



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

**INFORME DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO AMBIENTAL**

MECANISMO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

**EVALUACIÓN DE *Bacillus* sp ANTÁRTICOS EN LA
DEGRADACIÓN DE CELULOSA**

AUTORES:

MERA LOOR ANTONY ELIAN

VALVERDE ZAPATA KATHIUSCA CARLOTA

TUTORA:

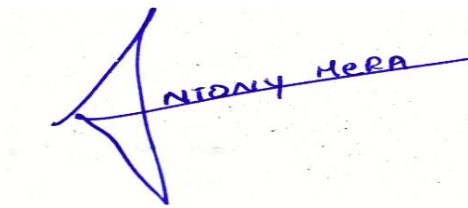
BLGA. MARÍA FERNANDA PINCAY CANTOS, MG.

CALCETA, JULIO 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Mera Loor Antony Elian, con cédula de ciudadanía **131654732-0** y **Valverde Zapata Kathiusca Carlota** con cédula de ciudadanía **095201647-5**, declaramos bajo juramento que el Trabajo de Integración Curricular titulado: **EVALUACIÓN DE *Bacillus* sp ANTÁRTICOS EN LA DEGRADACIÓN DE CELULOSA** es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, concedemos a favor de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, conservando a nuestro favor todos los derechos patrimoniales de autor sobre la obra, en conformidad con el Artículo 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación.

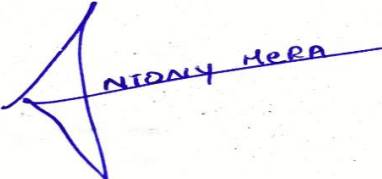


MERA LOOR ANTONY ELIAN
CC: 1316547320-0

VALVERDE ZAPATA KATHIUSCA CARLOTA
CC: 095201647-5

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Mera Loor Antony Elian con cédula de ciudadanía **131654732-0** y **Valverde Zapata Kathiusca Carlota** con cédula de ciudadanía **095201647-5**, autorizamos a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, la publicación en la biblioteca de la institución del Trabajo de Integración Curricular titulado: **EVALUACIÓN DE *Bacillus* sp ANTÁRTICOS EN LA DEGRADACIÓN DE CELULOSA**, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra exclusiva responsabilidad y total autoría.



ANTONY MERA



Kathiusca Valverde

MERA LOOR ANTONY ELIAN
CC: 1316547320-0

VALVERDE ZAPATA KATHIUSCA CARLOTA
CC: 095201647-5

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

BLGA. MARÍA FERNANDA PINCAY CANTOS, certifico haber tutelado el Trabajo de Integración Curricular titulado: **EVALUACIÓN DE *Bacillus* sp ANTÁRTICOS EN LA DEGRADACIÓN DE CELULOSA**, que ha sido desarrollado por **MERA LOOR ANTONY ELIAN** y **VALVERDE ZAPATA KATHIUSCA CARLOTA**, previo a la obtención del título de **INGENIERO AMBIENTAL**, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

BLGA. MARÍA FERNANDA PINCAY CANTOS, MG.
C.C.: 092175728-2
TUTORA

CERTIFICACIÓN DEL COORDINADOR DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Yo, Ángel Monserrate Guzmán Cedeño, Coordinador del Grupo de investigación Producción de Insumos Biológicos (PROINBIO), certifico que las estudiantes: **MERA LOOR ANTONY ELIAN** y **VALVERDE ZAPATA KATHIUSCA CARLOTA**, realizaron su Trabajo de Integración Curricular titulado: **“EVALUACIÓN DE *Bacillus* sp ANTÁRTICOS EN LA DEGRADACIÓN DE CELULOSA”**, previo a la obtención del título de **INGENIERO AMBIENTAL**. Este trabajo se ejecutó como parte de una actividad del programa de investigación titulado **“PROGRAMA DE VALIDACIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES AUTÓCTONOS EN SISTEMAS AGROPECUARIOS, AGROINDUSTRIALES Y AMBIENTALES”**, registrado en la Secretaría Nacional de Planificación con **CUP 91880000.0000.383757**.

**PH D. ÁNGEL MONSERRATE GUZMÁN
CEDEÑO COORDINADOR DEL GI-PROINBIO
CC: 1202260038**

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del Tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el Trabajo de Integración Curricular titulado: **EVALUACIÓN DE *Bacillus sp* ANTÁRTICOS EN LA DEGRADACIÓN DE CELULOSA**, que ha sido desarrollado por **MERA LOOR ANTONY ELIAN** y **VALVERDE ZAPATA KATHIUSCA CARLOTA**, previo a la obtención del título de Ingeniero Ambiental, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

**ING. VERÓNICA MONSERRATE
VERA VILLAMIL
CC: 131020148-6
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

**MG. CARLOS ANDREE
VILLAFUERTE VÉLEZ
CC: 130760554-1
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**PhD. SILVIA L.
MONTERO CEDEÑO
CC: 130535805-1
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que nos dio la oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad y en la cual hemos forjado nuestros conocimientos profesionales día a día; a todos los docentes que fueron nuestros formadores, personas con muchas sabidurías quienes compartieron sus conocimientos y habilidades.

A nuestra estimada Blga. María Fernanda Pincay Cantos por su gran corazón, por su predisposición, paciencia, amabilidad y la confianza que depositó en nosotros. La misma que nos dirigió en nuestro trabajo de investigación, revisando nuestros avances preliminares y aportando con sus conocimientos para nuestras futuras mejoras.

Al Dr. José Ormaza, Ing. Diego Zambrano e Ing. Diana Andrade, por su predisposición, conocimientos y habilidades que nos compartieron durante el desarrollo experimental de nuestra investigación.

Finalmente, pero no menos importante a nuestros amigos por su entusiasmo y consejos que nos brindaron durante el transcurso de nuestra etapa universitaria.

LOS AUTORES

DEDICATORIA

Agradezco de manera especial a Dios por haberme dado la vida, por la sabiduría, fortaleza, paciencia y guiarme durante todo este proceso que fue de constante sacrificio para obtener uno de los anhelos que tanto soñamos.

A mis seres queridos que fueron unos de los pilares fundamentales de este camino, los mismos que con sus consejos, motivaciones, amor, cariño, apoyo emocional y económico aportaron para la consecución de nuestra formación profesional.

La presente tesis se la dedico a mi padre el Sr. Lizandro Antonio Mera Loor, a mi madre la Sra. Manuela Antonia Loor de la Cruz, y a mi hermana Fiana por haber sido el pilar fundamental en este recorrido, ya que ellos estuvieron a mi lado en los momentos más difíciles, brindándome su apoyo incondicional para ser una mejor persona ya que ellos no hubiera sido posible alcanzar este gran objetivo. A mis amigos y compañeros que estuvieron presente en este largo trayecto los cuales me brindaron su apoyo incondicional y me ayudaron a potenciar mis habilidades.

MERA LOOR ANTONY ELIAN

DEDICATORIA

Dedico con todo amor y cariño principalmente a Dios por darme salud, sabiduría, paciencia y amor a mi carrera, a mi madre porque fue el principal cimiento para mi formación profesional y sembrar en mí que el estudio es fundamental en la vida, a mis hermanos, sobrinos y cuñado quienes con sus palabras de alientos me impulsaron para que siempre sea perseverante y cumpla mis ideales, a mi pareja por su esfuerzo, sacrificio y siempre brindarme su comprensión, confianza, cariño y amor los mismos que me impulsaron a no rendirme, a mi suegro por siempre aconsejarme y transmitirme esa valentía para lograr todo lo que me proponga, a mis amigos presentes y pasados que me demostraron su aprecio y brindaron ánimo durante este proceso, y a todas aquellas personas que en estos cinco años estuvieron a mi lado apoyándome de una u otra manera.

VALVERDE ZAPATA KATHIUSCA CARLOTA

CONTENIDO GENERAL

DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN.....	iii
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR.....	iv
CERTIFICACIÓN DEL COORDINADOR DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN.....	v
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
DEDICATORIA.....	viii
DEDICATORIA.....	ix
CONTENIDO GENERAL.....	x
CONTENIDO DE TABLA.....	xii
CONTENIDO DE GRÁFICO.....	xiii
CONTENIDO DE FIGURAS.....	xiii
CONTENIDO DE FÓRMULAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
PALABRAS CLAVE.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
KEY WORDS.....	xv
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3. OBJETIVOS.....	4
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.4. HIPÓTESIS.....	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. SUELOS AGRÍCOLAS.....	5
2.1.1. RESIDUOS AGRÍCOLAS.....	5

2.1.2. IMPACTOS AMBIENTALES DE LOS RESIDUOS AGRÍCOLAS.....	5
2.2. BIOMASA.....	6
2.2.1. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	6
2.2.2. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS ENZIMAS ACTIVAS SOBRE BIOMASA.....	10
2.3. MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS.....	11
2.3.1. DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS.....	11
2.3.2. MECANISMOS MICROBIANOS DE BIOCONVERSIÓN DE BIOMASA.....	12
2.4. BACTERIA <i>BACILLUS</i>	12
2.4.1. CARACTERIZACIÓN DE <i>Bacillus</i> sp.....	13
2.4.2. DEGRADACIÓN DE CELULOSA CON <i>Bacillus</i> sp.....	14
2.4.3. EXPERIENCIAS DE <i>Bacillus</i> sp EN LA ANTÁRTICA.....	14
CAPÍTULO III. DISEÑO METODOLÓGICO.....	15
3.1. UBICACIÓN.....	15
3.2. DURACIÓN.....	15
3.3. TIPOS DE INVESTIGACIÓN.....	15
3.3.1. MÉTODOS.....	16
3.3.2. TÉCNICAS.....	16
3.4. UNIDAD EXPERIMENTAL.....	17
3.5. VARIABLES A MEDIR.....	17
3.5.1. VARIABLE DEPENDIENTE.....	17
3.5.2. VARIABLE INDEPENDIENTE.....	17
3.6. PROCEDIMIENTO.....	18
FASE I. BIOTRANSFORMAR CELULOSA POR MEDIO DE BACTERIAS (<i>Bacillus</i> sp) ANTÁRTICOS PARA LA VALORACIÓN DE EFICIENCIA DE MICROORGANISMOS.....	18

FASE II. CALCULAR EL PARÁMETRO CINÉTICO CON RESPECTO AL CRECIMIENTO BACTERIANO DEL PROCESO DE DEGRADACIÓN DE CELULOSA.....	19
FASE III. OBTENER CONSORCIOS MICROBIANOS CELULOLÍTICOS PARA LA DEGRADACIÓN RESULTANTE DE RESIDUOS AGRÍCOLAS.....	20
3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	21
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	22
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
FASE I. BIOTRANSFORMAR CELULOSA POR MEDIO DE BACTERIAS (<i>Bacillus</i> sp) ANTÁRTICOS PARA LA VALORACIÓN DE EFICIENCIA DE MICROORGANISMOS.....	23
FASE II. CALCULAR EL PARÁMETRO CINÉTICO CON RESPECTO AL CRECIMIENTO BACTERIANO DEL PROCESO DE DEGRADACIÓN DE CELULOSA.....	26
FASE III. OBTENCIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS CELULOLÍTICOS PARA LA DEGRADACIÓN RESULTANTE DE RESIDUOS AGRÍCOLAS....	30
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	37
5.1. CONCLUSIONES.....	37
5.2. RECOMENDACIONES.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39
ANEXOS.....	54

CONTENIDO DE TABLA

Tabla 3.1. Cepas (tratamientos).....	21
Tabla 3. 2. Formato de análisis de la varianza - Diseño Completamente al Azar (DCA).....	22
Tabla 4.1. Características microscópicas.....	24
Tabla 4.2. Resumen del análisis de varianza (ANOVA).....	33
Tabla 4.3. Test Tukey $\alpha = (0,05)$ DMS= 5,1246 Error: 5,5083 gl: 15.....	35

CONTENIDO DE GRÁFICO

Gráfica 4.1. Medias de halos de degradación de celulosa en 72 horas.....	25
Gráfica 4.2. Tasa de crecimiento bacteriano con relación al tiempo experimental	28
Gráfica 4.3. Porcentaje de eficiencia en los diferentes tratamientos utilizando cepas de <i>Bacillus</i> sp	29
Gráfica 4.4. Medias comparativas entre degradación de almidón y pectina.....	31

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 3. 1. Laboratorio de Biología Molecular ESPAM MFL.....	6
Figura 4.1. Morfología de <i>Bacillus</i> sp; T-13, T-21, T-29, DEE-71, GA-52.....	23

CONTENIDO DE FÓRMULAS

Ecuación 3. 1. Tasa de crecimiento.....	19
Ecuación 3. 2. Determinación de crecimiento.....	20
Ecuación 3. 3. Eficiencia de tratamientos.....	20

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la degradación de la celulosa mediante la aplicación de cepas (*Bacillus* sp) aisladas en la Antártida. Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) unifactorial, que incluyó cinco tratamientos (cepas) y un control, con 24 unidades experimentales para cada uno de los tres periodos, cada uno con una duración de 72 horas. Las cepas aisladas se cultivaron en medio de agar nutriente y posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 horas en ausencia de luz. La evaluación de la degradación se realizó midiendo el halo de degradación en un medio enriquecido, a una temperatura ambiente de 37°C durante 72 horas. Se empleó el método de rojo Congo para evaluar la degradación de la carboximetilcelulosa. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico de varianza (ANOVA) y se aplicó la prueba de Tukey. Los resultados mostraron que la cepa T-29 mantuvo una eficiencia de degradación de celulosa del 86,4%, seguida por la cepa GA-52 con un valor del 81,9%, y la cepa DEE-71 con un 77,5%. Por otro lado, los tratamientos T-21 y T-13 mostraron porcentajes de degradación del 75,5% y 57,1%, respectivamente. Se observó que las cepas T-29 y GA-52 mostraron un mayor índice de degradación cuando se combinaron, en comparación con las demás cepas estudiadas. En conclusión, estas dos cepas demostraron un mayor potencial de degradación enzimática cuando se utilizaron juntas, lo que sugiere que podrían tener un efecto sinérgico en el proceso de degradación de celulosa.

PALABRAS CLAVE

Biodegradación, microorganismo, tratamientos, bacterias, carboximetilcelulosa, microorganismos extremófilos.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the degradation of cellulose by applying strains (*Bacillus* sp) isolated in Antarctica. A unifactorial Completely Randomized Design (RCD) experimental design was used, which included five treatments (strains) and a control, with 24 experimental units for each of the three time periods, each lasting 72 hours. The isolated strains were grown on nutrient agar medium and subsequently incubated at 37°C for 24 hours in the absence of light. The evaluation of degradation was carried out by measuring the degradation zone in an enriched medium, at an ambient temperature of 37°C for 72 hours. The Congo red method was used to evaluate the degradation of carboxymethylcellulose. The data obtained were subjected to statistical analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test was applied. The results showed that the T-29 strain maintained a cellulose degradation efficiency of 86.4%, followed by the GA-52 strain with a value of 81.9%, and the DEE-71 strain with 77.5%. On the other hand, treatments T-21 and T-13 showed degradation percentages of 75.5% and 57.1%, respectively. It was observed that strains T-29 and GA-52 showed a higher degradation rate when combined, compared to the other strains studied. In conclusion, these two strains demonstrated greater enzymatic degradation potential when used together, suggesting that they could have a synergistic effect on the cellulose degradation process.

KEYWORDS

Biodegradation, microorganism, treatments, bacteria, carboxymethylcellulose, extremophilic microorganisms.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La incineración de los residuos de cultivos en el campo es una práctica que ha incidido de manera negativa en el deterioro de la calidad del aire, smog, olas de calor y diferentes problemas de salud en la población mundial. Esta se ha convertido en una problemática importante para los esfuerzos de mitigación del cambio climático a nivel mundial (Haseeb et al., 2022). La quema de los residuos de algodón, maíz, arroz, trigo a nivel mundial genera la emisión de gases contaminantes en el aire como monóxido de carbono, metano, dióxido de carbono y carbono elemental las cuales generan afectaciones en la salud y contribuyen al cambio climático (De La Rosa et al., 2018).

