concentraciones de enzimas solubilizadora de fosfato existía una inhibición no competitiva (Kamal et al., 1988) o pudo ser debido a un proceso de hormesis enzimático.

En este aspecto los tratamientos con PhoEnz inactivo (InacPho) no presentaron diferencia significativa entre ellos, pero la liberación de P Olsen fue más que en W, esto puede indicar que el medio de PDB por el tiempo de exposición a la temperatura para desnaturalizar la

enzima pudo liberar P Olsen, el cual se mantuvo constante en todos los incrementos de InacPho (Fig. 8).

La mayor liberación de P (PhoEnz 40%) fue de 12.55% y quedo una gran cantidad de Po retenido en la composta que representa el 87.45%, la mineralización que se desarrollo puede haber sido influenciada por el porcentaje enzimático aplicado, adicionalmente, el pH del sustrato pudo generar una inhibición de la acción enzimática (Li et al., 2015). Por otra parte, el Po residual pudo estar ligado aniones metálicos, donde la acción enzimática no tiene efecto (Web et al., 2018)

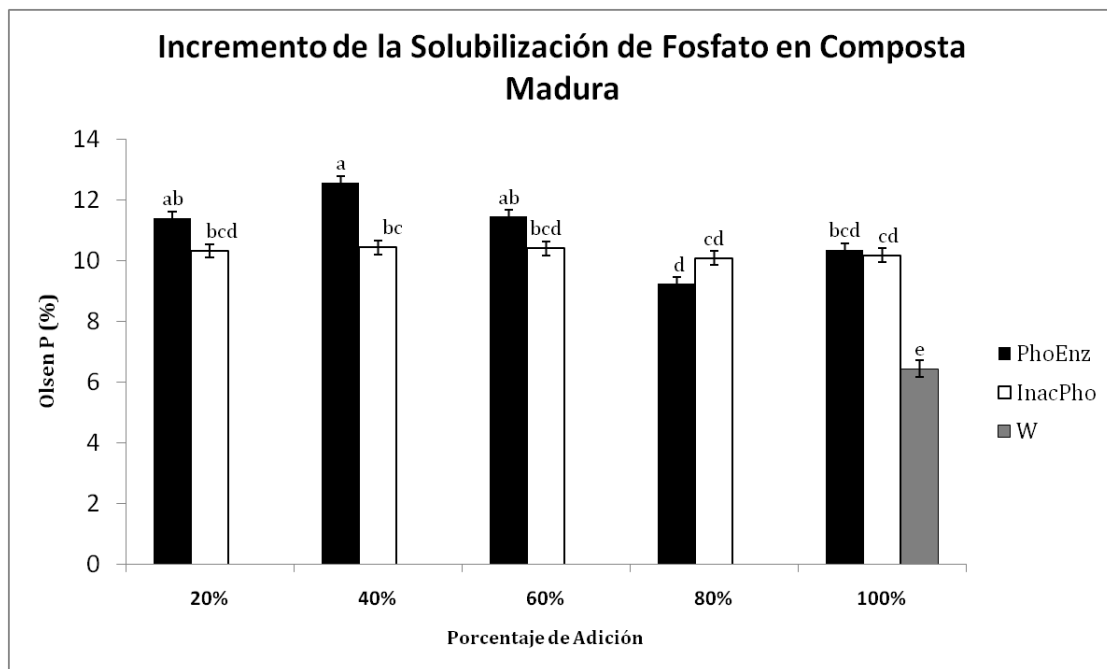


Figura 9. P Olsen liberado en Composta Madura por Enzimas, Control (W), Coctel Enzimático en PDB (PhoEnz) y Coctel Enzimático Inactivo en PDB (InacPho).

Este es uno de los primeros reportes de la adición de un cocktail enzimático para su acción sobre el Po presente en la composta madura, lo que revelo un incremento significativo en el Pi. El cocktail enzimático del cultivo de PSB, puede ser reproducido a mayor escala y no es

caro, por lo que se utilizó el medio PDB para su crecimiento. Esta metodología, de acuerdo con nuestros resultados tiene el potencial de incrementar el Pi en 60% más comparado con el compostaje tradicional, sin embargo, este fue en el proceso de postcompostaje y se requiere que la composta provenga principalmente de excretas animales que reciben alimento con una concentración mayor al 90% de Po (Siles et al., 2018).

6.3 Cultivo de pepino (*Cucumis sativus*) complementado en fósforo con composta tratada enzimáticamente.

6.3.1 Calidad del Fruta, Peso Seco, Contenido de Azúcar, Nitrógeno y Fósforo total.

La calidad del fruto de pepino se presentó tener mejor rendimiento a la fertilización completa (FC) durante toda la temporada de cosecha, del primer corte los tratamientos con Composta tradicional (CT) y Composta Tratada Enzimáticamente para la Solubilización del Fósforo (CE) no hubo diferencia significativa con FC, siendo de forma contraria después del primer corte donde el tratamiento que sustituyó a CE fue el tratamiento de la Composta con las Enzimas Desnaturalizadas para la Solubilización del Fósforo Total (CED) y en el último corte los grupos estadísticos de las compostas se mantuvieron siendo mayor el FC. Cabe señalar que el tratamiento de Fertilización Sin Fósforo en Sustrato de Perlita (FSP), su producción en pepinos fue decayendo hasta cero (Figura 10).

