

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
COLEGIO DE INGENIERÍA AMBIENTAL



**“AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS MICROBIANAS CON APLICACIÓN
AMBIENTAL”**

TESIS PROFESIONAL

PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DEL:
LICENCIATURA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTAN:

IVON REYES JUÁREZ

BRANDON RENDÓN JUÁREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA DEL CARMEN GUADALUPE AVELINO FLORES

PUEBLA, PUE, MAYO 2025

Dedicatoria

A mis padres. María Caritina, Albina y Eufemio

Quienes me dieron las bases para llevar una vida armoniosa, una familia maravillosa, así como amor y apoyo incondicional. Tienen toda mi admiración, amor y agradecimiento.

A mi madre la agradezco la paciencia, el apoyo y confianza en mi y en este trabajo.

También a mi padre Javier por enseñarme sobre resiliencia y determinación.

A mis hermanos. Karina y Paco

Por acompañarme en cada etapa de mi vida porque nos le queda opción y por su protección todos estos años con risas, peleas, lecciones de vida y malos cortes de cabello.

A Karina por invitarme a cuestionar sobre mis prejuicios e ideas más arraigadas y mostrándome nuevas perspectivas de la vida, además por compartir el amor a la natación.

A Paco por las bromas y recordarme cada día que mientras él este vivo habrá peleas llenas de risas.

A mi hermanita María de los Ángeles por traer armonía cada noviembre, así sea por solo unas horas.

Me emociona seguir creciendo junto a ustedes.

A mis compañeros peludos

Quienes alegran mis días y me enseñan sobre la simplicidad de la vida y la facilidad de ser feliz.

IVON REYES JUÁREZ

Agradecimientos

Dra. María del Carmen Avelino Flores

Por darnos la oportunidad de trabajar en este proyecto y mostrarnos el arte de un trabajo de investigación, por transmitir su pasión y dedicación por la microbiología, pero sobre todo por su calidez de persona.

Mirka, Arleth, Ignacio y Emiliano

Por trabajar juntos en este proyecto, divertirnos y frustrarnos en el proceso, son parte elemental de este trabajo. A Mirka gracia por recordarme soñar; Arleth gracias por tu sencillez; Nacho gracias por tu determinación y Emi gracias por tu empeño. Sobre todo, gracias por permitirnos conocerlos más y por su amistad.

Brandon

A pesar de ser tan diferentes, en el punto medio logramos concluir este proyecto y formar una amistad, no fue un camino fácil y la idea de rendirse estuvo presente, pero fue un trabajo que en su mayoría se disfruto gracias a la amistad que formamos. Un gusto hacer ciencia contigo.

Yannick, Diana, Ericka y Ale.

Gracias por las aventuras junto a ustedes, por escucharme siempre y compartir este proceso conmigo, son el mejor regalo inesperado que me dio este trabajo de investigación. A Yannick gracias por estar siempre y mostrarme buenas películas. También agradezco a Adri por su apoyo incondicional, así como a Dulce por estar en uno de los momentos más difíciles de mi vida. A Jessi y Conny agradezco su amistad durante la carrera. Así mismo hago una mención a Belen, Yatziri, Lorena y las amistades realizadas en la FIQ gracias por su tiempo compartido.

IVON REYES JUÁREZ

DEDICATORIA

En primer lugar, quiero dedicar el trabajo a Dios, mi Padre y Amigo, por estar siempre a mi lado y poner en mi camino a las personas y circunstancias necesarias para llegar hasta estas instancias.

A mis Padres, por brindarme todo su amor, esfuerzo, apoyo y valores que me han hecho crecer como persona, por siempre motivarme para salir adelante.

A mi hermano, por ser mi amigo, compañero y cómplice de aventuras desde que tengo memoria, que nunca dejó que me sintiera solo o aburrido.

A toda mi familia, incluyendo a los que ya no están, por brindarme siempre apoyo incondicional y permitirme vivir momentos inolvidables a su lado, mostrándome que la vida en equipo es más bonita.

A mis amigos, por reír y sufrir juntos, convertir momentos en anécdotas, y por hacer mi vida más divertida.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora María del Carmen Avelino Flores, no solo por asesorarnos y guiarnos en la elaboración de esta Tesis, sino también por ser una gran maestra y persona que deja huella en el crecimiento profesional y personal de sus alumnos.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por brindarme la oportunidad y recursos necesarios para mi formación profesional.

A mi compañera Ivón Juárez Reyes, por haberme apoyado en los momentos más difíciles durante la elaboración de este trabajo, por hacer de este proceso algo más ameno, entrañable y fructuoso.

A los compañeros que colaboraron en la elaboración de esta Tesis con trabajo, apoyo, tiempo y convivencias.

BRANDON RENDÓN JUÁREZ

Contenido

I.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
II.	JUSTIFICACIÓN.....	9
III.	OBJETIVO GENERAL.....	11
IV.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
V.	HIPÓTESIS.....	12
VI.	MARCO TEÓRICO.....	13
VI.I	CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS Y LAS LEVADURAS.....	13
	BACTERIAS	13
	LEVADURAS	15
	DIFERENCIAS ESTRUCTURALES ENTRE LAS BACTERIAS Y LEVADURAS.....	16
	IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	17
	NUTRICIÓN MICROBIANA.....	19
	MATERIALES DE RESERVA Y OTRAS INCLUSIONES CELULARES	20
	METABOLISMO MICROBIANO	20
	ENZIMAS.....	21
	FACTORES QUE INCIDEN EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	22
VI.II	GENERALIDADES DE LA BIODEGRADACIÓN	24
	BIODEGRADACIÓN	24
	FACTORES AMBIENTALES QUE INTERVIENEN EN LA BIODEGRADACIÓN.....	24
VI.III	POLÍMEROS NATURALES Y SU DEGRADACIÓN	26
	POLÍMEROS	26
	POLÍMEROS NATURALES	27
	MECANISMOS DE DEGRADACIÓN DE PÓLIMEROS	34
	BIODEGRADACIÓN DE POLÍMEROS.....	35
	CRITERIOS DE LA BIODEGRADABILIDAD DE POLÍMEROS	35
VII.	METODOLOGÍA	37
VII.I	FUNDAMENTOS DE LA METODOLOGÍA	39
	MEDIOS DE CULTIVO	39
	REACTIVOS PRESENTES EN MEDIOS DE CULTIVO	40
	TÉCNICAS DE CULTIVO DE MICROORGANISMOS	41