En América Latina la incineración de la biomasa de los residuos procedentes de la agricultura ha generado grandes afectaciones a causa de las columnas de humo que se han desplazado grandes distancias perjudicando a entornos frágiles considerados como áreas protegidas (Trujano et al., 2021). Según menciona Gupta (2019) los niños en América Latina son los más perjudicados a causa de la quema de material agrícola en los campos, teniendo como consecuencia problemas pulmonares y complicaciones graves a temprana edad. Además, el sector agrícola ha contribuido significativamente al cambio climático al utilizar combustibles fósiles para la quema de residuos agrícolas (Magagula et al., 2022).

En Ecuador, la agricultura es caracterizada como una unidad productiva agropecuaria cuya actividad se realiza en menor o mayor grado de producción, la magnitud de este problema se destaca con cifras que muestran una gran cantidad de residuos agrícolas generados anualmente, junto con emisiones considerables de gases de efecto invernadero. Estos residuos están compuestos principalmente de lignina, hemicelulosa y celulosa (Calderón et al., 2018) compuestos de lignina (10-15%), hemicelulosa (20-35%) y celulosa (40-50%) (Antonieta y Palma, 2018).

La viabilidad que representa la utilización de microorganismos como medios biodegradadores es alta, según indican resultados de estudios experimentales desarrollados. En cuanto al campo del presente estudio, se busca la implementación de alternativas que reduzcan el impacto que genera la quema de residuos agrícolas sino al aprovechamiento de materiales como la celulosa a partir de subproductos de interés industrial.

Una alternativa es la obtención de películas biodegradables para empaques de alimentos, además el consumo de residuos de maíz para animales, traen efectos negativos, por la presencia de metales pesados afectando a diferentes órganos y tejidos (Cerrón y Rubén, 2018), por lo tanto es factible transformar los residuos, mediante el proceso de biodegradación de la celulosa, por medio de microorganismos para la liberación de azúcares fermentables, pudiendo ser utilizados en la elaboración de etanol o edulcorantes (Rojas, 2019).

¿Cómo se comportan las bacterias antárticas (*Bacillus* sp) en la degradación de celulosa?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Esta investigación contribuirá a la degradación de la materia vegetal que implica la creación de cadenas largas de polisacáridos y la subsecuente hidrólisis en cadenas de glucosa de cinco a seis carbonos. Con la colaboración de sistemas celulolíticos, la celulosa llega a ser transformada a glucosa siendo ésta un elemento fundamental en la industria alimenticia, así mismo biológicamente favorable gracias al mínimo desperdicio que existe (Grijalva, 2017).

La nueva edición del informe Perspectivas del desarrollo agrícola y rural en las Américas en coautoría de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), promueve el desarrollo de la bioeconomía sostenible para impulsar el crecimiento productivo de la agricultura, lo que sugiere una ventaja en el manejo alternativo de la biomasa, siendo la agricultura sostenible y la seguridad alimentaria opciones para el mantenimiento, gestión y conservación de la biodiversidad (Rizo et al., 2017).

Durante los últimos años ha aumentado considerablemente el estudio con microorganismos de entorno extremos, como bacterias y hongos que tienen parte del microbiota del Ártico y la Antártica, que por sus características o las propiedades de sus enzimas tienen un elevado potencial como bio-recursos de aplicación biotecnológica, producción de alimentos, minería, desarrollo de basura, biorremediación ambiental, productos de provecho para la agricultura, la medicina y la valoración molecular (Oliart et al., 2017).

Bajo los criterios establecidos según el Art. 14 de Constitución de la República del Ecuador (2008) *“Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, sumak kawsay”* y anexo el *“Plan de Creación de Oportunidades 2021-2025”*, Objetivo 3, el que indica *“Garantizar los derechos de la naturaleza para las actuales y futuras generaciones”* (Secretaría Nacional de Planificación, 2021).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar microorganismos extremófilos (*Bacillus* sp) para la degradación de celulosa.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Biotransformar celulosa por medio de microorganismos extremófilos (*Bacillus* sp) para la valoración de eficiencia de microorganismos.
2. Calcular el parámetro cinético con respecto al crecimiento bacteriano durante el proceso de degradación de celulosa.
3. Obtener consorcios microbianos celulíticos para la degradación de celulosa.

1.4. HIPÓTESIS

Ho: La aplicación de las bacterias *Bacillus* sp Antárticos no tienen la capacidad de degradar celulosa.

Ha: Al menos una de las cepas tiene la capacidad de degradar celulosa.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. SUELOS AGRÍCOLAS

Los suelos son el medio más complejo y variado de todo el mundo. Además de facilitar a la sociedad el 98,8% de sustento alimenticio, los suelos proporcionan una extensa gama de otros servicios, pero el aumento de las prácticas agrícolas ya está provocando la degradación insostenible de suelos (Kopittke et al., 2022). El desarrollo productivo, desde una perspectiva de producción y consumo, se vincula directamente con los ecosistemas y sus elementos, los mismo que han tenido efectos perjudiciales con 49 % de alto riesgo de erosión en el Ecuador y una degradación persistente que suman aproximadamente 100 000 hectáreas (Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica [MAATE], 2017).

2.1.1. RESIDUOS AGRÍCOLAS

Los residuos agrícolas están constituidos como pequeñas cantidades de cultivo que no integran la cosecha o no cumple las condiciones para comercializar, estos son considerados como residuos no peligrosos de manera que son aprovechados en mínimas cantidades como alimentos para los animales y en la mayor de las ocasiones es incinerada. Aproximadamente en el 2026 a nivel mundial los residuos agrícolas van a llegar a 368 326 087,469 t (Peralta y Medina, 2021).

Estos residuos están formados por una gran cantidad de material lignocelulósico, la cual es una biomasa originada por los organismos vivos que captan la energía del sol. Este es considerado el material biológico más numeroso de la naturaleza y está conformado por una estructura de celulosa, hemicelulosa y lignina (Borus, 2021).

2.1.2. IMPACTOS AMBIENTALES DE LOS RESIDUOS AGRÍCOLAS

El crecimiento de la población global es la principal causa de los problemas ambientales, para el año de 1 950 era alrededor de 2 600 millones de habitantes y para noviembre del 2 022 se elevó a 8 000 millones de población mundial. Se estima que la población anual se incrementará en los próximos 30 años

aproximadamente 2 000 millones de habitantes más. Para el acceso a los diferentes recursos así mismo, el aumento de los residuos de todo tipo, principalmente los residuos agrícolas debido a que el alimento es el principal sustento de los seres humanos (Castro et al., 2020).

La administración inapropiada de los residuos agrícolas a lo largo de los años ha provocado serios problemas ambientales a causa de la quema desmedida y descontrolada de estos residuos, siendo la opción más económica para los agricultores, produciendo emisiones de gases de efecto invernadero que conlleva un grave problema a todos los seres vivos (Bilal et al., 2020).

2.2. BIOMASA

La formación de biomasa empieza a partir de la energía solar, la cual se lleva a cabo mediante el proceso de fotosíntesis. La biomasa se clasifica según su origen, según su composición y según su estado. En la primera clasificación se encuentra los de procedencia vegetal incluida la vegetación seca o residuos de productos agrícolas y a los productos que contengan azúcares, proteínas y almidones, como son los frutos y granos (Fernández, 2015; Sanz y Sánchez, 2022).

2.2.1. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

La biomasa lignocelulósica es considerada como la materia vegetal seca, la cual está formada por hemicelulosa y celulosa que son polímeros de carbohidratos y la lignina que es un polímero aromático, las cuales están presente en la pared celular de las plantas, cabe resaltar que su formación depende de diferentes factores como el tipo de la biomasa, localización, el clima y el suelo. Esta se la puede agrupar según los cultivos energéticos, biomasa virgen y biomasa residual (Cortes, 2011; Lázaro, 2018).

Esta se produce a partir del CO₂, agua y luz solar, de manera que es considerada como fuente de carbono orgánico en el planeta. La utilización que le dan a esta biomasa es para el consumo de los animales, abonos y fertilizantes, sin embargo, se han implementado nuevas técnicas para un mejor aprovechamiento (Yacuzzi et al., 2019).

- **FUENTES DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA**

Las fuentes lignocelulósicas son las fuentes renovables más grandes de la tierra para la producción de bioetanol y existen tres tipos principales: primero algas marinas, segundo residuos agrícolas y desechos sólidos municipales, y tercera las materias primas leñosas forestales. Así mismo se compone de tres polímeros mayoritarios: celulosa (30-35%), hemicelulosa (25-30%) y lignina (10-20%) y varios elementos en menor unidad como pectina, proteínas, pigmentos y cenizas (Vasić et al., 2021).

- **ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA PARED CELULAR VEGETAL**

Las paredes celulares efectúan funciones primordiales en las células vegetales, como dar rigidez, crear interfase entre células adyacentes y cooperando en la comunicación intercelular. Se dividen en dos grandes grupos: paredes celulares primarias (PCP), aquellas que se localizan rodeando células con capacidad de desarrollarse y paredes celulares secundarias (PCS) que bordean células del sistema vascular. Las PCS son estructuras más enriquecidas que las PCP y todas las células diferenciadas tienen paredes con diferentes composiciones (Garrido, 2022).

La pared celular está conformada principalmente por polisacáridos de compuesto y estructura diversa como celulosa, pectina, ácidos fenólicos, proteínas, iones y H₂O. La composición y disposición de los elementos independientes en la pared examina su estructura y función, por lo que es fundamental entender detalles de los PCP más cruciales que son la celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina (Valenciaga y Chongo, 2018).

- **CELULOSA**

La celulosa es el polímero más abundante de la tierra, es uno de los componentes más presentes de la biomasa vegetal que es degradada por una serie de microorganismos (Jerez, 2021), su transformación, aprovechamiento o eliminación ha sido analizada a lo largo de los años, el uso de bacterias para la reducción de la celulosa (15 a 20 %) en tallos de plantas de maíz (Ramírez y Cocha, 2003; Moreno et al., 2018).

- **HEMICELULOSA**

El término hemicelulosas se dio básicamente para referirse a los polisacáridos de origen vegetal que se sustraen en soluciones levemente alcalinas. Existen distintos tipos de hemicelulosas en los árboles; xilanos, mananos, glucanos, galactanos y galacturanos. Los dos primeros son los grupos de hemicelulosas primordiales presentes en los elementos lignocelulósicos. Frecuentemente, las hemicelulosas tienen mínimos grados de polimerización (<200) (Quiroz y Folch, 2011; Ghio, 2018).

La hemicelulosa no contiene zonas cristalinas y su grado de polimerización es menor que la celulosa ya que esta origina cadenas ramificadas y esta va a ser más sensible a los reactivos químicos (Sema y Ramos, 2018). En muchas especies vegetales puede estar ramificado por uniones α -1,2 con restos de glucuronosil produciendo glucuronoxilanos (GX), más frecuente en maderas duras. Mientras que, en maderas blandas y cereales son más probable las ramificaciones con presencia de arabinosa obteniendo arabinoxilanos (AX) o también glucurono arabinoxilanos (GAX) (Shafi et al., 2017; Velázquez et al., 2020).

- **LIGNINA**

Es el polímero aromático más numeroso y renovable de la tierra y la segunda biomasa más abundante en la naturaleza. La lignina es un co-polímero heterogéneo formado por tres monómeros de fenilpropanoides denominado monolignoles: p-cumaril alcohol, coniferil alcohol y sinapil alcohol, que cambian en el grado de suplementar los grupos metoxil en el anillo aromático. En el lapso del crecimiento de la planta, estos monómeros son enviados a la nueva pared celular en formación y se combinan dentro de la red de polisacáridos de celulosa-hemicelulosa (Gutiérrez et al., 2020). La lignina en la última década, ha sido estudiada ampliamente en diversas aplicaciones, como es la administración de fármacos y genes, la purificación del agua, la tecnología de los alimentos, el ambiente, los biocombustibles, los nutraceuticos, la catálisis y diversas aplicaciones energéticas (Kumar et al., 2021).

- **PECTINA**

La pectina es un carbohidrato formado cadenas largas de moléculas de ácido galacturónico las cuales se enlazan para crear el polisacárido y fundamentalmente se localiza en las paredes de las plantas. También es considerada como un heteropolisacárido ya que esta se encuentra presente en la lámina primaria y secundaria de las plantas terrestres (Eliaz y Raz, 2019). La degradación de la pectina involucra una serie de procesos microbianos ya que es la sucesión de reacciones enzimáticas encadenadas como la desesterificación y la escisión hidrolítica. Las pectinasas son producidas por bacterias, levaduras y hongos la cual es la encargada de descomponer las pectinas (Sourav, 2023).

- **ALMIDÓN**

El almidón representa el 80% de la comida calórica mundial, se usa como alimento para animales y es materia prima fundamental para la industria. Esta macromolécula es una combinación de polímeros de glucosa (amilosa y amilopectina) que las plantas crean y almacenan en forma de gránulos insolubles que se representan en formas y tamaños diferentes (Bernal y Martínez, 2018).

La biodegradación ocurre mediante la acción microbiana, donde el almidón es ingerido por hongos o bacterias, estos microorganismos fragmentan el almidón en sustancias fundamentales para su alimentación y lo usan como fuente de energía. Posteriormente de su digestión se libera dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O). Indicando ser un desarrollo de degradación acelerado en condiciones adecuadas de temperatura, humedad y disponibilidad de oxígeno (Merchán et al., 2019).

- **DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE LIGNOCELULOSA**

La velocidad de degradación de la lignocelulosa depende fundamentalmente de agentes como la carga microbiana y su capacidad de trabajar entre ellas. Esta se considera una transformación fundamental para el ciclo de carbono en la naturaleza, las cuales dependen de factores como la población microbiana y factores medioambientales, y esta tiene un extenso campo de acción en las industrias como en los biocombustibles, alimentación y papelera (Cerdeira, 2016; Detener et al., 2022).

2.2.2. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS ENZIMAS ACTIVAS SOBRE BIOMASA

La biomasa lignocelulósica está definida fundamentalmente por sus características fisicoquímicas, las cuales cumplen la función principal de proteger y certificar la capa vegetal. Las enzimas activas de carbohidratos se las puede catalogar en diferentes grupos como la secuencia peptídica que se basa en la protección de la estructura del plegamiento como del mecanismo catalítico (Ghio, 2018).

- **CELULASAS**

Las celulasas son proteínas completas que tienen como función principal hidrolizar enlaces (1-4)- β -D-glicosídico de celulosa, liquenina y glucanos. Están clasificadas según las características de su estructura enzimática las cuales son 133 familias GH y la mayor parte cuentan con estructuras de dos dominios. La producción del sistema de enzimas está vinculada con la degradación de sustratos celulolíticos que se lleva a cabo por acción de tres categorías de enzimas, las cuales en grupo son conocidas como celulasas (Miranda, 2019).

- **HEMICELULASAS**

Las hemicelulosas o enzimas degradantes de hemicelulosa, son una parte valiosa de la biomasa vegetal renovable y, por lo mismo, han tenido una atención grande en la biotecnología de la lignocelulosa, se ha distinguido una variedad de hemicelulasas a base de microorganismos mesófilos y termófilos, estas hemicelulasas tienen aportación en las industrias de producción alimenticia, bioetanol, papel, y bebidas, así como en la biotecnología ambiental y biorrefinerías (Gashaw, 2020).

Las hemicelulasas son fundamentalmente hidrolasas las cuales se las pueden clasificar según la acción de los sustratos diferentes. Están constituidas por polímeros de azúcares como pentosas, hexosas y azúcares ácidos y su objetivo primordial es la cohesión entre la celulosa y la lignina (León, 2016). La degradación de la hemicelulosa se realiza principalmente por la xilanasas, la cual tiene como función principal la creación de la xilosa y arabinosa (Díaz, 2020).

- **LACASAS Y PEROXIDASAS**

Las lacasas son enzimas que corresponden al conjunto de oxidorreductasas, las cuales han sido analizadas desde el siglo XIX, fundamentalmente por la degradación de una gran diversidad de compuestos recalcitrantes. Estas enzimas solo arremeten con subunidades fenólicas de la lignina, sin embargo, puede aumentar la capacidad de oxidación si hay un compuesto mediador (Silva y Vázquez, 2018). Las peroxidasas como las lacasas pertenecen al grupo de las oxidorreductasas, de manera que estas destruyen peróxidos empleando una variedad de sustratos reductores. También degradan un gran número de compuestos recalcitrantes y éstas han sido utilizadas para el tratamiento de efluentes de los textiles (Miranda et al., 2017; Solís, 2019).

