

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE CELULASAS EN INTESTINO DE LOMBRIZ DE TIERRA Y SU ACTIVIDAD CATALÍTICA SOBRE RESIDUOS VEGETALES CON DIFERENTE PROPORCIÓN C/N”

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORES

PÉREZ MONTES MARÍA TERESA

TERRONES ZAVALA MARTHA FERNANDA

ASESOR

Blgo. MBlgo. Villanueva Carlos José Manuel

Nvo. Chimbote, Perú

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE CELULASAS EN INTESTINO DE LOMBRIZ DE TIERRA Y SU ACTIVIDAD CATALÍTICA SOBRE RESIDUOS VEGETALES CON DIFERENTE PROPORCIÓN C/N”

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORES

PÉREZ MONTES MARÍA TERESA
TERRONES ZAVALA FERNANDA

Revisado y Aprobado por el Asesor


.....

Blgo. MBlgo. Villanueva Carlos José Manuel

Nvo. Chimbote, Perú, 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



**“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE
BACTERIAS PRODUCTORAS DE CELULASAS EN INTESTINO DE LOMBRIZ DE
TIERRA Y SU ACTIVIDAD CATALÍTICA SOBRE RESIDUOS VEGETALES CON
DIFERENTE PROPORCIÓN C/N”**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN
BIOTECNOLOGÍA**

AUTORES

PÉREZ MONTES MARÍA TERESA
TERRONES ZAVALA FERNANDA

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:

M. Sc. Gustavo Sandoval Peña
Presidente

Blgo. Mcblo. José Villanueva Carlos

Integrante

M. Sc. Ángel Castro Alvarado

Integrante

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el
LABORATORIO 3º PISO - FACULTAD DE CIENCIAS, siendo las 12:00 horas del
día 28 DE SEPTIEMBRE DEL 2019, dando cumplimiento a la Resolución N°
184-2019-UNS-FC se reunió el Jurado Evaluador presidido por MSc GUSTAVO
SANDOVAL PEÑA, teniendo como miembros a MSc ANGEL CASTRO
ALVARADO (secretario) (a), y Blogo MEdgo JOSE VILLANUEVA CARLOS (integrante),
para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGIA
realizado por el, (la), (los) tesista (as) MARIA TERESA PEREZ MONTES
Y MARTHA FERNANDA TERNONES ZAVALETA

....., quien, (es) sustentó (aron) la tesis intitulada:
"AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN
MOLECULAR DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE CELULASAS
EN INTESTINO DE LOMBRIZ DE TIERRA Y SU ACTIVIDAD
CATALÍTICA SOBRE RESIDUOS VEGETALES CON
DIFERENTE PROPORCIÓN C/N"

Terminada la sustentación, el, (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas
por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y
sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como
MUY BUENO, asignándole un calificativo de 17 puntos, según
artículo 40° del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del Santa, vigente
(Res.471-2002-CU-R-UNS)

Siendo las 14:30 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando
los miembros del Jurado en señal de conformidad

.....
Nombre: MSc GUSTAVO SANDOVAL PEÑA
Presidente

.....
Nombre: MSc ANGEL CASTRO ALVARADO
Secretario

.....
Nombre: Blogo MEdgo JOSE VILLANUEVA CARLOS
Integrante

Distribución: Integrantes J.E (), tesistas () y archivo (02).



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: **Maria Teresa PEREZ MONTES**
Título del ejercicio: **TESIS**
Título de la entrega: **AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓ...**
Nombre del archivo: **TESIS 211019.docx**
Tamaño del archivo: **6.53M**
Total páginas: **88**
Total de palabras: **17,052**
Total de caracteres: **98,142**
Fecha de entrega: **22-oct-2019 02:29p.m. (UTC-0500)**
Identificador de la entrega: **1198225588**



AGRADECIMIENTOS

Primero a Dios Padre Todopoderoso, que llena mi existencia con su amor, presente en mis aciertos, reveses, alegrías y preocupaciones que caracterizaron el transitar de este camino que hoy veo realizado, que sin su bendición no hubiese sido posible.

A mi amada madre Zina Zavaleta Espino por su amor, atención, dedicación y por siempre estar detrás de cada paso que doy; a mi padre Manuel Terrones Barrantes por su cariño, consejos y lecciones a lo largo de mi vida. A mis hermanos Yanina Terrones Zavaleta y Manuel Terrones Zavaleta por ser mis grandes ejemplos a seguir, por compartir toda una vida conmigo creciendo juntos en lo espiritual, personal y profesional.

A mi alma mater Universidad Nacional del Santa, a mis profesores por sus sabios consejos y orientación, que me han inculcado a lo largo de mi vida profesional, aportando positivamente para el desarrollo de la presente tesis.

Martha Fernanda Terrones Zavaleta

Gracias a mi madre por acompañarme cada noche de estudio; gracias a mi padre por siempre anhelar lo mejor para mi.

Gracias a Dios por la vida de mis padres, y por bendecir mi vida con la oportunidad de disfrutar al lado de las personas que quiero, también por este nuevo triunfo, que se llevó a cabo por personas que me apoyaron y creyeron en la realización de esta tesis.

Así mismo agradecer la Universidad Nacional del Santa, a los profesores y asesor por sus sabios consejos y orientación, que me han inculcado a lo largo de mi vida profesional, aportando positivamente para el desarrollo de la presente tesis.

María Teresa Pérez Montes

DEDICATORIAS

A mis padres Zina y Manuel, a mis hermanos Yanina y Manuel por todo el amor, confianza y apoyo en cada paso que he dado.

A todas aquellas personas que han contribuido en mi formación profesional y han sido pieza importante para cumplir cada meta trazada en mi vida

Martha Fernanda Terrones Zavaleta

A mis padres Vilma Montes Robles y
Nicolás Pérez Marreros por todo el
amor, confianza y apoyo en cada paso
que he dado.

A todas aquellas personas que han
contribuye mi formación profesional y
son importantes para cumplir cada meta
trazada en mi vida.

María Teresa Pérez Montes

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIAS	viii
ÍNDICE GENERAL	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
HIPÓTESIS	4
MARCO TEÓRICO	5
MATERIALES Y MÉTODOS	8
I. Construcción del hábitat	8
II. Preparación de materia prima	8
III. Análisis Carbono/Nitrógeno (C/N) en sustratos.	9
IV. Procedimientos previos para la obtención de bacterias en intestino de lombriz de tierra.	9
V. Aislamiento y caracterización bacterias en intestino de lombriz de tierra.	10
VI. Actividad catalítica de bacterianas productoras de celulosa.	11
VII. Determinación de celulosa en los sustratos de residuos vegetales (verduras, tubérculos y frutas).	14
VIII. Identificación molecular de bacterias aisladas con mayor actividad catalítica.	15
IX. Diseño experimental	17
X. Análisis Estadístico	17
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	34
RECOMENDACIONES	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	44

ANEXO I: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL COMPONENTE CARBOXIMETIL

CELULOSA (CMC)	44
ANEXO II: FIGURAS DEL PROCEDIMIENTO	45
ANEXO III: FLUJOGRAMA DEL ANÁLISIS DE PROPORCIÓN C/N	59
ANEXO IV: FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE ACTIVIDAD CATALÍTICA SOBRE PAPEL FILTRO EN SUSTRATOS DE RESIDUOS VEGETALES.	60
ANEXO V: ENSAYO PARA DEMOSTRAR EL CONSUMO DE SUSTRATO Y CRECIMIENTO MICROBIANO "T2" (<i>Bacillus cereus</i>)	61
ANEXO VI: DATOS DE ABSORBANCIA DE AZÚCARES REDUCTORES PARA CADA SUSTRATO	62
ANEXO VII: FORMULAS PARA LA OBTENCIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA EN UNIDADES CELULOLÍTICAS (UI)	63
ANEXO VIII: DATOS OBTENIDOS DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA EN UNIDADES CELULOLÍTICAS	64
ANEXO IX: DETERMINACIÓN DE CELULOSA, RENDIMIENTO DE BIOMASA Y PRODUCTO POR CONSUMO DE SUSTRATO	65
ANEXO X: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL RENDIMIENTO Y_x/s , Y_p/s y Q_p .	67
ANEXO XI: PORCENTAJE DE ALINEAMIENTO EN BLAST, NCBI, DE LAS SECUENCIAS <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> y <i>Brevibacillus</i> <i>laterosporus</i> .	69
ANEXO XII: FORMATOS DE INGRESO A LA UNIVERSIDAD AGRARIA LA MOLINA.	72

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Bacterias celulolítica con alta actividad.	7
Tabla 2. Calificación de la degradación del papel filtro (Whatman N° 1).	11
Tabla 3. Composición de cada matraz para proceso fermentativo.	12
Tabla 4. Descripción del primer para la amplificación del gen 16S rRNA.	15
Tabla 5. Temperaturas y tiempo para la ampliación en termociclador.	16
Tabla 6. Azúcares reductores (g/L) y actividad catalítica (UI/mL) en proceso fermentativo de bacteria T2 con sustrato de Residuos frutas.	19
Tabla 7. Azúcares reductores (g/L) y actividad catalítica (UI/mL) en proceso fermentativo de bacteria T2 con sustrato de Residuos tubérculos.	20
Tabla 8. Azúcares reductores (g/L) y actividad catalítica (UI/mL) en proceso fermentativo de bacteria T2 con sustrato de Residuos verduras.	21
Tabla 9. Rendimiento de biomasa y producto, con respecto al consumo de sustrato en 12 horas, para cada residuo vegetal (frutas, verduras y tubérculos).	24
Tabla 10. Resumen Estadístico del Análisis de varianza de un factor por el programa Excel.	24
Tabla 11. Concentraciones de glucosa (10 soluciones) a 40 mg/100 mL.	57
Tabla 12. Datos de la absorbancia a 540 nm de glucosa.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Actividad de celulosa (UI/L), concentración de glucosa (mg/mL) y crecimiento microbiano de T2, cada 4 horas en CMC 1%.	18
Figura 2. Actividad catalítica de la muestra neta (AMN) de Control y frutas cada 4 horas	19
Figura 3. Actividad catalítica de la muestra neta (AMN) de Control y tubérculos cada 4 horas	20
Figura 4. Actividad catalítica de la muestra neta (AMN) de Control y verduras cada 4 horas	21
Figura 5. Crecimiento microbiano, actividad y celulosa del sustrato Control cada 4 horas	22
Figura 6. Crecimiento microbiano, actividad y celulosa del sustrato de frutas cada 4 horas	22
Figura 7. Crecimiento microbiano, actividad y celulosa del sustrato de tubérculos cada 4 horas	23
Figura 8. Crecimiento microbiano, actividad y celulosa del sustrato de verduras cada 4 horas	23
Figura 9. Secuencias múltiples (<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Brevibacillus laterosporus</i>), en el programa CLUSTAL 2.1, indicando porcentaje de identidad.	27
Figura 10. Comparación de secuencias completas (<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus cereus</i>), por la opción Pairwise del programa CLUSTAL 2.1, verificando porcentaje de identidad.	27
Figura 11. Medidas de las cajas para cada sustrato (verduras, tubérculos y frutas).	45
Figura 12. Cajas con sustrato en condiciones adecuadas para el medio y material biológico.	46
Figura 13. Disección de Lombriz de tierra (<i>Eisenia foetida</i>).	47
Figura 14. Procesos dilución 10^{-3} para el aislamiento.	47

Figura 15. Aislamiento morfológico de bacterias a partir de la dilución 10^{-3} .	48
Figura 16. Criterios morfológicos para obtención de cultivos puros.	48
Figura 17. Obtención de cultivos puros (Tincion gram).	49
Figura 18. Caracterización morfológica de bacterias de la placa de tubérculos.	50
Figura 19. Caracterización morfológica de bacterias de la placa de verduras.	50
Figura 20. Caracterización morfológica de bacterias de la placa de frutas.	51
Figura 21. Caracterización bioquímica de bacterias que presentaron crecimiento en el medio CMC 1% con Rojo congo 1%.	51
Figura 22. Bacterias en medio CMC 1% con prueba cualitativa de Rojo congo 1%.	52
Figura 23. Evaluación cualitativa de bacterias que crecieron en medio CMC 1% por degradacion de papel filtro.	53
Figura 24. Tratamiento a los residuos vegetales.	54
Figura 25. Preparación de cada sustrato en matraz respectivo para proceso fermentativo, volúmen total 100 mL y control de sustrato CMC 1%.	54
Figura 26. Disolución de la bacteria preseleccionada para la concentración en el proceso fermentativo.	55
Figura 27. Determinación de la concentración de inóculo por nefelómetro de Mc Farland (NMF).	55
Figura 28. Cultivo aislado y caracterizado morfológicamente a partir de frutas (F1).	56
Figura 29. Cultivo aislado y caracterizado morfológicamente a partir de verduras (V2).	56
Figura 30. Cultivo aislado y caracterizado morfológicamente a partir de tubérculos (T2).	56
Figura 31. Curva patrón de concentraciones de glucosa (Eje X) vs. Absorbancia (Eje Y) e indicó un R^2 de 0,99.	58

RESUMEN

El aumento de efectos adversos causados por residuos orgánicos y su mala distribución, hace que se cuestione cada vez más, que alternativas podrían solucionar de manera rápida, rentable y eficiente este problema. Un organismo importante es la lombriz de tierra, *Eisenia foetida*, considerada como uno de los organismos más factibles para la transformación de dichos residuos. Es la microbiota de la lombriz de tierra que realizaría gran parte del proceso catalítico sobre los residuos vegetales, haciendo posible su transformación en humus (humificación), donde existe la interacción de diversas enzimas como proteasas, amilasas, celulasas, etc. El principal objetivo es aislar, caracterizar e identificar molecularmente bacterias productoras de celulasas en intestino de *Eisenia foetida* (lombriz de tierra) y su actividad catalítica sobre residuos vegetales con diferentes proporciones C/N.

Primero se preparó a la lombriz, colocándola en un ambiente y bajo condiciones favorables para un adecuado crecimiento, siendo esta la fuente para los microorganismos que fueron aislados. Se encontraron 10 bacterias a partir de dilución 10^{-3} ; 2 bacterias, en residuos de verduras (V1, V2), 3 con residuos de frutas (F1, F2, F3) y 5 con residuos de tubérculos (T1, T2, T3, T4, T5). Luego se realizó prueba morfológica (Tinción gram), y bioquímica (Rojo congo 1%), con la finalidad de ir seleccionando las bacterias para el proceso fermentativo de su actividad catalítica. El aislamiento F1 mostró mayor capacidad celulolítica al producir un halo (hidrólisis en CMC) con una amplitud de 1,5 cm; así también, se tomaron en cuenta T2 y V2, pues, aunque no hubo formación de halo, presentaron crecimiento en la placa con CMC 1%. Estos 3 microorganismos aislados fueron puestos en matraz con 2 tiras de papel filtro y un matraz control, para observar la degradación de la celulosa, obteniéndose valores de T2 (+4), F1 (+3), V2 (+2). Otro punto importante a tener en cuenta fueron los rendimientos Y_x/s (biomasa) y Y_p/s (producto), los cuales se detallan como la relación entre el producto obtenido y el sustrato consumido, usualmente referidos a la fuente de carbono y energía. Obteníose un rendimiento similar para los 3 residuos vegetales, y en cuanto al rendimiento de biomasa, se observó un valor mayor en el residuo de frutas.

Se identificó molecularmente cada aislamiento (T2, F1 y V2) por la amplificación del gen 16S ribosomal, siendo *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Brevibacillus laterosporus* respectivamente.

Palabras Claves: *Eisenia foetida*, celulasas, microorganismos, intestino de lombriz.

ABSTRACT

The growing concern about the adverse effects caused by organic waste due to its poor distribution, makes it increasingly questioned the alternatives that have a quick, cost-effective and efficient solution to this problem. A key organism is the earthworm *Eisenia foetida*, protocols as one of the most feasible organisms for the transformation of such waste. It is the native microbiota, which performs much of the catalytic process on the plant residues in question, making it possible to transform into humus, where there is the interaction of various enzymes such as proteases, amylases, cellulases, etc. The main objective was to isolate, characterize and molecularly identify cellulose producing bacteria from the intestine of *Eisenia foetida* (earthworm) and its catalytic activity on plant residues with different C/N ratio. The earthworm was first prepared, placing it in an environment and under favorable conditions for proper growth, as this was the source of the microorganisms that were dried. Ten colonies were found from dilution 10^{-3} , with 2 with vegetable residues (V1, V2), 3 with fruit residues (F1, F2, F3) and 5 with tube residues (T1, T2, T3, T4, T5). Then they were performed both morphological test (Gram stain), as well as biochemical (Congo red), with the determination to select the bacteria that met the expected characteristics, that is, with the greatest potential. F1 isolation showed greater cellulolytic capacity by producing halo (hydrolysis in CMC) with an amplitude of 1,5 cm, but T2 and V2 were also taken into account, because although they have not presented halo formation, plate growth with CMC. These 3 parameters were placed in flasks with 2 strips of filter paper and a flask control, to observe cellulose degradation, obtaining values of T2 (+4), F1 (+3), V2 (+2). Another important point to consider was the yields Y_x / s (biomass) and Y_p / s (product), which are defined as the relationship between the products obtained and the substrate consumed, usually referred to the source of carbon and energy. A similar yield was obtained for the 3 plant residues, and in terms of biomass yield, a higher value was observed in the fruit residue. Each isolation (T2, F1 and V2) were molecularly identified by the amplification of the 16S ribosomal, with *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Brevibacillus laterosporus* respectively.

Key words: *Eisenia foetida*, cellulases, microorganisms, intestine of the worm

INTRODUCCIÓN

Se realizó el presente trabajo de investigación, por la frecuente suma de residuos orgánicos que genera la sociedad; lo cual, no cuenta con un plan de tratamiento, siendo este un problema que impacta al medio ambiente, poniendo en riesgo el equilibrio de nuestros ecosistemas y Salud Pública. Ante esto, contamos con la llamada “máquina biológica”, representada por los organismos. En el caso de esta investigación, es la lombriz de tierra (*Eisenia foetida*) y gran parte de su microbiota, capaces de trabajar y transformar componentes propios de los residuos orgánicos, convirtiéndolos en productos para diferentes aplicaciones, resaltando en área agrícola.

Los residuos orgánicos son aquellos que poseen la cualidad de poder desintegrarse o degradarse rápidamente, convirtiéndose en otro tipo de materia orgánica. La degradación de sustancias orgánicas son parte de los residuos domésticos, se descompone biológicamente bajo condiciones controladas (Bonmatí, 2008). Existen diferentes tipos de tratamiento, el cual modifica las características físico-químicas y biológicas de cualquier residuo y de este modo se eliminan sus nocivas propiedades; así también reduzca su volumen o simplemente se haga susceptible de recuperación (Pineda, 2006). La selección de los tratamientos es dada por cuatro factores, las cuales son: alternativas de la técnica adecuada de tratamiento, la naturaleza de flujo de residuos, el objetivo del tratamiento, consideraciones económicas y energéticas.

De estos factores, una adecuada técnica de tratamiento, es Lombricultura que tiene como proceso: la adsorción por carbono con el tipo de estado sólido. Entonces, con esta técnica, la degradación de los residuos sólidos orgánicos domésticos (RSOD), tiene la disposición de la materia en conjunto con un organismo capaz de procesar y/o transformar los residuos en abono orgánico (humus), comúnmente el humus es generado a partir de la bioconversión de los residuos orgánicos existente. Para esto se necesita realizar un flujo de estos residuos, identificar los procesos posibles de tratamiento y eliminar aquellos que probablemente no resulten adecuados. (Gaggero & Ordoñez, 2009)

El material biológico es *Eisenia foetida*, un organismo ideal para este proceso, la cual excreta aproximadamente 60% de lo que ingiere de la materia orgánica descompuesta; por ello, se tiene en cuenta las características biológicas de la lombriz y las condiciones ambientales óptimas para su desarrollo; por ejemplo, la temperatura deberá oscilar entre los 12 °C y 25 °C; el pH del sustrato se debe estabilizar entorno a la neutralidad (6.8 – 7.2) (Díaz, 2002).

En la lombriz, el proceso de digestión inicia en la cavidad bucal y termina en el intestino donde grupos de microorganismos, por acción enzimática hace que la materia orgánica se degrade, lo cual está influenciada por el tipo de alimento los que poseen mayor porcentaje de celulosa; ya que, las lombrices se alimentan principalmente de plantas y materiales vegetales, dando como resultado la excreción en forma de humus (Ademolu *et al.*, 2014). Cuando los sustratos biodegradables son digeridos por las lombrices, una gran variedad de microorganismos (entre ellos bacterias y hongos), poseen una enzima llamada celulasa, la cual es capaz de transformar a la celulosa en moléculas menos complejas, haciendo más rápida y fácil su asimilación como fuente de carbono. (Aburto & García, 2013)

Una investigación que se realizó en Korea, consistió en aislar bacterias existentes en el tracto intestinal de las lombrices de tierra, con la finalidad de obtener un consorcio microbiano, con las condiciones fundamentales, siendo aeróbicas o anaeróbicas. Por ello, identificaron 39 bacterias, realizando la amplificación en cadena de polimerasa (PCR) (Gaggero & Ordoñez, 2009), como resultado de esta identificación fueron las bacterias *Aeromonas* sp. y *Bacillus* sp., siendo dominantes en alimentos, tractos intestinales y desarrollo de las lombrices de tierra. Entonces esta investigación es una buena alternativa, afirmando que, en el tracto intestinal habita el género *Bacillus* sp. (Hong Kim, Sam , Sub Ch, & Wook, 2011)

Así mismo, habitan otras bacterias dentro del intestino de *Eisenia foetida* que son productoras de celulasas; por ejemplo, en esta investigación de los autores (Ramirez *et al.*, 2013), se encontró *Streptomyces albaduncus* en el intestino de *Eisenia foetida*. Con el uso de medios de agar de glicerol asparagina, los organismos fueron identificados como *Actinomicetos* sp. Se determinó la actividad endoglucanasa del caldo de cultivo durante el crecimiento *Actinomicetos* midiendo la liberación de azúcar reductor a partir de celulosa carboxilo metilo (CMC), medio de sales minerales.

El azúcar reductor que se ensayó fue por el método del ácido salicílico di-nitro (DNS), utilizando glucosa como el estándar de azúcar. La producción de la enzima celulasa era baja a 37 °C, y a 50 °C se observó una producción óptima, con pH de 6,5 a 7,0 (Sam *et al.*, 2011).