INCUBACIÓN DE MICROORGANISMOS	41
PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN DE GRAM	41
PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN	42
VII.II DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA	43
TOMA DE MUESTRA	43
CRECIMIENTO EN POLÍMEROS NATURALES.	43
AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS	45
POTENCIAL HIDROLÍTICO	45
CRIOPRESERVACIÓN DE CEPAS	45
EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE MATERIALES CELULÓSICOS	46
VIII. RESULTADOS	47
VIII. I AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS	47
ACTIVIDAD AMIOLÍTICA	47
ACTIVIDAD CELULOLÍTICA	58
ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA.....	64
ACTIVIDAD LIPOLÍTICA.....	73
VIII. II EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE MATERIALES CELULÓSICOS	75
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	78
ACTIVIDAD AMIOLÍTICA	78
ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA.....	79
ACTIVIDAD LIPOLÍTICA.....	81
ACTIVIDAD CELULOLÍTICA	82
X. CONCLUSIONES	86
XI. REFERENCIAS.....	87

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estilo de vida que llevamos en la actualidad, junto con el gran incremento de la población y la satisfacción de sus necesidades, demanda el uso de grandes volúmenes de materiales que son usados como sustratos para la creación y síntesis de productos por parte de las industrias. Por esta razón, se generan abundantes residuos con la capacidad de producir diversos impactos al medio ambiente. Según datos del informe “Perspectiva Mundial de la Gestión de Residuos 2024”, se generaron a nivel mundial 2,100 millones de toneladas de residuos sólidos urbanos durante el 2023; sin embargo, se estima que en el 2050 se genere la cantidad de 3,800 millones de toneladas. (Programa de las Naciones Unidas Para el Medio Ambiente [UNEP], 2024). Por otro lado, según el Quinto Informe de Labores de la SEMARNAT 2022-2023, en México se generan al año aproximadamente 38,880,945 toneladas de residuos sólidos urbanos.

Aunado a esto, existe una mala disposición de los residuos al término de su vida útil, lo que provoca un incremento en la contaminación del medio ambiente. Por ejemplo, se presenta una contaminación del aire debido a la generación de gases o biogases por el proceso de descomposición de desechos orgánicos, como lo son metano (CH_4) y bióxido de carbono (CO_2), considerados gases de efecto invernadero, además de sustancias agotadoras de ozono como clorofluorocarbonos y hidroclorofluorocarbonos, por mencionar a los más importantes.

Por otro lado, se presenta una contaminación en el suelo, cuerpos de agua y acuíferos subterráneos debido a los lixiviados de los desechos y a los escurrimientos que se pueden dar por las lluvias. Además de las consecuencias ambientales, puede haber una transmisión de enfermedades de manera directa por el contacto con estos residuos, o de manera indirecta a través de moscas, cucarachas, ratas, etc. (Fernández, 2005).

Una adecuada disposición de los residuos hace posible que muchos de ellos puedan reciclarse, reutilizarse y reducir su consumo, disminuyendo así los impactos ambientales y costos en las empresas. Dentro de los materiales y productos más utilizados y desechados se encuentran los polímeros naturales como la celulosa y sintéticos en el caso de los plásticos.

Con la creciente demanda alimentaria, los residuos agroindustriales se han convertido en una problemática para su desecho; estos residuos se derivan de diferentes cultivos, los cuales no son destinados al consumo y son fuentes potenciales de polímeros como almidón y celulosa. En México, se estimó en 2020 una disponibilidad de fibras naturales de 77 millones de toneladas provenientes de residuos agroindustriales, donde el 50% corresponde a maíz, trigo, sorgo y caña de azúcar. La disposición final de estos residuos tiene altos costos, por lo que no solo genera pérdidas económicas para las compañías y productores agrícolas, sino también daños al ambiente cuando se dispone de estos residuos junto con los desperdicios de basureros o rellenos sanitarios (Consejo de Ciencia y Tecnología (2020). Diálogos del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado del Tabasco [CCYTET], 2020).

Para el caso específico de la celulosa, la podemos encontrar principalmente dentro de la producción de telas o papel. Según datos presentados en la Cámara Nacional de la Industria Editorial Mexicana,

en el 2021 se registró una producción aproximada de 415 millones de toneladas de papel en todo el mundo. Por su parte, en México se registró una producción de 5.8 millones de toneladas en el año 2020 (Cámara Nacional de la Industria Editorial Mexicana [CANIEM], 2022).

La contaminación por parte del almidón se presenta principalmente en la industria alimenticia, en donde bajo ciertas circunstancias se considera residuo. Por ejemplo, industrias que producen papas fritas, han presentado aguas residuales con exceso de materia prima y almidón proveniente del proceso de lavado de las papas (Prada, 2012).

Además de la presencia de estos polímeros naturales, en la vida cotidiana hay un gran consumo de otras sustancias como los lípidos presentes, por ejemplo, en el aceite de cocina. En México, según datos de la Procuraduría Federal del Consumidor, una persona consume aproximadamente 10 l de aceite al año. (Ceballos, 2021). En muchas ocasiones, de forma errónea, se acostumbra verter el aceite de cocina usado en el drenaje de los hogares, sin embargo, el aceite es capaz de formar una capa en la superficie de los cuerpos de agua que evita el paso de oxígeno, provocando así su eutrofización. (Moya, M. & Moya, J., 2018).

Así mismo, la producción y demanda de polímeros sintéticos también ha ido en aumento. Desde mediados del siglo veinte, los plásticos han sido una parte integral de la vida moderna; sin embargo, los residuos plásticos se han convertido en una de las principales problemáticas actuales. Dentro de la gran diversidad de plásticos se encuentran el poliestireno, polietileno y polipropileno. Los polímeros de este tipo no se deterioran fácilmente, ni se descomponen u oxidan naturalmente en un periodo de tiempo corto debido a su alta resistencia mecánica y composición química de cadenas de monómeros de carbono en presencia de aditivos que le dan rigidez (Ccallo, Sacaca, Callata, Vigo & Calla, 2020). Se estima que la degradación natural de los polímeros mencionados va de 100 a 600 años (Alania & Pérez, 2017).

Según el Informe “Plásticos – Situación en 2022”, elaborado por Plastics europe, la producción de plásticos a nivel mundial en 2021 fue de 390.7 millones de toneladas. Dentro de estas cifras, los plásticos que más se producen son los de origen fósil con aproximadamente 352.3 millones de toneladas, seguidos por los plásticos reciclados con 32.5 millones de toneladas y los plásticos de origen biológico con apenas 5.9 millones de toneladas. (PLASTICS EUROPE, 2022). Por otro lado, según datos de la Asociación Nacional de Industrias del Plástico, A.C. (ANIPAC), se registró un consumo de 5.9 millones de toneladas y una producción de 3.8 millones de toneladas de plástico en México durante el 2022. (Ortega, M., 2022).

Tomando en cuenta la información anterior, es evidente que los polímeros naturales y los lípidos son materiales muy usados en la actualidad y por consecuencia, generan una gran cantidad de desechos que son capaces de provocar un alto nivel de contaminación en nuestros ecosistemas. Debido a esto, se requiere de alternativas económicas y ambientales viables, que permitan dar un correcto tratamiento a estos residuos o reutilizarlos con el fin de reducir el impacto ambiental al momento de ser desechados, la degradación microbiana es la opción que más viable y eficaz para el tratamiento y reutilización de los mismos.