2.3. MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE CELULOSA

Estos microorganismos tienen enzimas que favorecen el proceso de hidrólisis de la materia lignocelulósica, las cuales incorporan los que son los hongos, bacterias, algas y protozoarios para la degradación de la celulosa. Entre los hongos más comunes se encuentran: *Trichoderma Reesei*, *Fusarium solani*, *Trametes* sp, Las bacterias más comunes y abundantes aerobias son: *Cellulomonas* sp, *Thermomonospora* sp, *Vibrio* sp, *Bacillus* sp, entre otros. Y a los anaerobios se los puede mencionar los siguientes: *Acetivibrio cellulolyticus*, *Butirivibrio* sp, *Ruminococcus salbus* (Alcívar y Vera, 2013; Arellano, 2021).

2.3.1. DIVERSIDAD FILOGENÉTICA DE MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS

La diversidad filogenética se la puede determinar como una parte del ciclo del dióxido de carbono que está en la atmósfera, la cual es retenida por las plantas y acumulado en la materia orgánica para posteriormente ser regresada por los organismos autótrofos y heterótrofos. La conversión de la biomasa tiene una gran diversidad ya que en torno a el dominio bacteriano se encuentran géneros celulolíticos que se clasifican en phyla Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria (Herrera, 2015; Carreño, 2019).

2.3.2. MECANISMOS MICROBIANOS DE BIOCONVERSIÓN DE BIOMASA

La biomasa estima cuatro procesos básicos los cuales tienden a transformarse en electricidad y calor: combustión, gasificación, pirolisis y digestión anaeróbica. Sin embargo, los agentes microbianos han desarrollado mecanismos o habilidades para la utilización de la biomasa, las cuales intervienen de manera sincronizada y conjunta como es el uso de la celulosa por medio de la elaboración de celulasas extracelulares, teniendo en cuenta que es una característica similar que tienen los hongos y las bacterias aeróbicas. Por lo tanto, la degradación de la celulosa mediante la creación de celulosomas es un mecanismo que las bacterias han implementado para poder ingresar a los sustratos celulósicos (Galván, 2018).

2.4. BACTERIA *BACILLUS*

Este género *Bacillus* sp fue descubierto por el investigador Ferdinand Julius Cohn entre 1872, hasta la actualidad existen 379 especies, además que se encuentra distribuido significativamente en los agrosistemas y una de sus primordiales aplicaciones es el control de enfermedades de cultivos agrícolas. (Villarreal et al., 2018). A través de diferentes técnicas moleculares del RNAr 16s, esta bacteria logró subdividirse en diversos conjuntos: el primero de ellos es el *Bacillus senso* donde se encuentra el *Bacillus subtilis*, el segundo corresponde al *Bacillus sensu lato* que abarca principalmente bacterias termófilas como *B. anthracis*, *Bacillus* sp, *B. thuringiensis* y *B.cereus*, *B. horti*, *B. carboniphilus*, *B. chitinolyticus*, y *B. infernus*, entre otros. Los *Bacillus* son un género de mucho beneficio, gracias a su amplio perfil fisiológico enfatizando el parasitismo, el que permite estar presente en otros ecosistemas como los acuáticos y los terrestres sin tener en cuenta las temperaturas (Plaza, 2019).

Está bacterias son microorganismos ubicados en todo el ambiente, principalmente en el suelo así mismo, como en entornos acuáticos resistiendo tanto el agua dulce como el agua salada, presentes también en material vegetal en proceso de descomposición, al ser termófilas soportan altas y bajas temperaturas por lo que se pueden encontrar en la Antártida y en desierto. Sus

esporas logran dispersarse por el aire, posteriormente, tienden a recorrer extensas distancias lo que les ayuda a desarrollarse en cualquier ambiente (Frackowian, 2018).

2.4.1. CARACTERIZACIÓN DE *Bacillus* sp

La bacteria *Bacillus* sp pertenece a la familia Bacillaceae del género *Bacillus*, es una bacteria Gram positiva, catalasa-positiva, de entorno aerobio localizada frecuentemente en el suelo, tiene la habilidad de formar una endospora protectora, lo que le ayuda a tolerar circunstancias ambientales extremas. Es parte del proceso de desintegración de la celulosa, familia de microorganismos bacterianos con mayor movimiento bioquímico, las cepas de esta bacteria provocan elevadas unidades de enzimas directamente en el entorno de crecimiento (Pedraza et al., 2019).

- ***Bacillus anthracis***

Esta bacteria bacilo corresponde a la familia de los *Bacillaceae*, son Gram positivo con un tamaño promedio de 1,3 micras y su taxonomía fundamentalmente es aerobios o anaerobios facultativos, encapsulados y son formadores de esporas (Instituto Nacional y Salud en el Trabajo de España, 2021).

- ***Bacillus albus***

Esta es una bacteria Gram positiva que se encuentra principalmente en el suelo, tiene una estructura de bastoncillo y posee la capacidad de formar endosporas. Se la considera como bacterias resistentes ya que tiene la capacidad de sobrevivir a condiciones extremas (García et al.,2021).

- ***Bacillus tropicus***

Esta bacteria tiene enzimas termoestables, lo que significa que son capaces de resistir condiciones extremas. Su morfología es de bastón con la capacidad de formar endosporas, la cual se utiliza para distintas aplicaciones ambientales e industriales. Tiene un gran potencial de biorremediación a causa de su capacidad para degradar componentes orgánicos (Abdallah et al.,2019).

- ***Bacillus paramycooides***

Es una bacteria que se encuentra regularmente en los suelos y ambientes naturales, necesitan del oxígeno para poder sobrevivir y tiene una estructura en forma de varilla. Puede elaborar enzimas extracelulares incluyendo como la celulasa y puede llegar a descomponer proteínas, almidón y celulosa (Han et al., 2023).

- ***Bacillus wiedmanni***

Lleva este nombre por el profesor de seguridad alimentaria Martin Wiedmann, es una bacteria Gram positiva con una estructura en forma de bastón y es capaz de producir endosporas. Esta es una bacteria psicotrófica, lo que significa que puede desarrollarse a bajas temperaturas y es considerada un patógeno, ya que es asociado a enfermedades transmitidas por los alimentos (Miller et al., 2016).

2.4.2. DEGRADACIÓN DE CELULOSA CON *Bacillus* sp

La seguridad ambiental y el ámbito económico urge la búsqueda de nuevas formas de acelerar la degradación de residuos agrícolas por lo tanto una de las propiedades de *Bacillus* sp es transformar a la celulosa en dióxido de carbono, etanol y en biomasa. La posibilidad del *Bacillus* sp, de crear esporas es la mismas que subsisten metabólicamente apáticas, pero se puede realizar a pesar de la circunstancia medioambiental adversas, lo que resulta apropiado en la realización de compuestos invariables que ayudan a la degradación de la celulosa y sus derivados (Aktayeva et al., 2022).

2.4.3. EXPERIENCIAS DE *Bacillus* sp EN LA ANTÁRTICA.

Entre los microorganismos que existen en la Antártida se halla la bacteria *Bacillus* sp, resistiendo elevados niveles de radiación ultravioleta, bajas temperaturas de hasta -54°C, con mínimas unidades de nutrientes para su desenvolvimiento y ausencia de agua líquida, lo que perjudica su crecimiento, sin embargo en el tiempo de verano dentro de la capa de nieve se crean micro espacios donde se localiza el agua líquida, esto ayuda a el crecimiento bacteriano usando sales y materia orgánica procedente del agua salada (mar) y la erosión de las rocas (Silva, 2018).

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del área de Medicina Veterinaria, de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López” localizado a 15,5 msnm. Ubicada en el sitio El Limón, parroquia Calceta, cantón Bolívar de la provincia de Manabí, localizada a 00°49'27,9" S y 80°10'47,2" O.

Figura 3. 1. Laboratorio de Biología Molecular ESPAM MFL.



Fuente: (Google Earth, 2018; Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 2018).

3.2. DURACIÓN

El presente estudio tuvo una duración de 13 meses, desde marzo del 2023 hasta mayo del 2024.

3.3. TIPOS DE INVESTIGACIÓN

El tipo de investigación es experimental y se manipularon las variables del estudio las cual tiene un enfoque científico, ya que se evaluó a los *Bacillus* sp Antárticos en la degradación de celulosa y su finalidad fue alcanzar cada uno de los objetivos planteados (Pazos, 2022).

3.3.1. MÉTODOS

- **MÉTODO DESCRIPTIVO**

Este método descriptivo se usó para llevar a cabo el análisis de las variables dependiente e independiente propuestas en la investigación para así lograr un avance en los datos seleccionados (Intriago y Saltos, 2020).

- **MÉTODO DEDUCTIVO**

El método deductivo se dice que nace de lo general a lo particular, es decir, la razón que permite estudiar y analizar los aspectos que están vinculadas con las características y desarrollo de la degradación de celulosa mediante la *bacteria Bacillus sp* (Cuervo, 2021).

- **MÉTODO GRAVIMÉTRICO**

Este método tiene como función determinar la degradación de celulosa por medio de la intervención bacteriana (Chávez, 2019).

- **MÉTODO ESTADÍSTICO**

Con este método se analizaron los datos y se elaboraron los gráficos con el fin de obtener resultados fiables del tema de investigación (Burgos et al., 2021).

3.3.2. TÉCNICAS

- **OBSERVACIÓN**

Esta técnica facilita obtener información de todo el comportamiento de la bacteria *Bacillus sp* y registrarla para su posterior análisis; por tal razón la observación es un elemento importante durante todo el desarrollo de la investigación (Bernal, 2017).

- **MICROSCOPIA ÓPTICA**

Esta técnica permitió observar la morfología bacteriana y su reacción a la tinción Gram, utilizando el objetivo de inmersión (Montalvo, 2010).

3.4. UNIDAD EXPERIMENTAL

La investigación tuvo como referencia 24 unidades experimentales por cada uno de los tres períodos con una duración de 72 horas (Carreño, 2019).

3.5. VARIABLES A MEDIR

3.5.1. VARIABLE DEPENDIENTE:

Degradación de celulosa

3.5.2. VARIABLE INDEPENDIENTE:

Bacillus sp

3.6. PROCEDIMIENTO

FASE I. BIOTRANSFORMAR CELULOSA POR MEDIO DE BACTERIAS (*Bacillus* sp) ANTÁRTICOS PARA LA VALORACIÓN DE EFICIENCIA DE MICROORGANISMOS.

Actividad 1. Preparación del cultivo microbiano para la reactivación de las bacterias *Bacillus* sp

El cultivo se preparó en matraz con agua peptona en un volumen de 100 ml, luego se le añadió 1 mm² de la bacteria aislada previamente y finalmente se le incubó por 24 horas a 20 °C para el crecimiento de la bacteria (Plaza, 2019).

Actividad 2. Tinción de Gram.

De acuerdo a Rodríguez y Arenas (2018) para realizar la tinción de Gram se consideró los siguientes pasos:

- La muestra se puso en un portaobjeto y se fijó en la flama.
- Durante 60 segundos se cubrió con un cristal violeta y se lavó con agua destilada.
- Durante 60 segundos se cubrió con Lugol y se lavó con agua destilada el exceso.
- Con alcohol se cubre durante 30 segundos y se lava con agua destilada.
- Con safranina se cubre durante 30 segundos y se lava con agua destilada.

Luego de cumplir los pasos correspondientes se visualizó en el microscopio las muestras con el objetivo de identificar si son bacterias Gram positivas o Gram negativas. Las bacterias Gram positivas surgieron teñidas de color violeta y las Gram negativas de color rosa o rojo. Es importante tener un enfoque preciso, pues de otra manera el color violeta puede asemejarse al rojo con la presencia de la luz en los bordes de la célula.

Actividad 3. Determinación cualitativa de la capacidad celulolítica bacteriana (*Bacillus* sp) antárticos.

Los aislamientos bacterianos con mayor porcentaje de crecimiento se sembraron en agar CMC. Se utilizó MC (Carboximetilcelulosa) como fuente de celulosa para

los experimentos de capacidad celulítica bacteriana al 1 %, extracto de levadura 0,25 %, peptona 0,25 %, sulfato de amonio 0,05 %, cloruro de calcio 0,05 %, fosfato monobásico de potasio 0,01 %, fosfato dibásico de potasio 0,01 % y agar 1,5 %; el pH del medio fue ajustado a 7,0 e incubó a 37°C por 72 horas. Culminado el tiempo de incubación se reveló la degradación de CMC cubriendo el medio con solución de rojo Congo 1 % (p/v). El colorante se dejó actuar por 15 min, se retiró el exceso y se enjuago con solución de cloruro de sodio 2 mol/L, dejando actuar 15 minutos misma solución. Finalmente se determinó la actividad celulolítica mediante la presencia de zonas claras (halos) mostrado por la hidrólisis de la celulosa, dichos diámetro fueron tomados en milímetros (Guzmán et al., 2015).

FASE II. CALCULAR EL PARÁMETRO CINÉTICO CON RESPECTO AL CRECIMIENTO BACTERIANO DEL PROCESO DE DEGRADACIÓN DE CELULOSA.

Actividad 4. Tasa de crecimiento.

Se identificó la formación de colonias bacterianas por medio de la fórmula de la tasa de crecimiento (ecuación 3.1), medido en unidades formadoras de colonias (UFCs) por unidad de tiempo (inicio y fin del tiempo de experimentación), a partir de la siembra de un ml de las muestras, diluido al 10%. Se realizó el conteo de UFCs a las 15 y 24 horas de la siembra en medio sólido.

$$\mu = \frac{\ln(N2) - \ln(N1)}{t2 - t1} \quad [3.1.]$$

Ecuación 3. 1. Tasa de crecimiento.

Donde:

- N1 es el número de UFCs a las 15 horas.
- N2 es el número de UFCs a las 24 horas.
- T1 es el tiempo de 15 horas.
- T2 es el tiempo de 24 horas.

La determinación de vida media de los microorganismos se vio relacionada con el crecimiento bacteriano y se calculó con la siguiente fórmula:

$$t = -\frac{\ln \ln(05)}{k} \quad [3.2.]$$

Ecuación 3. 2. Determinación de crecimiento.

Donde:

k: son los valores previamente obtenidos de la tasa de degradación.

Para la determinación de la eficiencia de los tratamientos se utilizó la siguiente ecuación:

$$Y = \frac{C_{inicial}}{C_{final}} * 100 \quad [3.3.]$$

Ecuación 3. 3. Eficiencia de tratamientos.

FASE III. OBTENER CONSORCIOS MICROBIANOS CELULOLÍTICOS PARA LA DEGRADACIÓN RESULTANTE DE RESIDUOS AGRÍCOLAS.

Una vez que se identificaron las cepas con mayor porcentaje de degradación de celulosa se procedió con:

Actividad 5. Preparación de medio de cultivo.

Obtenidas las cepas correspondientes, para su reactivación se inoculó en Agar Nutritivo que posteriormente se incubó a 37°C durante un periodo de 24h en ausencia de luz (Ramírez y Uscanga, 2020). Luego se sembraron las cepas seleccionadas en medio líquido Agua peptona y posteriormente se incubaron a 37 °C para la determinación de consorcios microbianos.

Actividad 6. Determinación cualitativa de la capacidad celulolítica de los consorcios bacterianos.

Los consorcios bacterianos con mejor porcentaje de degradación se sembraron en agar (Carboximetilcelulosa) en función. Dicho medio estaba compuesto por CMC 1 %, extracto de levadura 0,25 %, peptona 0,25 %, sulfato de amonio 0,05 %, cloruro de calcio 0,05 %, fosfato monobásico de potasio 0,01 %, fosfato dibásico de potasio 0,01 % y agar 1,5 %; el pH del medio a 7,0 y se incubaron a 37°C por 72 horas. Culminado el tiempo de incubación se reveló la degradación

de CMC cubriendo el medio con solución de rojo Congo 1 % (p/v). El colorante se dejó de actuar por 15 min, se retiró el exceso y se lavó dos veces con solución de cloruro de sodio dos moles/L, se dejó en reposo durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se determinó la actividad celulolítica por la presencia de zonas claras (halos) manifestado por la hidrólisis de la celulosa cuyo diámetro fue medido en milímetros.

3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA) unifactorial, donde el único factor está representado por las cepas, es decir, seis tratamientos (considerando el control), cuatro repeticiones durante tres periodos de tiempos diferentes de 72 horas, con un total de 72 unidades experimentales y degradación de celulosa como variable a medir en este diseño.