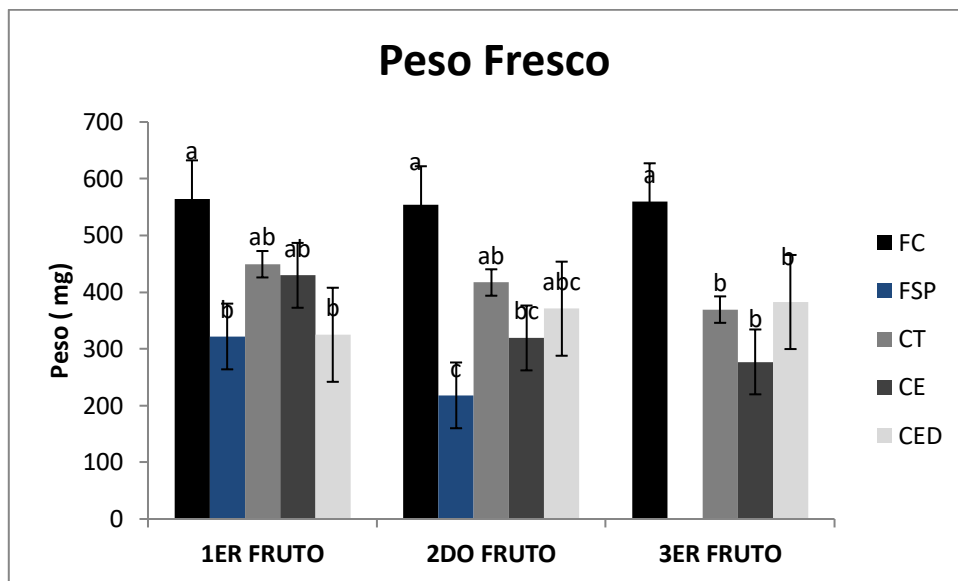


Figura 10. Peso Fresco de los frutos de pepino cultivados con fertilización completa (FC), fertilización sin fósforo (FSP), fertilización sin fósforo con: Composta tradicional (CT), Composta con coctel enzimático solubilizador de fósforo (CE) y Composta con enzimas solubilizadoras de fósforo desnaturalizadas (CED).

Varios expertos de producción en invernaderos indican que los fertilizantes más económicos y más utilizados son orgánicos y químicos para mantener o incrementar el rendimiento y la calidad del fruto (Alipour et al., 2021). Sin embargo, aunque se han realizado estudios detallados para determinar la cantidad y los métodos de suministración de nutrientes para el pepino en invernadero, no se ha encontrado registro de una evaluación en sustrato donde la única fuente de P sea a través de compostas tratadas con enzimas solubilizadoras de fósforo. En Lata et al., (2019) cultivo pepino en combinaciones tierra de jardín, fibra de coco y vermicomposta, la combinación con mayor peso de fruto fue la vermicomposta y tierra de jardín con un peso promedio de 189.5 g y en Singh et al., (2018) utilizo como complemento de fertilización la vermicomposta como enmienda orgánica y el mayor peso fresco del fruto de pepino fue de 161.5 g. La comparación del peso fresco del fruto de pepino se realiza de

acuerdo a la variedad cultivada datos no reportados en las referencias anteriores y nosotros obtuvimos el mayor peso fresco del fruto de 520 g en el tratamiento de fertilización completa FC.

Los frutos con mayor contenido de °Bx en semillas (4.3 %), contorno(4.2 %) y total (4.2%) fue la FC, pero no existiendo diferencia significativa en el contenido de los °Bx en las semillas, pero se observa que el tratamiento CED en contorno del fruto (3.8%) y total del fruto (3.6%) es del mismo grupo estadístico que FC (Fig. 11)