II. JUSTIFICACIÓN

Los polímeros se han convertido en un material muy utilizado en diversos procesos industriales debido a sus propiedades fisicoquímicas, las cuales le confieren las características adecuadas para múltiples aplicaciones, tanto en lo industrial como en lo comercial.

Usualmente, la disposición final de los polímeros suele reducirse a vertederos, rellenos sanitarios o incineración que, como se ha mencionado anteriormente, son una fuente de contaminación a la atmósfera, suelo y cuerpos de agua. Por lo tanto, resulta conveniente recurrir a otros métodos que reduzcan la contaminación y los efectos negativos de los desechos al medio ambiente. La degradación microbiana de polímeros es menos agresiva para el ambiente y se logra debido a la capacidad metabólica presente en los diferentes microorganismos que pueden degradar, transformar, sintetizar y acumular de forma natural polímeros naturales como almidón, celulosa, hemicelulosa, pectina, lignina, además de fármacos y metales, entre otros (Butrón, 2020).

Se ha demostrado que la biorremediación, mientras sea adaptada correctamente, resulta ser efectiva en la reducción de costos y beneficios ambientales, en comparación con los métodos de tratamiento químicos o físicos. Una de las ventajas de la biorremediación sobre las opciones convencionales, es que presenta un menor impacto en el espacio contaminado, esto porque la mayoría de veces no genera residuos que sean igual o más peligrosos que el contaminante original; al contrario, se generan moléculas simples como dióxido de carbono y agua. Por otro lado, esta se puede aplicar directamente en el sitio contaminado, y así, se eliminan los gastos y riesgos que implica el transporte del contaminante hasta el lugar de tratamiento. Así mismo, se pueden usar diversas tecnologías de biorremediación en cadena para poder tratar contaminantes complejos y obtener mejores resultados. Además de lo antes mencionado, para brindarle las condiciones y nutrientes necesarios para los microorganismos, se pueden utilizar materiales residuales como arroz, cáscaras, caña, maíz, madera, etc. (Garzón, Rodríguez & Hernández, 2017).

La biodegradación ocurre gracias al metabolismo de los microorganismos, el cual secreta enzimas que son afines a ciertos enlaces químicos presentes en las moléculas de las sustancias a degradar, dando como resultado un rompimiento de estos enlaces. Dentro de los tipos de enzimas de utilidad están las hidrolasas, las cuales se distinguen por romper moléculas mediante la ayuda del agua. Las hidrolasas son capaces de romper enlaces tipo éteres (-C-O-C-), ésteres (-CO-O-) y peptídico o amida (-CO-NH-). (De Lera, 2011). Como resultado, los microorganismos con capacidad hidrolítica, son capaces de degradar moléculas que contengan este tipo de enlaces, existen investigaciones con resultados exitosos en la degradación de celulosa, pectina, almidón y lípidos que sirven como indicio de la posibilidad y viabilidad que tiene el uso de microorganismos en la degradación de estas sustancias.

Por ejemplo, la celulosa es un polímero que puede encontrarse como componente estructural de las paredes vegetales. Se llevó a cabo un estudio en la Universidad del Quindío, en Armenia, Colombia, sobre la degradación de celulosa presente en desechos orgánicos domésticos utilizando *Aspergillus niger*, obteniendo como resultado un porcentaje de degradación de celulosa del 21.14%; además, debido a que su degradación produce azúcares reductores, también se determinaron los

azúcares reductores generados, obteniendo una producción máxima de 42,787 ppm. (García, Sánchez, Padilla & Giraldo, 2012), como esta, existen en la bibliografía otras referencias que reflejan la viabilidad de la aplicación de microorganismos en la degradación de la celulosa y de productos que la contengan, como el caso del papel.

También se ha observado la biodegradación aerobia de películas de un biopolímero de almidón de maíz termoplástico debida a la actividad de un microorganismos marino, simulando así, la problemática de presencia de plásticos y otros polímeros en las costas marinas, la prueba consistió en colocar trozos de la película en una solución que simulara el medio marino para los microorganismos, como consecuencia de la descomposición de los microorganismos generó CO_2 que fue capturado por una trampa alcalina de KOH. Después, se prosiguió con la titulación de la trampa alcalina para calcular la cantidad de CO_2 generado por la biodegradación de las películas, obteniendo así un resultado del 74% de degradación a los 30 días de inicio de la prueba (González, 2022).

Con respecto a la problemática del desecho de aceite en el agua, se han realizado pruebas que confirman la capacidad de degradar aceite de cocina usando microorganismos con capacidad lipolítica, obteniendo resultados de hasta el 95.5% de degradación de residuos (Moya & Moya 2018).

Los casos anteriores son solo algunos de los muchos resultados positivos del uso de microorganismos para la descomposición de sustancias de residuos desechados al medio ambiente. El aislamiento de diferentes cepas microbianas obtenidas de residuos vegetales para aplicarse en diferentes polímeros naturales, evaluando su capacidad degradadora, da apertura a múltiples beneficios al medio ambiente, a la industria y a la sociedad, así como a nuevas tecnologías de remediación, pero también de aprovechamiento de los mismos, dando como resultado la reducción del volumen de residuos, disminución de la contaminación visual o tratamientos en su disposición final e incluso su reutilización para otros procesos, sin demandas altas de energía o combustibles lo que minimiza también el efecto ambiental.

El presente estudio busca aislar y purificar microorganismos con la capacidad de degradar diferentes tipos de polímeros naturales y lípidos, para mejorar su reutilización, disposición y el cuidado del medio ambiente.

III. OBJETIVO GENERAL

Aislar cepas microbianas (bacterias y/o levaduras) a partir de una muestra vegetal en descomposición con capacidad degradadora para polímeros naturales (celulosa, pectina, almidón y lípidos), que puedan aplicarse en procesos de biorremediación o reutilización de residuos.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar en material vegetal en descomposición la actividad microbiana deseada.
2. Aislar de la diversidad microbiana presente en la muestra, cepas con capacidad hidrolítica aplicables para biorremediación o reutilización de residuos, basándose en su capacidad de crecimiento en diversos sustratos.
3. Evaluar la capacidad de las cepas para degradar diversos polímeros naturales.

V. HIPÓTESIS

De acuerdo a lo planteado en el presente proyecto de investigación, se plantea la siguiente hipótesis o pregunta de investigación:

¿Los microorganismos responsables del deterioro en vegetales, podrán ser capaces de degradar diferentes polímeros naturales para su aplicación en procesos de biorremediación y aprovechamiento de residuos?