A continuación, se presentará la tabla de tratamientos (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Cepas (tratamientos).

Tratamientos
T-13
T-21
T-29
DEE-71
GA-52
Control

Elaborado por: los autores

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se utilizó el programa InfoStat para la determinación de la significancia, la aceptación o el rechazo de las hipótesis (nula y alternativa), mediante el método ANOVA. Para determinar las diferencias entre los tratamientos, se ejecutó un Análisis de Varianza (ANOVA) y prueba de Tukey con un nivel de significancia

del 5% (95% de confianza) ajustado al modelo DCA unifactorial de la cepa con respecto al periodo de estudio. A continuación, se presenta la tabla del DCA (Tabla3.2).

Tabla 3. 2. Formato de análisis de la varianza - Diseño Completamente al Azar (DCA).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	$F_{Calculada}$
Tratamientos	$GL_{Trat.} = t - 1$	$SC_{Trat.} = \sum_{i=1}^t \frac{Y_i^2}{r} - \frac{Y^2 \dots}{tr}$	$CM_{Trat.} = \frac{SC_{Trat.}}{t - 1}$	$F_C = \frac{CM_{Trat.}}{CM_E.}$
Error	$GL_E = t(r - 1)$	$SC_E. = SC_{Tot.} - SC_{Trat.}$	$CM_E. = \frac{SC_E.}{t(r - 1)}$	
Total	$GL_{Tot.} = rt - 1$	$SC_{Trat.} = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^t Y_{ij}^2 - \frac{Y^2 \dots}{tr}$		

t: tratamientos; r: réplicas; n: total de observaciones (unidad experimental).

Fuente: (Gabriel et al., 2017).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

FASE I. BIOTRANSFORMAR CELULOSA POR MEDIO DE BACTERIAS (*Bacillus* sp) ANTÁRTICOS PARA LA VALORACIÓN DE EFICIENCIA DE MICROORGANISMOS.

PREPARACIÓN DEL CULTIVO MICROBIANO PARA LA REACTIVACIÓN DE LAS BACTERIAS *Bacillus* sp

Luego de la reactivación de cepas *Bacillus* sp fueron observadas individualmente a través del microscopio óptico para identificar la información complementaria y reconocer su estructura interna (Figura 4.1) (Anexo1).

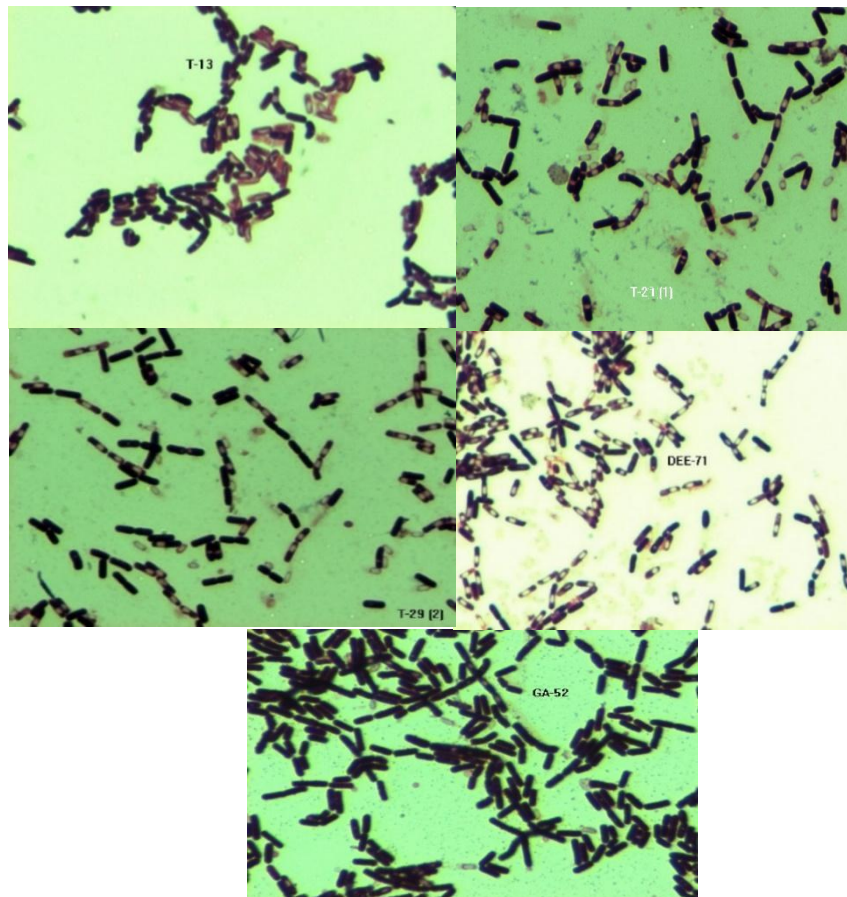


Figura 4.1. Morfología de *Bacillus* sp; T-13, T-21, T-29, DEE-71, GA-52.

TINCIÓN DE GRAM

A nivel microscópico mediante el método de la Tinción de Gram, se pudo estudiar a los *Bacillus* sp reconociendo su morfología, la presencia de bacterias Gram

positivas o Gram negativas, tipo de agrupación, pureza, tamaño y producción de endospora. A continuación, se describe la morfología de cada una de las cepas (tabla 4.1) (Anexo 2).

Tabla 4.1. Características microscópicas.

Cepa	Forma	Tinción Gram (+/-)	Agrupación	Pureza	Tamaño	Producción endosporas
T-13	Bacilo	+	Pleomórficas	Pura	Grande	Central
T-21	Bacilo	+	Diplobacilos	Pura	Mediano	Central
T-29	Bacilo	+	Pleomórficas	Pura	Pequeña	Central
DEE-71	Bacilo	+	Diplobacilos	Pura	Mediano	Central
GA-52	Bacilo	+	Pleomórficas	Pura	Mediano	Central

Elaborado por: los autores.

De acuerdo a las características microscópicas se obtuvo lo siguiente:

- Las cinco cepas estudiadas resultaron tener forma de Bacilo.
- La tinción de Gram para las cinco cepas fue identificada Gram positivas.
- Se comprobó que las cepas T-13, T-29 y GA-52 son de agrupación pleomórficas sin embargo las T-21, DEE-71 fueron caracterizadas diplobacilos.
- Las cepas T-21, DEE-71 y GA-52 mostraron tamaño mediano, no obstante, la cepa T-13 se identificó con un tamaño grande y la cepa T-29 manifiesta tamaño pequeño.
- Se comprueba que todas las cepas son puras, así mismo que la producción de endosporas para todas es central.

Según (Rodríguez y Arenas, 2018) menciona que mediante el microscopio se distinguen generalmente bacilos rectos Gram positivos de mediano a gran tamaño, teniendo esporas redondas en posición central o subterminal sin perjudicar la forma del cuerpo microbiano. Muigg et al.,2022 asegura que los *Bacillus anthracis* son inmóvil con un organismo aerobio es decir que tienen capacidad de crecer en medios artificiales como anaerobio facultativo, logran producir una espora como forma de resistencia pudiendo ser terminales, subterminales y endosporas centralmente puestas.

DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA BACTERIANA (*Bacillus* sp) ANTÁRTICOS.

La evaluación cualitativa de la capacidad celulolítica se efectuó relacionando el diámetro de crecimiento (halo bacteriano) con el diámetro de colonia desarrollado por cada una de las cepas de *Bacillus* sp, cultivadas en medio agar nutriente en estado puro bajo condiciones controladas y posteriormente evaluadas luego de 72 horas.

Se pudo demostrar la capacidad degradadora de celulosa que tuvo cada uno de los tratamientos con las cinco cepas de *Bacillus* sp estudiadas. La determinación de este parámetro consideró la formación de halos como un indicador de degradación de las cepas.

El tratamiento para el que se valoró un mayor índice de degradación correspondió a la cepa GA-52, con una estimación de halo celulolítico de 27,38 mm. El tratamiento con la cepa T-13 obtuvo un valor alto en formación de halo (26,93 mm), continuamente T-29 (24,75 mm), DEE-71 y T-21, que fueron las cepas con menor crecimiento de halos en el periodo de estudio; sin embargo, demostraron medias que se ajustaron a los valores anteriores, con 23,95 y 14,85 mm, respectivamente, en un tiempo de 72 horas como se muestra en la (figura 4.1) (Anexo 3).

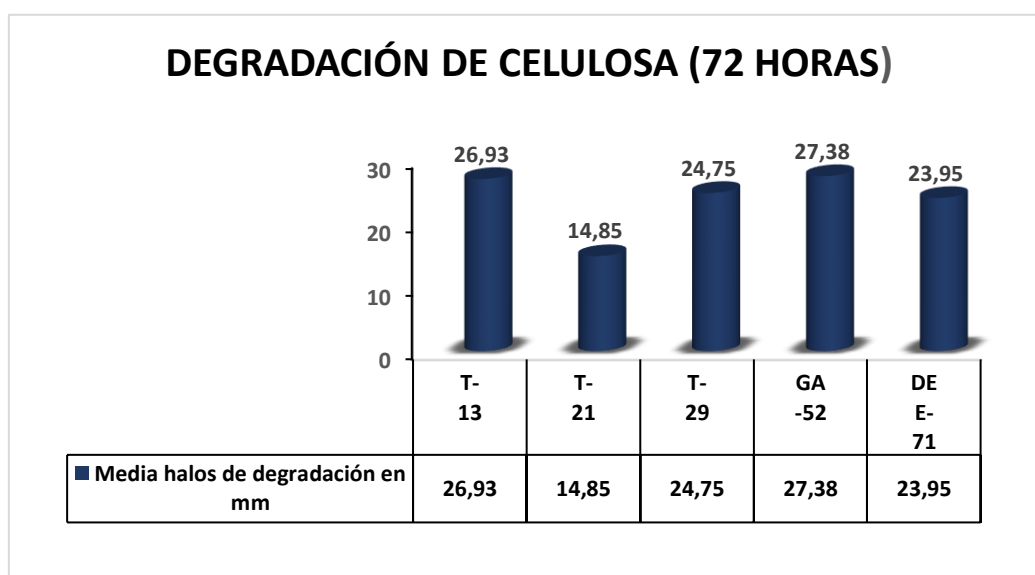


Figura 4.1. Medias de halos de degradación de celulosa en 72 horas

Los resultados de esta investigación coinciden con el estudio realizado por Ruíz (2020) donde señala que la cepa con mayor halo de degradación tuvo un valor promedio de 12,33 mm de diámetro, donde afirma que el mayor crecimiento de las bacterias dio en valores de pH neutro del medio de cultivo, se confirma además, que los niveles de pH del medio de cultivo son los óptimos para el crecimiento bacteriano del género *Bacillus* sp. Por otro lado, Zambrano et al., (2022) obtuvo un halo de crecimiento de 6,52 mm de diámetro, la cual estuvo entre las de mayor crecimiento en los dos niveles de temperatura estudiados, ya que es una condición muy importante a considerar porque durante la degradación de la celulosa se producen altas temperaturas, lo cual es un indicador de la actividad microbiana en la transformación de la materia orgánica.

La variabilidad de los resultados, se atribuye a la diversidad de respuestas enzimáticas que son propias de cada microorganismo, al producir unos más enzimas celulasas que otros (Ruíz, 2020); los resultados del estudio de Reyes et al., (2020) respaldan los de la presente experimentación, donde a mayor tiempo, incrementa el desplazamiento del halo como resultado de la multiplicación de microorganismos, considerando que los aislados bacterianos consumen celulosa como única fuente de carbono para su estabilidad y replicación.

FASE II. CALCULAR EL PARÁMETRO CINÉTICO CON RESPECTO AL CRECIMIENTO BACTERIANO DEL PROCESO DE DEGRADACIÓN DE CELULOSA.

TASA DE CRECIMIENTO

Se pudo observar la evaluación del crecimiento bacteriano en un periodo de tiempo de (24 horas), en donde bacterias multiplicaron y aumentaron su número de colonias en un tiempo determinado. Cabe mencionar que el crecimiento bacteriano realizado en este medio se ratifica la capacidad que tienen las bacterias para expandirse alrededor de la caja Petri, no obstante, la celulosa proporcionada es utilizado como fuente de energía y carbono por las bacterias.

La tasa de crecimiento bacteriano de cada una de las cepas estudiadas como consecuencia del desarrollo celular, estimado mediante conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

Las poblaciones de bacterias correspondientes al género *Bacillus* sp tienen alta capacidad de multiplicación celular en corto tiempo, siempre y cuando se encuentren expuestas a condiciones favorables, tales como temperatura y disponibilidad de nutrientes (Bruslind, 2022). La evolución de cepas bacterianas en condiciones controladas obedece en la mayoría de los casos a patrones de crecimiento ya establecidos en cuatro fases: retraso, exponencial, estacionaria y de muerte; sin embargo, los tiempos de evaluación resultan variables, al depender de las características propias de cada género de *Bacillus* sp (Van et al., 2023).

Durante el tiempo de evaluación se estimaron valores ajustados a un modelo de crecimiento efectivo. La cepa T-21 presentó un mayor número de UFC, siendo este de diez millones, seiscientos mil UFC ($1,06 \text{ E}+07$) en 24 horas. Las concentraciones de UFC son mostradas en notación por tratarse de valores altos; para los otros tratamientos se registraron datos T-29 ($6,48\text{E}+06$), DEE-71 ($6,40\text{E}+06$), GA-52 ($2,27\text{E}+06$) y T-13 ($1,40\text{E}+05$) respectivamente, siendo el caso de este último tratamiento aquel que registró el mínimo incremento como se muestra en la (figura 4.1) (Anexo 5).

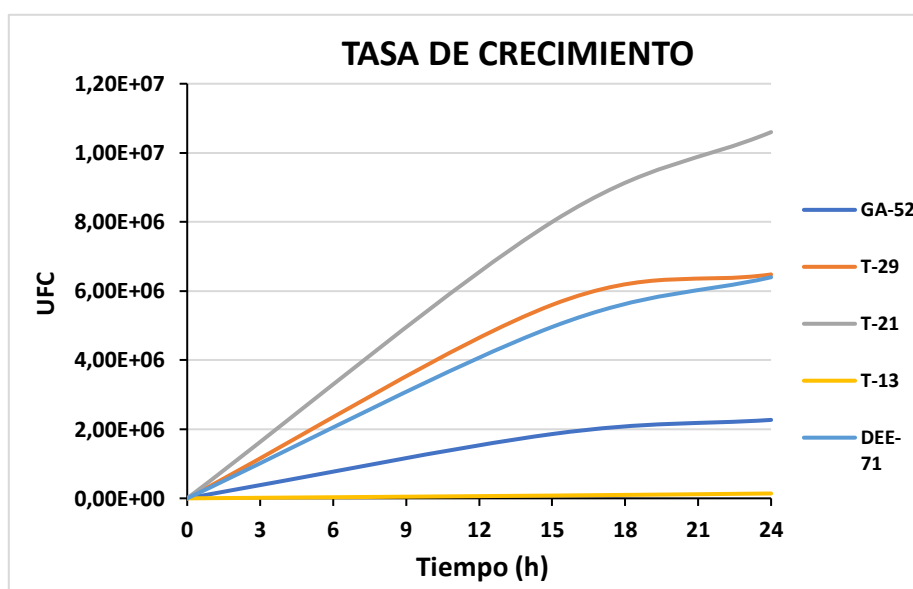


Figura 4.1. Tasa de crecimiento bacteriano con relación al tiempo experimental

Es preciso indicar que los tratamientos estudiados mostraron una rápida y significativa tasa de crecimiento en el transcurso 24 horas. En particular, la cepa T-21 destacó con un valor notablemente superior a los tratamientos, lo cual se respalda con la investigación de Zamora (2015); Aguilar (2019) quienes documentan resultados que se ajustan a los obtenidos en el presente estudio utilizando agar nutritivo.

En el mismo sentido, un estudio realizado por Sanabria (2016) detalla la utilización de cepas bacterianas que desplegaron curvas de crecimiento similares, exhibiendo la fase exponencial entre las ocho y diez horas de iniciado su periodo de incubación, factor asociado a la aplicación de un rango de temperatura óptima entre 37 y 39°C, lo cual se acopla a los rangos proporcionados en el presente trabajo. Sin embargo, el mismo autor menciona que de cuatro cepas bacterianas estudiadas, una de ellas reportó el crecimiento exponencial luego de 48 horas de iniciado el proceso de cultivo, atribuido a las características enzimáticas propias de cada microorganismo.