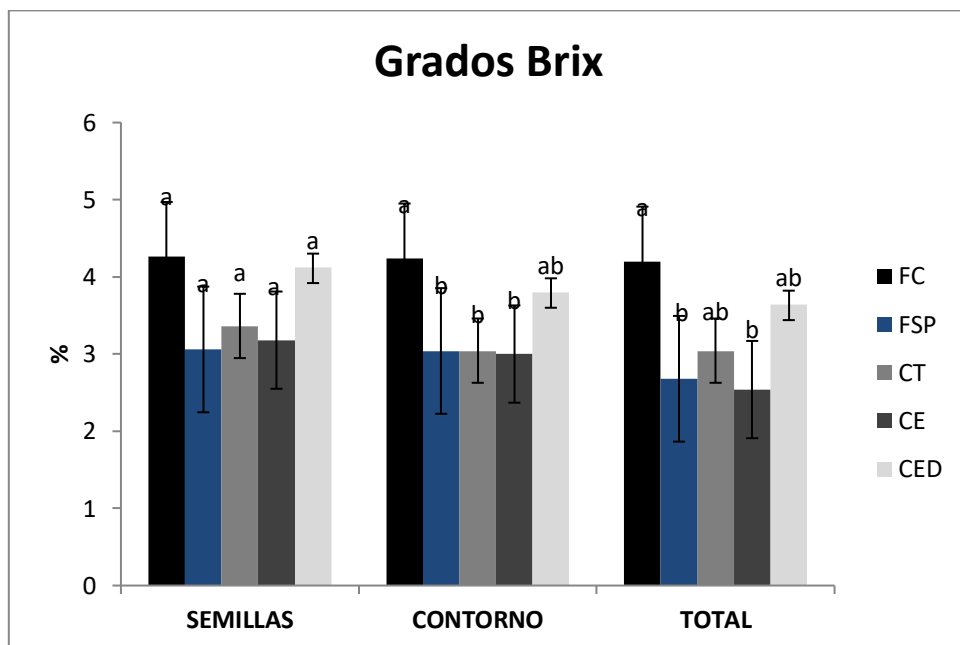


Figura 11. Grados Brix de los frutos de pepino cultivados con Fertilización Completa (FC), Fertilización Sin Fósforo (FSP), fertilización sin fósforo con: Composta Tradicional (CT), Composta con Coctel Enzimático Solubilizador de Fósforo (CE) y Composta con Enzimas Solubilizadoras de Fósforo Desnaturalizadas (CED).

Los grados Brix del fruto total en los tratamientos FSP, CT y CE, se compara con los rangos obtenidos en Lata et al., (2019) de 3.09 -3.02 ° Brix, el experimento con pepino consistió en fertilización en invernadero con combinaciones de sustratos de tierra de jardín,

vermicomposta y fibra de coco. Los azúcares en los frutos se incrementan cuando se disminuye la fertilización química. El jugo del pepino es un ingrediente utilizado en dietas adelgazantes y saludables debido a su alto contenido de vitaminas, fibra, minerales y antioxidantes (Henning et al., 2017).

El peso seco de los frutos de pepino en el primer corte no hubo diferencia significativa entre los tratamientos pero son los que obtuvieron mayor peso seco donde para FC 2.2% hasta para FSP de 1.5%. En el segundo corte no hubo diferencia significativa pero el valor promedio disminuyó para FC 1.4% y para FSP 1.6%, en el tercer corte el peso seco de FC fue de 1.4%, pero aquí FSP ya no tuvo frutos. En los tratamientos de fertilización complementaria para el fósforo por medio de las compostas en CT, CE y CED, a partir del primer corte hasta el tercer corte disminuyeron en el peso seco, no habiendo diferencia significativa entre ellos (Fig. 12).

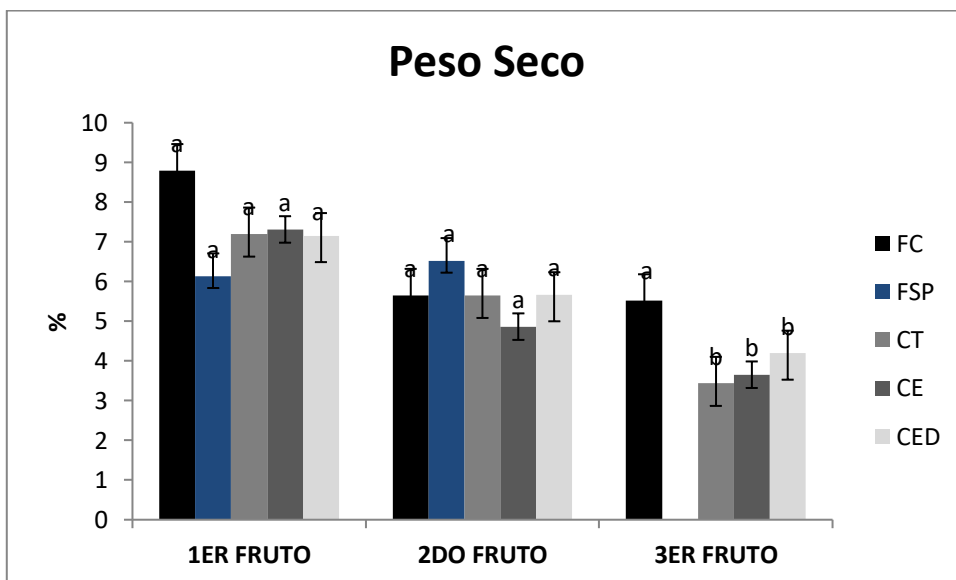


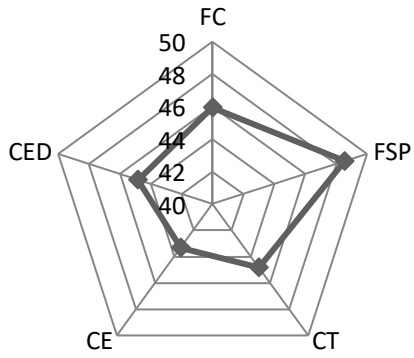
Figura 12. Peso seco de los frutos de pepino cultivados con fertilización completa (FC), fertilización sin Fósforo (FSP), fertilización sin Fósforo con: Composta tradicional

(CT), Composta con coctel enzimático solubilizador de Fósforo (CE) y Composta con enzimas solubilizadoras de Fósforo desnaturalizadas (CED).