VI. MARCO TEÓRICO

VI.I CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS Y LAS LEVADURAS

BACTERIAS

Joklik, Willett, Amos & Wilfert (1998) definen a las bacterias como microorganismos procariotas (unicelulares) que se dividen en dos: las eubacterias (bacterias verdaderas) y arqueobacterias (bacterias primitivas). Se reproducen por fisión binaria. La mayoría de las bacterias presentan una forma de bacilo, con un ancho que no supera 1 μm y una longitud de hasta 5 μm . Algunas especies de *Pseudomonas* tienen un diámetro que varía entre 0,4 y 0,7 μm , mientras que su longitud oscila entre 2 y 3 μm . Por otro lado, los micrococcos poseen un diámetro de aproximadamente 0,5 μm . Existen pocas bacterias de gran tamaño, como *Chromatium okenii*, *Thiospirillum jenense* y *Achromatium*, las cuales crecen a un ritmo más lento (Schlegel, 1997).

Las especies bacterianas, de acuerdo con Joklik, Willett, Amos & Wilfert (1998), se definen bajo los siguientes criterios:

1. Rasgos estructurales de forma, tamaño, tipo de movimiento, estadio en reposo, reacción frente a la coloración de Gram y desarrollo macroscópico.
2. Rasgos bioquímicos y nutricionales, productos finales y otra información bioquímica sobre componentes y metabolitos celulares.
3. Características fisiológicas relacionadas con el oxígeno, la temperatura, el pH y la respuesta ante los agentes microbianos.
4. Rasgos ecológicos
5. Composición de bases del ADN, homología y rasgos genéticos.

Ciclo celular o reproducción bacteriana

El fenómeno de división bacteriana se da mediante un proceso asexual denominado fisión binaria (Figura 1) o escisiparidad. Este proceso finaliza con la formación de dos células hijas y se lleva a cabo en cuatro pasos de acuerdo con Liébana (2002).

1. Replicación del ADN: se copia el material genético y se segregan las copias en los extremos opuestos de la célula.
2. División de la pared celular e invaginación de la membrana citoplasmática: Crecimiento de la pared celular y formación de un tabique divisor de las células hijas mediante diferentes tipos de proteínas.
3. Separación del ADN.
4. Separación de las células.

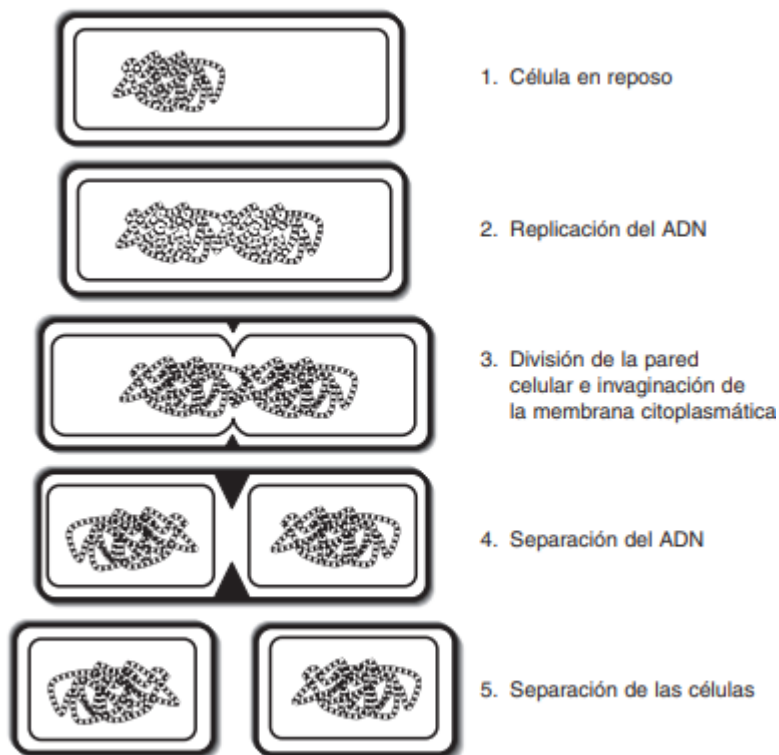


Figura 1. Representación esquemática del ciclo celular (fisión binaria).

Tomado de *Microbiología oral* (p.75), por J.L. Ureña, 2002, McGraw-Hill Interamericana.

Crecimiento bacteriano

Stuart (2003) indica que gran parte de las bacterias se reproducen por fisión binaria, el cual es un proceso asexual; aunque pueden seguir un proceso de intercambio de información genética mediante la conjugación. El crecimiento bacteriano es autolimitante, es decirse desarrolla de forma logarítmica durante 3 a 5 h, agotando sus nutrientes y acumulando los productos tóxicos del metabolismo; se observa en la [Figura 2](#) la curva de crecimiento bacteriano.

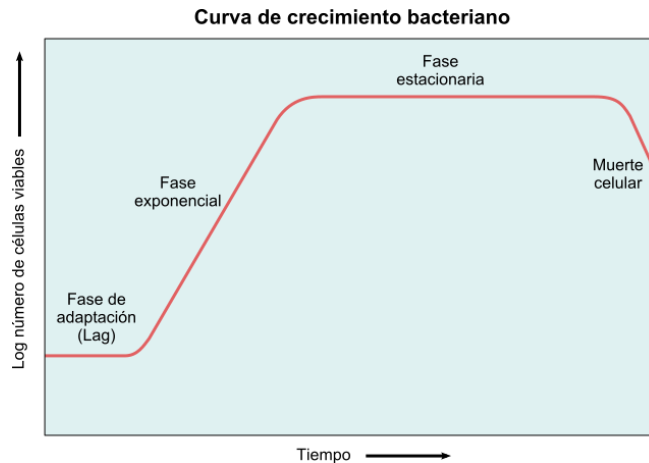


Figura 2. Curva de crecimiento bacteriano.

Adaptado de Curva de crecimiento bacteriano [Imagen], por Gonn, 2013, Wikipedia (https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Curva_de_crecimiento_svg.svg).

Fases de crecimiento

Stuart (2003) indica que las bacterias presentan cuatro fases de crecimiento: fase de retraso o adaptación, fase logarítmica o exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

- **Fase de retaso o adaptación:** las bacterias se ajustan a nuevas condiciones como lo son el cambio de temperatura, la disponibilidad y tipo de nutrientes, el nivel de metales, la concentración de productos de desechos. Bajo estas nuevas condiciones las bacterias tendrán una represión o expresión de genes; además, en esta fase las bacterias no se multiplican, pero la producción de enzimas requeridas para el crecimiento en estas condiciones solo se hará esperar segundos o minutos.
- **Fase logarítmica o exponencial:** se presenta la multiplicación de las bacterias y se incrementa logarítmicamente. En esta fase se puede determinar la tasa de crecimiento bacteriano propio de cada bacteria, que a su vez varía según el estado nutricional del medio y la temperatura. Dependiendo de las condiciones de crecimiento de las bacterias, se llegan a dividir cada 10 a 11 min en condiciones óptimas o, en casos con condiciones más estrictas, hasta 20 h.
- **Fase estacionaria:** en esta fase se presenta el agotamiento de nutrientes y llega la acumulación de productos tóxicos del metabolismo. Así la tasa de crecimiento como la tasa de muerte bacteriana se prolongan.
- **Fase de muerte:** ante la falta de nutrientes fundamentales y la acumulación de productos tóxicos del metabolismo, las bacterias que se encuentran en suspensión mueren rápidamente.