Los tratamientos que muestran un periodo de adaptación más corto suponen una transferencia de células de un mismo medio a otro con características similares, lo que favorece el proceso de adaptación para los microorganismos y hace que reduzcan su tiempo de rezago (Costanzo et al., 2021). No obstante, en el caso de las cepas que requieren de un mayor plazo en esta fase, podrían encontrarse experimentando una etapa de reparación por daño celular, síntesis de ARN y enzimas básicas antes de pasar a la fase de multiplicación (Lamont et al., 2015).

EFICIENCIA DE TRATAMIENTOS

De acuerdo a la eficiencia de cada tratamiento se consideraron las concentraciones de (UFC) inicial y final por cada repetición. La eficiencia de tratamientos utilizados para el presente estudio, valores que se expresaron en porcentajes, situándose todas las cepas por encima del 50% de eficacia. De acuerdo con Jiménez (2016) la eficiencia de tratamientos refiere al nivel de validez demostrado y/o a la cercanía que ha tenido un método ante un determinado proceso, determinando así si se cumplen o no los resultados esperados.

Con los datos estimados, se determinó que el tratamiento con mayor porcentaje de eficacia corresponde a la cepa T-29, el cual manifestó una eficiencia de 86,4%, en la misma secuencia se estimó un valor de 81,9% para el tratamiento GA.52, la cepa DEE-71 con 77,5%, mientras que en el caso de los tratamientos T-21 y T-13 mostraron porcentajes de 75,5% y 57,1% respectivamente. A continuación, se representa estos resultados obtenidos (Figura 4.2).

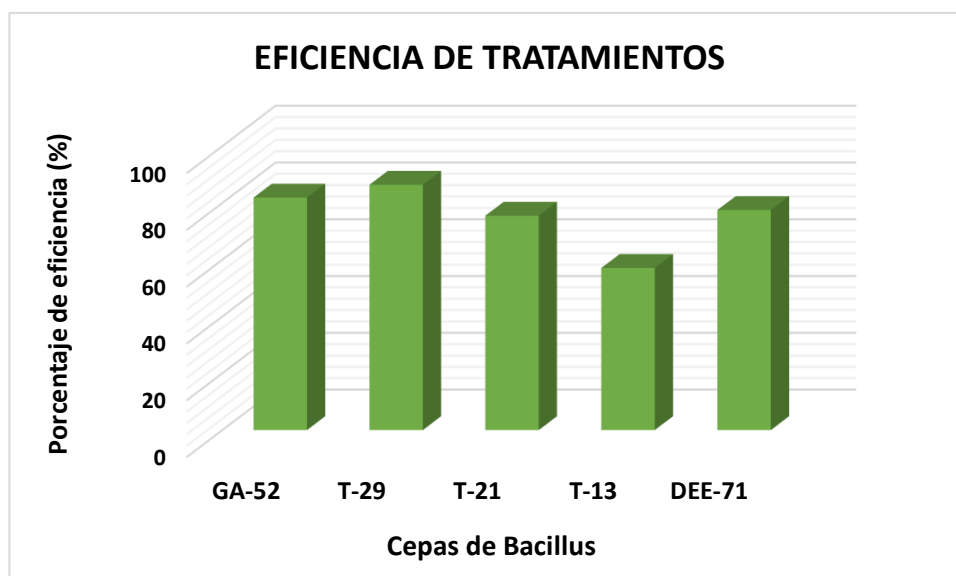


Figura 4.2. Porcentaje de eficiencia en los diferentes tratamientos utilizando cepas de Bacillus sp.

Los resultados presentados en este estudio se contrastan con los registrados por Gámez (2022) quien obtuvo porcentajes de degradación de celulosa que fluctuaron entre 62% y 83% utilizando inóculos bacterianos; según este mismo autor la actividad celulolítica trabajada *in vitro* únicamente incrementa exponencialmente hasta las 24 horas de cultivo, luego de este tiempo permanece constante o disminuye en tiempos más extendidos; lo cual discrepa Omer y El-Hadidy (2012) quienes revelaron porcentajes de degradación de celulosa entre el 52,4% y 68% y determinaron a su vez la vida útil del género de Bacillus por un periodo de 180 días, con una sola incorporación de la bacteria.

Bazurto y Murillo (2017) por otra parte señalan la aplicación de una ecuación matemática para determinar la eficiencia de remoción de un contaminante en su estudio, para la cual relacionaron los datos tomados de las concentraciones inicial y final del compuesto, misma que fue aplicada para evaluación de eficiencia en la actual investigación, permitiendo de tal manera conocer la capacidad del sistema estudiado para eliminar una fracción de contaminante.

En este sentido, Hernández (2017) utilizó los porcentajes de eficiencia para comparar los valores de diferentes concentraciones en sistemas de tratamientos, obteniendo datos más precisos con la finalidad de definir aquellos mayormente viables y avanzar aplicando mejoras para futuras investigaciones.

FASE III. OBTENCIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS CELULOLÍTICOS PARA LA DEGRADACIÓN RESULTANTE DE RESIDUOS AGRÍCOLAS.

Durante esta fase se seleccionaron los dos tratamientos con mayor crecimiento de halos, precisados en milímetros, lo que se considera una respuesta favorable cualitativa de degradación ante la exposición de las cepas sobre el sustrato carboximetilcelulosa, durante un periodo de tiempo definido de 72 horas, dando como resultado que las mejores cepas degradadoras son (T-13) y (GA-52) (Anexo 7).

PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

Las cepas con mayores indicadores de degradación (T-13) y (GA-52) aisladas y reactivadas en agar nutritivo e incubadas a una temperatura óptima favorable de 37°C, durante un periodo de 24 horas; Parra y Vergara (2019) afirman que los medios de cultivo se tratan de soluciones con amplio contenido de nutrientes, que proveen de fuentes y condicionan factores necesarios para complementar sus funciones metabólicas y garantizar de tal manera un óptimo crecimiento y desarrollo de los microorganismos.

Una característica destacada de las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* sp es que no revelan exigencias nutricionales, por lo que poseen una amplia facilidad de adaptación con diferentes tipos de sustrato y medios de cultivo, entre los que destaca el agar nutritivo y agar papa (Cuervo, 2020). Sáez (2016) afirma que el agua peptona es utilizada ampliamente en medios de cultivo con este tipo de género por la mejora demostrada en la actividad enzimática; sin embargo, la adaptabilidad de cada cepa dependerá también de las condiciones propiciadas en el ambiente de trabajo.

En un estudio desarrollado por Reyes et al. (2017) se realizaron ensayos para evaluar varios medios de cultivo: agar nutritivo (AN), agar soya-tripticosa (TSA) y agar papa dextrosa (PDA), mediante el crecimiento de aislados bacterianos y fúngicos, determinando así una mayor efectividad con diferencias significativas entre los tratamientos contenidos en AN y PDA; los resultados obtenidos contrastan la presente investigación por la alta afinidad que tuvieron los consorcios al medio suministrado.

DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA DE LOS CONSORCIOS MICROBIANOS

Los aislamientos bacterianos (T-13) y (GA-52) presentaron mayor diámetro de degradación en comparación de las demás cepas, teniendo en cuenta que la cepa (T-21) obtuvo el menor halo de hidrólisis. Como afirma (Paris et al.,2018) las bacterias de la Antártica son fisiológicas adaptables para favorecer su funcionamiento y supervivencia en condiciones adversas de ese ecosistema por lo tanto es decir que las bacterias aisladas tienen el potencial de degradación enzimática que aquellas aisladas desde áreas más tropicales.

Según Delgado (2021) se ha comprobado que las bacterias de la Antártida no son especies exigentes en cuanto a requerimientos nutricionales, la mayoría se desarrolla bien en medios con sustratos de naturaleza compleja como extracto de levaduras y peptona. En este contexto Hernández et al. (2019) destaca la importancia de la biodegradación de la celulosa que ocurre producto de la interacción entre microorganismos, quienes liberan enzimas capaces de ayudar a desintegrar los productos, asegurando el flujo de carbono en el medio terrestre que regula las condiciones del suelo.

Por otro lado, en el ambiente se encuentran otros componentes importantes en el ciclo de los nutrientes y la energía como son el almidón y la pectina. A continuación, se realiza una comparación con las cepas estudiadas.

En la figura 4.4 (Anexo 8) se manifiestan las medias comparativas entre la degradación de almidón y pectina desarrolladas por las cinco cepas bacterianas estudiadas, tomando como referencia el crecimiento de halos celulolíticos por cada tratamiento. Los resultados señalan que aquellos tratamientos que emplearon la cepa T-13 tuvieron una respuesta en formación de halos de

crecimiento mayormente favorables con los dos compuestos ensayados, en comparación con el resto de tratamientos, presentando medias cualitativas de degradación de 2,68 mm en almidón y 3,68 mm pectina.

El tratamiento con la cepa DEE-71 mostró continuidad en el proceso de degradación, para el cual se estimaron medias de halo de 1,62 mm en almidón y 3,31 mm en pectina; en el caso de la cepa T-29 ésta mostró valores que difirieron poco de los anteriores 1,31 mm almidón y 3,5 mm en pectina.

Los datos registrados por cada repetición conjuntamente con las medias de halos de degradación por cada tratamiento; aquellas cepas que mostraron menor actividad celulolítica por presencia de halos en el almidón fueron GA-52 y T-29, las cuales presentaron medias de degradación entre los dos componentes de 1,87 mm y 1,31 mm respectivamente.

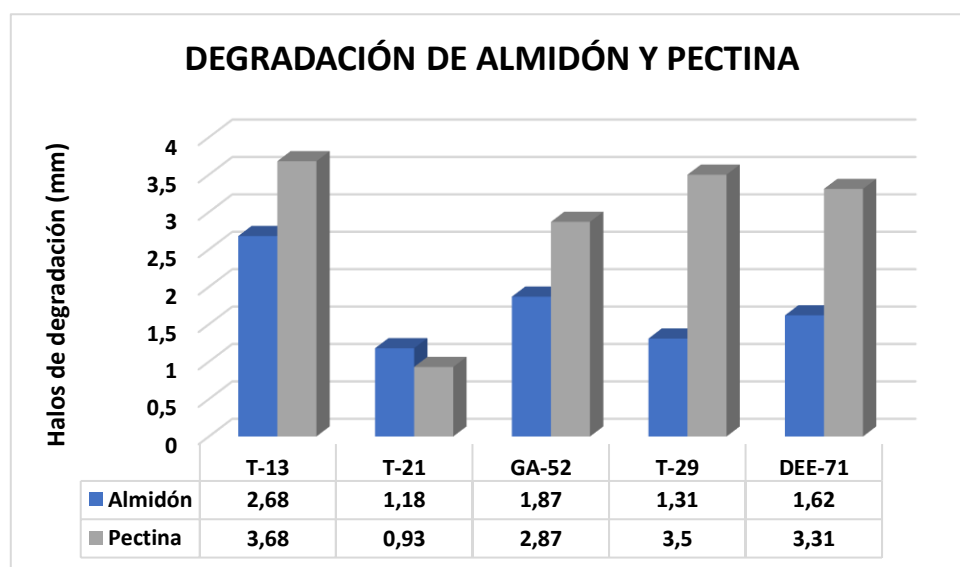


Figura 4.4. Medias comparativas entre degradación de almidón y pectina

Datos similares son evidenciados por Arellano et al. (2014) quien empleó 15 cepas de *Bacillus* sp aisladas para evaluar la capacidad de acción de la pectina el almidón obteniendo halos de crecimiento en este componente que se ubicaron entre dos y diecisiete mm de diámetro. Ruíz (2020) además indicó que es posible no observar presencia de halos de crecimiento alrededor de colonias debido a factores como el tiempo de experimentación y características propias de su sistema enzimático que no les permite la liberación de celulasas.

La cualidad de los aislados antárticos aplicados demuestran en otros estudios la capacidad que tienen para contribuir en la biodegradación de residuos naturales,

especialmente agrícolas, que contienen celulosa, almidón y pectina, al tratarse de un género que domina el ambiente terrestre, o en su efecto, que se adapta bien a él, favoreciendo así el aprovechamiento de nutrientes al suelo, incrementando la velocidad de degradación de residuos vegetales para que puedan ser absorbidos por los organismos vegetales de acuerdo a sus requerimientos (Zambrano, 2021).

Entre los componentes de residuos comunes naturales destaca la pectina, hemicelulosa y celulosa, este último habitualmente presente en la pared celular de la mayoría de tejidos vegetales terrestres, producto de la fotosíntesis (Abello, 2023). La biodegradación de celulosa es promovida principalmente por el género *Bacillus* sp, al ser la especie predominante en el suelo, conforme a ello Salazar et al. (2019) señala la producción de enzimas tipo celulasas en el proceso de degradación, a su vez que Gaviria (2023) ratifica la efectiva aplicación de este mismo género como mediador de biodegradación de celulosa, dada la intervención de metabolitos que los convierte en agentes de biocontrol y, a su vez, en fijadores de nitrógeno por la producción de ácido indol acético.

Por su parte Paillí (2012) asegura que la presencia de almidón en residuos agrícolas e industriales es considerada como un medio de aprovechamiento microbiano, para el que se han aplicado modelos de biodegradación con microorganismos vinculados a síntesis de enzimas tipo amilasas; Avalos et al. (2016) reporta elevados niveles de producción de amilasas a partir de la utilización de *Bacillus* sp como mediadores para la biodegradación de almidón.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CAPACIDAD BIODEGRADADORA DE CELULOSA

La tabla 4.1 muestra el ejemplar que presenta un segmento de las diferencias significativas determinadas en el análisis de varianza. El factor modelo evidenciado en la tabla demuestra que existen diferencias estadísticas, ya que el p-valor estimado es inferior a 0,05. Es preciso indicar que la variable halos de degradación depende de la diferenciación de los tratamientos (cepas).

El coeficiente de variación (C.V) presentado en el análisis (9,96) revela la dispersión de las medidas aritméticas sometidas al examen estadístico, lo que

revela la baja homogeneidad entre los datos y de acuerdo con Suárez (2019) es un indicador de media representativa con los valores del coeficiente de variación son ≤ 30 , con lo cual se constata mediante el análisis que las medias de los tratamientos estudiados (cepas) son particularmente representativas y los datos de las medias son comparativamente homogéneos.

En la tabla ANOVA la precisión general del modelo R^2 es elevada, con un valor de 0,83 y un A_j ajustado de 0,79. Además, en la tabla de resumen del análisis de varianza el valor de F calculada es de 18,76 y el p -valor $<0,0001$, lo que comprueba que en el modelo estudiado al menos uno de los tratamientos interviene de manera efectiva en la degradación del componente.

Con base en los factores de modelo y tratamientos, se justifica que estos son significativos al observar su p -valor $<0,0001$, lo cual exhibe la capacidad efectiva de las cepas (tratamientos estudiados) para la degradación de celulosa y supone la viabilidad del modelo para posteriores aplicaciones. De este modo, al ser p -valor inferior a 0,05, manifestándose diferencias estadísticas, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa que indica que al menos una de las cepas tiene la capacidad de degradar celulosa. A continuación, se presenta la tabla del análisis estadístico (Tabla 4.1).

Variable	N	R^2	A_j	CV
Halos de degradación (mm)	20	0,83	0,79	9,96

Factores	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media Cuadrática	F calculada	p-valor
Modelo	413,24	4	103,31	18,76	$<0,0001$
Tratamientos	413,24	4	103,31	18,76	$<0,0001$
Error	82,63	15	5,51		
Total	495,86	19			

Tabla 4.1. Resumen del análisis de varianza (ANOVA)

En concordancia con Vásquez (2019) quien obtuvo resultados del análisis de varianza con diferencias significativas entre tratamientos, indicando así existencia de actividad celulolítica en los microorganismos aislados sobre el

medio sólido carboximetilcelulosa indicando en el análisis un p-valor $<0,0001$, contrastando por tanto los resultados mostrados en el análisis de varianza del presente estudio. El mismo autor afirma que de los aislados bacterianos empleados para su investigación dio un 81, 25% actividad celulítica efectiva.