En el Perú, la Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, aislaron y seleccionaron bacterias celulolíticas de las fuentes termales ubicados en el callejón de Huaylas, Ancash - Perú. Este aislamiento se obtuvo de muestras frescas, enriquecido con medio basal salino (MBS), con pH de 6,5 a 50 °C, se realizó la selección mediante la coloración con rojo congo sobre placas, con medio carboximetil celulosa (CMC) (ANEXO II). Se analizó el gen 16s rDNA para su identificación taxonómica. Se aislaron 62 bacterias, de las cuales 29 mostraron halos de hidrólisis en CMC, y mediante el análisis del gen 16S rDNA, se encontró que las bacterias seleccionadas corresponden *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* y *Cohnella laeviribosi*, presentando mayor actividad en *B. subtilis* (Tamariz, 2014).

Es de interés comercial la producción de un consorcio microbiano, destinando su uso en conjunto a la optimización o mejoramiento del proceso industrial a gran escala de la transformación de residuos orgánicos tales como residuos vegetales, contribuyendo así a reducir el impacto negativo que genera cuando estos son desechados de manera incorrecta, brindando un valor agregado.

Por lo anterior mencionado, es importante considerar la siguiente incógnita: ¿Cuáles son las bacterias productoras de celulasas aisladas, caracterizadas e identificadas molecularmente que existen en el intestino de lombriz de tierra que tienen alta actividad catalítica sobre residuos vegetales con diferente proporción C/N?

OBJETIVOS

Objetivo General

Aislar, caracterizar e identificar molecularmente bacterias productoras de celulasas del intestino de *Eisenia foetida* (lombriz de tierra) y su actividad catalítica sobre residuos vegetales con diferente proporción C/N.

Objetivos Específicos

- Aislar y caracterizar bacterias obtenidas a partir del intestino de *Eisenia foetida* (lombriz de tierra).
- Amplificar el gen que codifica ARN ribosomal 16S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Determinar proporción de carbono en relación al nitrógeno para cada residuo vegetal, al inicio del proceso.
- Cuantificar la actividad catalítica de las bacterias seleccionadas sobre el sustrato de celulosa, y residuos vegetales por determinación de azúcares reductores.
- Determinar la celulosa, en base al rendimiento de biomasa y producto por consumo de sustrato.
- Analizar y representar la mayor actividad en residuos vegetales de verduras, frutas y tubérculos.

HIPÓTESIS ESTADÍSTICA

H1: Existen bacterias capaces de transformar la celulosa, se encuentra este carbohidrato en la pared celular de los residuos vegetales, que puedan representar un potencial de contaminación que afecte al medio ambiente. La mayoría de estas bacterias pertenecen al género *Bacillus*, aisladas a partir del intestino de *Eisenia foetida* (lombriz de tierra).

H0: La mayoría de estas bacterias que pertenecen al género *Bacillus*, aisladas a partir del intestino de *Eisenia foetida* (lombriz de tierra), no producen celulosa.

MARCO TEÓRICO

Enzimas celulasas

La celulosa es el carbohidrato más abundante, forma el 40 al 60 % de la pared celular de las plantas (Dongowski *et al.*, 2002). Las microfibrillas de celulosa están estabilizadas por enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares y rodeadas por polisacáridos hemicelulolíticos (mano y xilano), los cuales hacen extremadamente resistente a la hidrólisis química y biológica (Meherbe *et al.*, 2002). Los microorganismos son capaces de hidrolizar estos enlaces, con su complejo sistema de enzimas denominadas celulasas (Ovando *et al.*, 2005). Éstas enzimas son producidas por gran variedad de microorganismos de los cuales destacan bacterias y hongos, entre estas bacterias están las celulolíticas aerobias más abundantes y conocidas como *Bacillus* sp, *Cellulomonas* sp, *Pseudomonas* sp, *Vibrio* sp (Ramirez *et al.*, 2003).

Por medio de secreciones de enzimas es que participan los microorganismos, siendo fundamental en la depolimerización de los componentes orgánicos de diferentes residuos. Las más importantes entre estas enzimas son las celulasas, lipasas, fosfatasas, hemicelulasas y proteasas. Cuando las enzimas que producen los microorganismos son extracelulares pueden ser potencialmente útiles en la degradación de diferentes sustratos. Estas enzimas extracelulares, con respecto a las intracelulares tienen ventajas, porque para ser extraídas no necesitan técnicas de ruptura, presentan una estructura más compacta y son menos susceptibles a la degradación. Tales enzimas hidrolizan moléculas grandes como celulosa, pectina, almidón, hemicelulosa, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, que los microorganismos asimilan como fuente de energía y carbono (Cruz *et al.*, 2009).

Eisenia foetida

Actualmente, los sectores productivos generan grandes cantidades de residuos orgánicos, como las excretas de animales, los residuos agrícolas, residuos industriales, residuos humanos y lodos residuales. En algunos casos, estos residuos orgánicos tienen alguna aplicación, pero en la mayoría de ellos no son reutilizados, sino simplemente arrojados a los basureros, ríos, lagos y océanos sin ningún previo tratamiento; esto genera al ambiente un impacto negativo (López Méndez *et al.*, 2013). Para el tratamiento de desechos orgánicos, una de las opciones que existen es la lombricultura (también llamada vermicultura). Consiste esta técnica en la elaboración de abono orgánico a través de la

utilización de varias especies de lombrices, de las cuales la más conocida y usada es *Eisenia foetida*, conocida también como “californiana” o “lombriz roja”.

Mediante el uso de la lombricultura, es posible convertir casi cualquier tipo de desecho orgánico, en un producto final denominado genéricamente como lombricompost; el cual, es utilizado en la agricultura. Los abonos orgánicos contribuyen a la solución del problema sobre contaminación del ambiente, pues mejoran las propiedades químicas del suelo, propiedades físicas y biológicas (Durán & Henríquez, 2009).

En el tracto digestivo de la lombriz se ha encontrado una diversidad de microorganismos como: bacterias, hongos. Las lombrices de tierra pueden regular directamente la población de microorganismos por la gran cantidad que consumen de estos a partir del suelo; es decir, conduce a la proliferación de microorganismos en el tracto digestivo (Byzov & Khomyakov, 2007).

Proporción C/N en residuos vegetales

Para los microorganismos el carbono es una fuente de energía y el nitrógeno es un elemento necesario para la síntesis proteica. Una relación adecuada entre estos dos nutrientes en cuanto al sustrato, favorecerá un buen crecimiento y reproducción de microorganismos. La proporción C/N óptima suministrada; es decir, material "crudo o fresco" a compostar, es de 25 unidades de carbono por una unidad de nitrógeno, es decir $C(25) / N(1) = 25$. En términos generales, una relación C/N inicial de 20 a 30 se considera como adecuada para iniciar un proceso de compostaje. Si la proporción C/N está en el orden de 10 nos indica que el material tiene relativamente más Nitrógeno. Si la relación es de por ejemplo 40, manifiesta que el material tiene relativamente más Carbono. Según datos obtenidos por el Lic. Miguel Ángel Pravia, la relación C/N de residuos frutales fue de 30/1 (Pravia, 2012).

Bacterias celulolíticas

Los microorganismos degradadores de celulosa incluyen bacterias y hongos; siendo, aerobios, anaerobios, termófilos y mesófilos que ocupan diversos hábitats; entre las bacterias más diversas y conocidas son las aerobias dentro de las cuales son: *Cytophaga* sp., *Vibrio* sp., *Bacillus* sp., *Cellulomonas* sp., *Pseudomonas* sp. y *Thermobifida* sp. Además, se encuentran algunos anaerobios como: *Acetivibrio cellulolyticus*, *Thermo monospora* sp., *Butiri vibrio* sp., *Bacteroides cellulosolvans*, *Bacteroides succionogenes*, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus salbus*, *Coryne bacterium* sp., *Tuminococcus flavofaciens*. El pH óptimo para la actividad de celulasas

producidas por bacterias abarca un amplio rango; el cual, incluye condiciones ácidas y alcalinas (Gaitan *et al.*, 2007). La morfología celular también sirve para caracterizar a las bacterias, las cuales pueden ser bacilos, cocos y espirilos. Algunos bacilos producen endosporas que permanecen en estado latente en condiciones adversas (Alexander, 1990).

Actividad catalítica

La presencia de una enzima es determinada por la medida de la reacción que cataliza, pudiéndose estimar la cantidad de enzima por la velocidad de reacción. Además, la caracterización de una enzima implica la determinación de su actividad en diferentes condiciones. Por esto, la medida de actividad enzimática es de importancia para la investigación.

Tabla 1. Bacterias celulolítica con alta actividad.

Microorganismo	Actividad específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	pH óptimo
<i>Bacillus subtilis</i>	514,0	5-7
<i>Clostridium thermocellum</i>	428,0	7
<i>Streptomyces murinus</i>	6,7	6
<i>Bacillus macerans</i>	5030,0	6
<i>Bacillus sp</i>	369,6	9

Fuente: (Howard *et al.*, 2003)

La acción enzimática es el factor más importante en el proceso de degradación de celulosa donde los microorganismos (Tabla 1) tienen la capacidad de sintetizar exoenzimas (celulasas), que van a actuar sobre la celulosa con lo cual la hidrolizarán hidrolizando en productos que puedan ser usados como fuente de energía y carbono (Barrera *et al.*, 2009), estas enzimas confieren la posibilidad de degradar las fibras de celulosa principalmente por dos sistemas enzimáticos llamados agregativos y no agregativos (Marín, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Construcción del hábitat.

Lugar: Las cajas con estructuras de Tecnopor con poros de 2 cm (laterales y tapa) lo que favoreció la aireación, el modelo que se siguió es “Can-O- worms”, Grupo de Acción para el Medio Ambiente (GRAMA, 2007), se observa en la Figura 12 c – ANEXO II, se colocó en un soporte de madera y se cubrió la superficie de la caja con material de plástico amarillo, el color amarillo evitó las radiaciones directas (GRAMA, 2007) y la entrada de insectos.

Siembra: La cama en donde se consignó, es tierra arcillosa, conseguida en la Agropecuaria “Agro Tokape”. De acuerdo a su volumen (0,005 m³), se necesitó 20 000 lombrices por m² (pero, se obtuvo de área total 0,2 m², lo cual se necesitó 4 000 lombrices con peso de 20 g) (Chicaiza, 2007). (Figura 11, 12a y b) – ANEXO II.

Alimento: Su fuente de sustrato en la cama (residuos de verduras, tubérculos y frutas) estuvo entre 25°C a 30°C (Chicaiza, 2007). El alimento fue suministrado en capas delgadas, cada 7 días, dependiendo de la cantidad de residuo (verduras, tubérculos y frutas) que fue degradando (Figura 12b) – ANEXO II.

II. Preparación de materia prima

Se estableció el lugar donde se extrajo dicha materia orgánica (verduras, tubérculos y frutas); para esto, se escogieron casas en la urbanización Nicolás Garatea, distrito Nuevo Chimbote, departamento de Ancash.

Dicha recolección fue respecto a su naturaleza (residuos vegetales), se realizó después de 24 h expuesta a temperatura ambiente para obtener temperatura óptima de 20 – 30°C, y para su almacenamiento, se recolectó en contenedores (balde 300 mL). El método para controlar la temperatura consistió en la remoción, para evitar que el medio donde se encontrase la lombriz empiece a descomponerse (Díaz, 2002). La materia no estaba ni húmeda ni seca, mediante Ferruzzi (1986), el cual consistió en comprimir un puñado del material con el uso de guantes de asbesto y comprobar si suelta líquido (apenas gotas); es decir, la humedad correspondió entre 70% y 80%, con este método se mantuvo la aireación. Se controló pH usando un potenciómetro y por el tipo de residuo vegetal, para el sustrato de frutas se evitó el suministro de cáscaras de residuos de frutas cítricas (naranja, mandarina, etc.); en el caso de verduras, se evitó suministrar verduras

con alto grado de descomposición; por lo tanto, se mantuvo pH neutro (Díaz, 2002). Para el consumo adecuado de materia prima se realizó picado de los residuos (verduras, tubérculos y frutas); en él, se empleó cuchillo para realizar la función, el tamaño se conservó entre 25 y 75 mm (2,5cm y 7,5 cm) (Díaz, 2002).

III. Análisis Carbono/Nitrógeno (C/N) en sustratos.

La proporción C/N, se analizó al inicio del proceso para cada residuo vegetal, con el propósito de mantener en estado óptimo del sustrato suministrado; teniendo así, residuos de verduras (15/1), residuos de tubérculos (25/1) y residuos de frutas (40/1); se desarrolló por el método de Walkley y Black para materia orgánica; y, el método de Kjeldahl para nitrógeno (ANEXO III), datos brindados en la Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Ciencias, Laboratorio de Ecología Microbiología “Marino Tabusso”. La *Eisenia foetida* asimiló 1/3 de la materia orgánica, y eliminó 2/3 (Chicaiza, 2007); es decir, en forma de CO₂. La fracción asimilada como 1/3 de materia prima, es la energía para su metabolismo. Por consiguiente, la materia prima es asimilada 100 %; la cual, es distribuida a su organismo y ambiente; este último, es para producción del humus (Chicaiza, 2007).

IV. Procedimientos previos para la obtención de bacterias en intestino de lombriz de tierra.

a. Identificación de la lombriz tierra.

La lombriz de tierra (*Eisenia foetida*) es de color rojo oscuro. La etapa de adultez es alcanzada a los 3 meses de nacidos; así también, su madurez sexual mide de 5 a 6 centímetros, su diámetro oscila entre 3 y 5 mm y pesa aproximadamente un gramo.

Para seleccionar al ejemplar, se tomó en cuenta la edad de la lombriz, la cual osciló de a 3 a 4 meses, cumpliendo las condiciones de tamaño y por desarrollar su celi. Ferruzi, C. (1986)

b. Disección de la lombriz de tierra.

Esta lombriz se obtuvo de parcela de vermicompost (2 m por 3 m) de un Terreno de cultivo Urb. Pepao, Nuevo Chimbote, Ancash, luego cultivadas en cajas del material de Tecnopor (Figura 12) – ANEXO II. Cada organismo (1 lombriz por sustrato) se lavó 2 veces en agua destilada (estéril) por 2 minutos en placas, y se refrigeró por 4 horas.

Se desinfectó el área de trabajo con alcohol 90 %, se preparó la cámara de seguridad para una posterior disección, después del tiempo de congelación se trasladó la lombriz en placas estériles (dentro de la cámara de bioseguridad), para la disección la lombriz se fijó en posición horizontal por la parte dorsal (hacia abajo) y la parte ventral se abrió longitudinalmente a lo largo de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) (Figura 13) – ANEXO II, se añadió 2 mL de solución salina 0,85% (homogenizar durante 1 minuto), luego de ello se extrajo 1 mL de muestra (Figura 14) – ANEXO II. Se realizó diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , (1 mL de muestra + 9 mL de solución salina 0,85%, homogenizar), se escogió la dilución que contenga menos carga microbiana (10^{-3}), (Devaki *et al.*, 2015) todos los ensayos fueron evaluados por triplicado.

V. Aislamiento y caracterización de bacterias en intestino de lombriz de tierra.

a. Aislamiento de bacterias a partir del intestino de lombriz de tierra.

Luego 1 mL de la dilución (10^{-3}) se inoculó en placas estériles (1 placa por sustrato o Lombriz) los medios preparados y esterilizados (agar TSA, medio nutritivo para bacterias aerobias, anaerobias y facultativas, teniendo su crecimiento sin estrés debido a sus componentes), las diluciones en placas respectivas fueron sembradas por extensión (Figura 15) – ANEXO II. Estas placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. La primera identificación se dió mediante el uso de técnica, tinción gram, observándose rojo o violeta, dando como resultado positivas o negativas; y su forma, siendo cocos o bacilos. Luego, se sembró cada colonia pura en viales con medio TSA para un posterior proceso (Figura 16 y 17) – ANEXO II. (Devaki *et al.*, 2015).

b. Caracterización bioquímica y evaluación cualitativa de bacterias

De las bacterias seleccionadas mediante el procedimiento anterior (Figura 18, 19 y 20) – ANEXO II, y con la obtención de cultivo puro, se realizó la caracterización bioquímica. Estas colonias se sembraron en medio CMC 1% (ANEXO I), incubadas a 37°C por 24 horas. Las placas que presentaron crecimiento se les añadió Rojo congo 1%, esparciendo en toda la placa, dejando por 15 minutos en reposo, se retiró lo sobrante y se añadió NaCl, cuya concentración fue de 2 mol/L (solución salina), por 15 minutos (se repitió 1 vez más). La placa con crecimiento bacteriano que se visualizó halo (Figura 21 y 22) – ANEXO II, se obtuvo el índice de potencia (IP), midiendo el diámetro de la colonia (DC) entre la medida del halo (H) (Figura 21) – ANEXO II (Devaki *et al.*, 2015).

Para la evaluación cualitativa, se preparó medios líquidos por cada bacteria seleccionada, estos medios líquidos en matraz de 500 mL con medio CMC 1 % (40 mL) + dos tiras de papel filtro (Whatman N°1), su temperatura es la misma que se realizó en la siembra de CMC 1%, tiempo de incubación es de 7 días, se observó diariamente la degradación del papel filtro; por consiguiente, se agrupó por su degradación (Tabla 2) (Figura 23) – ANEXO II.

Tabla 2. Calificación de la degradación del papel filtro (Whatman N° 1)

Calificación	Valoración de la degradación
Muy Buena	+4
Buena	+3
Regular	+2
Escasa	+1
Ausencia	-

Para el análisis cuantitativo de actividad catalítica se seleccionó las bacterias que presenten mayor calificación en su degradación (+4, +3) (Ademolu *et al.*, 2014).

VI. Actividad catalítica de bacterias productoras de celulosa.

a. Tratamiento al sustrato de Residuos vegetales para el proceso fermentativo.

Se realizó este tratamiento para desinfectar los residuos vegetales y controlar pH al inicio del proceso; y así, no ser un factor de variación durante el proceso fermentativo. Por consiguiente, los residuos vegetales (verduras, tubérculos y frutas) se pesó 12 g/L, cortados en fragmentos de 0,5 a 1 cm, se ajustó la humedad a 80%. Para esto a los Residuos (1,2 g/ 100 mL) se realizó un tratamiento con 3 mL de HCl 5% por 24 horas (Figura 24) – ANEXO II, se midió pH, se lavó 2 veces con agua destilada (agitando), se midió pH, se añadió 4mL de NaOH 1% (agitando), esperar 10 minutos (verduras), 20 minutos (tubérculos) y 15 minutos (frutas), cada uno en diferentes tubos, se lavó 2 veces con agua destilada, medir pH y regular a básico, secar a 50° C por 2 horas (verduras, tubérculos y frutas), luego se esterilizó a 121°C cada residuo vegetal en placas (Álvarez, 2010).

b. Preparación de inóculo.

Las bacterias con mayor actividad (+4, +3), se suspendieron en solución salina 0,85%, se añadió 10 mL de esta suspensión en matraz con 90 mL de medios líquidos (tres matraz) que contiene cada uno de los sustratos tratados anteriormente (residuos vegetales, respectivamente) considerando como control el medio de celulosa (sustrato CMC 1%), teniendo en total 4 matraz de 100 mL (Figura 25) – ANEXO II, a 37°C durante 24 horas a 150 rpm. La muestra fue extraída cada 4 horas, se realizaron tres repeticiones.

➤ Concentración de inóculo para la suspensión

Las bacterias con mayor actividad (+4, +3), en el vial se le añadió 2 mL de solución salina (0,85%), se dejó inclinado por 5 minutos, se extrajo 1 mL de esta suspensión (se eliminó el sobrenadante) y se añadió a placa con medio Agar TSA (composición; peptona de caseína 15 g/L, peptona de soya 5 g/L, lactosa 10 g/L, cloruro de sodio 5 g/L, polisorbato 80 5 g/L, lecitina 0,7 g/L, Agar-Agar 15 g/L) (MacFaddin,1985) a 37 °C por 24 horas.

Luego se realizó un raspado con aza bacteriológica a la placa con el inóculo, se añadió a tubos con 9 mL de solución salina (0,85%) (Figura 22) – ANEXO II, se determinó turbidez con NMF (Nefelómetro de Mc Farland) N° 4 concentración 12×10^9 (Figura 27) – ANEXO II, se adicionó al matraz con 50 mL de solución salina (0,85%) para luego realizar la distribución de 10 mL de suspensión a cada matraz (Tabla 3) a 37 °C por 24 horas, con pH neutro.

Tabla 3. Composición de cada matraz para proceso fermentativo.

Matraz	Sustrato 1%	Nutrientes g/L
Matraz 1	CMC verduras tubérculos frutas	Extracto de levadura: 2,5
Control		Peptona: 2,5
Matraz 2		Fosfato di-básico de potasio: 0,1
Matraz 3		Fosfato monobásico de potasio: 0,1
Matraz 4		Sulfato de amonio: 0,5 Cloruro de calico: 0,5

Gaitan, *et al.* (2007)

➤ Proceso Fermentativo

De los matraz se extrajo 2 mL, cada cuatro horas a 2 500 rpm por 30 minutos de centrifugación, se obtuvo el sobrenadante y extracto crudo. Se conservó el sobrenadante a temperatura de – 20°C.

c. Cuantificación de actividad catalítica del proceso fermentativo.

Del sobrenadante obtenido por centrifugación se distribuyó 2 mL de cada muestra a tubos respectivamente, para una posterior determinación de azúcares reductores (DNS) (Devaki *et al.*, 2015). (ANEXO II)

➤ Determinación de azúcares reductores.

Se realizó por técnica colorimétrica por DNS, utilizando así una curva patrón de solución stock de glucosa 0,4 g/L (Tabla 11). A partir de 2 mL de sobrenadante obtenido se tomó un volumen de 0,25 mL a otros tubos con tapa rosca, al cual se adicionó 0,25 mL de DNS, agitando por un minuto, esta mezcla se sometió a ebullición por 5 minutos, transcurrido este tiempo, la mezcla se llevó a un recipiente con hielo por 5 minutos, posteriormente se adicionó 2,5 mL de agua destilada, por 2 minutos se agitó cada tubo, su lectura fue en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm, para registrar la absorbancia generada (Tabla 12), la cual se reemplazó en la ecuación de la curva patrón de glucosa previamente realizada (Figura 31), para la obtención de la concentración de glucosa residual en cada cuatro horas de muestreo. (Durán *et al.*, 2009)

➤ Actividad catalítica sobre papel filtro. (Pachón *et al.*, 2010)

Se preparó el extracto crudo obtenido de la centrifugación, para conseguir el volumen y distribuir en cada tubo se añadió solución salina (0,85%), aproximadamente 4 mL. Se preparó el buffer citrato de sodio 50 mM con pH 5, entonces en 4 tubos se añadió (ANEXO IV):

Tubo N°1: Tira de papel filtro Whatman N°1 + 1 mL buffer citrato de sodio a pH 5 (BS: Blanco Sustrato).