LEVADURAS

Las levaduras son un grupo de hongos unicelulares de tipo eucariota. Liébana (2002) indica que las levaduras presentan dimensiones de 3-10 μm de diámetro y 5-30 μm de largo; las hifas pueden estar

o no presentes. Además, se reproducen asexualmente por fisión binaria o gemación (Mendoza, 2005) y sexualmente por (ascosporas); algunas células poseen reproducción sexual por conjugación (Curia, D'alessandro & Briand, 2010). La fase del crecimiento de las levaduras consta de las mismas que el crecimiento bacteriano; las diferencias radican en los tiempos de duplicación y adaptabilidad metabólica de cada microorganismo.

Reproducción de las levaduras

Las levaduras presentan dos tipos de reproducción asexual, así lo indica Liébana (2002): fisión binaria y gemación. La fisión en las levaduras ocurre de la misma manera que en las bacterias. La gemación se describe por la presencia de una yema (protuberancia) en un punto de la superficie de la célula madre. Cuando crece la célula hija, el núcleo de la célula madre se divide y uno de los núcleos, junto con los orgánulos citoplasmáticos correspondientes, se desplaza hacia la nueva célula, separándose de la célula madre.

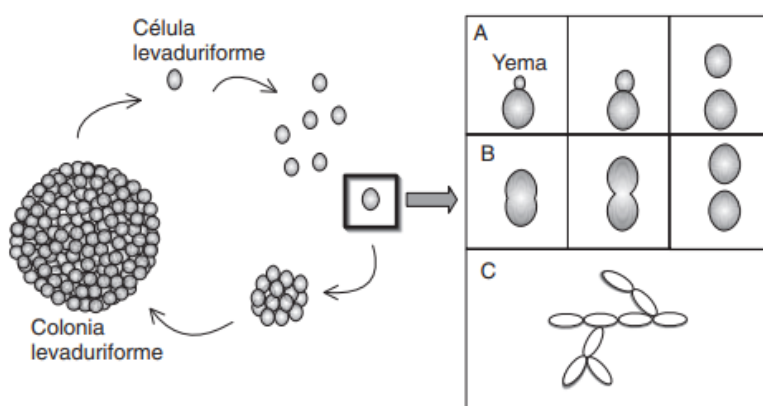


Figura 3. Formación de una colonia por hongo levaduriforme. En el recuadro se muestran los tipos de división. A: gemación, B: fisión, C: pseudomicelio.

Tomado de *Microbiología oral* (p. 226), por J.L. Ureña, 2002, McGraw-Hill Interamericana.

DIFERENCIAS ESTRUCTURALES ENTRE LAS BACTERIAS Y LEVADURAS

Las bacterias y levaduras se distinguen principalmente por el tipo de célula que las compone; la levadura son células eucariotas y las bacterias son células procariotas, dando lugar así a diferencias estructurales propias de su célula ([Tabla 1](#)).

Tabla 1. Diferencias estructurales entre la célula eucariota y la procariota (Liébana, 2002).

Características	Eucariotas	Procariotas
Tamaño (dimensional lineal)	10-100 μm	1-10 μm
ADN	Lineal en núcleo, formando un complejo con proteínas básicas. Organizado en	Circular en nucleóide y otros elementos, sin formar complejos con proteínas básicas. No organizado en

	cromosomas. Presencia de membrana nuclear	cromosomas. Ausencia de membrana
Organelos	Mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, cloroplastos, etc.	Escaso o ninguno
Mureína (peptidoglicano)	Ausente	Normalmente presente
Ribosoma	80S	70S
Reproducción	Sexual y asexual. Meiosis y mitosis	Asexual. Fisión binaria
Metabolismo	Aerobios, anaerobios facultativos	Aerobios, microaerófilos, anaerobios facultativos, anaerobios estrictos, etc.

A su vez, existen diferencias estructurales entre las células eucariotas de los hongos, bacterias, plantas y animales (*Tabla 2*).

Tabla 2. Diferencias estructurales entre las células de los hongos, bacterias, plantas y animales (Liébana, 2002).

Estructura	Hongos	Bacterias	Plantas	Animales
Núcleo	Si	No	Si	Si
Cromosomas	Varios	Uno	Varios	Varios
Membrana nuclear	Si	No	Si	Si
Retículo endoplasmático	Si	No	Si	Si
Mitocrondrías	Si	No	Si	Si
Cloroplastos	No	No	Si	No
Clorofila	No	Algunas	Si	No
Ribosomas	80S	70S	80S	70S
Esteroles en la membrana citoplasmática	Esgosterol*	No	Si	Colesterol
Pared celular	Quitina Mananos Glucanos	Mureína	Celulosa	No
Cápsula	Algunos		No	No

*A excepción de *Pneumocystis carinii*

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

La identificación de las bacterias y microorganismos se guía bajo el siguiente esquema (Joklik et al., 1998).

1. Aislamiento de microorganismos en cultivos puros (axénicos): la muestra se siembra por estría cruzada en un medio sólido con agar, con el fin de aislar en células individuales la población bacteriana. En ocasiones se suele usar medios selectivos para favorecer a

microorganismos con ciertas características, como lo es un pH, fuerza iónica o una composición química específicos, presencia de inhibidores o que carezcan de nutrientes para todos los microorganismos excepto el que se requiere estudiar.

2. Morfología de la colonia bacteriana: las bacterias y demás microorganismos forman colonias, es decir, se multiplican y forman masas de desarrollo macroscópico visibles. Usualmente, al ser inoculadas en el medio correspondiente con 2% de agar, se les incuba de 12 a 48 h en condiciones adecuadas. Cuando se presenta dos o más células juntas, es decir, una bacteria o un pequeño grupo de bacterias que se replicaron múltiples veces para formar una sola colonia visible, se le denomina Unidad Formadora de Colonia (UFC). Las UFC ayudan a la identificación de los microorganismos, puesto que existe variedad de tamaños, formas, texturas, colores, olor y grado de adherencia al medio; a este conjunto de características se le denomina morfología de la colonia bacteriana. A continuación, se presentan las características usadas para la identificación de la morfología colonial del presente estudio (*Tabla 3*).