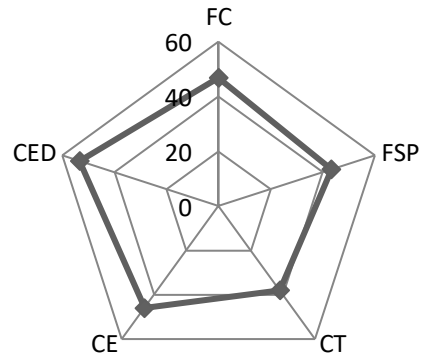
La comparación para el peso seco, solo se puede hacer en el tercer fruto donde existió diferencia significativa por la falta de fruto en FSP; haciendo un solo grupo estadístico a las compostas y la diferencia con FC. En Alipour et al., (2021), se realizó una fertilización incompleta de NPK complementada con una inoculación de *Pseudomonas putida* P3-57 en el cultivo de pepino y en los resultados de peso seco del fruto no encontraron diferencias significativa.

En la evaluación sensorial, para la aceptación general FSP fue el más aceptado, en sabor FSP, FC, CE, y CED tuvieron similitud para el panel. Cabe resaltar que para el panel FSP Jugosidad, Aroma, y Dulzor fue de los mejor evaluados pero en Apariencia fue el contrario. Los tratamientos de compostas en Aceptación General fueron bajos pero en Sabor, Aroma, Jugosidad, Dulzor y Apariencia se mantuvieron con evaluaciones constantes de un rango del 40-50 %.(Fig. 13)

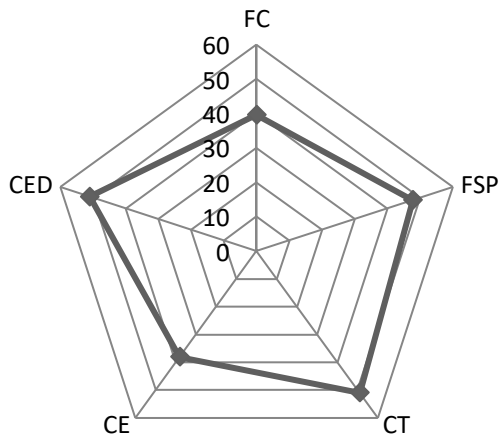
Aceptación General



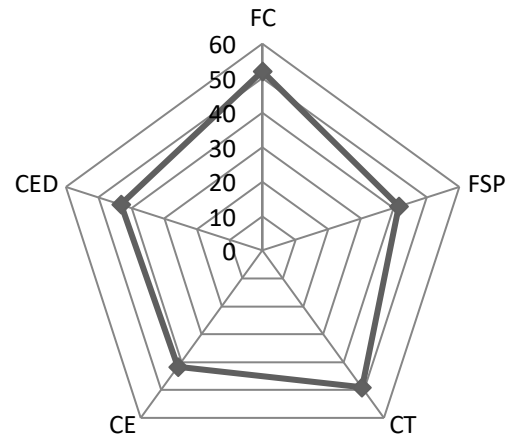
Sabor



Dulzor



Aroma



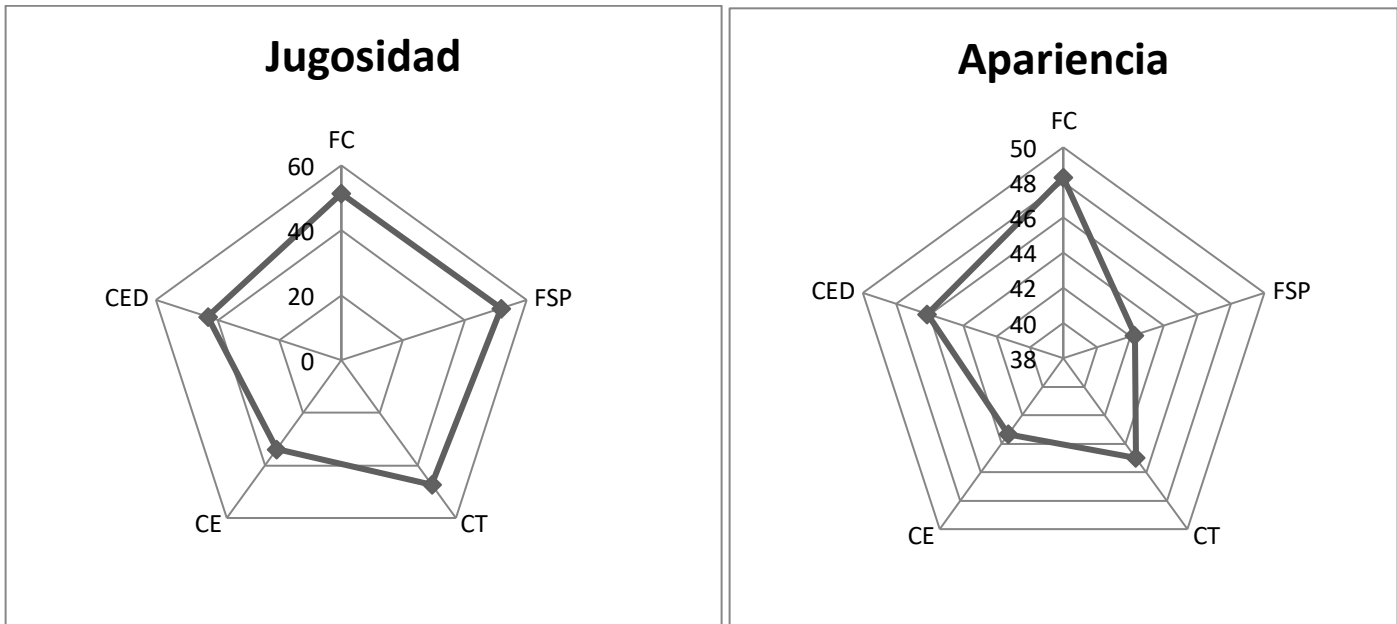


Figura 13. Diagrama de Radar refleja el efecto de los frutos de pepino cultivados con fertilización completa (FC), fertilización sin fósforo (FSP), fertilización sin fósforo con: Composta tradicional (CT), Composta con Coctel Enzimático Solubilizador de Fósforo (CE) y Composta con enzimas solubilizadoras de fósforo desnaturalizadas (CED).