Tubo N°2: Tira de papel filtro Whatman N°1 + 1 mL de extracto enzimático + 1 mL buffer citrato de sodio a pH 5 (Rx: Reacción).

Tubo N°3: 1 mL de extracto enzimático + 1 mL buffer citrato de sodio a pH 5
(BM: Blanco muestra).

Tubo N°4: Tira de papel filtro Whatman N°1 + 1 mL de extracto enzimático
(MT: Muestra).

Todos los tubos pasaron a una incubación de 50°C por 60 minutos, se evaluó por la técnica colorimétrica de DNS, en unidades celulolíticas las que son cantidades de azúcares reductores (glucosa) $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mL}$ (Tabla 6, 7 y 8). La concentración de los azúcares reductores producidos, se calculó la absorbancia neta de la muestra (AMN) y absorbancia de muestra Blanco (Buffer) (AMB), indicando absorbancia (A) (Tamariz, 2014) (ANEXO IX):

$$\text{AMN} = \text{AMB} - (\text{ABM} + \text{ABS})$$

VII. Determinación de celulosa en los sustratos de residuos vegetales (verduras, tubérculos y frutas).

Para la determinación de la celulosa, se empleó el método de Kurschner y Hoffer (Bautista *et al.*, 2005). Las muestras (residuos vegetales), fueron sometidas a un proceso de extracción de componentes en agua a 95 °C, mezclando las muestras con agua destilada durante 3 horas. Se filtró el residuo y se dejó secar a 105 °C.

Se pesó 2 gr de esta materia seca, se colocaron en matraz y se añadió 20 mL de etanol y 5 mL de ácido nítrico concentrado, se colocó en baño María a 100 °C durante 30 minutos, la solución se filtró con porosidad media, el líquido se desechó y el sólido se sometió por segunda vez a igual temperatura y tiempo, se realizó una decantación como la etapa anterior y se realizó por tercera vez el procedimiento durante 1 hora. La materia filtrada se lavó con agua destilada caliente, luego se añadió 100 mL de solución saturada de acetato de sodio y por último con 500 mL de agua destilada caliente. El residuo se secó a 105 ± 3 °C para luego enfriarlo y pesarlo.

La celulosa se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Celulosa} = \frac{P_{\text{or}}}{P_{\text{o}}} ;$$

Donde:

Por = Peso seco del residuo (g)

Po = Peso anhidro de la muestra (2 g)

VIII. Identificación molecular de bacterias aisladas con mayor actividad catalítica.

Todo el procedimiento se desarrolló siguiendo la metodología estandarizada por el Laboratorio de Ecología Microbiología “Marino Tabusso” (Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina).

a. Extracción de ADN

Los aislamientos que presentaron mayor actividad se cultivaron en medio CMC 1% (CMC 10 g/L, peptona 2,5 g/L, extracto de levadura 2,5 g/L, cloruro de sodio 0,5 g/L, fosfato dibásico de potasio 0,1 g/L, fosfato monobásico de potasio 0,1 g/L y sulfato de amonio 0,5 g/L) (Gaitán *et al.*, 2007), a 37 °C por 24 horas en tubos de ensayo. Las bacterias a 12 000 rpm por 5 minutos de centrifugación, y se eliminó el sobrenadante, éste procedimiento se realizó una vez más por la conservación de la pureza del cultivo.

La extracción de ADN se realizó mediante el kit comercial (Thermo Scientific, GeneJET, Estados Unidos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el ADN se almacenó a -20 °C para posteriores análisis.

b. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa

Por el método de Huang *et al.*, 2012. La amplificación del gen 16S rRNA correspondió una identificación de las bacterias seleccionadas. La reacción de cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador (MyCycler™ Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos). Cada mezcla consistió (50 µL), buffer 10x, 1.5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada cebador, 0,2 µM dNTP, 2,5 U/µL Taq ADN polimerasa (TaKaRa Biotechnology, China), y 25 ng/µL de ADN molde.

Se utilizó cebadores universales bacterianos (Tabla 4).

Tabla 4. Descripción del primer para la amplificación del gen 16S rRNA.

Nombre	Secuencias 5' → 3'	Tamaño del amplicon esperado
EUB-27F	AGAGTTTGATCMTGGCTAG	1400 a 1500 pb
EUB-1492R	GGGTACCTTGTTAGGACTT	

(Frank *et al.*, 2008).

El programa de PCR involucró los siguientes parametros de temperaturas y tiempo en el termociclador mencionado (Tabla 5).

Tabla 5. Temperaturas y tiempo para la ampliación en termociclador.

Proceso	Temperatura	Tiempo	
Start			
desnaturalización	94°C	5 min	
Desnaturalización	94°C	30 seg	} 35 ciclos
Anneling	55°C	30 seg	
Extensión	72°C	1,5 min	
Extensión Final	72°C	10 min	

(Huang *et al.*, 2012).

Las secuencias amplificadas por PCR se visualizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 1,2 % (p/v) y teñidos con bromuro de etidio (10 mg/mL) durante 80 min a 80 voltios.

c. Secuenciación

Los productos de PCR correspondientes al gen del ARNr 16S con amplicones purificados fueron secuenciado por la empresa Macrogen (Korea de sur) enviado por Laboratorio de Microbiología Marino Tabusso, Lima.

Para alineación y análisis de secuencias recibidas, se empleó el programa BioEdit. Luego, compararon las secuencias obtenidas de 16S ARNr de las bacterias aisladas con otras especies conocidas, depositadas en la base de datos GenBank (Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos), a traves de una busqueda de nucleótidos BLAST porpocionada por el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI) (ANEXO XII). Posteriormente, las secuencias obtenidas en el GenBank fueron alineadas usando el programa CLUSTAL versión 2,1. (Larkin *et al.* 2007)

IX. Diseño Experimental

Se realizó con un diseño No Experimental tipo transaccionales o transversales para estudios correlaciones/ casuales de una casilla; en cuanto la actividad catalítica se empleó el diseño factorial A*B con tres réplicas por cada procedimiento, un factor la biomasa, sustrato y actividad catalítica, con tres tipos de residuos vegetales (verduras, tubérculos y frutas) y sustrato control (CMC 1%).

X. Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante (ANOVA) por clasificación simple de un factor, a través del programa Microsoft Excel (office 16), con un nivel de significancia $P < 0.05$ y de confianza 95%.

RESULTADOS

Se observa datos obtenidos de azúcares reductores y de actividad catalítica, de la bacteria seleccionada T2 (obtenida de residuos de tubérculo). Las condiciones de estos procesos fueron pH 5 a 50 °C, extrayendo muestra cada 4 horas.

Se demostró la actividad catalítica haciendo el ensayo del procedimiento; teniendo en cuenta la actividad en unidades celulolíticas, consumo de sustrato en concentraciones de glucosa y crecimiento microbiano de la bacteria seleccionada T2 (ANEXO V) en sustrato CMC 1%. En la Figura 1, la actividad catalítica asciende cada 4 horas; a su vez, el sustrato es consumido mostrando crecimiento exponencial, obteniendo resultados reales del microorganismo T2, puede producir celulosa en tiempo determinado.

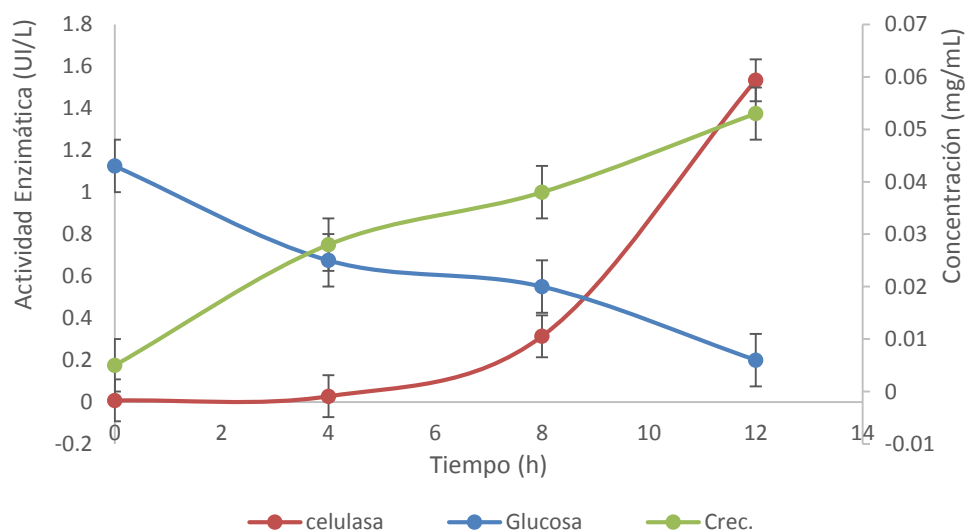


Figura 1. Actividad de celulosa (UI/L), concentración de glucosa (mg/mL) y crecimiento microbiano de T2, cada 4 horas en CMC 1%.

Indicando margen de error 5%, encontrándose en eje secundario el consumo de sustrato en unidades de glucosa y el crecimiento microbiano.

En la tabla 6, 7 y 8, se muestra por el lado izquierdo, datos de azúcares reductores realizados por la técnica colorimétrica DNS, la muestra se extrajo cada 4 horas, cuyo resultado se reemplaza en la ecuación de la concentración de glucosa (Figura 31) – ANEXO II. Del lado derecho, se observa la actividad catalítica (UI/mL), calculado por la técnica de azúcares reductores en sustratos CMC 1% (control) y residuos de frutas, tubérculos y verduras, extrayendo muestra cada 4 horas, para la primera toma de muestra se esperó 8 horas, porque el extracto crudo a obtener en tiempo cero, era mínima en los sustratos.

Tabla 6. Azúcares reductores (g/L) y actividad catalítica (UI/mL) en proceso fermentativo de bacteria T2 con sustrato Residuos frutas.

Tiempo (h)	Azúcares reductores (g/L)		Tiempo (h)	Actividad catalítica (UI/mL)	
	CMC 1% Control	Residuos Frutas pretratadas		CMC 1% Control	Residuos frutas pretratadas
0	0,134	0,072	8	1,60	1,200
4	0,023	0,054	12	0,40	0,002
8	0,041	0,054	16	0,07	0,100
12	0,040	0,043	20	0,90	0,006
16	0,027	0,009	24	0,80	0,050
20	0,021	0,025	28	0,30	1,200
24	0,021	0,017			

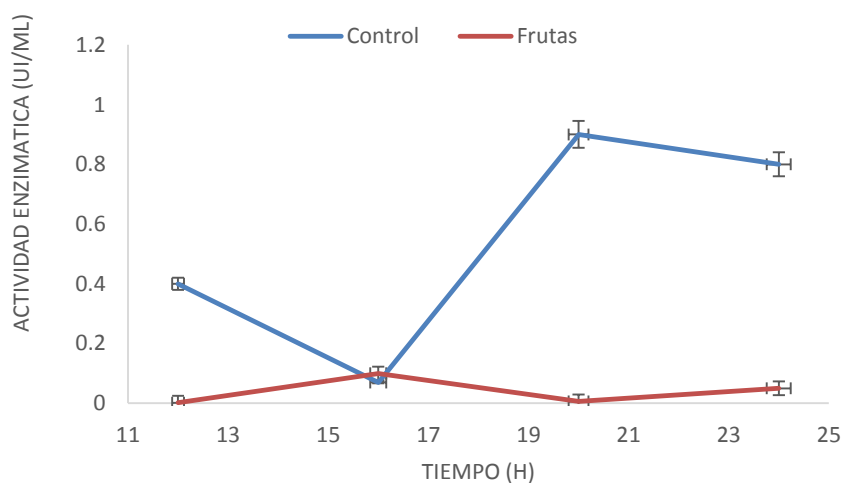


Figura 2. Actividad catalítica de la muestra neta (AMN) de Control y frutas, cada 4 horas.

Indicando margen de error 5%. Se obtiene actividad catalítica con bajas concentraciones (UI/mL), siendo no constante en el tiempo de 28 horas

Tabla 7. Azúcares reductores (g/L) y actividad catalítica (UI/mL) en proceso fermentativo de bacteria T2 con sustrato de Residuos tubérculos.

Tiempo (h)	Azúcares reductores (g/L)		Tiempo (h)	Actividad catalítica (U/mL)	
	CMC 1% Control	Residuos tubérculos pretratadas		CMC 1% Control	Residuos tubérculos pretratadas
0	0,134	0,008	8	1,60	0,3
4	0,023	0,025	12	0,40	0,2
8	0,041	0,024	16	0,07	0,6
12	0,040	0,025	20	0,90	0,4
16	0,027	0,006	24	0,80	0,2
20	0,021	0,200	28	0,30	0,6
24	0,021	0,003			

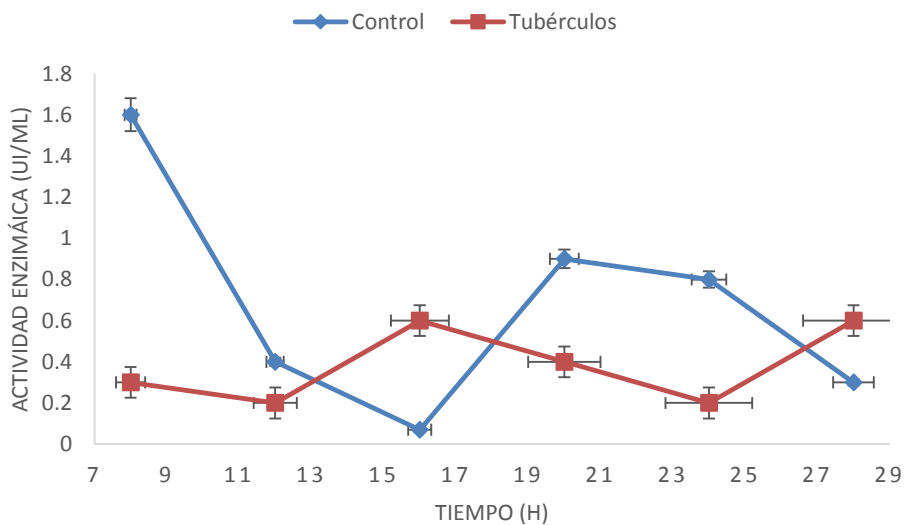


Figura 3. Actividad catalítica de la muestra neta (AMN) de Control y tubérculos, cada 4 horas.

Indicando margen de error 5%, su actividad catalítica es eficiente siendo constante en el tiempo, teniendo concentraciones altas, siguiendo el modelo (Pachón *et al.*, 2010) con los datos de autores.

Tabla 8. Azúcares reductores (g/L) y actividad catalítica (UI/mL) en proceso fermentativo de bacteria T2 con sustrato de Residuos verduras.

Tiempo (h)	Azúcares reductores (g/L)		Tiempo (h)	Actividad catalítica (U/mL)	
	CMC 1% control	Residuos verduras pretratadas		CMC 1% control	Residuos verduras pretratadas
0	0,134	0,023	8	1,60	0,30
4	0,023	0,013	12	0,40	0,50
8	0,041	0,024	16	0,07	0,70
12	0,040	0,019	20	0,90	0,02
16	0,027	0,024	24	0,80	0,30
20	0,021	0,006	28	0,30	0,30
24	0,021	0,005			

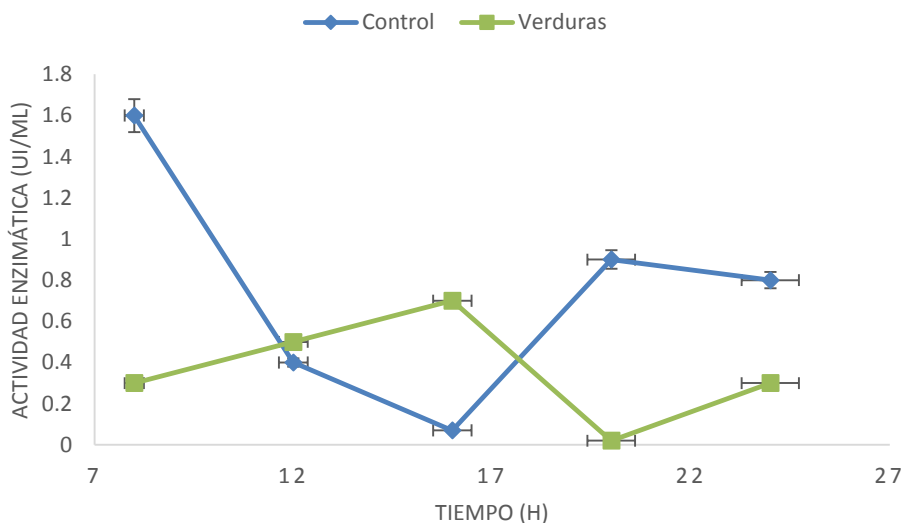


Figura 4. Actividad catalítica de la muestra neta (AMN) de Control y verduras, cada 4 horas.

Indicando margen de error 5%, la actividad catalítica de verduras es alta en menos tiempo, en comparación a los otros residuos; por consiguiente, esta bacteria demuestra estabilidad en residuos de verduras, teniendo una mayor actividad catalítica. Siguiendo el modelo (Pachón *et al.*, 2010) con los datos de autores.

Figura 5, 6, 7 y 8, se observan crecimiento microbiano, actividad catalítica (como producto) y sustrato celulosa obtenidos a partir del método de Kurschner y Hoffer, el cual se tomó para su determinación (ANEXO IX). Se trató en cada residuo vegetal (frutas, tubérculos y verduras) y control CMC. Los puntos fueron tomados cada 4 horas para cada residuo. Estas figuras representativas son necesarias para la determinación de rendimientos.

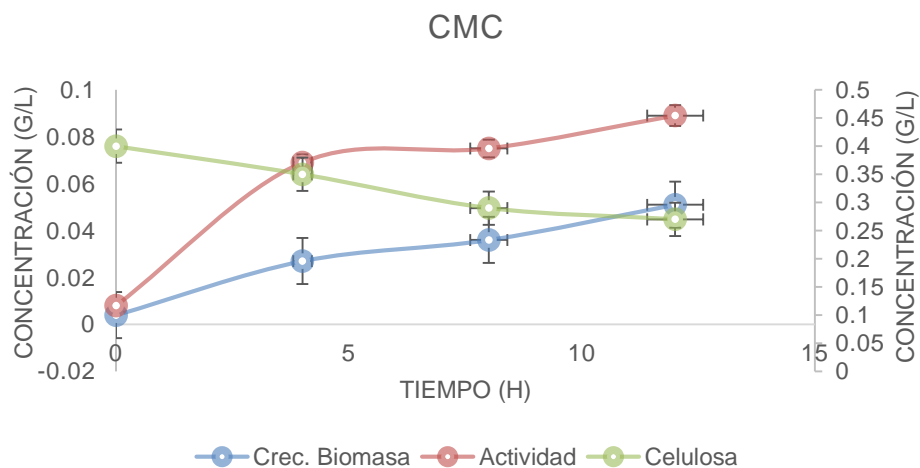


Figura 5. Crecimiento microbiano, actividad y celulosa del sustrato Control, cada 4 horas.

Indicando margen de error 5%, figura control, en eje secundario se ubica la concentración de celulosa; por consiguiente, en eje primario, crecimiento y actividad.

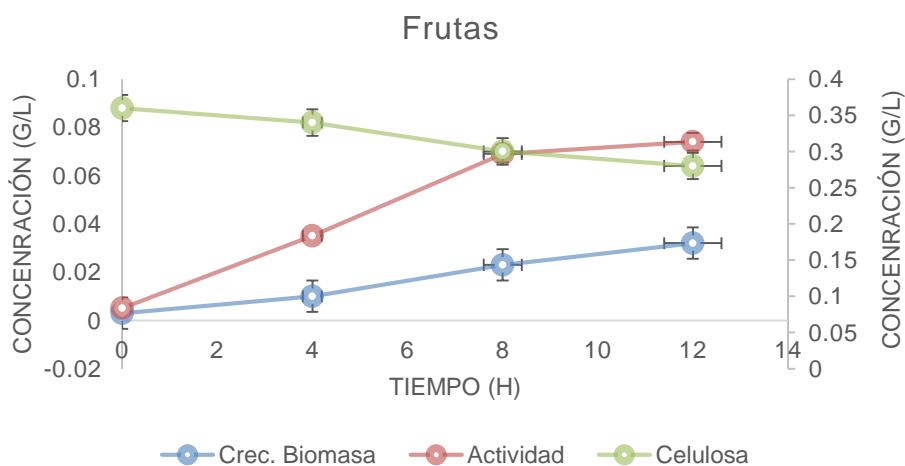


Figura 6. Crecimiento microbiano, actividad y celulosa del sustrato de frutas, cada 4 horas

Indicando margen de error 5%, la ubicación de la concentración de celulosa se encuentra en el eje secundario. El crecimiento y la actividad se encuentran en el eje primario.

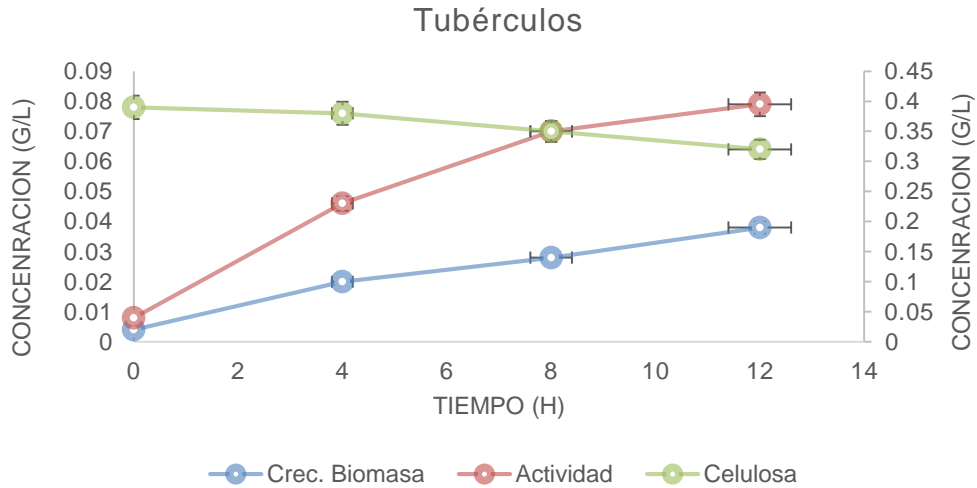


Figura 7. Crecimiento microbiano, actividad y celulosa del sustrato de tubérculos, cada 4 horas.