Tabla 3. Morfología colonial (Luna, 2016)

Morfología colonial	
Forma (colonia)	Puntiforme Circular Irregular
Borde	Entero Ondulado Filamentoso
Brillo (luz reflejada)	Brillante Mate (sin brillo)
Luz transmitida	Opaca Traslúcida Transparente
Superficie (textura)	Lisa Rugosa
Elevación	Plana Elevada Convexa Pulvinada Umbicada
Consistencia	Dura Suave Mucoide
Aspecto	Húmedo Seco

3. Morfología microscópica: El microscopio óptico nos proporciona información sobre la identificación de las formas bacterianas (cocos, bacilos, formas espiraladas, etc.) u otros microorganismos. Para esta prueba se requiere de microscopio óptico, uso del objetivo de inmersión y sin uso de cubreobjetos de la muestra preparada con tinción de Gram. La tinción de Gram sirve como herramienta de monitoreo para observar la homogeneidad en la coloración y forma de las bacterias o microorganismos estudiados. En ocasiones se usan otro tipo de tinciones que se usan para la detección de flagelos, esporas o cuerpos de inclusión intracelulares, como la coloración de ácido-resistencia de ser necesario.

Tinción de Gram

La tinción de Gram es una técnica tintorial que se basa en la diferenciación de la pared celular. Esta técnica se debe realizar con cultivos frescos del microorganismo, con crecimiento exponencial (24 a 48 h), para que la pared celular se encuentre intacta. Las bacterias presentes en cultivos más antiguos presentan la posibilidad de tener una ruptura en la pared celular; así las bacterias Gram positivas llegan a teñirse como Gram negativas o Gram variables (Bado, 2022).

El primer colorante aplicado es violeta genciana (cristal violeta o violeta de metilo), que tiñe de color violeta las células porque entra al citoplasma. Al aplicar el yodo, se forman complejos insolubles que se adhieren a la pared celular y se retienen en microorganismos con una pared celular compuesta por una capa gruesa de peptidoglucanos. La aplicación de alcohol-acetona deshidrata el peptidoglucano de las células Gram positivas, reteniendo aún más el complejo violeta de genciana-yodo; en las células Gram negativas, el alcohol-acetona disuelve la membrana externa de la célula (capa fosfolipídica externa) y crea orificios en la capa de peptidoglucano, por la cual se liberan los cristales o complejos del violeta genciana – yodo quedando incoloras las células. Así, al agregar la safranina, las células Gram negativas adquieren el color rosado de la misma; en las células Gram positivas también es absorbida, pero al ser el colorante violeta más intenso, es el que se observa al microscopio (Tortura, Funke & Case, 2007).

4. Características bioquímicas: permiten identificar a los microorganismos mediante sus características metabólicas. Diversos microorganismos presentan patrones en la utilización de sustratos, formación de productos metabólicos y fermentación de azúcares; de esta manera, las pruebas bioquímicas permiten la diferenciación entre grupos de microorganismos (Joklik et al., 1998).

NUTRICIÓN MICROBIANA

Los microorganismos requieren de dos elementos para su nutrición y adecuado crecimiento: nutrientes o compuestos químicos necesarios y condiciones ambientales adecuadas.

Entre los requerimientos nutricionales se requiere de macroelementos: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro (C, H, O, N, S, P, K, Na, C, Mg, Fe), los cuales se encuentran en los microorganismos, y microelementos (oligoelementos):

manganeso, zinc, cobre, níquel, vanadio, boro, cloro, selenio, silicio, wolframio, etc., que solo requieren ciertos microorganismos. Entre algunos de los microelementos están presentes y son requeridos para la composición de enzimas. Los microorganismos obtienen el carbono celular de nutrientes orgánicos que se utilizan como fuente de carbono y energía; una parte es asimilada en forma de sustancias celulares y la otra se oxida para la obtención de energía. Algunos microorganismos también requieren suplementos que son sustancias pertenecientes a los componentes básicos de las células y no pueden ser sintetizados a partir de otros elementos o componentes más sencillos. (Schlegel, 1997)

MATERIALES DE RESERVA Y OTRAS INCLUSIONES CELULARES

Schlegel (1997) explica la capacidad que tienen los microorganismos de almacenar sustancias intracelulares bajo condiciones ambientales determinadas. Este almacenamiento de sustancias intracelulares se le denomina materiales de reserva y consta de polisacáridos, grasas, polifosfatos y azufre. Este almacenamiento ocurre cuando en el medio de cultivo hay un crecimiento limitado o interrumpido por falta de nutrientes o la presencia de inhibidores. Las sustancias intracelulares de almacenamiento se encuentran en la célula de forma osmóticamente inerte, son insolubles en agua y cuando el microorganismo se encuentra en un ambiente favorable al crecimiento, las sustancias vuelven a ser metabólicamente activos. Los polisacáridos de reserva, las grasas neutras y el ácido polihidroxibutírico pueden actuar como fuentes de carbono y energía, lo que permite extender la vida de la célula cuando no hay una fuente externa de energía. Además, pueden favorecer la formación de esporas durante el proceso de esporulación, incluso en ausencia de sustratos externos. Los polifosfatos pueden considerarse como reservas de fosfato y azufre, almacenados como posibles donadores de hidrógenos.

METABOLISMO MICROBIANO

Las células en cualquier estado, ya sea de crecimiento o reposo, necesitan de energía para mantenerse viva y para sintetizar los componentes celulares a partir de sustancias nutritivas sencillas; esta energía la obtienen mediante el metabolismo (Schlegel, 1997). El metabolismo de acuerdo con Tortura, Funke & Case (2007) es un conjunto de reacciones químicas que producen en un organismo vivo y se puede dividir entre dos tipos de reacciones: las que liberan energía y las que consumen energía, conocidas como catabolismo y anabolismo. Así mismo indican que el catabolismo son reacciones que liberan energía en su proceso, en el cual se da la degradación de compuestos orgánicos complejos a más simples. Las reacciones catabólicas por lo general son reacciones hidrolíticas (reacciones que hacen uso de agua y rompen enlaces químicos) y exergónicas (indica que su capacidad de liberar energía es mayor que la que consumen). El anabolismo lleva a cabo la formación de moléculas orgánicas complejas a partir de unas más simples, denominándolas reacciones anabólicas o biosintéticas. Las reacciones sintéticas de deshidratación (liberan agua) y las endógenas (su consumo de energía es mayor que el de producción) están relacionadas con procesos catabólicos. La formación de proteína a partir de aminoácidos y de polisacáridos a partir de azúcares simples son algunos ejemplos.

ENZIMAS

Las enzimas son proteínas, esencialmente polímeros conformados por aminoácidos que son capaces de catalizar reacciones químicas en las células vivas. La estructura tridimensional de las enzimas forma espacios llamados “sitio activo”, los cuales son afines a ciertos sustratos.