Se ha demostrado por varios reportes que la adición de enmiendas orgánicas de estiércoles resultan en el incremento de la materia orgánica del sustrato o suelo, y a los diferentes efectos en la actividad macrobia que tiene influencia en el intercambio de nutrientes y la relación con la disponibilidad para la planta así como con su contenido presente en el fruto (Al et al., 2011). Esto nos sugiere como el modelo de utilizar las mismas materia prima de las compostas no se comportan de forma similar en los resultados de los frutos al adicionar las enzimas solubilizadoras naturalizadas o desnaturalizadas y en la posible composición bioquímica de CT, CE y CED. Basado en nuestra revisión de literatura no existen reportes del efecto de la fertilización sin fósforo complementado con composta en el cultivo de pepino en condiciones de invernadero.

6.2.3 Actividad enzimática.

Los frutos de pepino no tuvieron diferencia significativa en SOD y en CAT no hubo resultados significativos para poder representarlos, lo que sugiere que el no hubo reacción en el sistema inmune en el fruto del pepino con ningún tratamiento (Fig. 14-A). En la actividad PAL hubo diferencia estadística donde la mayor actividad enzimática fue en el tratamiento FSP de Fertilización sin Fósforo, lo que sugiere una necesidad de supervivencia en la planta generando nuevas células lo que sucedió ya que la planta sobrevivió y siguió creciendo pero deteniendo su producción conforme el tiempo de cultivo avanzó. En PAL los tratamientos FC y CT tuvieron una diferencia de FSP de 1.2 U/mg proteína, aproximadamente igual a lo encontrado en CED (Fig. 14-B).

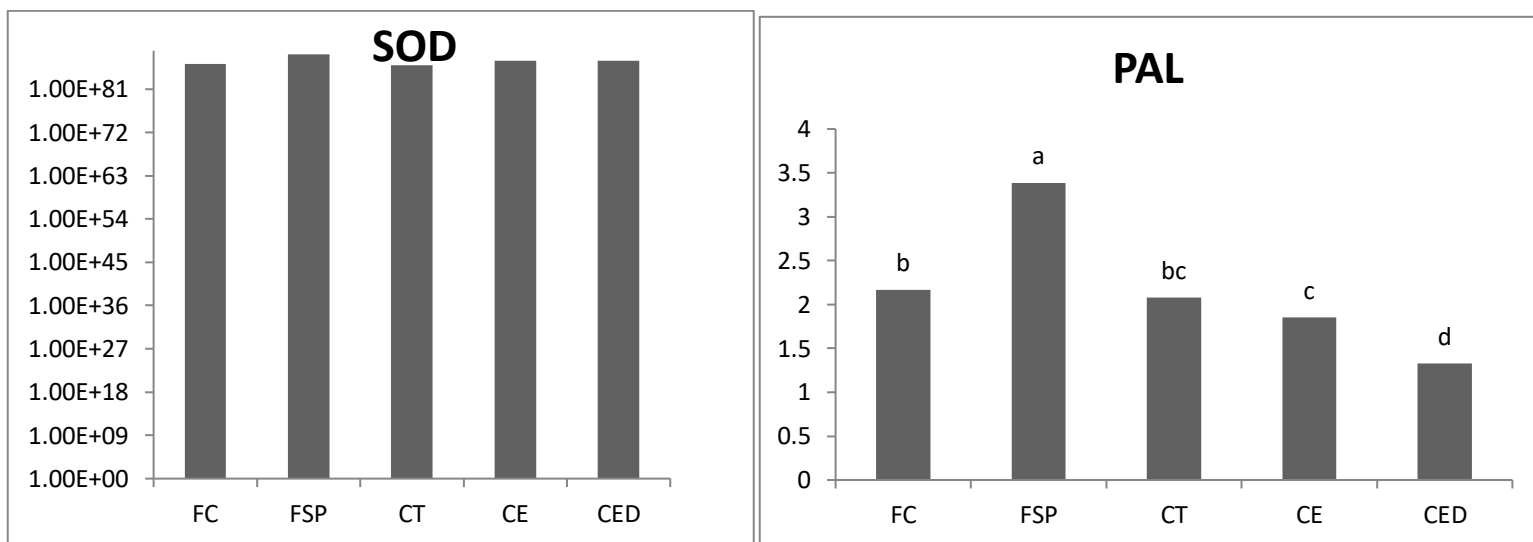


Figura 14. Actividad enzimática A) SOD y B) PAL de los frutos de de los frutos de pepino cultivados con fertilización completa (FC), fertilización sin fósforo (FSP), fertilización sin fósforo con: Composta tradicional (CT), Composta con Coctel Enzimático Solubilizador de Fósforo (CE) y Composta con enzimas solubilizadoras de fósforo desnaturalizadas (CED).