Indicando margen de error 5%, la ubicación de la concentración de celulosa se encuentra en el eje secundario. El crecimiento y la actividad se encuentran en el eje primario.

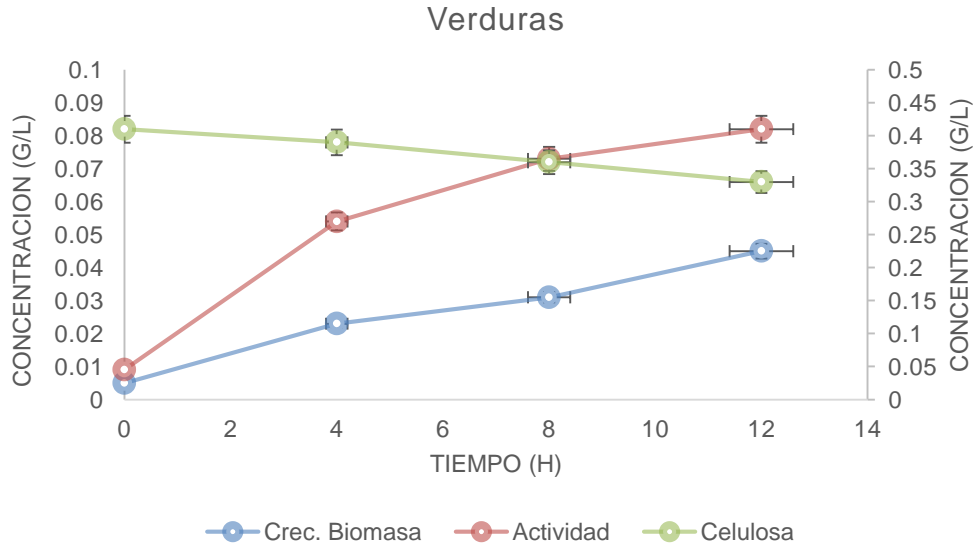


Figura 8. Crecimiento microbiano, actividad y celulosa del sustrato de verduras, cada 4 horas.

Indicando margen de error 5%, la ubicación de la concentración de celulosa se encuentra en el eje secundario. El crecimiento y la actividad se encuentran en el eje primario.

La Tabla 9, cuadro comparativo de los rendimientos que se obtuvieron de cada Figura 5, 6, 7 y 8, donde representa el crecimiento, consumo de celulosa, y producto como actividad, con estos datos obtenidos cada 4 horas durante 12 horas (ANEXO X).

Se puede obtener el rendimiento de biomasa y producto en base al consumo de sustrato, dando como resultado mayor rendimiento de producto en tubérculos con 1,01; así mismo, su rendimiento en verduras 0,9.

Estos datos se corroboraron con la tabla 10, donde explica en resumen los datos estadísticos (ANEXO II), señalando que el error típico es $< 0,9$; es decir, estos datos de rendimiento están estadísticamente dentro del margen de error. Así también se observa el promedio, siendo intervalo del rendimiento (Yp/s) aceptable $> 0,853$. Entonces, los 3 residuos vegetales entran en este intervalo.

Tabla 9. Rendimiento de biomasa y producto, con respecto al consumo de sustrato en 12 horas, para cada residuo vegetal (frutas, verduras y tubérculos).

	Control	Frutas	Verduras	Tubérculos
Yx/s	0,362	0,363	0,5	0,486
Yp/s	0,623	0,863	0,913	1,014
Qp	0,007	0,006	0,006	0,006

Tabla 10. Resumen estadístico de los procesos fermentativos por el programa Excel.

<i>Rendimientos</i>	<i>Error típico</i>	<i>Nivel de confianza (95.0%)</i>	<i>Promedio o Media</i>	<i>Varianza</i>
Yp/s	0,083	0,264	0,853	0,028
Yx/s	0,038	0,121	0,427	0,006
Qp	0,0002	0,0007	0,006	1,9213E-07

Secuencias 16S del gen RNAr obtenidas de las 3 bacterias aislados (T2, F1, V2), presentados en la Figura 28, 29 y 30 - ANEXO II, respectivamente.

(T2) - *Bacillus cereus*

> Bcereus, siendo el cultivo bacteriano (T2)

```
AATCGAGCGATGGATGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC
TGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACGTGCATGGTTC
GAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
CGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCG
GTGAGTGATGAAAGCTTTCCGGTCTTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCT
GGCACTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGAAATCCAT
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTG
ACACTGAAGCCCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGA
GTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTATAGTGTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGT
ACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCCTAGAGATAGGGCTTCTTCCTT
GGGGAGAGGAAAAGTGGTGCATGGTTTTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAAGTCCCGCAAGGA
GGCAAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCAATAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGG
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACG
GTACAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCT
GCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGACACACCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAAGTCCGGTGGGGTAACCTTTTTG
GAGCCAGCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAAC
```

(F1) - *Bacillus subtilis*

>Bsubtilis, siendo el cultivo bacteriano (F1)

```
ATCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT
GCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCA
AACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCATTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC
GGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGC
TGAGTGATGAAAGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCG
GTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG
GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACG
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGA
CGCTGAAGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAG
TGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTATGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGT
ACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTC
GGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGCTGCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTACAGTTGGGCAATTTTAAAGGTGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAAGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
GACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCA
CTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
CCCGGCCCTTGACACACCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAAGTCCGGTGGGGTAACCTTTT
TTAGGAGCCAGCCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAATCGTAACAA
```

Con respecto a la secuencia de la bacteria *Brevibacillus laterosporus*, solo existe secuencia parcial del gen 16S.

(V2) - *Brevibacillus laterosporus* strain BL-2, secuencia parcial.

>Blaterosporus, siendo el cultivo bacteriano (V2)

```
AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGGGTCTTC
GGACCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACATAGGGAAA
CTTATGCTAATACCGGATAGGGTTTTGCTTCGCCTGAAGCGAAACGGAAAGATGGCGCAAGCTATCACTT
ACAGATGGGCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGA
CCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA
ATTTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGCTTTCGGGTGCGTAAAG
TTCTGTTGTTAGGGAAGAAACAGTGCTATTTAAATAAGGTAGCACCTTGACGGTACCTAACGAGAAAGCC
ACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA
AAGCGCGCGCAGGTGGCTATGTAAGTCTGATGTTAAAGCCGAGGCTAACCTCGGTTTCGCATTGGAAC
TGTGTAGCTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGTGGTATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGCCTGTAACGTGACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
AGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGTTTCAATACCCTTA
GTGCCGAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTT
GACATCCCCTGACCGCTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGCAGTGGTACAGGTGGTGCATGGTTGT
CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTAGTTGCCAGC
ATTCAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGTCGACAAGACGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATC
ATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAACGGGATGCTACTTCGCGAGAAG
ATGCTAATCTCTTAAACCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCG
CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA
CGGGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCGTAAGGAGCCAGCCGCGCAAGGTGGGGTAGATAA
CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAATCACTA
```

Luego de obtener las secuencias de las 3 bacterias (T2, F1, V2), se buscó el porcentaje en NCBI, donde indicó el mayor score de estas secuencias (ANEXO XI). Encontrándose entre las 3 secuencias, *Brevibacillus laterosporus*, tiene una secuencia incompleta. A partir de esta secuencia incompleta, seleccionando score más alto, el cual se trabajó.

El siguiente procedimiento fue el alineamiento, con el cual se utilizó el programa CLUSTAL 2,1, como primer paso se realizó un alineamiento múltiple de las 3 secuencias (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Brevibacillus laterosporus*), para observar secuencias conservadas con alto porcentaje de alineamiento.

En la Figura 9 se observa las tres secuencias con el porcentaje de identidad, lo que indicó que tan parecidas son una secuencia con la otra. Por ejemplo, *Brevibacillus laterosporus* (1) con *Bacillus cereus* (2) tiene 84,96% de similitud; así también, *Brevibacillus laterosporus* (1) con *Bacillus subtilis* (3), 85,28% de similitud.

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

	1	2	3
1: Blaterosporus	100.00	84.96	85.28
2: Bcereus	84.96	100.00	90.58
3: Bsubtilis	85.28	90.58	100.00

Figura 9. Secuencias múltiples (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Brevibacillus laterosporus*), en el programa CLUSTAL 2.1, indicando porcentaje de identidad.

Los porcentajes son bajos comparando los tres alineamientos siendo una de ellas, secuencia incompleta; entonces, para evitar ese porcentaje de error, se realizó el segundo paso que es un alineamiento adicional, donde solamente se comparó las secuencias completas; a través, de pairwise (alineamiento en pares), siendo *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*. Ambas secuencias tienen 92,4% de identidad (Figura 10); es decir, son casi idénticas, son muy conservadas en la sección 16S ribosomal. Por lo tanto, esta similitud es aceptable por ser dos bacterias del mismo género.

```
# Aligned_sequences: 2
# 1: Bcereus
# 2: Bsubtilis
# Matrix: EDNAFULL
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 1459
# Identity: 1348/1459 (92.4%)
# Similarity: 1348/1459 (92.4%)
# Gaps: 19/1459 ( 1.3%)
# Score: 6231.0
..
```

Figura 10. Comparación de secuencias completas (*Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*), por la opción pairwise del programa CLUSTAL 2.1, verificando el porcentaje de identidad.

DISCUSIÓN

En cuanto al lugar, según indica (Escobar, 2001) menciona que, haber expuesto las lombrices a luz natural; estas murieron rápidamente; así también, se colocó un plástico en la tapa para evitar su ingreso directo. Para el alimento de la lombriz dentro de la caja de tecnopor, la temperatura estuvo en 25 °C. Por lo tanto, Los datos fueron; entre 20-30°C, temperatura adecuada para el máximo rendimiento de las lombrices. Las autoras (Das & Samanta, 2016), hace referencia que la temperatura adecuada es 18 °C \pm 2°C; por lo tanto, si la temperatura desciende de 18 °C, disminuyen su actividad, dejando de crecer y producir ácidos húmicos y fúlvicos.

Así también, afirma (Rojas, 2005), la temperatura ambiente del lombricario osciló entre 16-20 °C, pues la temperatura dentro fue variable por las condiciones del medio en el que se instalaron las diferentes camas, debido a que al inicio hay un proceso aeróbico. Existe el aumento de temperatura del sustrato por estar expuesto al ambiente por 24 horas, siendo parte del procedimiento; esto se realiza porque los residuos están a temperaturas distintas, cuando sucede la exposición al ambiente, su temperatura se regulariza. Según el autor (Tineo, 1996) expone que, el alimento dentro del hábitat con altas temperaturas queman rápidamente destruyendo bacterias y haciendo perder el valor nutritivo del alimento; para ello, la disponibilidad de oxígeno contrarresta este efecto, removiendo la cama de la lombriz; esta acción no solo baja la temperatura; sino también, acelera la descomposición aeróbica permitiendo que las lombrices colonicen su hábitat.

El alimento se consideró preparado cuando las condiciones de su hábitat se estabilizaron. Según el autor (García, 2005), la humedad es un factor de mucha importancia y debe oscilar 70 y 80%. Cuando es superior al 80%, ocasiona que las lombrices entren en latencia; caso similar, si los niveles de humedad son inferiores al 70%. Así mismo, según (Martínez, 2000) observó que la lombriz requería alto porcentaje de humedad para desplazarse y facilitar su respiración. Por lo tanto, el porcentaje de humedad se mantuvo dentro de este intervalo, con el método de la remoción también empleado por estos autores.

En cuanto al análisis de proporción C/N en residuos vegetales, se realizó por los métodos Walkley y Black (materia orgánica) y método Kjeldahl (nitrógeno) se obtuvo entre 15/1 a 40/1, manteniendo control de esta proporción; este proceso, se realizó al inicio por la dificultad en el análisis; es decir, el carbono en las muestras fue por la determinado por materia orgánica, en el cual se emplea reactivos fiscalizados; así mismo, el método determinación de nitrógeno, es valorado por los químicos muy tóxicos, realizándose solo en campanas de gases. Por esta complejidad, también el autor (Casco, 2015), realizó el análisis de C/N al inicio del compostaje

en residuos orgánicos sólidos y así obtener un compostaje exitoso por degradación de materia orgánica, el cual obtuvo una óptima relación (C/N) desde 25/1 a 35/1, favoreciendo a su energía y crecimiento.

Para el autor (Cochachi, 2008), una relación C/N inicial es de 20 a 30; la cual, siendo adecuada al inicio del compostaje. Si la relación C/N es menor que 20, indica que el habitat posee más nitrógeno. Si la relación es de 40, entonces el material posee más carbono. Así mismo, en la proporción C/N de frutas (40/1) para su biodegradación necesitó mayor número de lombrices de tierra. También afirma que, este residuo presenta elevada relación C/N, porque, los vegetales poseen mayor nitrógeno, siendo factor importante para este proceso.

El autor (Arévalo, 2017), realizó el análisis C/N al final de su procedimiento (30 días), siendo este su variable; sus resultados mostraron diferencias significativas; siendo el carbono, más abundante en su vermicompost de ambos sustratos (residuos vegetales y estiércol equino). La mayoría de autores observan que esta variable es influyente en obtención de humus, por lo tanto, realizan estos análisis al final del proceso de compostaje.

Según el autor (Soriano, 2016), la relación C/N debe oscilar de 25 a 35, siendo mejor proporción para los microorganismos; esto coincide con otros autores, a proporción más alta, su crecimiento de los microorganismos se ve afectado, haciendo lenta su descomposición de sustrato, lo que sucedió en residuo de frutas; y, proporción más baja se aceleran en descomponer ocasionando pérdida de nitrógeno produciendo amonio, se percibe por olores desagradables (Gilbert & Wendell, 2008).

Teniendo la lombriz de tierra seleccionada, se realizó aislamiento y caracterización de las bacterias que se encuentran dentro de la lombriz. Estos microorganismos aislados fueron sembrados en medio TSA con dilución 10^{-3} , este medio provee un soporte de crecimiento para organismos anaerobios, aerobios, fuente de nitrógeno y minerales. Para los autores (Castañón, Villalobos, Meza, & Enciso, 2017), utilizaron este medio con el mismo propósito; además por el tipo del sustrato que suministro (materia orgánica del suelo), realizaron el aislamiento en otros medios como agar nutritivo (AN), para aislamiento de bacterias poco exigentes; medio King A (KA) para la detección de especies del género *Pseudomonas*; Agar de infusión Cerebro y Corazón (ABHI) es un medio para el cultivo de bacterias y hongos con difícil crecimiento; es decir, se emplea medios selectivos para lo que se desea obtener.

Sin embargo, los autores (Jaramillo et al., 2012), realizaron su aislamiento en medio PCA (medio plate count agar), teniendo en cuenta que en este medio crece todo tipo de bacterias de modo muy disperso, un medio que se utiliza para conteo de colonias; entonces, para los autores una de sus variables fue el análisis de crecimiento. El propósito de otras autoras (Das & Samanta, 2016) fue aislar todo microorganismo que existiera dentro del intestino de la

lombriz de tierra; por consiguiente, emplearon los medios de Agar nutritivo (AN), Agar Mackonkey (MA); para hongos, Agar Dextrosa Sabouraud (ADS); actinobacteria agar (AA). Los aislamientos que realizaron los autores tienen en común, formar consorcios microbianos, con medios nutritivos y medios selectivos.

Posteriormente, se realizó la selección de estos aislamientos, a base de su crecimiento y morfología por técnica de Tinción gram, se seleccionó las bacterias Gram (+) (cocos y bacilos), evitando la selección de Gram (-): ya que la mayoría de ellas son *Enterobacteriaceae*, siendo no fermentadores de glucosa. Los autores (Escobar, Mora, & Romero, 2012), realizaron la selección de bacterias y hongos por macroscopía y microscopía, la cual afirma que los Gram (-), no fermentas glucosa y de sus cultivos aislados el género más representativo, fue *Bacillus*. Para la caracterización bioquímica, consistió en el uso del indicador Rojo congo 1%, según la autora (Herrera, 2015), expresó que los microorganismos celulolíticos (capaces degradar CMC), se identificaron porque producen un halo de hidrólisis del CMC, alrededor de la colonia, luego del revelado con el colorante Rojo congo; sin embargo, se realizó esta prueba a todas las bacterias aisladas, dando como resultado ausencia de halo pero si crecimiento, lo que indica que estas bacterias son intracelulares.

Se decidió realizar la siguiente prueba a todos los cultivos aislados, presenten o no halo de hidrólisis, esta prueba cualitativa se dio valor al cultivo bacteriano que presente mayor degradación de tiras de papel filtro, el resultado fue el cultivo T2 presentando (+4) en la degradación de papel filtro, este papel filtro (Whatman N°1); teniendo como componente fibra de algodón 98%(Whatman, 2006). Los demás aislamientos presentaron menos calificación. La bacteria T2 presentó mayor degradación del papel filtro (Whatman N°1), se realizó proceso fermentativo en residuos vegetales (verduras, tubérculos y frutas) y CMC 1% (control), previamente se realizó tratamiento a los residuos vegetales con método ácido-alcalino; por que los residuos vegetales poseen altos porcentajes de biomasa lignocelulósica, ese proceso realiza la conversión en glucosa, permitiendo con ello una mayor accesibilidad de las enzimas, la importancia de este pretratamiento es controlar el pH (Badal, 2009).

Los autores (Daza, Escudero, Gil, & Mora, 2013) realizaron tratamiento al sustrato de residuos agrícolas de caña de azúcar (RAC), su variable es la efectividad de distintos tratamientos al sustrato; estos fueron, fragmentación mecánica, proceso organosolvente (hidrólisis ácida – alcalina), con el fin de eliminar características complejas en la pared celular como lignina y gran parte de la hemicelulosa, obteniendo como resultado, lignina más accesible para la producción de actividad.

Para los autores (Pérez, Tejada , Quintana, & Young, 2011) y otros autores (Flores, López, & Salcedo, 2011), registraron que el procedimiento ácido-alcalina tuvo mayor

rendimiento en residuos vegetales. Así mismo, realizaron cuatro tratamientos con un solo sustrato (residuos vegetales), siendo el proceso organosolvente que presentó mayor actividad, alcanzando las muestras enzimáticas propuestas.

Para tener una concentración de inóculo fue determinado por NMF (Nefelómetro de Mc Farland) N° 4 concentración 12×10^9 , el aislamiento bacteriano (T2), fue inoculado en cada matraz con residuos vegetales y CMC 1% (control), los autores (Pachón & Perea, 2010) sostienen que crecen y generan azúcares sin iniciar su metabolismo enzimático. Este autor, utilizó NMF (Nefelómetro de Mc Farland) N° 1 concentración 3×10^8 , fue otro factor para el consumo de sustrato de nuestro trabajo, ocasionando que el consumo sea en menor tiempo.

La determinación de actividad catalítica del extracto crudo a partir de las 8 horas, porque las 8 primeras horas de extracto crudo era mínimas. Se realizó cinética de crecimiento, determinación de celulosa y la actividad catalítica (como producto) a partir del extracto crudo producto de la centrifugación. Se determinó, por la cantidad de azúcares reductores producidos (método DNS); así también, rendimiento de biomasa y producto en base a consumo de celulosa (sustrato), obteniendo como mayor rendimiento en residuo de tubérculo.

De acuerdo con la Tabla 9 el rendimiento con respecto al producto es bastante similar entre los 3 diferentes residuos vegetales (frutas, verduras y tubérculos), lo que nos indica que, con los 3 residuos, el microorganismo seleccionado (*Bacillus cereus*) puede degradarlos haciendo uso de la enzima celulasa. Los rendimientos se definen como entre el producto y biomasa obtenida sobre el sustrato consumido, a medida que el sustrato va consumiéndose, los datos van a graficar una caída con respecto al incremento de la productividad (actividad catalítica), lo mismo sucede entonces con la formación de biomasa, la cual fue en aumento conforme se iba consumiendo el sustrato durante las 12 horas de trabajo. El principal factor es a concentración de sustrato, afectando la producción de celulosa. Sin embargo, altas concentraciones de sustrato pueden también causar inhibición enzimática, lo cual disminuye sustancialmente la velocidad (Sun & Cheng, 2002). Por ello es importante tener en cuenta con cuánto sustrato se está iniciando el proceso fermentativo, y con cuánto se está obteniendo en un determinado tiempo, puesto que permite mantener la actividad y controlar el crecimiento optimizando el producto (Wu & Chu, 2011).

En el trabajo realizado por (Zapata, 2014), se programó en el Termociclador una corrida de 40 ciclos (para bacterias celulolíticas termófilas), a comparación de los ciclos programados para la presente investigación, los cuales fueron de 35. El número de ciclos recomendado por literatura para este tipo de bacterias oscila entre 30 - 40 ciclos. Para observar las secuencias amplificadas se usó gel de poliacrilamida con bromuro de etidio a 80 voltios, a diferencia de la investigación realizada por (Zapata, 2014) quien utilizó para este procedimiento gel de

agarosa a 75 voltios. Si bien es cierto, el gel de poliacrilamida es más costoso, pero es mucho más efectivo ya que tiene un mayor poder de resolución (El-Osta & Hillier, 2005).

Se seleccionaron 3 bacterias en medios de cultivo con CMC, las cuales tuvieron una mayor actividad enzimática, teniendo (T2, V2 y F1). Según la región ARNr 16S, las bacterias seleccionadas corresponden al género *Bacillus*, siendo identificadas como *Bacillus cereus*, *Brevibacillus laterosporus* y *Bacillus subtilis* respectivamente.

El género *Bacillus* consiste en un grupo de bacterias aeróbicas o anaerobias facultativas con una amplia diversidad de capacidad fisiológica con respecto al calor, pH y salinidad (Holt, 1994). Otros estudios demostraron que las especies de *Bacillus* desempeñaban un papel importante en la biodegradación de compuestos moleculares grandes (Akin, 1987).

En la investigación de (Hermila & De los Ángeles, 2015), *Bacillus subtilis* fue una de las cepas identificadas molecularmente la cual presentó una alta actividad enzimática en sustrato CMC a 60 °C con pH de 7.4, contrastando con lo realizado en esta investigación a 50 °C con pH neutro; por lo tanto, estas bacterias son capaces de producir celulasas, trabajando correctamente a temperaturas oscilantes a 50 – 65 °C.

En el reporte de (Heck, Hertz, & Ayub, 2002), la bacteria que identificó molecularmente como *Bacillus subtilis* mostró los mejores resultados, teniendo una actividad de 1,08 UI/ mg en 24 horas.