El análisis de varianza se complementa con los resultados del Test de Tukey efectuado, para el que se impuso un valor de 0,05 de significancia (alfa); 5,1246 de distancia mínima (DMS) y un error de 5,5083.

Aquí se precisa los tratamientos (cepas), las medias estadísticas, (n) que representa el tamaño de la muestra y (E.E.) el error estándar de las medias en cada uno de los tratamientos. Un indicador de que existen diferencias significativas entre los tratamientos estudiados con respecto al tiempo son las letras diferentes (A y B) que se muestran junto al error estándar, estas denotan la existencia de distinciones representativas entre cada cepa; por ello, es preciso mencionar que aquellas medias de tratamientos que contienen letras en común, en este caso (A) no muestran diferencias estadísticas significativas, mientras que, en el caso del tratamiento que muestra la letra (B), se diferencia del resto de tratamientos demostrando ser significativamente diferente.

Las medias de los tratamientos proporcionados en la tabla 4.3 denotan similitud entre la mayoría de ellos, lo que indica poca diferencia entre los promedios de halos de degradación, con diferencias estadísticas en el caso del tratamiento con la cepa T-21, para el que se observa un promedio menos elevado en comparación con los otros. Rodríguez y Torres (2018) mencionaron la existencia de homogeneidad en los datos de su experimento utilizando *Bacillus* sp como degradadores de celulosa para aprovechamiento de celulosa en compost, obteniendo medias de amplitud de halos poco variables con lo cual aseguró un 95% de confiabilidad de los microorganismos aplicados en laboratorio.

En la prueba de Tukey, los resultados correspondientes a las medias de los halos de degradación para cada una de las cepas no son significativamente diferentes en el caso de los tratamientos GA-52, T-13, T-29 y DEE-71 (Grupo A); sin embargo, los promedios de sus halos indican mayor efectividad en el proceso por mostrar valores por encima de 20 mm, los cuales se diferencian del

tratamiento T-21 (Grupo B), cuya media de degradación fue de 14,85 evidenciando el valor más bajo de degradación en el tiempo de estudio (72 horas) (Gómez, et al., 2019). A continuación, se detalla la tabla de la prueba de Tukey (Tabla 4.3).

Tratamientos	Medias	N	E.E.	
GA-52	27,38	4	1,17	A
T-13	26,93	4	1,17	A
T-29	24,75	4	1,17	A
DEE-71	23,95	4	1,17	A
T-21	14,85	4	1,17	B

Tabla 4.3. Test Tukey alfa= (0,05) DMS= 5,1246 Error: 5,5083 gl: 15

Los datos reportados por Rodríguez y Llengue (2016) son particularmente similares con los de la presente investigación. La ausencia o poca actividad demostrada por algunas cepas microbianas podría interpretarse como un indicador de la necesidad de un tiempo más prolongado para tener mayor actividad de degradación; o en su efecto, refiere Viteri et al. (2016) por la falta de algún componente que impulse la actividad enzimática de las cepas, tal como lo menciona Cruz et al. (2017) la lactosa incorporada con el componente carboximetilcelulosa estimula la liberación de enzimas coadyuvantes en el proceso de biodegradación.

De forma general, los resultados obtenidos suponen la efectividad de los tratamientos ajustados al modelo en el que el grupo A muestra diferencias estadísticamente significativas, es decir, sugiere mejores resultados en comparación al correspondiente al grupo B. No obstante, estas características pueden mostrar variabilidad, considerando las condiciones empleadas durante el estudio y el tiempo de experimentación.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- La tasa de crecimiento de las cepas Antártidas estudiadas demostraron patrones exponenciales que se ajustaron a un modelo de crecimiento efectivo transcurridas las 8 y 10 horas de incubación, considerándose un indicador positivo ante el suministro de carboximetilcelulosa en cada uno de los tratamientos; aquellos que mostraron mejores respuestas cualitativas por crecimiento de halos de degradación fueron las cepas GA-52 y T-13.
- Se obtuvieron valores máximos en las medias de crecimiento de 27,38 mm (GA-52) y 26,93 mm (T-13), respectivamente, demostrando un mejor índice de degradación de celulosa en 72 horas de estudio atribuido al desarrollo de mejores respuestas enzimáticas y adaptabilidad de las cepas al sustrato.
- Los consorcios microbianos celulolíticos exhibieron medias comparativas entre los compuestos de residuos vegetales pectina y almidón que resultaron oportunos en su totalidad, favoreciendo el proceso de biodegradación, con lo cual se demostró la aplicabilidad como mediadores degradativos en procesos agrícolas por la actividad celulolítica evidenciada, situando al tratamiento T-13 como aquel con mejor desarrollo de respuestas enzimáticas ante ambos componentes, en comparación con los otros tratamientos.
- Los resultados de este estudio proporcionan evidencia sólida de la eficacia de los microorganismos extremófilos del género *Bacillus* sp en la degradación de la celulosa. Nuestros hallazgos sugieren que estas cepas tienen un potencial significativo para ser utilizadas en la biodegradación de residuos agrícolas y la producción de bioproductos. Con base en ello, se acepta la hipótesis alternativa que indica al menos una de las cepas de *Bacillus* sp tiene la capacidad de degradar celulosa y se rechaza la hipótesis nula que señala las bacterias aisladas Antártidas no tienen la capacidad de degradar este componente.

5.2. RECOMENDACIONES

- Realizar evaluaciones periódicas de crecimiento de halos con la finalidad de obtener información precisa sobre los patrones de crecimiento en un determinado tiempo.
- Evaluar el proceso de degradación de celulosa utilizando consorcios microbianos que incluyan hongos conjuntamente con las cinco cepas de *Bacillus* estudiadas, a fin de determinar la viabilidad de cultivos mixtos antártidos.
- Utilizar métodos cuantitativos para establecer comparaciones entre las concentraciones inicial y final del sustrato carboximetilcelulosa.
- En futuros estudios, establecer porcentajes de biodegradación de celulosa, asociados a diferentes intervalos de tiempo con el fin de proporcionar datos más precisos para próximas investigaciones, explorar la aplicación de estas cepas en escenarios prácticos de gestión de residuos agrícolas y producción industrial u otros materiales.

BIBLIOGRAFÍA

- Abello, L. (2023). *Universidad Politécnica de Catalunya*. Estudio para el desarrollo de nuevos materiales compuestos por textiles de fibras naturales con matriz orgánica.
- Aguilar, P. (2019). *Universidad de las Américas*. Análisis comparativo del efecto de extracto natural de eneldo y té verde sobre la estabilidad oxidativa entre carne de res y carne de pollo: <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/11782/1/UDLA-EC-TMACSA-2019-09.pdf>
- Aktayeva, S., Baltin, K., Kiribayeva, A., Akishev, Z., Silayev, D., Ramankulov, Y., y Khasenov, B. (2022, febrero 4). Aislamiento de *Bacillus* sp A5.3 Cepa con actividad queratinolítica. National Library of medicine. 10.3390/biology11020244
- Alcívar, M., y Vera, V. (2013). Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López" Aislamiento De Bacterias Celulolíticas A D. Repositorio ESPAM. <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/192/1/TMA56.pdf>
- Alvarado, J., Estela, R., López, Y., Santamaría, N., Mori, R., & Gutiérrez, M. (2019). Vista de Aislamiento Y Evaluación De La Actividad Celulolítica De Bacterias Rizosféricas Del Distrito De Bagua, Amazonas Rebiol. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/faccbbiol/article/view/2732/2819>.
- Antonieta, M., y Palma, R. (2018). Obtención de bioplásticos a partir de desechos agrícolas. Una revisión de las potencialidades en Ecuador. Redalyc. <https://www.redalyc.org/journal/933/93368279005/html/>.
- Arellano, G. (2021). Universidad Agraria Del Ecuador Aislamiento De Bacterias Celulolíticas A Dos Profundidades En Una Plantación De Cacao. Cia - Centro de Información Agraria. <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/ARELLANO%20TOMAL%20C3%81%20OG%20C3%89NESIS%20KATHERIN>.

- Arellano, J., Ilich, S., Salazar, M., Rodríguez, I., Alarcón, W., y Gasco, F. (2014). Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad y estabilidad de pectinasas producidas por *Bacillus* spp. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*, 33-41.
- Avalos, R., Llengue, L., y Segura, R. (2016). Aislamiento y selección de cultivos nativos de *Bacillus* sp. productores de amilasas a partir de residuos amiláceos del mercado La Hermelinda, Trujillo, Perú. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*, 16-26.
- Bernal, P. (2017). *La investigación en ciencias sociales*. Universidad Piloto de Colombia.
- Bilal, M., Wang, Z., Cui, J., Románholo, L., Bharagava, R., y Iqbal, H. (2020). Environmental impact of lignocellulosic wastes and their effective exploitation as smart carriers - A drive towards greener and eco-friendlier biocatalytic systems. *PubMed*.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32199388/>.
- Bocanegra, S. (2021). Documental sobre bioformulaciones a base de *Bacillus* sp. para el control biológico de *Botrytis cinerea*. Repositorio: <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/2840/Sara%20Natalia%20Bocanegra%20Dur%C3%A1n%20Presentaciones%20Sara%20Bocanegra%20FINAL.pdf?sequence=1>
- Borus, K. (2021). Hidrólisis química de residuos agrícolas para obtención de azúcares reductores: revisión bibliográfica de procesos. *Zaguan*.
<https://zaguan.unizar.es/record/110068/files/TAZ-TFG-2021-4916.pdf?version=1>.
- Burgos, R., Argüelles, V., y Palacios, R. (2021). *Etapas del método estadístico*. Repositorio. <file:///C:/Users/TECO%20TINTAS/Downloads/6703-Manuscrito-35151-2-10-20201201>.
- Bruslind, L. (2022). *Microbiología*. Oregon: Oregon State University.

- Cañar, J., y Pardo, J. (2021). Obtención de una película de almidón dosificado con BHET catalizado con óxido de metales, mediante glicólisis de PET. Repositorio UPS. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/20057/4/UPS-CT009016.pdf>
- Castro, H., Contreras, E., y Rodríguez, J. (2020). Análisis ambiental: impactos generados por los residuos agrícolas en el municipio de El Dorado (Meta, Colombia). *Espacio*, 41(38). 10.48082.
- Cárdenas, G., Vázquez, P., Arzate, G., Jarquín, L., y Portilla, O. (2014). Degradación de películas de celulosa residual usando celulasas de *Trichoderma reesei* ATCC 26921. Ecorfan: https://www.ecorfan.org/handbooks/Ciencias%20de%20la%20Ingenieria%20y%20Tecnologia%20T-V/Articulo_5.pdf
- Cerda, L. (2016, Julio). Enzimas modificadoras de la pared celular vegetal. Celulasas de interés biotecnológico papelerero. TDX. <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/398119/LCM>.
- Cerrón, M., y Rubén, V. (2018). Recuperación de suelos degradados por contaminación con metales pesados en el valle del Mantaro mediante compost de Stevia y fitorremediación. Universidad Nacional Agraria La Molina. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/3770>
- Chávez, M. (2019). Análisis gravimétrico. Repositorio. <https://repositorio.une.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14039/5330/MONOGRAF%C3%8DA%20-%20CHAVEZ%20LEIVA%20MARIANO%20-%20FAC.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Crespo, A. (2021). Biodegradación de partículas de microplástico de polietileno a partir de un consorcio microbiano aislado del contenido intestinal de la larva *Galleria mellonella* L. Dspace: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/20234/1/UPS-CT009094>.

- Cruz, N., Castellanos, D., y Argüello, H. (2017). Aislamiento y caracterización de microorganismos xilanolíticos, celulolíticos, proteolíticos y aminolíticos, provenientes de dos tipos de compost. *Revista Agricultura, Ambiente y Sociedad*, 1-15.
- Cortes, W. (2011). Materiales Lignocelulosicos Como Fuente De Biocombustibles Y Productos Químicos. Esufa. file:///C:/Users/TECO%20TINTAS/Downloads/pcadena12,+materiales+lignocelulosicos.
- Costanzo, M., Hou, J., Messier, V., Nelson, J., Rahman, M., Vander, B., . . . Ross, C. (2021). Impactos ambientales en las redes genéticas. *Science*, 67-89.
- Cuervo, J. (2020). Universidad Javeriana. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales.
- Cuervo, S. (2021). Uso pedagógico de los medios de comunicación en la enseñanza de las ciencias: Discurso sobre las bacterias Bacillus. Universidad Nacional de Colombia. <http://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/81505>
- De La Rosa, N., Gonzáles, G., Figueroa, J., Gutierrez, M., Octaviano, C., Ramírez, I., y Mugica, V. (2018). Emission factors of atmospheric and climatic pollutants from crop residues burning. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29652225/>
- Delgado, J. (2021). Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla. Microorganismos extremófilos. Vida microbiana más allá de sus condiciones óptimas.
- Detener, J., Remmond, C., Machado, C., Harakat, D., y Besaurio, L. (2022). Co-elicitation of lignocellulolytic enzymatic activities and metabolites production in an *Aspergillus-Streptomyces* co-culture during lignocellulose fractionation. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35243445/>
- Díaz, K. (2020). Análisis de la actividad enzimática de hemicelulasas de dos razas de *Colletotrichum lindemuthianum* con diferentes sustratos

naturales. Biblioteca Virtual UMSNH.
http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/1968

Fernández, J. (2015). *Biomasa La Gran Esperanza De Las Renovables*. Universidad Pontificia Comillas.

Frackowian, J., Zerosznska, K., Banaszczyk, J., Jedrzejczak, G., Stachula, A., y Skowron, P. (2018). The promises and risks of probiotic *Bacillus* species. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30521647/>

Gabriel, J., Castro, C., Valverde, Y., y Soledad, B. (2017). *Diseños experimentales: Teoría y práctica para experimentos agropecuarios*. Repositorio.
<file:///C:/Users/TECO%20TINTAS/Downloads/Diseosexperimentales-experimentosagropecuarios>.

Galván, B. (2018). *Actividad Celulolítica De Hongos De Corteza*. RI UAEMex. <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/95216/Tesis%20Berenice%20Galvan%20Quintero%20Actividad%20Celulol%C3%ADtica.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Garrido, M. (2022). *Enzimas microbianas activas sobre polisacáridos estructurales de pared celular vegetal: producción recombinante y caracterización*. Universidad De Buenos Aires. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n7084_Garrido.

Gashaw, M. (2020). *Hemicelulasas activas alcalinas*. National Center for biotechnology Information. 10.1007/10_2019_101.

Gaviria, C. (2023). *Universidad Libre Seccional Pereira. Aislamiento y caracterización de aislados del género *Bacillus* spp. con potencialidades de bioestimulación del crecimiento vegetal de cultivos de plátano*: <https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/25702/Camila%20Gaviria.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

- Gómez, D., Salazar, J., y Vargas, A. (2019). Impacto del desbalance en los tamaños de muestra por tratamiento sobre el desempeño de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. *Revista de Estadística*, 38-44.
- Ghio, S. (2018). Prospección y caracterización de bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas. Biblioteca Digital Exactas. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n6385_Ghio.pdf
- Grijalva, N. (2017). Degradación de residuos vegetales mediante inoculación con cepas microbianas (Vegetal waste degradation by microbial strains inoculation). Universidad Tecnológica Equinoccial, 4(Enfoque UTE), 1-13. [file:///C:/Users/User/Downloads/21-Article%20Text-85-1-10-20130627%20\(1\).](file:///C:/Users/User/Downloads/21-Article%20Text-85-1-10-20130627%20(1).)
- Gupta, S. (2019). Agriculture Crop Residue Burning And Its Consequences On Respiration Health Of School-Going Children. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31523702/>
- Gutiérrez, A., Guirola, C., Armas, A., Albornas, Y., y Villanueva, G. (2020). Valorización de la lignina en el concepto de biorrefinería. Scielo, 3. ISSN 2223-486.
- Guzmán, Á., Zambrano, D., Rivera, R., Rondón, A., Laurencio, M., y Pérez, M. (2015). Aislamiento y selección de bacterias autóctonas de Manabí-Ecuador con actividad celulolítica. SciELO Cuba. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362015000100001
- Haseeb, M., Abid, M., Faisal, M., Yan, T., Ajtar, S., y Adnan, M. (2022). Environmental and Health Impacts of Crop Residue Burning: Scope of Sustainable Crop Residue Management Practices. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35457622/>
- Hernández, D. (2017). Universidad Tecnológica Equinoccial. Análisis de la eficiencia de la planta de tratamiento de aguas residuales en el Coca para la empresa Vacuumtruck Services.