Esta afinidad sucede gracias a que la forma de la estructura tridimensional del sitio activo debe coincidir y acoplarse con la estructura de los sustratos. Además de la estructura tridimensional, la enzima y el sustrato deben tener un acomodo de cargas electrónicas que les permita realizar una atracción entre ellos y no una repulsión. Por este motivo, se menciona que las enzimas tienen una alta especificidad, ya que solamente pueden reaccionar con un sustrato o grupo de sustratos en específico, que tengan lo necesario para acoplarse tanto a su estructura tridimensional como a sus cargas electrónicas. La especificidad de las enzimas juega un papel importante a la hora de catalizar reacciones en las que se encuentren diversas sustancias, debido a que solo catalizará la reacción de los sustratos de interés. Cabe mencionar que la enzima tiene la capacidad de adaptar un poco su forma para poder acoplarse de mejor forma a los sustratos. Sin embargo, una vez que los sustratos hayan formado los nuevos productos dentro del sitio activo, la enzima regresará a su forma original, permitiendo que esté lista para poder unirse a otros sustratos para catalizarla reacción química (Ramírez & Ayala, 2014).

De Lera (2011) indica que, de acuerdo a la función, las enzimas se clasifican de la siguiente manera:

- **Oxidorreductasas:** Se encargan de la transferencia de electrones, es decir, catalizan reacciones de oxidación – reducción.
- **Transferasas:** Realizan la transferencia de grupos (amino, carboxilo, carbonilo, fosforilo, etc.) de una molécula a otra.
- **Hidrolasas:** Tienen la capacidad de romper enlaces mediante la participación del agua.
- **Liasas:** Rompen enlaces de manera diferente a la hidrólisis u oxidación. Adicionan grupos de doble enlace, producto de la eliminación de otros grupos
- **Isomerasas:** Transfieren grupos dentro de una misma molécula, generando la conversión de un isómero a otro.
- **Ligasas:** Son capaces de formar enlaces C-C, C-S, C-O y C-N mediante la hidrólisis del ATP.

Hidrolasas

Estas enzimas tienen la capacidad de romper enlaces, principalmente los tipos C-O, C-N, C-C y en ocasiones C-P. De esta forma, las enzimas hidrolasas son capaces de romper enlaces tipo éster, glucosídico y peptídico (Alcántara & Sánchez, 2010). La acción de las hidrolasa requiere la presencia de la molécula del agua, en donde el hidrógeno y el oxidrilo resultantes de la hidrólisis, se unen respectivamente a las dos moléculas formadas por la ruptura de los enlaces antes mencionados (Caffini, 2009).

Los diferentes tipos de hidrolasas se van a clasificar y nombrar en función del sustrato que son capaces de hidrolizar, seguido de la terminación “asa”. Dentro de esta clasificación, algunas de las más importantes son las esterasas, proteasas, glucosidasas y lipasas, las cuales son capaces de

actuar sobre enlaces éster, proteico, glucosídico y lipolítico, respectivamente (Shukla, Dipak & Gaikwad, 2022).

Esterasas.

Enzimas hidrolasas que tienen la capacidad de cortar enlaces éster, específicamente los que se encuentran en ácidos grasos de cadena corta con 10 carbonos o menos, mismos que son solubles en agua. Se puede decir entonces que, las esterasas prefieren actuar sobre ésteres no lipídicos.

Lipasas.

Tanto lipasas como esterasas son enzimas lipolíticas; sin embargo, a diferencia de las esterasas, las lipasas actúan mayormente sobre enlaces éster de triglicéridos con ácidos grasos de cadena larga con más de 10 carbonos, los cuales son poco solubles.

El mecanismo de acción de esterasas y lipasas es el mismo; ambas enzimas actúan sobre el enlace éster que hay entre ácidos grasos y el glicerol o cualquier otro residuo alcohólico, ambas enzimas pertenecen a la familia α/β hidrolasa (Ramos, 2016).

Proteasas

Tienen la capacidad de actuar sobre los enlaces de una proteína; en otras palabras, rompen el enlace peptídico entre los aminoácidos de una proteína. El enlace peptídico se conforma por la unión del grupo amino de un aminoácido con el grupo carboxilo de otro; es por ello que la enzima actúa rompiendo el enlace C-N, en donde el grupo hidroxilo del agua se irá con el carbono, mientras que el protón se unirá al nitrógeno. En función de la ubicación del enlace peptídico que ataquen, las proteasas se pueden dividir en endopeptidasas, exopeptidasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas (Alquicira, 2003).

FACTORES QUE INCIDEN EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Tortura, Funke & Case (2007) indican que la actividad enzimática está sujeta a diferentes factores como lo son la temperatura, pH, concentración del sustrato y la presencia o ausencia de inhibidores.

Temperatura: el comportamiento de la velocidad de reacción aumenta linealmente con la temperatura hasta llegar a su temperatura óptima. Una vez que esta temperatura siga en aumento, la actividad enzimática disminuirá significativamente debido a que llevará a la enzima a la desnaturalización, es decir, la pérdida de la estructura tridimensional. Las moléculas a temperaturas bajas se desplazan más lentamente que a temperaturas altas; así a bajas temperaturas, no se podría tener la energía suficiente para llevar a cabo la reacción.

pH: Las enzimas requieren un pH ideal que genera parte de las condiciones óptimas para una actividad enzimática máxima; un aumento o disminución del pH disminuirá la actividad enzimática y así la velocidad de reacción.

Concentración de sustrato: ante la presencia elevada de sustrato, se encuentra una enzima saturada, es decir, el sitio activo está ocupado en cualquier momento, ya sea por sustrato o del producto enzimático. Si se agrega más sustrato la velocidad de reacción no se verá afectada; en

cambio, si hay baja cantidad de sustrato no todas las enzimas estarán activas por lo cual un aumento de sustrato alterara la velocidad de reacción.

Inhibidores: Son una manera de controlar a las enzimas y se clasifican como inhibidores competitivos o no competitivos. Los inhibidores competitivos tienen conformación y composición química similar al sustrato; buscan colocarse en el sitio activo, pero no llevan a cabo ninguna reacción. Algunos de estos inhibidores son reversibles e irreversibles; los irreversibles evitan la interacción con el sustrato, mientras que los reversibles solo retrasan la interacción con el sustrato. Los inhibidores no competitivos no buscan ocupar el sitio activo, sino que interactúan con otra región de la enzima, modificando así el sitio activo y bajando la actividad enzimática. También son reversibles e irreversibles; depende de si el sitio activo puede regresar a su configuración original.

VI.II GENERALIDADES DE LA BIODEGRADACIÓN

BIODEGRADACIÓN

La biodegradación es el tratamiento o restauración de suelo, agua, aire y diversos ecosistemas mediante organismos vivos (bacterias, hongos, algas, etc.) que tienen la capacidad de degradar, transformar o capturar diversos contaminantes a través de su sistema metabólico. Estos organismos son capaces de producir enzimas que sirven para descomponer ciertas sustancias, con el objetivo de generar compuestos más simples que sirvan como alimento para ellos.