Otra bacteria identificada en esta investigación fue *Bacillus cereus*, en comparación con los investigadores (Lu, Wang, Yang, & Wang, 2005), quienes obtuvieron cepas designadas como CDB1, CDB2, CDB10, CDB13 y CDB19. Las características morfológicas anteriores junto con los resultados de las pruebas fisiológicas revelaron que CDB2 estaban estrechamente relacionados con *Bacillus cereus*, todas estas cepas tienen efectos positivos sobre el consumo de celulosa en procesos fermentativos, a las que les realizó una caracterización morfológica y fisiológica más detallada.

En el gen 16S rRNA su secuenciación en bacterias se mantuvo durante mucho tiempo como el estándar de oro para la tipificación de bacterias y, en su mayor parte, es un excelente método para identificar taxonómicamente diferentes especies bacterianas. Sin embargo, el alto nivel de similitud de secuencia de 16S rRNA de algunas cepas publicadas como *Brevibacillus laterosporus*, complica el uso de la secuencia de 16S rRNA como un marcador molecular eficaz para su identificación (Berg, Crockett, Esplin, & Evans, 2016). Según cita (Merrill, Berg, & Breakwell, 2018) se emplea métodos más definitivos para distinguir cepas de *B. laterosporus*, los que estaban disponibles previamente en las plataformas. En su informe, presentaron y discutieron mejores alternativas de identificación para *Brevibacillus laterosporus* y *Paenibacillus larvae*, quienes comparten estrechos lazos ecológicos y evolutivos, que han

llevado a muchas dificultades reportadas para distinguir e identificar estas cepas. Estas dificultades pueden haber llevado a la clasificación errónea de varias secuencias 16S ARNr de *B. laterosporus* en NCBI. Un enfoque múltiple puede ser más preciso que el análisis tradicional de 16S rRNA por sí solo, para identificar estas cepas a nivel de especie, el uso combinado de marcadores moleculares proporcionando un método rápido, económico y confiable para diferenciar con éxito estas especies. Con esto, se da la reciente y continua incorporación de otras secuencias de *Brevibacillus* a GenBank, con la finalidad de obtener datos precisos.

En esta investigación, se halló una bacteria de *B. laterosporus*, observándose que tenía poder para degradar celulosa. Esto pudo comprobarse mediante una evaluación cualitativa, donde se preparó medios líquidos en matraz de 500 mL, con medio CMC 1 % (40 mL) + tiras de Whatman N°1 incubándose en 7 días, observándose diariamente la degradación del papel filtro, la cual presentó una calificación de +2 (regular). Sin embargo, como mencionan algunos autores, no se tienen datos completos sobre *Brevibacillus laterosporus*, la cual cuenta aún, incluso, con una secuencia parcial, haciendo difícil hallar características importantes como la de poder degradar celulosa, con el fin de la presente investigación.

Los datos estadísticos se desarrollaron con el programa Microsoft Excel (Office 16); para establecer las diferencias estadísticas en todos los parámetros de los procesos fermentativos con el cultivo bacteriano (T2), que presentó mayor actividad catalítica en verduras. Así también, los datos de la fermentación, no presentaron amplia dispersión, por lo tanto, se determinó que los valores que se obtuvieron de los 3 residuos vegetales en cuanto a rendimientos son muy similares, entonces la hipótesis alternativa se considera estadísticamente significativa.

Para esta investigación consistió en diseño factorial A*B, este cultivo bacteriano, se inoculó en cada residuo vegetal (verduras, tubérculos y frutas), y CMC 1% como control. Según (Gámez, 2016), todos estos análisis, representa al desarrollo de las hipótesis; en este caso, la hipótesis nula, el promedio de los parámetros en todos los tratamientos es igual, con 95% de confiabilidad; la hipótesis alternativa, un tratamiento es distinto, con 95% de confianza. Si $P(p) \geq 0,05$ se acepta hipótesis nula, caso contrario se acepta la alternativa.

CONCLUSIONES

Las bacterias obtenidas se aislaron y se caracterizaron a partir del intestino de *Eisenia foetida* (lombriz de tierra), las cuales fueron cocos y bacilos, resultado obtenido por la técnica de tinción gram. Estas bacterias fueron seleccionadas mediante la prueba bioquímica por indicador Rojo Congo, habiéndose evaluado la hidrólisis del medio CMC 1%, siendo el indicador la formación de halo.

Se amplificó el gen que codificaba el ARN ribosomal en bacterias, mediante PCR en los cultivos seleccionados, obteniendo como cultivos identificados *Bacillus subtilis* y *cereus* con mayor porcentaje de identificación, sin embargo, *Brevibacillus laterosporus* presentó bajo porcentaje.

Se determinó el porcentaje de carbono en relación al porcentaje de nitrógeno para cada residuo vegetal, por Walkley y Black (método de carbono); y, Kjeldahl (método de Nitrógeno), obteniendo la proporción C/N adecuada de 15/1 a 40/1, intervalo que favoreció en la proliferación de lombriz de tierra (*Eisenia foetida*)

Por la determinación de celulosa se obtuvo el rendimiento de biomasa y producto por consumo de sustrato en residuos vegetales (verduras, tubérculos y frutas), dando como resultado rendimiento de producto similar para los 3 residuos vegetales con diferencia mínima y en cuanto al rendimiento de biomasa, se observó un valor mayor en el residuo de frutas.

Se cuantificó la actividad catalítica de los aislamientos seleccionados, sobre sustrato de celulosa como control, y otros sustratos a base de vegetales (verduras, tubérculos y frutas), por determinación de azúcares reductores usando la técnica colorimétrica DNS con curva patrón de glucosa; y, mediante gráficos comparativos, se analizó y representó la mayor actividad en los residuos vegetales con datos estadísticos; dando como, resultados mayor actividad en sustrato de verduras, con margen de error de 0.5%.

RECOMENDACIONES

En el proceso de crianza de las lombrices, se recomienda mantener las condiciones como, porcentaje de humedad, se debe tener en cuenta que una abundancia de ella podría provocar la mortalidad de las lombrices, además de generar malos olores en el biorreactor, para ello se debe controlar continuamente el aspecto que tenga la tierra donde se encuentran las lombrices, mantener el pH debe considerarse si se trabaja con sustrato cítrico, y la medición se realizaría con potenciómetro específico. Para la proporción C/N, se recomienda medir en los residuos vegetales (verduras, tubérculos y frutas), al inicio del proceso, donde se trabaja con *Eisenia foetida* al cual se va proporcionar como alimento; así también medir esta proporción al sustrato para realizar la actividad catalítica, mejorando el proceso de análisis.

Para la disección de la lombriz, se debe cumplir el tiempo de congelación adecuado para poder realizar el corte y proceder con el aislamiento. La preparación de medios específicos debe contener el peso exacto, para que el crecimiento sea adecuado para proceder la caracterización morfológica.

En la actividad enzimática, las muestras deben ser tomadas al tiempo indicado, de esta manera, obtener resultados con menos margen de error, logrando así el nivel de confianza del 95 % - 99%. Se debe tener en cuenta también como dato, el rendimiento del consumo de sustrato en la actividad de celulosa. Para el crecimiento microbiano, se considera mantener al microorganismo más tiempo, superando las 12 horas, para obtener curva de crecimiento completa.

En la identificación molecular, se recomienda realizar la migración de electroforesis por gel de agarosa al mismo porcentaje. Además, para el revelado utilizar otra sustancia química menos dañina. Las secuencia identificada de *Brevibacillus laterosporus*, la cual corresponde a una secuencia parcial, no debe ser descartada, al contrario, debe seguir siendo motivo de investigación, contrastando su secuencia con la de otras que puedan guardar relación entre sí, de ahí la importancia del análisis del alineamiento múltiple de secuencias de diferentes organismos.

REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS

- Abreu, C. A., Baudel, H. M., Maior, A. M., Martin, C., Rocha, G. J., & Soares, I. B. (2011). Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. *Biomass Bioenerg*, 35, 663 - 670.
- Aburto, A., & García, A. (2013). Recoleccion y Tratamiento de Desechos Solidos. Manuales Elementales de Servicios Municipales. Nicaragua: AMUNIC e INIFOM, vol.1.
- Ademolu, K., Atayese, A., Bamidele, J, Idowu, A. (2014). Microbial diversity and digestive enzyme activities in te gut of earthworms found in sawmill industries in Abeokuta, Nigeria. *Rev. Bio. Trop*, vol 62, 1241-1249.
- Akin, C. (1987). Biocatalysis with immobilized cells. *Biotechnol Genet*.
- Álvarez, N. M., Paredes, M. D., & Silva, O. M. (2010). Obtención de Enzimas Celulasas por Fermentacion Solidas de Hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de Bioalcohol de Residuos del cultivo de Banano. *Tecnologica ESPOL*, 82 - 88, vol 23.
- Alexander, M. (1990). *Introducción a la Microbiología*. Nueva York: John Wiley & Sons.
- Anandham, R., Nagaiah, P., Nellaiappan, O. G., Polpass, A. J., & Soon Wo, K. (2015). Optimization of cellulase production by *Enhydrobacter* sp. ACCA2 and its application in biomass saccharification. *Frontiers in Microbiology*, 1-11.
- Arévalo, C. (2017). Determinación de las cantidades de carbono y nitrógeno presente en Lombricompost producido a partir de dos diferentes sustratos (material vegetal y estiércol de caballo (tesis de pregrado). Bogotá, Colombia.
- Badal, S. (Septiembre de 2009). Lignocellulose Biodegradation and Applications in. Obtenido de PubMed: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bk-2004-0889.ch001>
- Bautista, H., R.; Honorato S., J., A. (2005). Composición química de a madera de cuatro especies del género *Quercus*. *Revista ciencia forestal en México* 30 (98).
- Barrera, C., Carlosama, P., & Flores, P. (2009). Aislamiento, selección y preservación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales en compost generados en un cultivo de crisantemo. Quito: Universidad Central de Ecuador.
- Benitez, E., Melgar, R., & Nogales, R. (2009). Bioconversion of wastes from olive oil industries by vermicomposting process using the epigeic earthworm *Eisenia andrei*. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 489-495.
- Berg, J., Crockett, J., Esplin, K., & Evans, M. (15 de Junio de 2016). Characterization of five novel *Brevibacillus* bacteriophages and genomic comparison of *Brevibacillus* phages. Obtenido de Plos One:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0156838>

- Bora, T. C, Gogoi, D. K., Mazumder, S., Saikia, R., Sarma, R. K., Yadav, A., (2011). *Brevibacillus laterosporus* strain BPM3, a potential biocontrol agent isolated from a natural hot water spring of Assam, India. *Microbiological Research*, 166(3), 216–225. doi: 10.1016/j.micres.2010.03.002
- Brito, H. & Espinosa, D. (2009). Bacterial Diversity in the Digestive Trac of Earthworms (oligochaeta). Obtenido de <https://scialert.net/abstract/?doi=jbs.2009.192.199>
- Carazo, W. C., Castillo, P. M., & Ponce, M. J. (2013). Efecto de la Incorporación de Abonos Orgánicos (Compost y Lombrihumus) al suelo de la Finca Belén. Nicaragua: Somoto.
- Cardona, C. A., Paz, I. C., & Quintero, J. (2010). Production of bioethanol from sugar cane bagasse: status and perspectives. *Bioresource Technol*, 101, 4754-4766.
- Casco, A. (28 de Julio de 2015). Determinación de carbono y nitrógeno de los residuos orgánicos del distrito metropolitano de Quito (tesis de pregrado). Quito, Ecuador.
- Castañón, J., Villalobos, J., Meza, R., & Enciso, S. (2017). MOLECULAR IDENTIFICATION OF CULTIVATED BACTERIA IN *Eisenia foetida* Savigny, WITH THE POTENTIAL FOR REMOVAL OF PERSISTENT ORGANIC CONTAMINANTS. México.
- Chen, T., Dewhirst, F., Downes, J. I., Sutcliffe, I., Vartoukian, S., Wade, W., & W., Y. (2009). *Pyramidobacter piscolens* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum ‘Synergistetes’ isolated from the human oral cavity. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 972-980.
- Chicaiza, T. J. (2007). La producción de lombriz roja Californiana (*Eisenia foetida*) y lombrihumus con estiércol de vaca, cabra, cerdo y caballo. Honduras: Zamorano, Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria.
- Cindi, E. (2015). La basura que entra por los ojos llega al alma, Desechos Organicos, Compostaje, Lombricultura, Biodigestion. Canadá: Blogspot.
- Clarridge, J. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 841- 862 vol7, No4.
- Cochachi, E. (2008). Determinación del efecto de la relación C/N y la humedad en la calidad del compost obtenido a partir del tratamiento de residuos sólidos orgánicos del distrito de San Pedro mediante el proceso de degradación aerobia a nivel laboratorio. Huancayo. Obtenido de Repositorio UNCP: <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/228>.

- Coha, J., M.; Ramirez, P. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. Rev. Perú, biol. 10 (1): 67-77, Lima, Facultad de ciencias biológicas, UNMSM.
- Cruz, N., & Castellanos, D. (2009). Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la sabana de Bogotá. Bogotá: Rev. Colomb. Cienc. Hortíc.
- Dale, B., Elander, R. H., Ladisch, M., Lee, Y., & Mosier, N. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technol, 96, 673.
- Das, A., & Samanta, T. (29 de Enero de 2016). Isolation, identification, and characterization of gut microflora of *Perionyx excavatus* collected from Midnapore, West Bengal. Ed. Journal of Basic Microbiology, Department of Physiology, Raja N.L. Khan Women's College, Midnapore, West Bengal. Obtenido de Pub Med: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26821782>
- David, S., Guendouzi, S. E., Haggoud, A., Hassi, M., Houari, A., Ibsouda, S., & Iraqui, M. (2012). Antimycobacterial activity of a *Brevibacillus laterosporus* strain isolated from a moroccan soil. Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 43(4), 1516-22.
- Devaki, K., Murali, T., Pavana, K., Ramakrishna, A., & Suma, K. (2015). Isolation and Characterization of Cellulase producing *Streptomyce albaduncus* from gut of *Eisenia foetida*. International Journal of Scientific y Engineering Research, Vol. 6, Issue 2, 105-112.
- Daza, M., Z., T.; Escudero, A., J.; Gil, Z., N., J.; Mora, M., O., Y. (2013). Evaluación de las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado solido (SSF) utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar. Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XV No. 1, pp 108-117.
- Devi, S., Jyothi, K., Jyotsna, K., Rani, M., Shaheen, S., & Vijayalakshmi, K. (2009). Comparative assessment in enzyme activities and microbial populations during normal and vermicomposting. Journal of Environmental Biology, 1013-1017.
- Díaz, E. (2002). Guía de Lombricultura. España: ADEX, Agencia de Desarrollo Economico y Comercio Exterior.
- Dongowski G., Sembries S., & Will F. (2002). Degradation of apple cell wall material by commercial enzyme preparations. Nahrung/Food.
- Gilbert, M., & Wendell, E. (2008). *Introducción a la Ingeniería Medioambiental*. Madrid: Pearson Education (3a ed.).
- El-Osta, Y., & Hillier, A. (2005). Construction of a combined physical and genetic map of the chromosome of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and characterization of the rRNA operons. Obtenido de

https://www.researchgate.net/publication/7976663_Construction_of_a_combined_physical_and_genetic_map_of_the_chromosome_of_Lactobacillus_acidophilus_ATCC_4356_and_characterization_of_the_rRNA_operons/citation/download

- Escobar, C. (2001). Bioabonos agricultura para desarrollar una agricultura sostenible. Programa nacional de tecnología agropecuaria. Caquetá: Gráficas Florencia.
- Escobar, N., Mora, J., & Romero, J. (2012). Identificación de poblaciones microbianas en compost de residuos orgánicos de fincas cafeteras de Cundinamarca. Bol. Cient. Mus. Hist. Nat. Univ. Caldas. vol.16, pp.75-88. Obtenido de SciELO: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-30682012000100006&script=sci_abstract&tlng=es
- Espejo, R., Navarrete, P., Opazo, R., & Orúzar, F. R. (2012). Reduction of Soybean Meal Non-Starch Polysaccharide and alfa-Galactosides by Solid-State Fermentation Using Cellulolytic Bacteria Obtained from Different Environments. Open Access, 1- 10.
- Espinoza, E. (2017). Evaluación de la producción y composición química de humus de lombriz roja californiana (*Eisenia foétida*) con el contenido ruminal en el camal municipal de Huancavelica. Huancavelica, Perú. Obtenido de Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de Huancavelica: <http://repositorio.unh.edu.pe/handle/UNH/1324>
- Ferruzi, C. (1986). Manual de Lombricultura. Madrid - España: Mundi - Prensa.
- Flores, P., López, G., & Salcedo, M. (18 de Julio de 2011). EVALUACIÓN DE ENZIMAS PARA LA HIDRÓLISIS DE RESIDUOS (HOJAS Y COGOLLOS) DE LA COSECHA CAÑA DE AZÚCAR. ISSN: 0012-7353. Medellín. Obtenido de Redalyc: <https://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=49622390021>
- Frank, J. A., C. I. Reich, S. Sharma, J. S. Weisbaum, B. A. Wilson & G. J. Olsen (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2461-2470
- Fujii, K., Ikeda, K., & Yoshida, S. (2012). Isolation and characterization of aerobic microorganisms with cellulolytic activity in the gut of endogeic earthworms. *International Microbiology*, 12-130.
- Fun-Zhen, H., & S., W. Z. (1992). The nitrogen uptake efficiency from N15 labelled chemical fertilizer in the presence of earthworm manure (cast). India - New Dehli: C.A. Viraktmath.
- Gaitan, D., & Lara, C. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Gaggero, E., & Ordoñez, M. (2009). Gestion integral de Residuos Solidos Urbanos. Buenos Aires: OPDS, Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible.

- Gámez, Z. (2016). Efectos de los microorganismos eficientes autóctonos (MEA) en la producción de vermicompostaje (tesis de pregrado. Esmeraldas, Ecuador.
- García, C. (2005). Cría de la lombriz de tierra. Una alternativa ecológica y rentable. Bogotá: San Pablo.
- Gilbert, M., & Wendell, E. (2008). *Introducción a la Ingeniería Medioambiental*. Madrid: Pearson Education (3a ed.).
- Gómez, A. R. (2015). El tratamiento de los residuos. España: UNED.
- González, E. (2015). Fundamentos para el cultivo de lombriz roja californiana. S.L. SENA.
- Goto, T., Inouye, K., Miyatake, K., Nakazawa, M., Saaguchi, M., & Ueda, M. (2010). A novel cold-adapted cellulase complex from *Eisenia foetida*: Characterization of a multienzyme complex with carboxymethylcellulase, Beta-glucoside, beta-1,3 glucanase, and beta-xylosidase. *EL SEVIER*, 27-32.
- GRAMA. (2007). Manual de Vermicompostaje. Madrid: Asociacion Grama.
- Heck, J., Hertz, P., & Ayub, M. (2002). Cellulase and Xylanase production by isolated amazon Bacillus strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. 33. Sao Paulo. Obtenido de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822002000300005
- Heitmann, J., Joyce, T., & Kaya, F. (2000). Influence of lignin and its degradation products on enzymatic hydrolysis of xylan. 80:241-247.
- Hermila, Y. & De los Angeles, M. (2015) "Celulasas de bacillus aisladas del compostaje de residuos de café". Colegio de la Frontera Sur. Biotecnología Ambiental. Tapachula, Chiapas. hsiu@ecosur.edu.mx.
- Herrera, L. (2015), Microorganismo productores de enzimas hidrolíticas provenientes del alga antártico, *Grania* sp. Uruguay, Universidad de la Republica Uruguay, Facultad de Ciencias.
- Holt, J. (1994). *The aerobic endospore-forming rods and cocci. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins.
- Hong; Kim, I., S.; Sam, L.; J.; Sub, Ch., K.; Wook, S. (2011). Culture-Based and denaturing gradient gel Electrophoresis Analysis of the Bacterial Community Structure from the Intestinal tracts of Earthworms (*Eisenia foetida*). *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(9), 885–892. Korea.
- Howard, R., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E., & Howard, S. (2003). Lignocellulose

biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. Academic Journals.

- Huang, S., Sheng P., Zhang H. (2012). Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria from the Gut of *Holotrichia parallela* Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Int.J.Mol.Sci.* 2012, 13(3), 2563-2577.
- Jaramillo, K.; Mesa, L.; Paz, Y.; Rojas, M.; Salvador, C. (2012). Búsqueda de bacterias con actividad EC 3.2.1.4 (endo-1,4-beta-glucana) en *Eisenia foetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). Quito: Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas.
- Larkin M. A; Blackshields G.; Brown N. P; Chenna R.; McGettigan P.A.; McWilliam H.; Valentin F.; Wallace I. M.; Wilm A.; Lopez R.; Thompson J.D.; Gibson T. J.; Higgins D. G. (2007). Clustal W and CLUSTALX version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- López Méndez, C., David Ruelas, R., & Armenta López, C. (2013). Influencia de diferentes sustratos orgánicos en la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*). *Tecnociencia Chihuahua*, 7.
- Lu, W., Wang, H., Yang, S., & Wang, Z. (2005). Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. Beijing, China. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16474195>
- MacFaddin, J.F. (1985). Media for isolation cultivation identification maintenance of medical bacteria, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Marín, R. (2007). Caracterización y expresión recombinante de una celulasa de origen antártico. Santiago de Chile: Universidad de Chile.
- Martínez, C. (Junio de 2000). Lombricultura. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural pesca y alimentación. Texcoco, México: Texcoco, 11a ed. Obtenido de https://www.academia.edu/10129292/Lombricultura_1_
- Melherbe S., & Cloete T. (2002). Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Re/Views in Environmental Science*.
- Merrill, B., Berg, J., Breakwell, D., Hope, S., Grose, J. (2018). A PCR-based method for distinguishing between two common beehive bacteria, *Paenibacillus larvae* and *Brevibacillus laterosporus*. Obtenido de PMC - NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6210111/>
- Morales, L., H. (2006). Aislamiento, selección y evaluación de la actividad celulolítica de cuatro cepas de hongos nativos de Costa Rica. Cartago, Ingeniería en Biotecnología. Pag. 1-44
- Ovando S., & Waliszewski K. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. Veracruz: Universidad y Ciencia ed.