- Hernández, D., Ferrera, R., y Alarcón, A. (2019). Importancia agrícola, biotecnológica y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural y Animal Science* , 98-112.
- Hernández, S. (2020). Medidas de dispersión y coeficiente de variación. *Escuela Superior de Tepeji del Río*, 7-15.
- Herrera, L. (2015). Microorganismos productores de enzimas hidrolíticas provenientes del oligoqueto antártico, *Grania* sp. Instituto Antartico Uruguayo. <http://www.iau.gub.uy/wp-content/uploads/2018/11/Herrera-2015.pdf>
- Intriago, L., y Saltos, Z. (2020). Evaluación De La Calidad De Agua Mediante La Ictiofauna Como Bioindicador En El Humedal El Tabacal - Rocafuerte. Repositorio ESPAM. <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1323/1/TTMA05D.pdf>
- Jerez, C. (2021). "Obtención Y Caracterización De Enzimas Celulolíticas Y/O Lignocelulolíticas De Hongos Saprófitos Ecuatorianos. Repositorio de la Universidad Internacional SEK Ecuador. <https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/4240/1/Jerez%20V enegas%2C%20Cecilia.pdf>
- Jiménez, R. (2016). Indicadores de calidad y eficiencia de los servicios hospitalarios. *Revista Cubana de Salud Pública*, 36-45.
- Kopittke, P., Menzies, N., Wang, P., McKenna, B., y Lombi, E. (2022). Soil and the intensification of agriculture for global food security. *Environment international*. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0160412019315855?token=008AD504004116FA1F9196402F1E6784FCF28BCBCEEC3AE181B11CDF360AA3C613C4E181B71BC4126CEF65032611DD55&originRegion=u s-east-1&originCreation=20221226220725>
- Kumar, R., Butreddy, A., Kommineni, N., Reddy, P., Bunekar, N., Sarkar, C., Dutt, S., y Mishra, V. (2021). Lignin-Drug/Gene Delivery and Tissue

Engineering Application | IJN. Dove Medical Press.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S303462>

Lamont, R., Hajishengallis, G., y Jenkinson, H. (2015). Microbiología e inmunología oral. México: El Manual Moderno.

Lama, D. (2017). Aislamiento y caracterización de bacterias con potencial producción de biosurfactantes para la degradación de aceite de cocina industrial. *Universidad de los Andes - Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental*, 1-13.

Lázaro, B. (2018). "Evaluación De La Capacidad De Degradación De Residuos Agrícolas Utilizando Bacterias Celulolíticas Y Xilanolíticas, Como. Repositorio UNASAM.
http://repositorio.unasam.edu.pe/bitstream/handle/UNASAM/2012/T033_43969115_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y

León, A. (2016). Benemérita Universidad Autónoma De Puebla Facultad De Ingeniería Química Colegio De Ingeniería En Alimentos "Extracción. Repositorio Institucional BUAP.
<https://repositorioinstitucional.buap.mx/bitstream/handle/20.500.12371/14033/178216TL.pdf?sequence=1>

Magagula, P., Masemola, C., Ballim, M., Moloto, N., y Linganiso, E. (2022). Lignocellulosic Biomass Waste-Derived Cellulose Nanocrystals and Carbon Nanomaterials: A Review. PubMed.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35457128/>

Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. (2017). Ecuador lucha contra la desertificación y degradación de la tierra – Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. <https://www.ambiente.gob.ec/ecuador-lucha-contra-la-desertificacion-y-degradacion-de-la-tierra/>

Miranda, A. (2019). Producción de celulasas de *Aspergillus niger* ITV-02. Secretaría de Educación Pública.

<https://rinacional.tecnm.mx/jspui/bitstream/TecNM/2605/1/Tesis%20final%20Alejandra%20Miranda%20Sosa%20>.

Miranda, E., Moeller, G., Buitrón, G., y Garzón, M. (2017). Obtención de peroxidases a partir de un residuo industrial de soya para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil. ECORFAN. https://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournals/Ciencias_Naturales_y_Agropecuarias/vol4num12/Revista_de_Ciencias_Naturales_y_Agropecuarias_V4_N12_3.

Monsalves, M. (2021). Bacterias degradadoras de tintas de impresión y celulosa: Una alternativa biotecnológica para tratar los residuos generados en el proceso de destintado de papel reciclado. Repositorio: <http://repositorio.udec.cl/bitstream/11594/6266/1/Tesis%20Bacterias%20degradadoras%20de%20tintas%20de%20impresi%C3%B3n%20y%20celulosa.Image.Marked>.

Montalvo, C. (2010). Microscopía. Facmed. http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/2_microscopia.pdf

Moreno, L., Muñoz, E., y Medina, O. (2018). Revalorización De Los Residuos De Biomasa Para La Hemisíntesis De Celulosa Dialdehído Asistida Por Microondas. [repositorio. https://repositorio.uptc.edu.co/bitstream/001/5646/1/Revalorizacion_de_los_residuos_de_biomasa_para_la_hemisintesis_de_celulosa_dialdehido_asistida_por_microondas.pdf](https://repositorio.uptc.edu.co/bitstream/001/5646/1/Revalorizacion_de_los_residuos_de_biomasa_para_la_hemisintesis_de_celulosa_dialdehido_asistida_por_microondas.pdf)

Nanda, A., Mohapatra, B., Kumar, A., Kumar, A., y Kumar, A. (2021). Multiple comparison test by Tukey's honestly Multiple comparison test by Tukey's honestly control type I error. *International Journal of Statistics and Applied Mathematics* , 59-65.

Oliart, R., Manresa, Á., y Sánchez, M. (2017, diciembre 3). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. SciELO México. Retrieved December 26, 2022.

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582016000200079.

- Paillié, M. (2012). Universidad Javeriana. Determinación de la actividad celulolítica, ligninolítica y aminolítica de actinobacterias aisladas de suelo rizosférico de trébol blanco.
- Parra, J., y Vergara, V. (2019). Índice de crecimiento absoluto (ICA) para diferentes medios de cultivo de origen natural con la bacteria *Enterobacter* spp. Repositorio Institucional Universidad Libre Pereira, 1-7.
- Pazos, C. (2022). Evaluación De La Degradación De Polietileno De Baja Densidad Por Acción De Una Bacteria Antártica. Repositorio UTN. <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/13331/2/03%20BIO%200046%20TRABAJO%20DE%20GRADO.pdf>
- Pedraza, L., Hernestp, C., y Uribe, D. (2019). Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas m. SciELO Colombia. <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v25n1/0120-548X-abc-25-01-112.pdf>
- Peralta, W., y Medina, C. (2021). El Papel de los Residuos Agrícolas en la Extracción de Nanocristales de Celulosa | Revista Bases de la Ciencia. Revistas Científicas. <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/Basedelaciencia/article/view/3009>
- Plaza, J. (2019). Degradación De Celulosa De Pañales Desechables Usados Con *Bacillus* Sp. Facultad De Ingeniería Y Ciencias Aplicadas. <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/10773/4/UDLA-EC-TIAM-2019-06.pdf>
- Quiroz, R., y Folch, J. (2011). Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. *Elfosscientiae*. <https://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Apl/2011/28/4/BA002804RV194-204.pdf>
- Ramírez, P., y Cocha, J. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de

- la actividad celulolítica. SciELO Perú.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=s1727-99332003000100008&script=sci_arttext
- Ramirez, J., y Uscanga, I. (2020). Manual de laboratorio de Microbiología Médica. Universidad Veracruzana.
<https://www.uv.mx/qfb/files/2020/09/Guia-de-Microbiologia-Medica-Laboratorio.pdf>
- Reyes, A., Noriega, L., Serafín, A., Sánchez, L., Puy, M., y Mendoza, L. (2020). Géneros bacterianos extremófilos con potencial aplicación biotecnológica. *Jóvenes de la Ciencia*, 1-6.
- Rivera, R. (2020). Diversidad filogenética: una forma de medir la historia evolutiva de la biodiversidad. CICY.
https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2020/2020-12-10-Rivera-Martinez-Diversidad-filogenetica.pdf
- Rizo, M., Vuelta, D., y Lorenzo, A. (2017). Agricultura, Desarrollo Sostenible, Medioambiente, Saber Campesino Y Universidad. Redalyc. Retrieved November 21, 2022. <https://www.redalyc.org/pdf/1813/181351615008.pdf>
- Rodríguez, B., y Torres, F. (2018). Evaluación de *Penicillium* sp como degradador de celulosa en el proceso de compostaje de residuos orgánicos de origen vegetal en la localidad 20 de Bogotá. 1-11.
- Rodríguez, L., y Llengue, L. (2016). Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*, 19-28.
- Rodríguez, P., y Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. Medigraphic. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>
- Rojas, J. (2019). Repositorio Institucional de Producción Científica de la Universidad de Jaen: Producción de bioetanol de segunda generación a partir de bagazo de cerveza. RUJA.
<https://ruja.ujaen.es/handle/10953/1140>

- Ruíz, Y. (2020). Centro de Investigaciones en ciencias microbiológicas - Laboratorio microbiología de suelos. "Degradación de residuos orgánicos domésticos a través de un consorcio bacteriano para la formación de una composta.
- Sáez, A. (2016). Proteasas alcalinas de una cepa nativa de *Bacillus* sp alcalofílico. *Ingeniería y Ciencia*, 29-38.
- Salazar, I., Zúñiga, A., Naquiche, J., Ferrer, C., y Castellanos, R. (2019). Caracterización enzimática de una celulasa producida por *Bacillus* sp. (GCB-13) para la degradación de sustratos lignocelulósicos. *Ciencia y Desarrollo*, 61-67.
- Sanabria, D. (2016). Universidad Nacional de Colombia - Interfacultades de Microbiología. Design of a culture medium for isolation and growth of the hydrogen-producing bacterium *Ruminococcus albus*.
- Sanz, E., y Sánchez, M. (2022). Biomasa biocombustible y sostenibilidad. Researchgate.
- Secretaría Nacional de Planificación. (2021). Secretaria Nacional de Planificación y Desarrollo (SENPLADES) de Ecuador. Observatorio Regional de Planificación para el Desarrollo. <https://observatorioplanificacion.cepal.org/es/instituciones/secretaria-nacional-de-planificacion-y-desarrollo-senplades-de-ecuador>
- Sema, J., y Ramos, M. (2018, June 26). Simulación de un proceso de extracción hidrotermal de hemicelulosa utilizando Aspen Plus con Aspen Polymers. UVaDOC Principal. <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/31470/TFG-I-958.pdf?sequence=1>
- Shafi, J., Hui, T., y Mingshan, J. (2017). Bacilo especies como armas versátiles para fitopatógen. *Biología Y Equipos Biotecnológicos*. <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/13102818.2017.1286950?needAccess=true&role=button>

- Silva, O., y Vázquez, R. (2018). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California Maestría en Ciencias en Nanociencias. Repositorio CICESE. https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/2519/3/Tesis_Omar_Silva_Torres_22_oct_2018.pdf
- Solís, C. (2019). PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA PEROXIDASA DE ZANAHORIA. Portada TFG. https://tauja.ujaen.es/bitstream/10953.1/10442/1/TFG_Solis_Molero_Carmen_Maria.pdf
- Suárez, M. (2019). Gráficos de control para el coeficiente de variación multivariante: estado actual y análisis comparativo. *Universidad Politécnica de Valencia - España*, 6-13.
- Trujano, F., Ríos, B., Jaramillo, A., Ladino, L., y Raga, G. (2021, January 4). The impact of biomass burning emissions on protected natural areas in central and southern Mexico. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33394413/>
- Valenciaga, D., y Chongo, B. (2018). Los sistemas silvopastoriles y su contribución al medio ambiente. *Cubana de Ciencia Agrícola*, 45, 107-115. ISSN (0034-7485)
- Van, A., LeVeque, R., Martin, N., y DiRita, V. (2023). Curvas de crecimiento: Generación de curvas de crecimiento utilizando unidades formadoras de colonias y mediciones de densidad óptica. *Journal of Visualized Experiments*.
- Vargas, J. (2018). Diseño y optimización de un medio de cultivo para producción de esporas de *Bacillus* sp. Repositorio Institucional - Pontificia Universidad Javeriana. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/35019/Tesis%20pregrado%20Juan%20David%20Vargas%20Mendoza%202018.pdf?sequence=4&isAllowed=y>

- Vasić, K., Knez, Z., y Leitgeb, M. (2021). Bioethanol Production by Enzymatic Hydrolysis from Different Lignocellulosic Sources. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33535536/>
- Vásquez, E. (2019). Producción de celulasas en fermentación sumergida utilizando microorganismos aislados de *Moringa oleifera* con potencial aplicación en procesos biotecnológicos. *Centro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional Unidad Sinaloa*.
- Velázquez, L., López, L., Bolaños, E., y Illescas, O. (2020). Simulación dinámica del proceso de remoción de hemicelulosa y producción de xilosa a partir de residuos agroindustriales. Researchgate. https://www.researchgate.net/profile/Luis-Velazquez-Herrera/publication/348551093_simulacion_dinamica_del_proceso_de_remocion_de_hemicelulosa_y_produccion_de_xilosa_a_partir_de_residuos_agroindustriales/links/60039939299bf140889ecb0a/simulacion-dinamica-de
- Villarreal, M., Villa, E., Cira, L., Estrada, M., Parra, F., y Santos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *SciELO México*. ISSN (0185-3309)
- Cruz, N., Castellanos, D., y Argüello, H. (2017). Aislamiento y caracterización de microorganismos xilanolíticos, celulolíticos, proteolíticos y aminolíticos, provenientes de dos tipos de compost. *Revista Agricultura, Ambiente y Sociedad*, 1-15.
- Gómez, D., Salazar, J., y Vargas, A. (2019). Impacto del desbalance en los tamaños de muestra por tratamiento sobre el desempeño de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. *Revista de Estadística*, 38-44.
- Hernández, S. (2020). Medidas de dispersión y coeficiente de variación. *Escuela Superior de Tepeji del Río*, 7-15.
- Nanda, A., Mohapatra, B., Kumar, A., Kumar, A., y Kumar, A. (2021). Multiple comparison test by Tukey's honestly Multiple comparison test by Tukey's

- honestly control type I error. *International Journal of Statistics and Applied Mathematics* , 59-65.
- Rodriguez, B., y Torres, F. (2018). Evaluación de *Penicillium* sp como degradador de celulosa en el proceso de compostaje de residuos orgánicos de origen vegetal en la localidad 20 de Bogotá. 1-11.
- Rodríguez, L., y Llengue, L. (2016). Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*, 19-28.
- Suárez, M. (2019). Gráficos de control para el coeficiente de variación multivariante: estado actual y análisis comparativo. *Universidad Politécnica de Valencia - España*, 6-13.
- Vásquez, E. (2019). Producción de celulasas en fermentación sumergida utilizando microorganismos aislados de *Moringa oleifera* con potencial aplicación en procesos biotecnológicos. *Centro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional Unidad Sinaloa*.
- Viteri, P., Castillo, D., y Viteri, S. (2016). Capacidad y diversidad de bacterias celulolíticas aisladas de tres hábitats tropicales en Boyacá, Colombia. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 362-367.
- Yacuzzi, S., Poncio, C., Ribota, P., Balsamo, N., Moyano, E., y Falcon, H. (2019). Biomasa Lignocelulósica: Una Plataforma Alternativa y Sustentable a los Recursos Fósiles. SEDICI. <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/118026/P%C3%B3ster.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Zambrano, Á. (2021). Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López". Evaluación in vitro de cepas de *Bacillus* sp, aislados de la Antártida, como promotoras de crecimiento en *Zea mays* L.
- Zamora, L. (2015). Universitat de Girona. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas.

ANEXOS

Anexo 1. Reactivación de *Bacillus* sp.



T-13



T-21



T-29



DEE-71

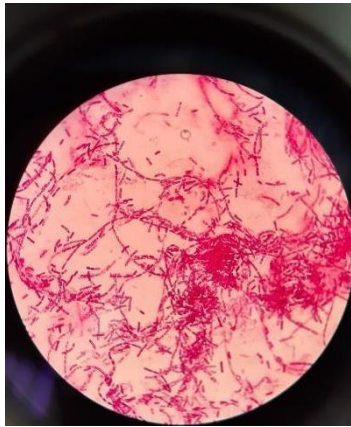


GA-52



Anexo 2. Tinción de Gram.