En el fruto de pepino (*Cucumis sativus* L.) se han evaluado diferentes estrategias de eustresores, siendo una de ellas el sumergimiento de frutos en oligosacáridos de quitosano (Ru et al., 2020), 6-Benzylaminopurina (Chen & Yang, 2013), ácido salicílico (Cao et al., 2009), ó óxido nítrico (Yang et al., 2011) obteniendo como resultado la supresión de oxidación de lípidos en membrana, incremento en la expresión de genes y actividad del sistema oxidativo (SOD, GR, APX, CAT), entre otras respuestas. Estos resultados sugieren una estrecha relación del sistema oxidativo en fruto con la tolerancia al frío y en el caso de la falta del nutriente de P se aumento la actividad PAL unicamente sugieirnod que la deficiencia activa diferentes rutas a las de oxidación, y así mediante la activación de varios mecanismos de respuesta a estrés

7. CONCLUSIÓN

Un análisis comparativo para lograr el incrementó del fósforo disponible para la agricultura presente en la composta madura, por la adición de un cocktail enzimático solubilizador de fosfatos aislado in vitro de una bacteria *Pseudomona aeruginosa*. *P. aeruginosa* presentó la exudación de la fosfatasa neutra, ácida, y alcalina y fitasas esto fue uno de los primeros reportes que encontraron estas presencias enzimáticas en un mismo medio de cultivo que se puede realizar de forma industrial el caldo de papa dextrosa. Este es el primer trabajo en su tipo de la adición de la mezcla enzimática en composta madura para incrementar el P disponible y con un resultado significativo así como de la presencia de la mezcla de enzimas en un medio de cultivo. Este trabajo permite utilizar la bacteria como solubilizadora, utilizar de forma in vitro las enzimas y abre una posibilidad para que el porcentaje que queda de la composta de P orgánico puede incrementarse por diferentes estrategias del uso de PSMS y estos en apoyar la fuentes renovables de P para los países que no cuentan con una reserva de P.

8.- REFERENCIAS

- Acevedo, E., Galindo-casta, T., Prada, F., Navia, M., & Romero, H. M. (2014). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq .) in Colombia, *80*, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.03.011>
- Al, O., Livieratos, I., Stamatakis, A., Tsirogiannis, I., Gizas, G., & Savvas, D. (2011). Scientia Horticulturae Hydraulic characteristics of composted pig manure , perlite , and mixtures of them , and their impact on cucumber grown on bags. *Scientia Horticulturae*, *129*(1), 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.023>
- Alavi, N., Daneshpajou, M., Shirmardi, M., Goudarzi, G., Neisi, A., & Babaei, A. A. (2017). Investigating the efficiency of co-composting and vermicomposting of vinasse with the mixture of cow manure wastes, bagasse, and natural zeolite. *Waste Management*, *69*, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.039>
- Alipour, S., Arabhosseini, S., Karimi, E., & Koobaz, P. (2021). Scientia Horticulturae Pseudomonas putida P3-57 induces cucumber (*Cucumis sativus* L .) defense responses and improves fruit quality characteristics under commercial greenhouse conditions. *Scientia Horticulturae*, *280*(December 2020), 109942. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109942>
- Azim, K., Soudi, B., Boukhari, S., Perissol, C., Roussos, S., & Thami Alami, I. (2018). Composting parameters and compost quality: a literature review. *Organic Agriculture*, *8*(2), 141–158. <https://doi.org/10.1007/s13165-017-0180-z>
- Behera, B. C., Yadav, H., Singh, S. K., Mishra, R. R., Sethi, B. K., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *15*(1), 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.003>
- Bernal, M. P., Albuquerque, J. A., & Moral, R. (2009). Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology*, *100*(22), 5444–5453. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2008.11.027>
- Cáceres, R., Malińska, K., & Marfà, O. (2018). Nitrification within composting: A review. *Waste Management*, *72*, 119–137. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2017.10.049>
- Cucumis, C., & Condition, P. (2019). Effect of Growing Media and Fertigation Schedules on Growth and Yield of Effect of Growing Media and Fertigation Schedules on Growth and Yield of Cucumber (*Cucumis sativus* L .) under Polyhouse Condition, (December). <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.712.173>
- Donohoe, K. (2018). Chemical and microbial characteristics of vermicompost leachate and

their effect on plant growth, 287.