- Pachon, A., & Perea, D. (Mayo de 2010). Determinación cuantitativa de la actividad enzimática celulolítica de microorganismos aislados de suelos de cultivos de arroz (tesis de pregrado). Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Pérez, J., Tejada, L., Quintana, J., & Young, H. (2011). Obtención de etanol a partir de residuos de poda, mediante hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.*, 116.
- Pineda, L. (2006). Propuesta de un plan para el manejo de desechos sólidos y líquidos, producidos en una empresa de servicio de mantenimiento automotriz. Guatemala: Universidad de San Carlos.
- Pravia, M. (2012). Manual para la elaboración de compost, bases conceptuales y procedimientos. Organización Panamericana de la Salud.
- Ramírez P., & Cocha J. (2003). Degradación de celulosa por actinomicetos termófilos: Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. Lima.
- Rojas, M. (2005). Producción de humus de lombriz roja californiana (*Eisenia foetia*) elaborado con diferentes sustratos vegetales en la comunidad de Trinidad Pampa (tesis de pregrado). Coripata, Bolivia.
- Sam, L. J., Su Kim, I., Sub, C. K., & Sung, W. H. (2011). Culture-Based and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of the Bacterial Community Structure from the Intestinal Tracts of Earthworms (*Eisenia fetida*). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 886-892.
- Schnitzer, M. (2001). The in situ analysis of organic matter in soils. Canadian: *Journal of Soil Science*.
- Sidley Chemical. (2018). Properties of Sodium Carboxymethyl Cellulose. Recuperado de: celluloseether.com
- Soriano, J. (2016). Tiempo y calidad del compost con aplicación de tres dosis de "microorganismos eficaces" (tesis de pregrado). Facultad de Ciencia Forestales y del Ambiente, Universidad Nacional del Centro del Perú. Universidad Nacional del Centro del Perú, Huancayo, Perú.
- Sun, Y., & Cheng, J. (Mayo de 2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. 83, 11. *Biosource technology*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852401002127>
- Tamariz Angeles, C. D. (2014). Diversidad de bacterias termotolerantes celulolíticas y xilanolíticas aisladas de fuentes termales del callejón de Huaylas. Lima, Perú: UNMSM.

- Tineo, B. (1996). Estudio preliminar de algunos aspectos reproductivos de tres especies de lombrices de tierra. (*tesis de pregrado*). Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú.
- Veleceta, A., S., G. (2019). Pretratamiento de estiércol vacuno para producción de humus supresor a través de la interrelación de *Eisenia foetida* y microorganismos benéficos. Lima, Perú. Ingeniería y Ciencias Ambientales. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Wu, D., & Chu, J. (Agosto de 2011). High efficient production of recombinant human consensus interferon mutant in high cell density culture of *Pichia pastoris* using two phases methanol control. Obtenido de ResearchGate: https://www.researchgate.net/publication/251668132_High_efficient_production_of_recom
- Zapata, H. (2014). Aislamiento e identificación molecular de bacterias celulolíticas termófilas de las fuentes termales de calientes. Obtenido de Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann: <http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/2991>

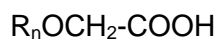
ANEXOS

ANEXO I: COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL COMPONENTE CARBOXIMETILCELULOSA (CMC) (Sidley Chemical, 2018)

Pero, ¿qué es la celulosa? Forma de un biopolímero con moléculas de β -glucosa; éstas se unen con enlaces β -1,4-o-glucosídico. La celulosa presenta la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$ con un valor mínimo de 2000 para n. El polímero puede tener una estructura lineal o fibrosa, siendo el constructor de la pared celular en vegetales.

Características físicas y químicas

- Fórmula



- Aspecto físico

Polvo color blanco. Carboximetilcelulosa sódica: partículas fibrosas de color blanco o lechoso.

- Olor y sabor

Inodora e insípida.

- Solubilidad en agua

Es soluble (20 mg/mL).

ANEXO II: FIGURAS DEL PROCEDIMIENTO

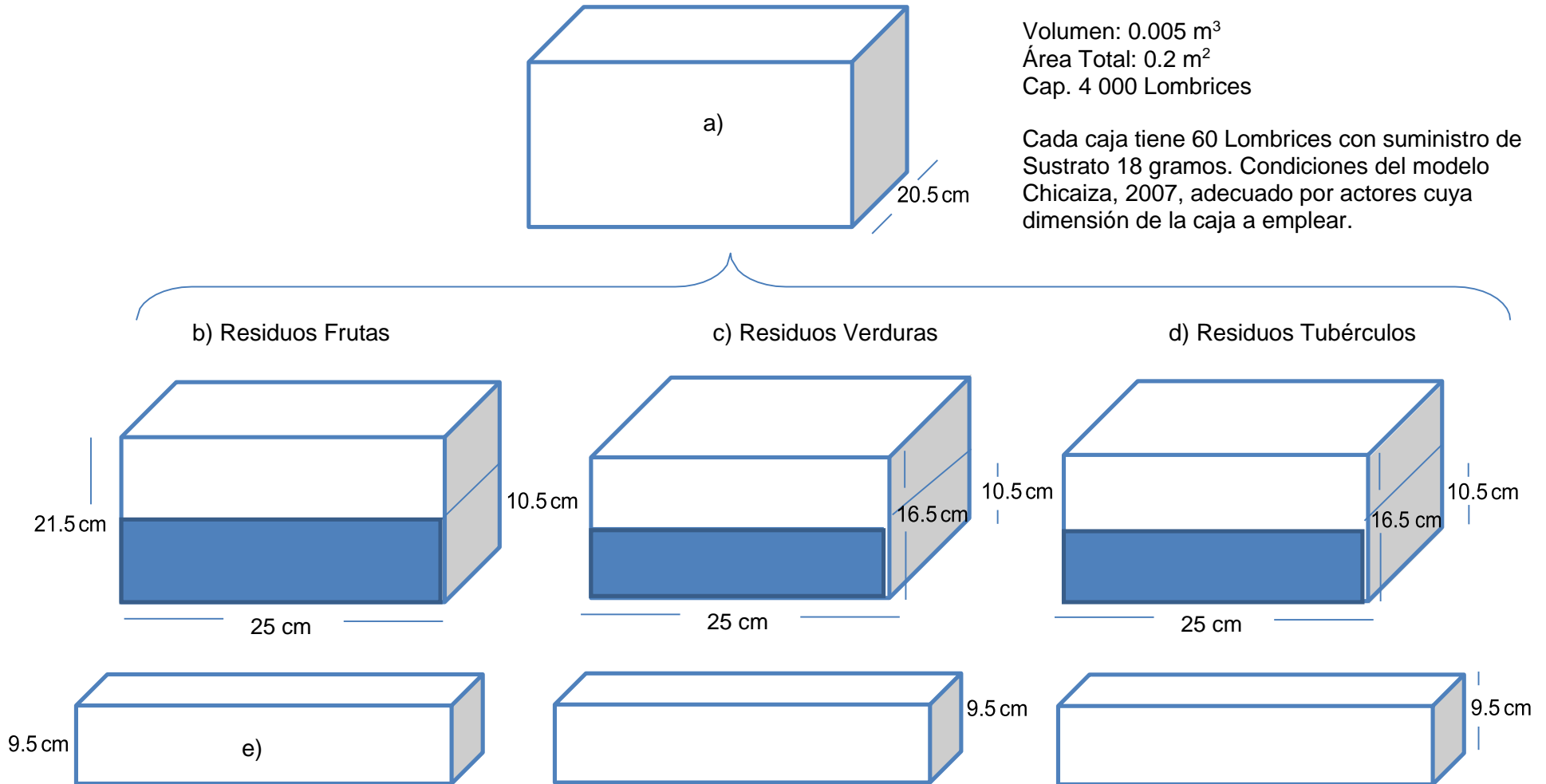


Figura 11. Medidas de las cajas para cada sustrato (verduras, tubérculos y frutas).

En la que consiste, (a) Medida del ancho de la caja, (b) dimensiones de la caja para el sustrato con residuos de frutas, (c) dimensiones De la caja para los residuos de verduras indicando el ancho de la tierra, (d) dimensiones de la caja para Residuos de tubérculos y (e) dimensiones de la parte inferior de la caja para el biol. Elaborado por el modelo (GRAMA, 2007), modificado por autores adecuando la cantidad de lombriz, como; de sustrato suministrado semanal.



a)

b)



Figura 12. Cajas con sustrato en condiciones adecuadas para el medio y material biológico.

Consiste, (a) Recolección de lombrices roja californiana (*Eisenia foetida*), (b) Cajas con sustrato (verduras, tubérculos y frutas), aun no añadidas las lombrices de tierra (*Eisenia foetida*), (c) Cajas con medios culminados. Siguiendo el modelo GRAMA, 2007, modificado por autores respecto a cantidades de sustrato y de organismo, con respecto a las dimensiones de las cajas.



Figura 13. Disección de Lombriz de tierra (*Eisenia foetida*),

Lavado de 3 lombrices (Residuos verduras, tubérculos y frutas, respectivamente) con agua destilada (2 veces por 2 minutos) en placas estériles, pre congelado por 4 horas, se colocó en la posición horizontal, para una posterior disección (estuche de disección esterilizada).



Figura 14. Proceso de dilución 10^{-3} para el aislamiento.

Se añadió 2 mL de solución salina 0.85%, luego se extrajo 1mL de cada muestra para obtener tres diluciones de 10^{-3} . Procedimiento seguido de (Devaki *et al.*, 2015), modificado por autores, en la congelación se espero 4 horas para obtener facilidad en la disección.



Figura 15. Aislamiento morfológico de bacterias a partir de la dilución 10^{-3} .

Sembrado en 3 placas estériles (cada muestra respectivamente) y en medio TSA, por extensión con 0.1 mL de dilución, esparciendo con la misma pipeta.

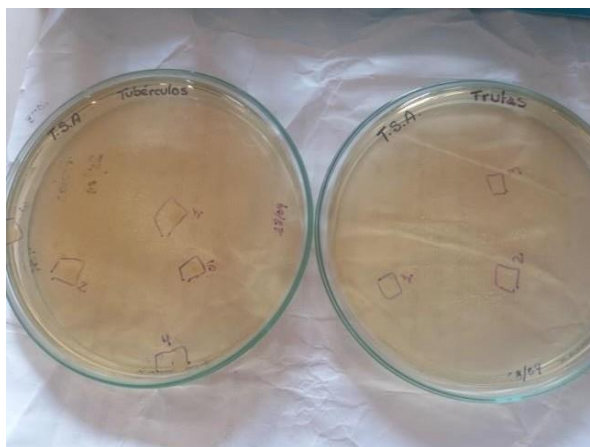


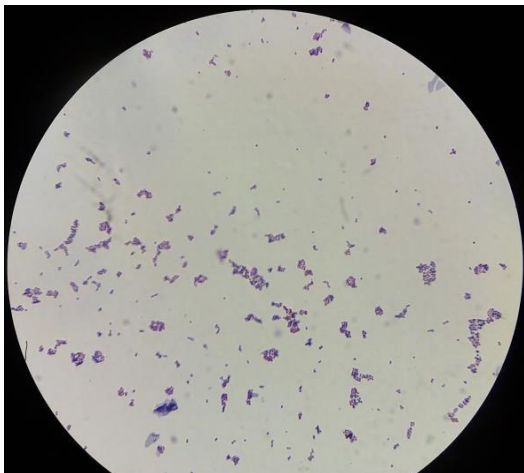
Figura 16. Criterios morfológicos para obtención de cultivos puros.

Bacterias obtenidas después de 24 horas, tanto en placa de verdura, tubérculos y frutas, se separó por características morfológicas y la facilidad para obtener cultivos puros. Se puede observar en las Figuras 25, 26 y 27.



Figura 17. Obtención de cultivos puros (Tinción gram).

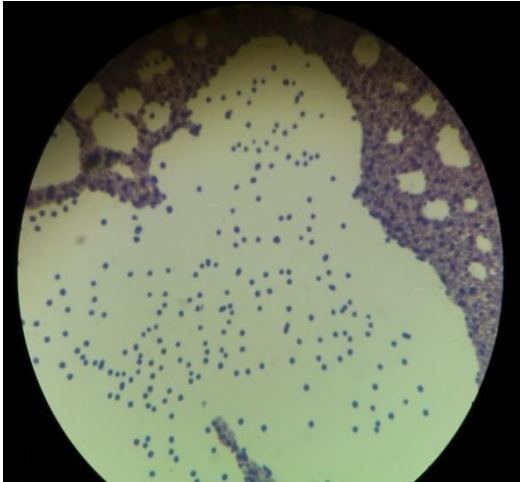
Bacterias seleccionadas de cada placa, en la placa de verduras, se identifica por (V1, V2), placa de tubérculos (T1, T2, T3, T4, T5) y placa de frutas (F1, F2, F3), se sembró en viales después de 24 horas de su crecimiento, se procedió a realizar tinción.



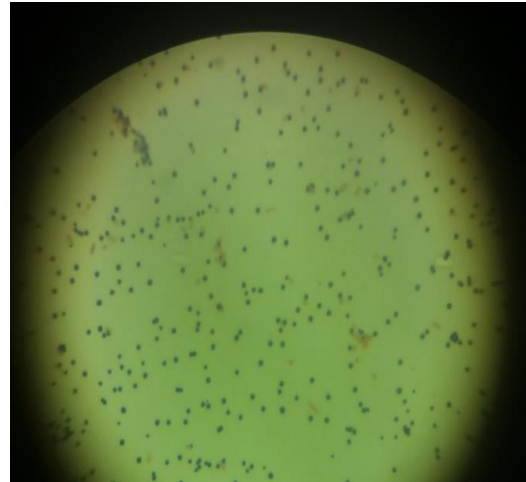
T1: Bacterias positivas



T2: Bacterias positivas



T3: Bacterias positivas



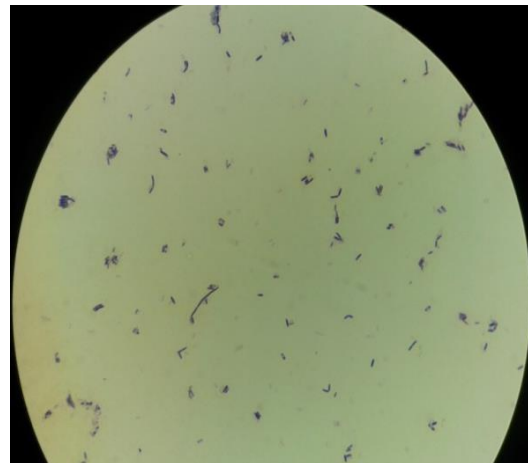
T4: Bacterias positivas

Figura 18. Caracterización morfológica de bacterias de la placa de tubérculos.

Las bacterias se nombraron como: T1: Bacterias gram positivas, T2: Bacterias gram positivas, T3: Bacterias gram positivas, T4: Bacterias gram positivas. T1, T2, T3 y T4 son colonias bacterianas de la placa de tubérculos, en ellos se seleccionó solo bacilos positivos en este caso T2. Por el método (Devaki *et al.*, 2015)



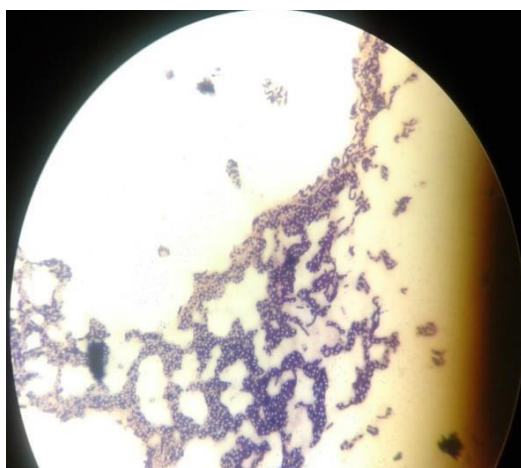
V1: Bacterias negativas



V2: Bacterias positivas

Figura 19. Caracterización morfológica de bacterias de la placa de verduras.

Las bacterias se nombraron como: V1: Bacterias gram negativas, V2: Bacterias gram positivas. V1 y V2 son colonias bacterianas de la placa de verduras, se seleccionó V1 y V2. Por el método (Devaki *et al.*, 2015) con modificación; la cual, consistió en seleccionar las bacterias gram negativas.



F1: Bacterias positivas

Figura 20. Caracterización morfológica de bacterias de la placa de frutas.

Las bacterias se nombraron como: F1: Bacterias gram positivas, se seleccionó por ser positivas con el método (Devaki *et al.*, 2015)



F1: Bacterias gram positivas



T2: Bacterias gram positivas

Figura 21. Caracterización bioquímica de bacterias que presentaron crecimiento en el medio CMC 1% con Rojo congo 1%.

Bacterias que se nombró F1 y T2, se obtuvo de las placas frutas y tubérculos respectivamente, la colonia F1, se visualiza la letra "a)" indicando halo que presentó la colonia por coloración del indicador del Rojo congo 1%. Ambas bacterias crecieron en el medio CMC 1%, pero el que presentó halo es la bacteria F1.



V1: Bacterias gram negativas



V2: Bacterias gram positivas

Figura 22. Bacterias en medio CMC 1% con prueba cualitativa de Rojo congo 1%.

Presenta las bacterias que se nombró (V1, V2), se obtuvo de las placas de verduras, si crecieron en el medio CMC 1%, pero no presentaron halos lo que indicó bajo índice de potencia respecto a la actividad, siguiendo la metodología de (Devaki *et al.*, 2015),

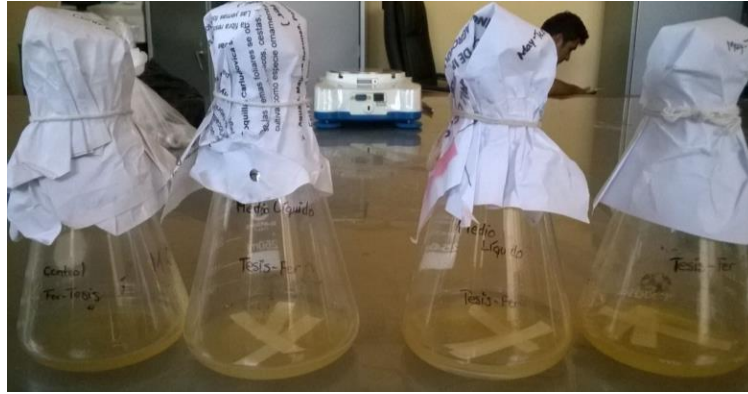
Verificando el Índice de Potencia (IP) para la cepa F1, siguiendo la metodología (Devaki *et al.*, 2015)

$$IP = \frac{DC}{H}$$

→ Diámetro de la colonia
→ Halo de Hidrolisis

$$IP = \frac{1,5 \text{ cm}}{1 \text{ cm}} = 1,5 \text{ cm}$$

➔ Los valores son mayores a 1 lo que indica que posee actividad celulolítica



a)



b)



c)

Figura 23. Evaluación cualitativa de bacterias que crecieron en medio CMC 1% por degradación de papel filtro.

(a) Imagen de los 4 matraz (control, T2, F1, V2), con la calificación de (+4, +3, +2) respectivamente, permanecieron por 7 días a 37°C con medio CMC 1% (40 mL) + dos tiras de papel filtro. **(b)** Matraz Control y Matraz T2. **(c)** Matraz F1 y Matraz V2. La metodología utilizada fue de (Ademolu *et al.*, 2014), modificado por autores considerando bacterias que presentaron halos y las que no.

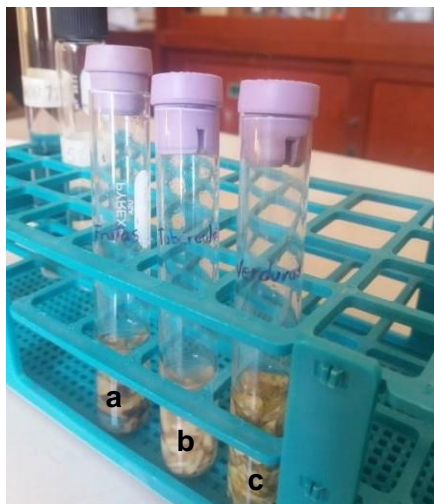


Figura 24. Tratamiento a los residuos vegetales.

“a” (frutas), “b” (tubérculos) y “c” (verduras). En tubos de ensayo con 4 mL de HCl 5% durante 24 horas. Elaborado por el método de (Álvarez *et. al*, 2010) y modificado por autores en el proceso de secado, fue de 2 horas.

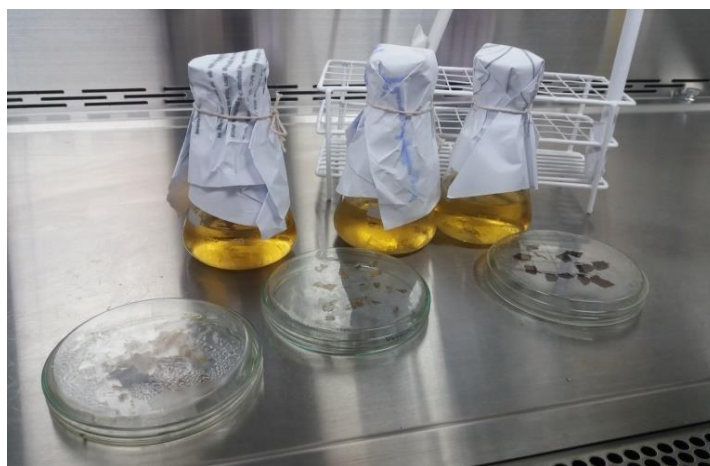


Figura 25. Preparación de cada sustrato en matraz para procesos fermentativo, volúmen total 100 mL y control de sustrato CMC 1%.

Los sustratos respectivos son verduras, tubérculos y frutas, para el proceso fermentativo, se secó y esterilizó el sustrato dentro de las placas con las condiciones de su peso (12 g/L), el tamaño de las partículas es de 0,5 cm a 1 cm, humedad 80 %, por el método de (Devi *et al.*, 2009) y modificado por autores considerando un control, para comparar resultados.



Figura 26. Disolución de la bacteria seleccionada para la concentración en el proceso fermentativo.

Bacteria se obtuvo a partir de cultivo puro (vial), se añade solución salina 0,85% se hizo el raspado con la aza bacteriológica y se disolvió con reposo de 5 minutos, bacteria preseleccionada por la evaluación cualitativa (+4 y +3) de su degradación del papel filtro (Pachón *et al.*, 2010) .



Figura 27. Determinación de la concentración de inóculo por nefelómetro de Mc Farland (NMF).

Tubo con solución salina (9 mL) y 1 mL de concentración de bacteria disuelta, y se comparó con NMF de N° 4 (12×10^9), se propuso alcanzar a esa concentración, por los 4 matraz. Elaborado y modificado por autores en cuanto al número de concentración, por la distribución en 4 matraz (Control, verduras, tubérculos y frutas).