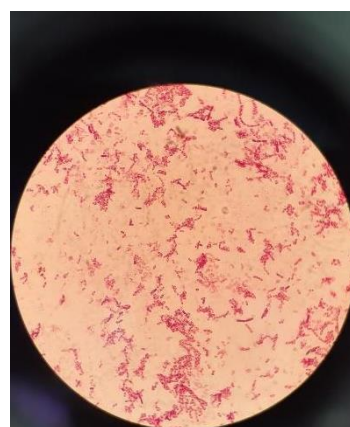
T-13



T-21



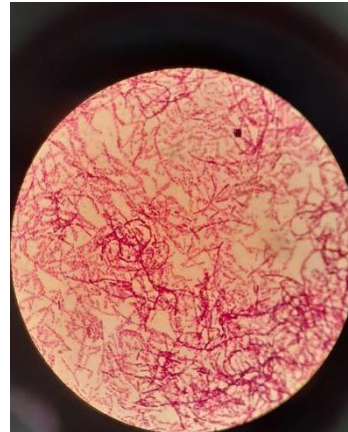
T-29



DEE-71

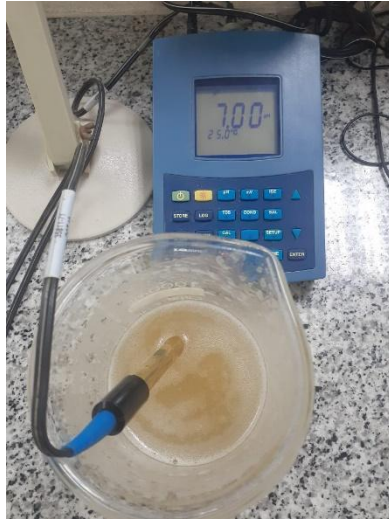


GA-52



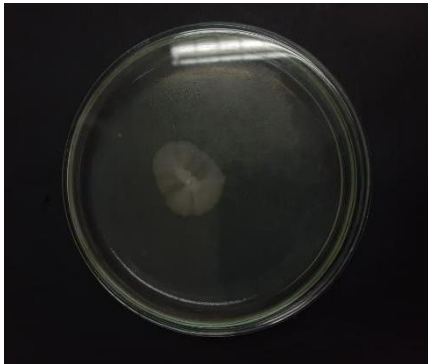
Anexo 3. Preparación de medios de cultivo.





Anexo 3. Crecimiento de halo en medio enriquecido

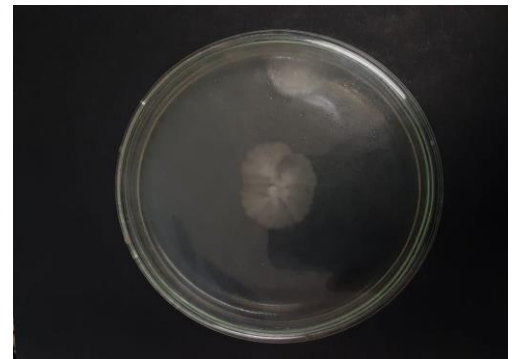
T-13



T-21



T-29



DEE-71

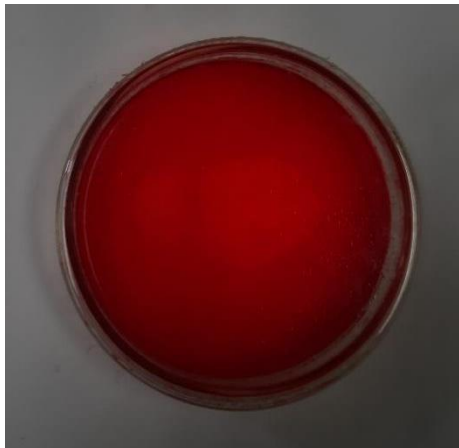


GA-52

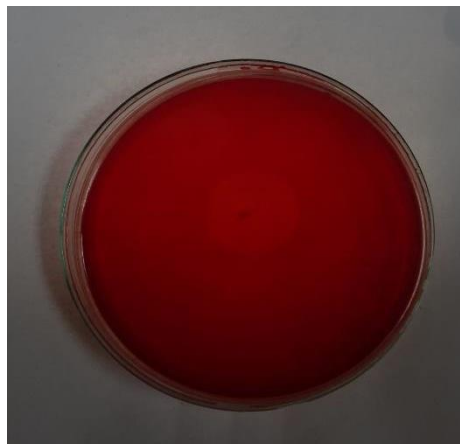


Anexo 4. Aplicación de técnica Rojo Congo

GA-52



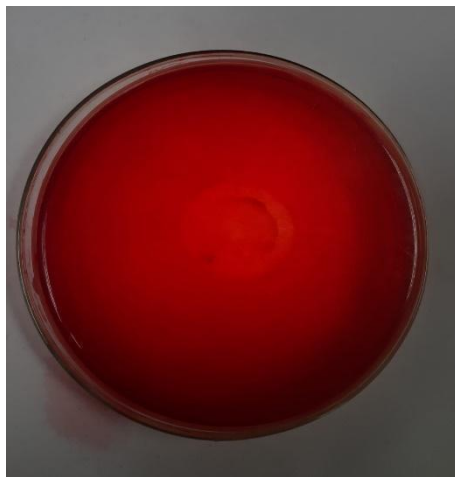
T-21



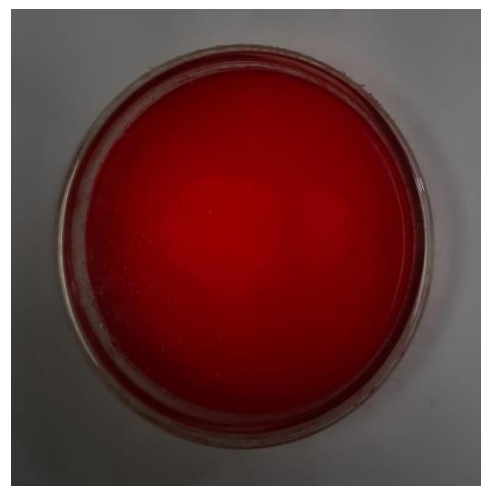
T-29



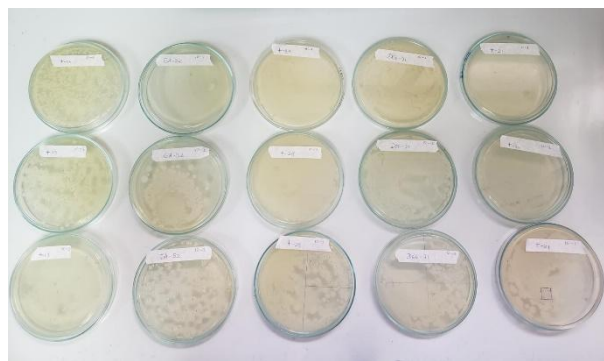
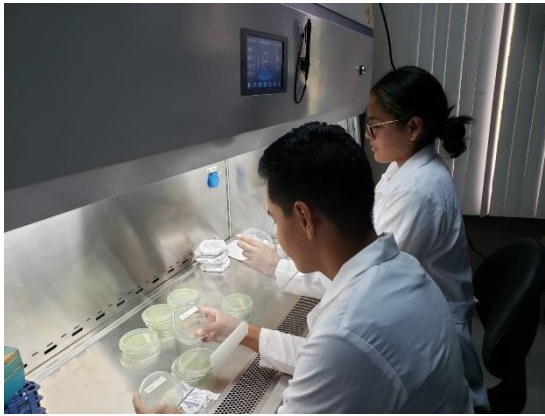
DEE-71



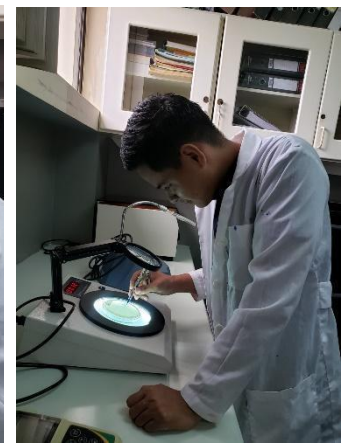
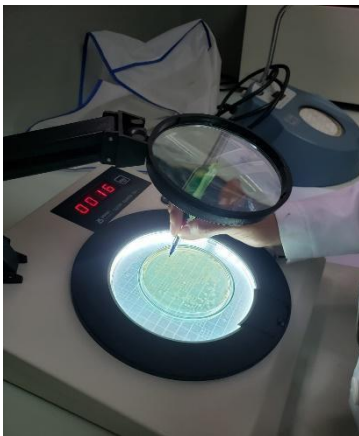
T-13



Anexo 5. Siembra y crecimiento de colonias por cada cepa



Conteo de colonias



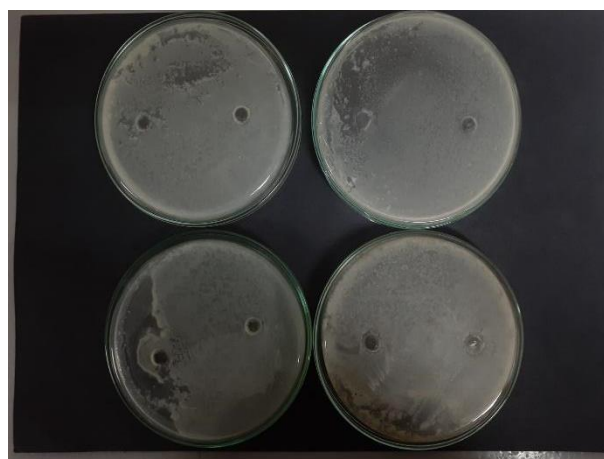
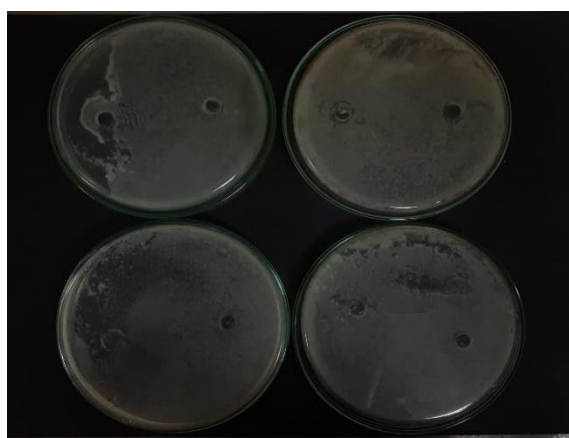
Determinación de la tasa de crecimiento de las cepas de *Bacillus* en los tiempos de estudio.

TASA DE CRECIMIENTO					
HORAS	GA-52	T-29	T-21	T-13	DEE-71
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
15	1,86E+06	5,60E+06	8,00E+06	8,00E+04	4,96E+06
24	2,27E+06	6,48E+06	1,06E+07	1,40E+05	6,40E+06

Anexo 6. Estimación del porcentaje de eficiencia de tratamientos de *Bacillus* sp

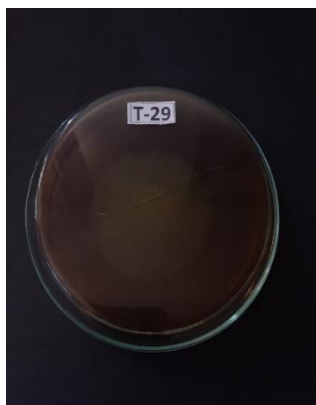
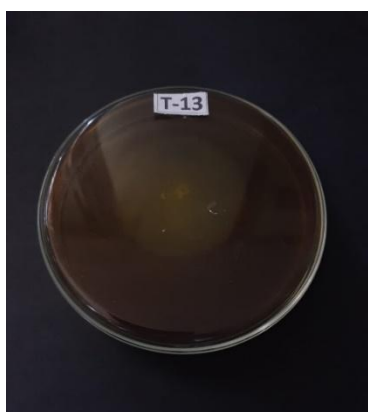
Eficiencia de tratamientos			
Cepas	(Ci /Cf)	Sin Notación C.	Eficiencia Trat%
GA-52	8,19E-01	0,819	81,9
T-29	8,64E-01	0,864	86,4
T-21	7,55E-01	0,755	75,5
T-13	5,71E-01	0,571	57,1
DEE-71	7,75E-01	0,775	77,5

Anexo 7. Consorcio bacteriano con las mejores bacterias degradadoras

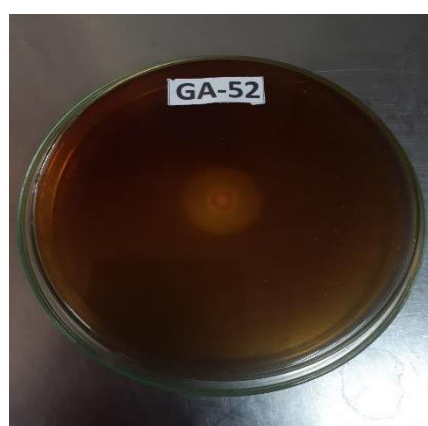
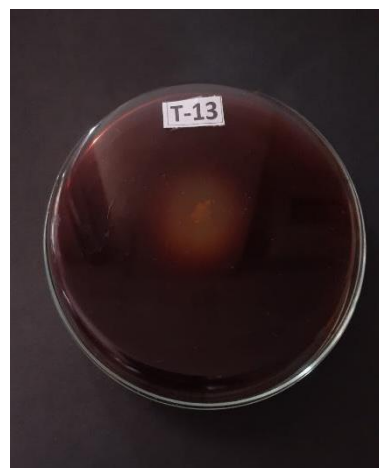
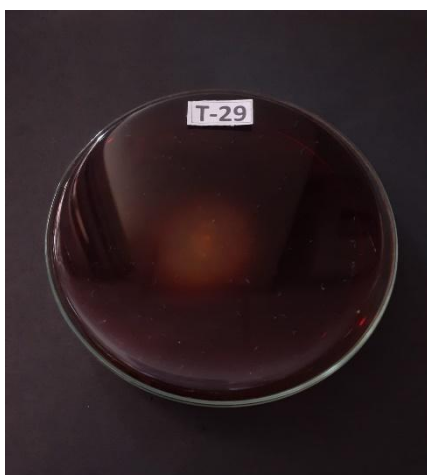
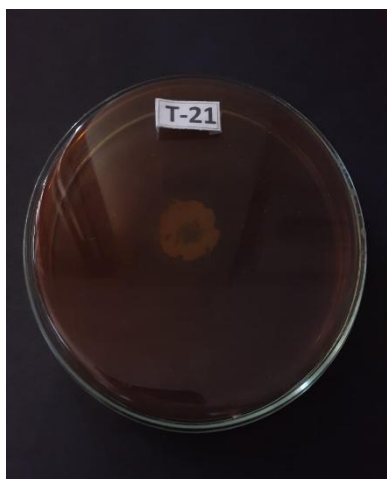


Anexo 8. Degradación de almidón y pectina por cada cepa de *Bacillus* sp

Pectina



Almidón



Degradación de almidón y pectina	
Almidón	Media de degradación (mm)
T-13	2,68
T-21	1,18
GA-52	1,87
T-29	1,31
DEE-71	1,62
Pectina	Media de degradación (mm)
T-13	3,68
T-21	0,93
GA-52	2,87
T-29	3,5
DEE-71	3,31
Medias de degradación por cepa para los 2 compuestos (mm)	
T-13	3,18
T-21	1,06
GA-52	2,37
T-29	2,41
DEE-71	2,47

Anexo 9. Análisis de la varianza y Test de Tukey en degradación de celulosa efectuado por las cepas de *Bacillus* sp

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	Aj	CV
Halos de degradación (mm)	20	0,83	0,79	9,96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	413,24	4	103,31	18,76	<0,0001
Tratamientos	413,24	4	103,31	18,76	<0,0001
Error	82,63	15	5,51		
Total	495,86	19			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,12462

Error: 5,5083 gl: 15

<u>Tratamientos</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
GA-52	27,38	4	1,17	A
T-13	26,93	4	1,17	A
T-29	24,75	4	1,17	A
DEE-71	23,95	4	1,17	A
<u>T-21</u>	<u>14,85</u>	<u>4</u>	<u>1,17</u>	<u>B</u>

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)