- Duan, Y., Kumar, S., Liu, T., & Zhang, Z. (2019). Bioresource Technology Evaluation of integrated biochar with bacterial consortium on gaseous emissions mitigation and nutrients sequestration during pig manure composting. *Bioresource Technology*, 291(June), 121880. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121880>
- Félix-Herrán, J. A., Serrato-Flores, R., Armenta-Bojorquez, A. D., Rodríguez-Quiroz, G., Martínez-Ruiz, R., Azpiroz-Rivero, H. S., & Olalde-Portugal, V. (2010). Propiedades Microbiológicas De Compostas Maduras Producidas a Partir De Diferente Materia Orgánica. *Ra Ximhai*, 6(1), 105–113.
- Feng, C., Zeng, G., Huang, D., Hu, S., Zhao, M., Lai, C., ... Li, N. (2011). Effect of ligninolytic enzymes on lignin degradation and carbon utilization during lignocellulosic waste composting. *Process Biochemistry*, 46(7), 1515–1520. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.038>
- Fernández-Delgado Juárez, M., Prähauser, B., Walter, A., Insam, H., & Franke-Whittle, I. H. (2015). Co-composting of biowaste and wood ash, influence on a microbially driven-process. *Waste Management*, 46, 155–164. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2015.09.015>
- Frossard, E., Achat, D. L., Bernasconi, S. M., Fardeau, J., Jansa, J., Morel, C., ... Oberson, A. (2011). *The Use of Tracers to Investigate Phosphate Cycling in Soil – Plant Systems*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9>
- González-Fernández, J. J., Galea, Z., Álvarez, J. M., Hormaza, J. I., & López, R. (2015). Evaluation of composition and performance of composts derived from guacamole production residues. *Journal of Environmental Management*, 147, 132–139. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2014.09.016>
- Henning, S. M., Yang, J., Shao, P., Lee, R., Huang, J., Ly, A., ... Li, Z. (2017). Health benefit of vegetable / fruit juice-based diet: Role of microbiome, (April), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02200-6>
- Insam, H. (2007). Chapter 3 Microbiology of the composting process. *Waste Management Series*, 8, 25–48. [https://doi.org/10.1016/S1478-7482\(07\)80006-6](https://doi.org/10.1016/S1478-7482(07)80006-6)
- Kalemelawa, F., Nishihara, E., Endo, T., Ahmad, Z., Yeasmin, R., Tenywa, M. M., & Yamamoto, S. (2012). An evaluation of aerobic and anaerobic composting of banana peels treated with different inoculums for soil nutrient replenishment. *Bioresource Technology*, 126, 375–382. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.04.030>
- Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Naqvi, S. M. S., & Rasheed, M. (2009). Phosphorus Solubilizing Bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production.

Journal of Agricultural and Biological Science, 1(1), 48–58.
<https://doi.org/10.5923/j.re.20120201.10>

- Li, Zhaolei, Cui, J., Mi, Z., Tian, D., Wang, J., Ma, Z., ... Niu, S. (2019). Science of the Total Environment Responses of soil enzymatic activities to transgenic *Bacillus thuringiensis* (Bt) crops - A global meta-analysis. *Science of the Total Environment*, 651, 1830–1838. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.073>
- Li, Zhentong, Lu, H., Ren, L., & He, L. (2013). Experimental and modeling approaches for food waste composting: A review. *Chemosphere*, 93(7), 1247–1257. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2013.06.064>
- López-gonzález, J. A., Vargas-garcía, M. C., López, M. J., Suárez-estrella, F., Jurado, M., & Moreno, J. (2015). Bioresource Technology Biodiversity and succession of mycobiota associated to agricultural lignocellulosic waste-based composting, 187, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.124>
- Mander, C., Wakelin, S., Young, S., Condron, L., & O’Callaghan, M. (2012). Incidence and diversity of phosphate-solubilising bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 44(1), 93–101. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2011.09.009>
- Martínez-Blanco, J., Lazcano, C., Christensen, T. H., Muñoz, P., Rieradevall, J., Møller, J., ... Boldrin, A. (2013). Compost benefits for agriculture evaluated by life cycle assessment. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(4), 721–732. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0148-7>
- Menezes-blackburn, D. (2013). Critical Reviews in Environmental Science and Technology Phytases and Phytase-Labile Organic Phosphorus in Manures and Soils, (September), 37–41. <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.627019>
- Mlaik, N., Khoufi, S., Hamza, M., Ali, M., & Sayadi, S. (2019). Biomass and Bioenergy Enzymatic pre-hydrolysis of organic fraction of municipal solid waste to enhance anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy*, 127(July), 105286. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105286>
- Nash, D. M., Haygarth, P. M., Turner, B. L., Condron, L. M., McDowell, R. W., Richardson, A. E., ... Heaven, M. W. (2014). Using organic phosphorus to sustain pasture productivity: A perspective. *Geoderma*, 221–222, 11–19. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2013.12.004>
- Neevel, H., Reissland, B., Scheper, K., & Fleischer, S. (2007). Calcium - Phytate Treatment Agent, 1–6.
- Owen, D., Williams, A. P., Griffith, G. W., & Withers, P. J. A. (2015). Use of commercial

- bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology*, 86, 41–54. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2014.09.012>
- Pergola, M., Persiani, A., Palese, A. M., Di Meo, V., Pastore, V., D'Adamo, C., & Celano, G. (2018). Composting: The way for a sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, 123, 744–750. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2017.10.016>
- Phutela, U. G., & Sahni, N. (2013). Microscopic Structural Changes in Paddy Straw Pretreated with *Trichoderma reesei* MTCC 164 and *Coriolus versicolor* MTCC 138. *Indian Journal of Microbiology*, 53(2), 227–231. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0321-8>
- Rawoteea, S. A., Mudhoo, A., & Kumar, S. (2017). Co-composting of vegetable wastes and carton: Effect of carton composition and parameter variations. *Bioresource Technology*, 227, 171–178. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.12.019>
- Rocky-salimi, K., Hashemi, M., & Safari, M. (2016). A novel phytase characterized by thermostability and high pH tolerance from rice phyllosphere isolated *Bacillus subtilis* B . S . 46. *Journal of Advanced Research*, 7(3), 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2016.02.003>
- Rouphael, Y., Kyriacou, M. C., Petropoulos, S. A., Pascale, S. De, & Colla, G. (2018). *Scientia Horticulturae* Improving vegetable quality in controlled environments. *Scientia Horticulturae*, 234(October 2017), 275–289. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.033>
- Safari, M., Motamedi, E., Kari, H., Ali, S., & Modarres, M. (2020). Heliyon Nano-carriers effects on the viability and efficiency of *Pseudomonas* strains as phosphate solubilizing bacteria. *Heliyon*, 6(September), e05076. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05076>
- Sánchez, Ó. J., Ospina, D. A., & Montoya, S. (2017a). Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste Management*, 69(26), 136–153. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.08.012>
- Sánchez, Ó. J., Ospina, D. A., & Montoya, S. (2017b). Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste Management*, 69(26), 136–153. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.08.012>
- Sasirekha, B., Bedashree, T., & Kl, C. (2012). Optimization and partial purification of extracellular phytase from *Pseudomonas aeruginosa* p6, 2(1), 95–104.
- Shahid, M., & Hameed, S. (2012). Root colonization and growth promotion of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by phosphate solubilizing *Enterobacter* sp . Fs-11, 2749–2758.

<https://doi.org/10.1007/s11274-012-1086-2>

- Singh, J., Singh, M. K., Kumar, M., & Kumar, V. (2018). Effect of integrated nutrient management on growth , flowering and yield attributes of cucumber (*Cucumis sativus* L .), (July).
- Stutter, M. I., Shand, C. A., George, T. S., Blackwell, M. S. A., Bol, R., MacKay, R. L., ... Haygarth, P. M. (2012). Recovering phosphorus from soil: A root solution? *Environmental Science and Technology*, 46(4), 1977–1978. <https://doi.org/10.1021/es2044745>
- Teng, Z., Zhu, J., Shao, W., Zhang, K., Li, M., & Whelan, M. J. (2020). Increasing plant availability of legacy phosphorus in calcareous soils using some phosphorus activators. *Journal of Environmental Management*, 256(December 2019), 109952. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109952>
- Turner, B. L., & Engelbrecht, B. M. J. (2011). Soil organic phosphorus in lowland tropical rain forests. *Biogeochemistry*, 103(1), 297–315. <https://doi.org/10.1007/s10533-010-9466-x>
- Vélez, C., Pinedo, C., Viramontes, O., Ortega, C., & Melgoza, A. (2008). Bio-tecnologías ambientales para el tratamiento de residuos ganaderos. *Creatividad y Desarrollo Tecnológico, II*(2), 131–144.
- Wan, W., Wang, Y., Tan, J., Qin, Y., Zuo, W., Wu, H., & He, H. (2020). Bioresource Technology Alkaline phosphatase-harboring bacterial community and multiple enzyme activity contribute to phosphorus transformation during vegetable waste and chicken manure composting. *Bioresource Technology*, 297(November 2019), 122406. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122406>
- Wang, K., He, C., You, S., Liu, W., Wang, W., Zhang, R., ... Ren, N. (2015). Transformation of organic matters in animal wastes during composting. *Journal of Hazardous Materials*, 300, 745–753. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.08.016>
- Wei, Y., Wei, Z., Cao, Z., Zhao, Y., Zhao, X., Lu, Q., ... Zhang, X. (2016). A regulating method for the distribution of phosphorus fractions based on environmental parameters related to the key phosphate-solubilizing bacteria during composting. *Bioresource Technology*, 211, 610–617. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.03.141>
- Wei, Y., Zhao, Y., Shi, M., Cao, Z., Lu, Q., Yang, T., ... Wei, Z. (2018). Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Bioresource Technology*, 247, 190–199. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.09.092>

- Williams, A., & Hedlund, K. (2013). Indicators of soil ecosystem services in conventional and organic arable fields along a gradient of landscape heterogeneity in southern Sweden. *Applied Soil Ecology*, *65*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2012.12.019>
- Yu, H., Ding, W., Luo, J., & Geng, R. (2012). Effects of long-term compost and fertilizer application on stability of aggregate-associated organic carbon in an intensively cultivated sandy loam soil, 325–336. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0629-2>
- Zhou, Y., & Selvam, A. (2014). Evaluation of humic substances during co-composting of food waste, sawdust and Chinese medicinal herbal residues. *Bioresource Technology*, *168*, 229–234. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.05.070>
- Zhu, J., Li, M., & Whelan, M. (2018). Phosphorus activators contribute to legacy phosphorus availability in agricultural soils: A review. *Science of the Total Environment*, *612*, 522–537. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.095>
- Zhu, L., Yang, H., Zhao, Y., Kang, K., Liu, Y., He, P., & Wu, Z. (2019). Bioresource Technology Biochar combined with montmorillonite amendments increase bioavailable organic nitrogen and reduce nitrogen loss during composting. *Bioresource Technology*, *294*(October), 122224. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122224>