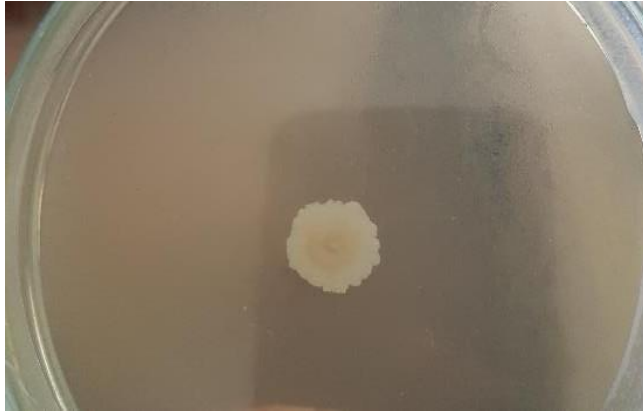


Figura 28. Cultivo aislado y caracterizado morfológicamente a partir de frutas (F1)



Figura 29. Cultivo aislado y caracterizado morfológicamente a partir de verduras (V2)



Figura 30. Cultivo aislado y caracterizado morfológicamente a partir de tubérculos (T2)

Tabla 11. Concentraciones de glucosa (10 soluciones) a 40 mg/100 mL

Tuvo un volúmen final de 1 mL = 1000 μ L. Empleando la fórmula $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$., por el método de (Durán *et al.*, 2009), modificado por autores, en cuanto a la concentración de Glucosa.

Glucosa		Agua Destilada (μ L)
Concentración (μ g/ μ L)	Volumen (μ L)	
0,04	100	900
0,08	200	800
0,12	300	700
0,16	400	600
0,2	500	500
0,24	600	400
0,28	700	300
0,32	800	200
0,36	900	100
0,4	1000	-

Tabla 12. Datos de absorbancia a 540 nm de glucosa.

No se consideró intersección, por lo que las concentraciones de glucosa fueron elaboradas independientemente del tiempo. Continuando con el método (Durán *et al.*, 2009).

Concentración Glucosa (μ g/ μ L)	Absorbancia (540 nm)
0,04	0,113
0,08	0,176
0,12	0,263
0,16	0,326
0,2	0,399
0,24	0,498
0,28	0,571
0,32	0,647
0,36	0,736
0,4	0,801

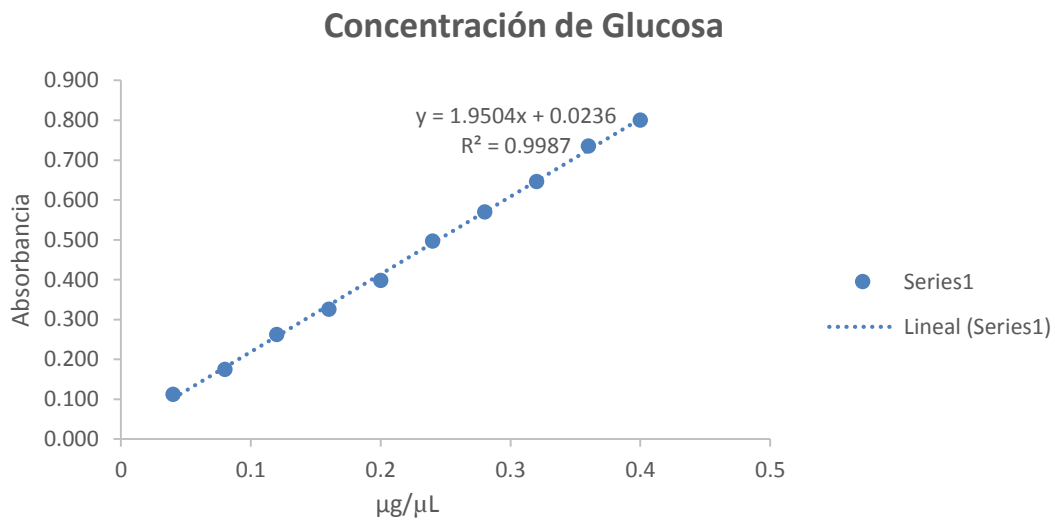
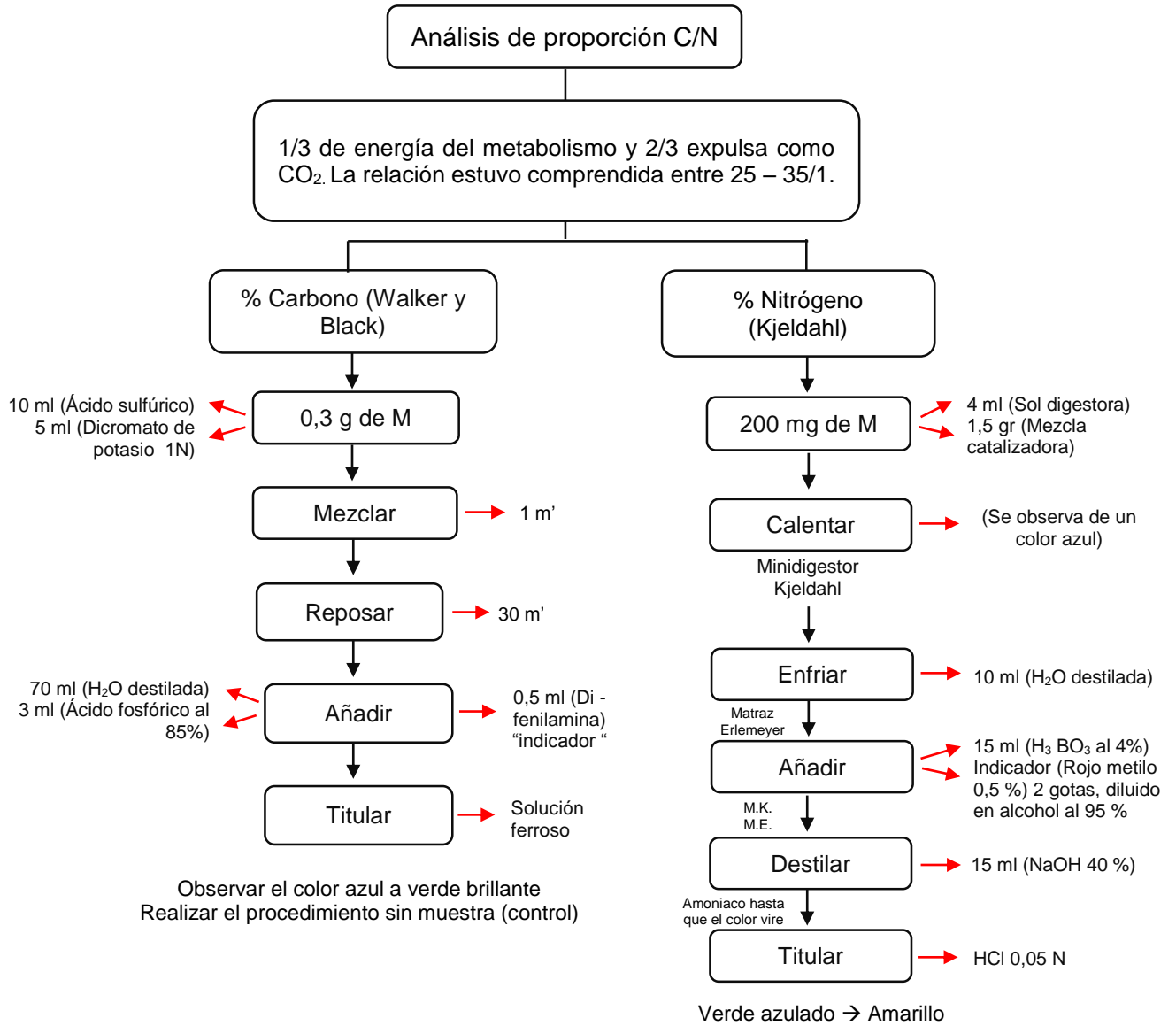


Figura 31. Curva patrón de Concentraciones de Glucosa (Eje X) vs. Absorbancia (Eje Y) e indicó un R^2 de 0,99.

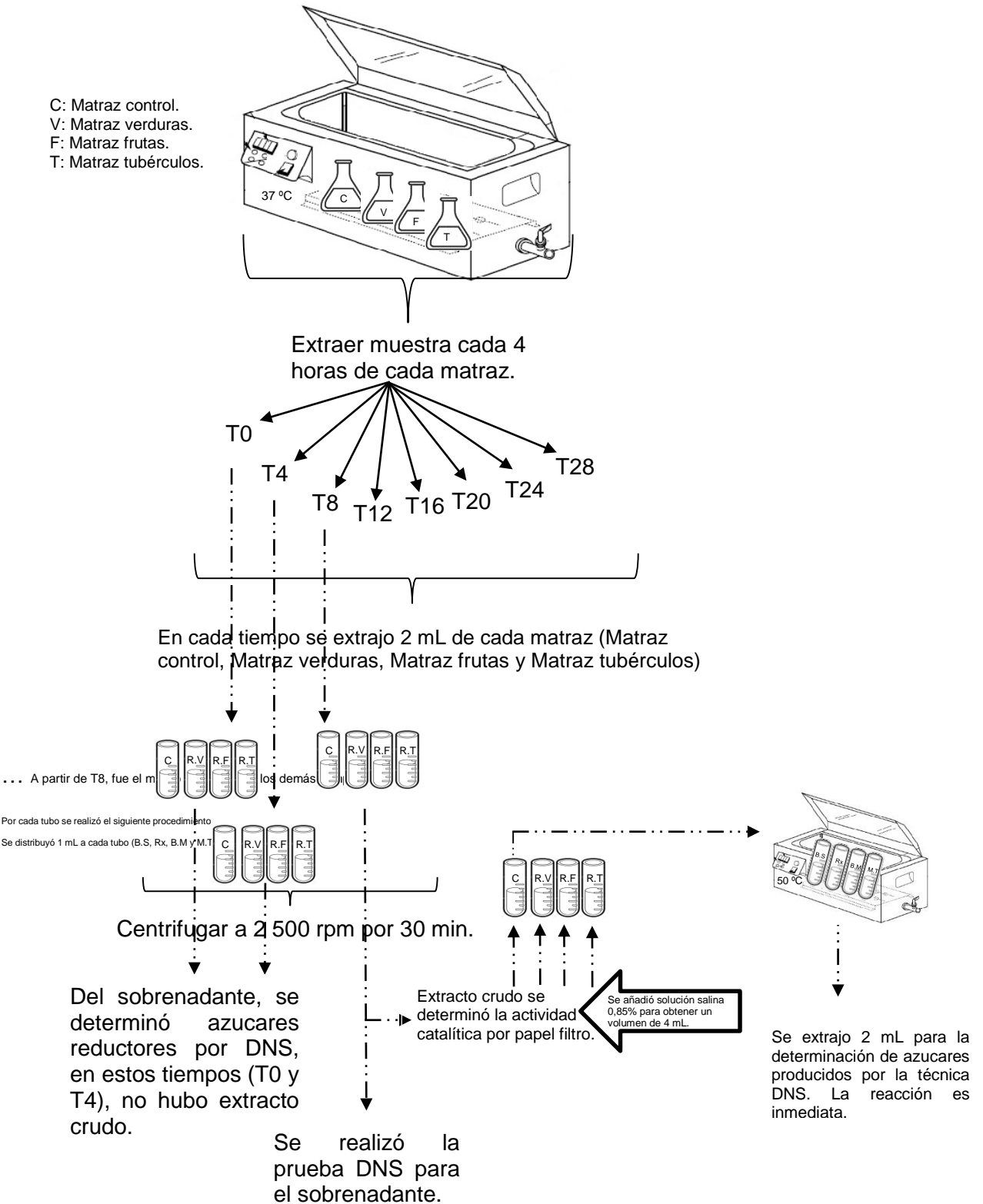
Se trazó línea de tendencia sin intercepto, por el R^2 , se realizó el reemplazo de Absorbancia en la ecuación para conocer los azúcares reductores que hubo en el proceso elaborado con el modelo (Durán *et al.*, 2009).

ANEXO III: FLUJOGRAMA DEL ANÁLISIS DE PROPORCIÓN C/N



ANEXO IV: FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE ACTIVIDAD CATALÍTICA SOBRE PAPEL FILTRO EN SUSTRATOS DE RESIDUOS VEGETALES.

Pachón, *et al.*, 2010



ANEXO V: ENSAYO PARA DEMOSTRAR EL CONSUMO DE SUSTRATO Y
CRECIMIENTO MICROBIANO "T2" (*Bacillus cereus*)

Consumo de sustrato y crecimiento

Tiempo (h)	Absorbancia	Conc. en Unid. de Glucosa g/L	Actividad de la celulasa (UI/L)	Absorbancia de Crecimiento (g/L)
0	0,107	0,043	0,008	0,005
4	0,072	0,025	0,028	0,028
8	0,062	0,02	0,314	0,038
12	0,035	0,006	1,534	0,053

Actividad enzimática (UI/L)

Tiempo (h)	Datos	Tubos	Absorbancia	Resultados AMN= (ABS + ABM)
0	T0	BS	0,002	0,008
		Rx	0,054	
		BM	0,006	
		M	0,018	
4	T1	BS	0,013	0,026
		Rx	0,005	
		BM	0,013	
		M	0,017	
8	T2	BS	0,026	0,053
		Rx	0,017	
		BM	0,027	
		M	0,004	
12	T3	BS	0,002	0,061
		Rx	0,039	
		BM	0,059	
		M	0,075	

Tiempo (h)	Absorbancia	Unidades Enzimatica (U/L)
0	0,008	0,008
4	0,026	0,028
8	0,053	0,314
12	0,061	1,534

ANEXO VI: DATOS DE ABSORBANCIA DE AZÚCARES REDUCTORES PARA CADA SUSTRATO

Tiempo	Sustratos	Absorbancia
T0	Control	0,286
	Frutas	0,164
	Tubérculos	0,040
	Verduras	0,068
T1	Control	0,068
	Frutas	0,219
	Tubérculos	0,073
	Verduras	0,050
T2	Control	0,104
	Frutas	0,130
	Tubérculos	0,070
	Verduras	0,070
T3	Control	0,102
	Frutas	0,108
	Tubérculos	0,073
	Verduras	0,061
T4	Control	0,077
	Frutas	0,043
	Tubérculos	0,036
	Verduras	0,070
T5	Control	0,065
	Frutas	0,072
	Tubérculos	0,034
	Verduras	0,035
T6	Control	0,065
	Frutas	0,056
	Tubérculos	0,030
	Verduras	0,034
T7	Control	0,066
	Frutas	0,047
	Tubérculos	0,034
	Verduras	0,035

ANEXO VII: FORMULAS PARA LA OBTENCIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA EN UNIDADES CELULOLÍTICAS (UI). Tamariz, 2014 y por autores.

En el caso de la actividad catalítica, la concentración de azúcares reductores del extracto crudo, se calcula la absorbancia neta de la muestra (AMN):

$$AMN = AMB - (ABM+ABS)$$

En la fórmula de la Figura 22:

[Glucosa]= $\left(\frac{AMN-0,0236}{1,9504}\right)$ mg/mL en ello se calcula la concentración de los azúcares reductores en la reacción de la actividad catalítica, se deriva a "x" como AMN.

Por lo tanto, reemplazando AMN como "x", la fórmula sería la siguiente:

$$[X \text{ glu}] = \left(\frac{AMN-0,0236}{1,9504}\right) \times 1000 \text{ ug/mL}$$

Calculando en unidades Enzimáticas:

$$U = \frac{\# \mu M}{t(\text{min})}, \dots \dots (1)$$

$$\# \mu M = \frac{X \mu g}{PM (\text{glucosa})}, \dots \dots (2)$$

Reemplazar 2 en 1:

$$U = \frac{X \mu g}{PM (\text{glucosa}) \times t (\text{min})}, \text{ los tiempos fueron cada 4 horas.}$$

Ahora dividirlo en el volumen de reacción que fue 1 mL, quedando la fórmula de la siguiente manera:

$$U/L = \left(\frac{X \mu g}{180 \times t (\text{min})}\right) \times 1000$$

ANEXO VIII: DATOS OBTENIDOS DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA SOBRE PAPEL
 FILTRO

T2 (8 h)	Control	Frutas	Verduras	Tubérculos
Bs.	0,048	0,042	0,036	0,047
Rx.	0,049	0,059	0,063	0,049
Bm.	0,066	0,065	0,085	0,034
M.	0,055	0,057	0,061	0,065

T3 (12 h)	Control	Frutas	Verduras	Tubérculos
Bs.	0,038	0,019	0,019	0,032
Rx.	0,030	0,036	0,036	0,039
Bm.	0,039	0,048	0,027	0,029
M.	0,044	0,045	0,031	0,041

T4 (16 h)	Control	Frutas	Verduras	Tubérculos
Bs.	0,045	0,018	0,019	0,031
Rx.	0,028	0,044	0,040	0,038
Bm.	0,032	0,061	0,034	0,051
M.	0,039	0,053	0,044	0,045

T5 (20 h)	Control	Frutas	Verduras	Tubérculos
Bs.	0,038	0,023	0,031	0,085
Rx.	0,029	0,050	0,026	0,027
Bm.	0,045	0,055	0,031	0,035
M.	0,040	0,053	0,038	0,038

T6 (24 h)	Control	Frutas	Verduras	Tubérculos
Bs.	0,039	0,029	0,016	0,036
Rx.	0,028	0,042	0,038	0,035
Bm.	0,042	0,050	0,045	0,023
M.	0,041	0,066	0,043	0,040

T7 (28 h)	Control	Frutas	Verduras	Tubérculos
Bs.	0,035	0,032	0,031	0,039
Rx.	0,030	0,041	0,024	0,035
Bm.	0,036	0,059	0,028	0,035
M.	0,042	0,044	0,029	0,038

ANEXO IX: DETERMINACIÓN DE CELULOSA, RENDIMIENTO DE BIOMASA Y PRODUCTO POR CONSUMO DE SUSTRATO

Pesos de celulosa (g/L)

Tiempo (h)	CMC	Frutas	Verduras	Tubérculos
0	0,45	0,36	0,41	0,39
4	0,35	0,34	0,39	0,38
8	0,29	0,3	0,36	0,35
12	0,27	0,28	0,33	0,32

Peso seco del residuo (gr)

Tiempo (h)	CMC	Frutas	Verduras	Tubérculos
0	0,9	0,72	0,82	0,78
4	0,7	0,68	0,78	0,76
8	0,58	0,6	0,72	0,7
12	0,54	0,56	0,66	0,64

Datos de biomasa (x), sustrato (s) y producto (p) durante las 12 horas del proceso.

Tiempo (h)	CMC			Frutas			Verduras			Tubérculos		
	x (g/L)	s (g/L)	p (g/L)	x (g/L)	s (g/L)	p (g/L)	x (g/L)	s (g/L)	p (g/L)	x (g/L)	s (g/L)	p (g/L)
0	0.004	0.4	0.008	0.003	0.36	0.005	0.005	0.41	0.009	0.004	0.39	0.008
4	0.027	0.35	0.069	0.01	0.34	0.035	0.023	0.39	0.054	0.02	0.38	0.046
8	0.036	0.29	0.075	0.023	0.3	0.069	0.031	0.36	0.073	0.028	0.35	0.07
12	0.051	0.27	0.089	0.032	0.28	0.074	0.045	0.33	0.082	0.038	0.32	0.079

Datos de biomasa (x), sustrato (s) y producto (p); tanto inicial y final, para la determinación del rendimiento, a partir de los datos anteriores.

	CMC	Frutas	Verduras	Tubérculos
X _o	0,004	0,003	0,005	0,004
X	0,051	0,032	0,045	0,038
S _o	0,4	0,36	0,41	0,39
S	0,27	0,28	0,33	0,32
P _o	0,008	0,005	0,009	0,008
P	0,089	0,074	0,082	0,079

Fórmulas para la obtención de los rendimientos (Y_{x/s} y Y_{p/s})

$$\text{➤ } Y_{x/s} = \frac{X - X_o}{S - S_o}$$

$$\text{➤ } Y_{p/s} = \frac{P - P_o}{S - S_o}$$

$$\text{➤ } Q_p = \frac{P - P_o}{T_f - T_o}$$

Rendimiento de biomasa y producto, con respecto al consumo de sustrato en 12 horas.

Y_{x/s}	0,362	0,363	0,5	0,486
Y_{p/s}	0,623	0,863	0,913	1,014
Q_p	0,007	0,006	0,006	0,006

ANEXO X: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL RENDIMIENTO Y_x/s , Y_p/s y Q_p

Y_p/s		Y_x/s	
Promedio	0,853	Promedio	0,427
Error	0,083	Error	0,038
Mediana	0,888	Mediana	0,424
Desviación estándar	0,166	Desviación estándar	0,076
Varianza	0,028	Varianza	0,006
Rango	0,391	Rango	0,138
Mínimo	0,623	Mínimo	0,362
Máximo	1,014	Máximo	0,5
Suma	3,412	Suma	1,710
Cuenta	4	Cuenta	4
Nivel de confianza(95.0%)	0,264	Nivel de confianza(95.0%)	0,121

Q_p	
Promedio	0,006
Error	0,0002
Mediana	0,006
Desviación estándar	0,0004
Varianza	1,9213E-07
Rango	0,001
Mínimo	0,006
Máximo	0,007
Suma	0,024
Cuenta	4
Nivel de confianza(95.0%)	0,0007

Análisis de varianza

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Yp/s	4	3,412	0,853	0,028
Yx/s	4	1,710	0,427	0,006
Qp	4	0,025	0,006	1,9213E-07

<i>Variaciones de los grupos</i>	<i>Total de cuadrados</i>	<i>Promedio</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico</i>
Entre Yp/s, Yx/s, Qp	1,435	0,717	4,5492E-06	4,257
Dentro de Yp/s, Yx/s, Qp	0,099	0,011		
Total	1,534			

ANEXO XI: PORCENTAJE DE ALINEAMIENTO EN EL NCBI, DE LAS SECUENCIAS
Bacillus subtilis, *Bacillus cereus* y *Brevibacillus laterosporus*.

Gene 16S ARN ribosomal del cultivo *Bacillus cereus*

BLAST® » blastn suite » RID-NBJBWHG7014 [Home](#) [Recent Results](#) [Saved Strategies](#) [Help](#)

BLAST Results

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#) [YouTube](#) [How to read this page](#) [Blast report description](#) [Click here to use the new BLAST results page](#)

Job title: AJ277908:Bacillus cereus 16S rRNA gene for...

RID: NBJBWHG7014 (Expires on 08-17 05:07 am)

Query ID: AJ277908.1
Description: Bacillus cereus 16S rRNA gene for 16S ribosomal RNA, strain Bactisubtil
Molecule type: nucleic acid
Query Length: 1447

Database Name: nr
Description: Nucleotide collection (nt)
Program: BLASTN 2.9.0+ [Citation](#)

Sequences producing significant alignments:
Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus 16S rRNA gene for 16S ribosomal RNA, strain Bactisubtil	2673	2673	100%	0.0	100.00%	AJ277908.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain Bti chromosome	2567	34137	99%	0.0	98.69%	CP037890.1
<input type="checkbox"/> Bacillus toyonensis strain ChemUPES_7_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2567	2567	99%	0.0	98.69%	MK281615.1
<input type="checkbox"/> Bacillus mobilis strain ML-A2C4 chromosome, complete genome	2567	35785	99%	0.0	98.69%	CP031443.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain T0131 chromosome	2567	34126	99%	0.0	98.69%	CP035735.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain t0137 chromosome	2567	34158	99%	0.0	98.69%	CP035736.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain T0139 chromosome	2567	34156	99%	0.0	98.69%	CP035737.1
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus strain ZB201708 chromosome, complete genome	2567	35740	99%	0.0	98.69%	CP030982.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. (in: Bacteria) strain MS3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2567	2567	99%	0.0	98.69%	MH699239.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. (in: Bacteria) strain TNB 8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2567	2567	99%	0.0	98.69%	MG471390.1
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus strain VLS-S-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2567	2567	99%	0.0	98.69%	MH068823.1
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus strain TG1-6 chromosome, complete genome	2567	35818	99%	0.0	98.69%	CP026678.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. FDAARGOS_235 chromosome, complete genome	2567	35851	99%	0.0	98.69%	CP020437.2
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis serovar israelensis strain VCRC B-17 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2567	2567	99%	0.0	98.69%	MG745385.1
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus strain MLY1 chromosome MLY1.0, complete sequence	2567	40363	99%	0.0	98.69%	CP024655.1
<input type="checkbox"/> Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792, complete genome	2567	35851	99%	0.0	98.69%	CP020754.1
<input type="checkbox"/> Bacillus cereus strain FORC_047, complete genome	2567	35885	99%	0.0	98.69%	CP017060.1
<input type="checkbox"/> Bacterium strain PAH13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2567	2567	99%	0.0	98.69%	MF278996.1

Gene 16S ARN ribosomal del cultivo *Bacillus subtilis*.

BLAST® » [blastn suite](#) » RID-NBJZ4K4P014 [Home](#) [Recent Results](#) [Saved Strategies](#) [Help](#)

BLAST Results

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#) [YouTube](#) [How to read this page](#) [Blast report description](#) [Click here to use the new BLAST results page](#)

Job title: emb|AJ277905.1|

RID [NBJZ4K4P014](#) (Expires on 08-17 05:17 am)

Query ID [AJ277905.1](#)

Description [Bacillus subtilis 16S rRNA gene for 16S ribosomal RNA, strain Lactipan](#)

Molecule type nucleic acid

Query Length 1452

Database Name nr

Description Nucleotide collection (nt)

Program BLASTN 2.9.0+ [Citation](#)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis 16S rRNA gene for 16S ribosomal RNA, strain Lactipan	2682	2682	100%	0.0	100.00%	AJ277905.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. KBS0812 chromosome, complete genome	2639	26388	99%	0.0	99.52%	CP041757.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain DSM 10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2639	2639	99%	0.0	99.52%	MN077147.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain 50-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2639	2639	99%	0.0	99.52%	MH475924.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis subsp. subtilis NBRC 13719 DNA, complete genome	2639	26333	99%	0.0	99.52%	AP019714.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain SEM-9 chromosome, complete genome	2639	26340	99%	0.0	99.52%	CP021123.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis subsp. subtilis NCIB 3610 = ATCC 6051 strain NCIB 3610 chromosome, complete genome	2639	26383	99%	0.0	99.52%	CP034484.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain PR10 chromosome, complete genome	2639	26338	99%	0.0	99.52%	CP040528.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain H19 chromosome, complete genome	2639	26338	99%	0.0	99.52%	CP039935.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain MBI 600 chromosome, complete genome	2639	26314	99%	0.0	99.52%	CP033205.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain DLSB-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2639	2639	99%	0.0	99.52%	MK795390.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. (in: Bacteria) strain SS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2639	2639	99%	0.0	99.52%	MK736123.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain WS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2639	2639	99%	0.0	99.52%	MK621207.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis subsp. subtilis strain CP-350 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2639	2639	99%	0.0	99.52%	MK601694.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis subsp. subtilis strain G7 chromosome, complete genome	2639	26366	99%	0.0	99.52%	CP029609.1

Gene 16S ARN ribosomal del cultivo *Brevibacillus laterosporus* BL-2, secuencia parcial.

La parte sombreada indica el nombre de la bacteria, se empleó búsqueda rápida pore specie *B. aterosporus*, señalando score máximo.

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [▶ Formatting options](#) [▶ Download](#)

Job title: gb|DQ371289.2| (1507 letters)

RID [34586DF7014](#) (Expires on 01-07 21:47 pm)

Query ID [DQ371289.2](#)

Description Brevibacillus **laterosporus** strain BL-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Molecule type nucleic acid

Query Length 1507

Database Name nr

Description Nucleotide collection (nt)

Program BLASTN 2.8.1+ [▶ Citation](#)

Other reports: [▶ Search Summary](#) [[Taxonomy reports](#)] [[Distance tree of results](#)] [[MSA viewer](#)]

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus strain BL-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2784	2784	100%	0.0	100%	DQ371289.2
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2772	2772	100%	0.0	99%	DQ122932.2
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus strain E7593-50 chromosome, complete genome	2765	33025	99%	0.0	99%	CP032410.1
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus DSM 25, complete genome	2765	30310	99%	0.0	99%	CP017705.1
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus strain BL-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2758	2758	99%	0.0	99%	DQ371288.2
<input type="checkbox"/> Uncultured Brevibacillus sp. clone LHN42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2748	2748	99%	0.0	99%	KF003156.1
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus strain LHC95 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2743	2743	99%	0.0	99%	KC951909.1
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus strain Bl-zi chromosome, complete genome	2732	32582	99%	0.0	99%	CP032848.1
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus strain ZQ2 chromosome, complete genome	2732	32616	99%	0.0	99%	CP025545.1
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus LMG 15441, complete genome	2732	32599	99%	0.0	99%	CP007806.1
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus strain IHBB 9233 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2728	2728	99%	0.0	99%	KR085791.1
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus strain SMC57 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2721	2721	99%	0.0	99%	KF358454.1
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus strain DSM 25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2717	2717	98%	0.0	99%	NR_112212.1
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus isolate Y28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2712	2712	97%	0.0	99%	KF730748.1
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus strain B9, complete genome	2710	32409	99%	0.0	99%	CP011074.1
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus strain Lakshmi1210 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2706	2706	99%	0.0	99%	HQ412764.1
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus strain IAM 12465 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2706	2706	97%	0.0	99%	NR_037005.1
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus strain BPM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2704	2704	99%	0.0	99%	EU159585.1
<input type="checkbox"/> Brevibacillus laterosporus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: TISTR 1911	2700	2700	99%	0.0	99%	AB817147.1

ANEXO XII: FORMATOS DE INGRESO A LA UNIVERSIDAD AGRARIA LA MOLINA.

CARTA DE COMPROMISO INTEGRANTES LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA
Y BIOTECNOLOGÍA

Conste por el presente documento, que yo Maía Tausa Pérez Montes
con DNI N° 74533790, R.U.C. N° 10745337908 y domicilio legal
Vilo Nicolás González Mz 3 lote 31, Chumbale como parte del equipo de Laboratorio de Ecología
Microbiana y Biotecnología de la UNALM me comprometo a cumplir con las reglas
establecidas por el laboratorio (que se encuentran adjuntas a este documento), así como
las disposiciones que se detallan a continuación:

1. Ingresar al laboratorio a las 9.00 am y salir de él a las 6.00 pm o al concluir sus actividades, previa coordinación con las personas encargadas. El horario de ingreso será anotado en un fólder que se encontrará en la puerta de ingreso. Si algún ensayo se extendiera, se deberá anotar en el fólder de registro previa autorización y firma del encargado del proyecto.
2. Realizar los trabajos encomendados de manera eficiente sin desperdiciar material o hacer mal uso de reactivos, instrumentos o equipos.
3. El horario de almuerzo es de 1 h que podrá ser tomada en los siguientes turnos: de 12.45 pm a 1.45 pm. Cualquier cambio de horario deberá ser consultado con las personas encargadas del proyecto o con el responsable del laboratorio.
4. Las vacaciones serán tomadas en julio, desde el viernes de la semana del 20 de julio hasta el 29 de julio y en diciembre desde el viernes de la semana del 20 de diciembre hasta el 31 de diciembre, que serán las fechas en el que el laboratorio se encontrará cerrado y por lo que no se deben instalar ensayos.
5. Se deberán cumplir con los cronogramas establecidos y entregar los informes en el tiempo señalado dentro de él.
6. No se podrá divulgar o proporcionar información o documentación alguna referente a los ensayos, servicios, resultados o proyectos realizados dentro del laboratorio.

En caso de incumplimiento se efectuará la sanción correspondiente. Si se reincidiera, la persona será retirada del laboratorio, habiendo entregado todo los datos e información que haya sido generada dentro de él.



Firma

Nombre y apellido: Maía Tausa Pérez Montes

DNI: 74533790



REGLAS Y NORMAS DEL LABORATORIO DE ECOLOGIA MICROBIANA Y BIOTECNOLOGIA

1. Es de uso OBLIGATORIO traer y usar MANDIL BLANCO para entrar a las instalaciones del laboratorio, sobre todo en las áreas de trabajo. No se permitirá el ingreso a las áreas de trabajo sin mandil.
2. Todo integrante del laboratorio debe traer su CUADERNO de apuntes y dejarlo en el laboratorio. El cuaderno debe ser entregado al responsable del proyecto cada vez que se termine de usar.
3. Antes y Después de trabajar deben dejar LIMPIO Y ORDENADO, la mesa o área de trabajo.
4. NO encender un equipo o usar algún material del laboratorio si no se le ha enseñado previamente por el coordinador encargado.
5. Solo está permitido el ingreso al LEMYB, a las personas que forman parte del equipo del LEMYB y no ha personas ajenas o que ya no pertenecen al mismo.
6. SÓLO PERMANECERÁN dentro del laboratorio en el HORARIO ESTABLECIDO, programado con el responsable de cada proyecto o encargado.
7. Los asistentes de investigación, tesis, alumnos, técnicos y todo el personal del laboratorio debe respetar y cumplir las tareas encargadas por el responsable del proyecto o encargado, caso no culminen por algún imprevisto, no retirarse sin avisar.
8. Cuidar los casilleros asignados para cada integrante del laboratorio, no dejar alimentos u otros objetos guardados que puedan traer malestar al personal de trabajo del laboratorio.
9. Los pasadizos deben estar libres en todo momento, evitar hacer desorden. NO dejar mochilas en los pasadizos, ni tapers o botellas sobre los casilleros.
10. El uso del internet es solo exclusividad del personal de trabajo del laboratorio y para realizar trabajos o tareas exclusivas del laboratorio.
11. Evitar ocupar las salas o áreas del laboratorio para uso personales de tareas o estudios de pregrado o postgrado de la universidad.
12. Evitar el uso de laptops en el área de trabajo.
13. Está PROHIBIDO retirar algún medio de cultivo, reactivo, cepa en estudio y/o controles, material y equipos fuera del laboratorio sin autorización de la jefa del LEMYB.
14. Mantener limpio el COMEDOR, limpiando las mesas después de comer.
15. Está PROHIBIDO coger y usar llaves de las áreas del laboratorio sin autorización de la persona encargada.

DRA. DORIS ZÚÑIGA DÁVILA
Jefa del LEMYB Marino Tabusso
Prof. Principal Dpto de Biología
Universidad Nacional Agraria La Molina



María Teresa Pérez Montes
DNI: 74533790

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN
 MOLECULAR DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE
 CELULASAS EN INTESTINO DE LOMBRIZ DE TIERRA Y SU

	Fuente de Internet	<1 %
9	repositorio.espam.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
10	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
11	link.springer.com Fuente de Internet	<1 %
12	repository.javeriana.edu.co Fuente de Internet	<1 %
13	Submitted to Universidad Nacional de Colombia Trabajo del estudiante	<1 %
14	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	<1 %
15	www.fbioyf.unr.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
16	Submitted to Universidad Continental Trabajo del estudiante	<1 %
17	alicia.concytec.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
18	T Gadd. "Epidemiological aspects of viral haemorrhagic septicaemia virus genotype II isolated from Baltic herring, Clupea harengus	<1 %

membras L. : Epidemiology of VHSV from Baltic herring", Journal of Fish Diseases, 07/2011

Publicación

19	Submitted to Escuela Politecnica Nacional Trabajo del estudiante	<1%
20	www2.inecc.gob.mx Fuente de Internet	<1%
21	journals.plos.org Fuente de Internet	<1%
22	www.nrcresearchpress.com Fuente de Internet	<1%
23	edwards.sdsu.edu Fuente de Internet	<1%
24	www.repositoriodigital.ipn.mx Fuente de Internet	<1%
25	remcb-puce.edu.ec Fuente de Internet	<1%
26	docplayer.es Fuente de Internet	<1%
27	repositorio.espe.edu.ec Fuente de Internet	<1%
28	www.lasallista.edu.co Fuente de Internet	<1%

Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS

29	Trabajo del estudiante	<1 %
30	www.redhucyt.oas.org Fuente de Internet	<1 %
31	Kelsey Desjardine, Alban Pereira, Helen Wright, Teatulohi Matainaho, Michael Kelly, Raymond J. Andersen. " Tauramamide, a Lipopeptide Antibiotic Produced in Culture by Isolated from a Marine Habitat: Structure Elucidation and Synthesis ", Journal of Natural Products, 2007 Publicación	<1 %
32	repositorio.unapiquitos.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
33	documents.mx Fuente de Internet	<1 %
34	Submitted to Universidad Manuela Beltrán Virtual Trabajo del estudiante	<1 %
35	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
36	Submitted to 95131 Trabajo del estudiante	<1 %
37	Submitted to Universidad ESAN -- Escuela de Administración de Negocios para Graduados Trabajo del estudiante	<1 %

38	T. Brady, Christopher Fajardo, Bryan Merrill, Jared Hilton, Kiel Graves, Dennis Eggett, Sandra Hope. "Bystander Phage Therapy: Inducing Host-Associated Bacteria to Produce Antimicrobial Toxins against the Pathogen Using Phages", Antibiotics, 2018 Publicación	<1%
39	repositorio.unh.edu.pe Fuente de Internet	<1%
40	www.biologia.ucr.ac.cr Fuente de Internet	<1%
41	hera.ugr.es Fuente de Internet	<1%
42	www.compostandociencia.com Fuente de Internet	<1%
43	Martin Bilej. "Mucosal Immunity in Invertebrates", Elsevier BV, 2015 Publicación	<1%
44	Submitted to Universidad San Ignacio de Loyola Trabajo del estudiante	<1%
45	www.jmb.or.kr Fuente de Internet	<1%
46	human.ndsl.kr Fuente de Internet	<1%

47	Submitted to Cardiff University Trabajo del estudiante	<1 %
48	Submitted to University of Salford Trabajo del estudiante	<1 %
49	biblioteca.usac.edu.gt Fuente de Internet	<1 %
50	bibliotecadigital.umsa.bo:8080 Fuente de Internet	<1 %
51	Submitted to Royal Melbourne Institute of Technology Trabajo del estudiante	<1 %
52	Submitted to Universidad Autonoma de Bucaramanga Trabajo del estudiante	<1 %
53	isca.in Fuente de Internet	<1 %
54	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1 %
55	Submitted to Universidad Nacional de Colombia Trabajo del estudiante	<1 %
56	Wael Alsultan, Ganesan Vadamalai, Ahmad Khairulmazmi, Halimi Mohd Saud et al. "Isolation, identification and characterization of endophytic bacteria antagonistic to	<1 %

Phytophthora palmivora causing black pod of cocoa in Malaysia", European Journal of Plant Pathology, 2019

Publicación

57	www.tdx.cat Fuente de Internet	<1%
58	Submitted to Universidad Nacional del Centro del Peru Trabajo del estudiante	<1%
59	bd.com Fuente de Internet	<1%
60	dspace.uazuay.edu.ec Fuente de Internet	<1%
61	Submitted to University of Southern California Trabajo del estudiante	<1%
62	Submitted to CONACYT Trabajo del estudiante	<1%
63	www.cetaos.com Fuente de Internet	<1%
64	www.bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	<1%
65	Gurdeep Rastogi. "Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA", Journal of Industrial	<1%

Microbiology & Biotechnology, 04/2009

Publicación

66	edoc.hu-berlin.de Fuente de Internet	<1%
67	Submitted to Harper Adams University College Trabajo del estudiante	<1%
68	Lebin Thomas, Hari Ram, Ved Pal Singh. "Inducible cellulase production from an organic solvent tolerant Bacillus sp. SV1 and evolutionary divergence of endoglucanase in different species of the genus Bacillus", Brazilian Journal of Microbiology, 2018 Publicación	<1%
69	www.scielo.sa.cr Fuente de Internet	<1%
70	periodicos.unifor.br Fuente de Internet	<1%
71	bioresourcesbioprocessing.springeropen.com Fuente de Internet	<1%
72	Submitted to Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales (FLACSO) - Sede Ecuador Trabajo del estudiante	<1%
73	tel.archives-ouvertes.fr Fuente de Internet	<1%
74	repositorio.upeu.edu.pe	

	Fuente de Internet	<1%
75	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1%
76	Submitted to Universidad San Francisco de Quito Trabajo del estudiante	<1%
77	Submitted to Universitat Politècnica de València Trabajo del estudiante	<1%
78	www.ambmanagua.um.dk Fuente de Internet	<1%
79	pt.scribd.com Fuente de Internet	<1%
80	www.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	<1%
81	www.scribd.com Fuente de Internet	<1%
82	www.colprocah.com Fuente de Internet	<1%
83	foroarchive.infojardin.com Fuente de Internet	<1%
84	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	<1%
	www.unmsm.edu.pe	

85	Fuente de Internet	<1%
86	www.buenastareas.com Fuente de Internet	<1%
87	repository.unimilitar.edu.co Fuente de Internet	<1%
88	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	<1%
89	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Trabajo del estudiante	<1%
90	doaj.org Fuente de Internet	<1%
91	www2.edtrust.org Fuente de Internet	<1%
92	riul.unanleon.edu.ni:8080 Fuente de Internet	<1%
93	knewhealth.com Fuente de Internet	<1%
94	repositorio.uam.es Fuente de Internet	<1%
95	www.refertil.info Fuente de Internet	<1%
	www.redalyc.org	

96	Fuente de Internet	<1 %
97	m.dbpia.co.kr Fuente de Internet	<1 %
98	journals.nubip.edu.ua Fuente de Internet	<1 %
99	repositorio.unan.edu.ni Fuente de Internet	<1 %
100	opac.bibliotecaorton.catie.ac.cr Fuente de Internet	<1 %
101	www.scielo.org.co Fuente de Internet	<1 %
102	Submitted to Napier University Trabajo del estudiante	<1 %
103	www.grocare.com Fuente de Internet	<1 %
104	Submitted to CSU Northridge Trabajo del estudiante	<1 %
105	www.jstage.jst.go.jp Fuente de Internet	<1 %
106	B Gunya, V Muchenje, P J Masika. "The Potential of Eisenia foetida as a Protein Source on the Growth Performance, Digestive Organs Size, Bone Strength and Carcass	<1 %

Characteristics of Broilers", The Journal of Applied Poultry Research, 2019

Publicación

107	www.vidaecuestre.com.ar Fuente de Internet	<1 %
108	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	<1 %
109	www.swissinfo.org Fuente de Internet	<1 %
110	www.estedemadrid.com Fuente de Internet	<1 %
111	www.viasalus.com Fuente de Internet	<1 %
112	Submitted to Universidad Andina Nestor Caceres Velasquez Trabajo del estudiante	<1 %
113	Submitted to University of New South Wales Trabajo del estudiante	<1 %
114	id.123dok.com Fuente de Internet	<1 %
115	www.anater.com Fuente de Internet	<1 %
116	books.google.com.na Fuente de Internet	<1 %

117	repositorio.uss.edu.pe Fuente de Internet	<1%
118	acikarsiv.ankara.edu.tr Fuente de Internet	<1%
119	krshikosh.egranth.ac.in Fuente de Internet	<1%
120	busqueda.bvsalud.org Fuente de Internet	<1%
121	Tushar Chandra Sarker, Shah Md Golam Gousul Azam, Giuliano Bonanomi. "Recent Advances in Sugarcane Industry Solid By-Products Valorization", Waste and Biomass Valorization, 2016 Publicación	<1%
122	Duarte, Gilvan Caetano(Ferreira Filho, Edivaldo Ximenes and Ricart, Carlos André Ornelas). "Holocelulasas produzidas por Aspergillus oryzae : purificação, caracterização e degradação de biomassa lignocelulósica", RIUnB, 2013. Publicación	<1%
123	www.rte.espol.edu.ec Fuente de Internet	<1%
124	Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León Trabajo del estudiante	<1%

125	Luis José Espejo, Karen Lorena Rodríguez, Martha Fabiola Rodríguez, Arlen Patricia Gómez Ramírez. "Identificación genotípica de Staphylococcus con fenotipo meticilino resistente aislados de muestras de humanos, animales y ambiente", Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 2019 Publicación	<1%
126	Submitted to Unviersidad de Granada Trabajo del estudiante	<1%
127	repositorio.uisek.edu.ec Fuente de Internet	<1%
128	Submitted to Universidad Internacional de la Rioja Trabajo del estudiante	<1%
129	ola.icmyl.unam.mx Fuente de Internet	<1%
130	www.kioscoverde.bo Fuente de Internet	<1%
131	Submitted to Gimnasio Campestre Trabajo del estudiante	<1%
132	Kroschel, JÃ¼rgen, and Birgit Schaub. "Biology and Ecology of Potato Tuber Moths as Major Pests of Potato", Insect Pests of Potato, 2013. Publicación	<1%

133 Marcio De Andrade Cordeiro, Ossalin De Almeida, Douglas Alberto Rocha de Castro, Haroldo Jorge Da Silva Ribeiro et al. **<1%**
"HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO CAROÇO DE AÇAÍ (Euterpe oleracea Mart) PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL", Revista Brasileira de Energias Renováveis, 2019

Publicación

134 Submitted to Fundacion Universidad de America **<1%**
Trabajo del estudiante

135 Biofuels in Brazil, 2014. **<1%**
Publicación

136 Submitted to Universidad Cientifica del Sur **<1%**
Trabajo del estudiante

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Apagado