La transformación de los contaminantes puede ser parcial, en donde se obtiene un compuesto menos tóxico o con una estabilidad mayor para su posterior retiro del ecosistema. Por otro lado, la transformación completa o mineralización consiste en la descomposición total del contaminante hasta la obtención de dióxido de carbono y agua, en el caso de un proceso aeróbico, o agua y metano, si es por un proceso anaerobio. Cabe mencionar que la biodegradación será efectiva solo si el material a tratar es biodegradable (Barrios, 2011).

Un material biodegradable se define como aquel capaz de descomponerse en dióxido de carbono, metano, agua, componentes inorgánicos o biomasa, mediante la acción enzimática de microorganismos que puede ser medida por pruebas estandarizadas en un período específico de tiempo, en condiciones normalizadas (Fiaco, 2014).

Con relación a tecnologías químicas o físicas, la biodegradación suele ser más barata; se puede llevar de forma más fácil in situ, lo cual disminuye costos y riesgos de transporte; no genera residuos y puede realizarse sin una gran intrusión en el sitio contaminado. (Garzón, Rodríguez & Hernández, 2017).

FACTORES AMBIENTALES QUE INTERVIENEN EN LA BIODEGRADACIÓN

De acuerdo con Flores (2009) el grado de degradación se ve afectado por las condiciones ambientales físicas, químicas y biológicas, las cuales tienen un efecto sobre los microorganismos, lo cual se refleja sobre la actividad enzimática.

Factores físicos: Se refiere a la **temperatura** óptima a la cual ocurre el máximo crecimiento. La mayoría de los microorganismos presentan una temperatura óptima entre 25°C y 37°C, a los cuales se les denomina mesófilos. Mantener unos niveles de temperatura resulta sustancial; se ha demostrado que un aumento de temperatura acelera el grado de biodegradación, pero a su vez, un aumento de temperatura fuera de un rango adecuado al microorganismo puede provocar desnaturalización de las enzimas y algunas proteínas e incluso su muerte.

Factores químicos: Los microorganismos poseen un pH óptimo donde hay mayor crecimiento. En general, los hongos prosperan en entornos ácidos, mientras que las bacterias prefieren condiciones más cercanas a la neutralidad. Variaciones significativas respecto al pH óptimo pueden llevar a la desnaturalización de las proteínas. La sensibilidad a cambios en el pH varía entre diferentes microorganismos.

El oxígeno: Afecta directamente el metabolismo de los microorganismos. Es necesario que el entorno tenga una adecuada oxigenación para que ocurra la biodegradación aeróbica. En ausencia de oxígeno, los microorganismos perecen y la eficiencia de la biodegradación se reduce. Por otro lado, un exceso de oxígeno también resulta perjudicial, ya que genera un estrés oxidativo que conduce a la muerte de los microorganismos. La necesidad de oxígeno dependerá del manejo de gases característico del mismo como aerobio, anaerobio, anaerobio facultativo, microaerófilo, etc.

Humedad: Interviene en la correcta hidratación de los microorganismos y en los niveles de oxígeno disponible; si no hay suficiente presencia de humedad, los microorganismos se deshidratan y no logran el crecimiento. Por otra parte, un exceso de humedad genera una disminución de oxígeno, provocando la muerte de microorganismos.

Factores biológicos: La población microbiana constituye un factor importante debido a que son las encargadas de producir diversidad de enzimas, las cuales son las encargadas de llevar a cabo la biodegradación.

Nutrientes: Debido a que el 50% de las células microbianas están constituidas por carbono, es necesario proporcionar a los microorganismos una fuente de carbono, la cual puede ser una sustancia, compuesto, polímero, a degradar (Iturbide, 2010). Es recomendable que la sustancia sea la única fuente de carbono para que el microorganismo se vea obligado a degradarlo, y así garantizar un mayor nivel de biodegradación.

VI.III POLÍMEROS NATURALES Y SU DEGRADACIÓN

POLÍMEROS

Un polímero es una molécula de gran tamaño y peso; se basa en la repetición de pequeñas unidades químicas simples denominadas monómeros. La repetición puede ser lineal o ramificada, formando retículos tridimensionales. Las unidades químicas que conforman a los polímeros constan principalmente de átomos de carbono que pueden poseer grupos laterales o radicales con uno o más átomos. Además, estas unidades químicas se unen entre sí por enlaces covalentes para formar esas largas cadenas repetitivas. Durante muchos años, el ser humano ha procesado polímeros naturales como la lana, seda y caucho para poder obtener diferentes productos. Así mismo, se ha aprendido a sintetizar polímeros a través de reacciones químicas controladas en las que se unen monómeros repetidamente, a este proceso se le llama polimerización. (Brown, LeMay, Bursten & Murphy, 2009).

Por ejemplo, la unidad repetitiva del poli (cloruro de vinilo) es $-\text{CH}_2\text{CHCl}-$, su monómero es el cloruro de vinilo, $\text{CH}_2=\text{CHCl}$. (Billmeyer, 2020). La extensión o longitud de la cadena se determina con el número de unidades presentes, a lo que se denomina grado de polimerización (DP), debido a que es el número promedio de unidades monoméricas por molécula de polímero; por tanto, es directamente proporcional al peso molecular promedio en número. Además, la longitud de las moléculas poliméricas tiene influencia en las propiedades mecánicas de los polímeros (Coreño & Méndez, 2010).

Según el origen, existen los polímeros naturales (como la lana, madera, celulosa, etc.) y sintéticos o también conocidos como plásticos, entre los cuales se encuentran los termoplásticos, termorrígidos, gomas, fibras, adhesivos y pinturas (Meira & Gugliotta, 2019).

Dentro de sus estructuras químicas, los polímeros sintéticos suelen tener entre uno y tres tipos diferentes de unidades que se repiten, mientras que los polímeros naturales presentan estructuras más complejas. Por otra parte, las fuerzas que unen las cadenas en la estructura química de los polímeros son de diferente naturaleza y dependerán del tipo de átomos que las conforman. Cada átomo que conforma la estructura química del polímero tiene una polaridad y volumen específico que definirán el tipo de fuerza con la que se unirán las cadenas, y a su vez, este tipo de fuerza será lo que determinará las propiedades del material, como su flexibilidad, temperatura de fusión y de transición vítrea, capacidad de cristalización, etc.

Siguiendo con lo antes mencionado, podemos decir que, mientras mayores sean las fuerzas de cohesión entre las cadenas, mayor será la rigidez del material, así como sus temperaturas de fusión (en polímeros cristalinos) y de reblandecimiento (para polímeros no cristalinos). Así mismo, la presencia de grupos aromáticos en la cadena principal de los polímeros hará que sean más rígidos. Por ejemplo, en la molécula de polietileno, que es no polar, las cadenas se unen entre sí mediante fuerzas intermoleculares débiles, provocando que este material sea blando y con una temperatura de fusión baja. Caso contrario al PVC, el cual tiene moléculas polares y con cadenas unidas mediante

fuerzas intermoleculares fuertes tipo dipolo-dipolo que provocan que el material sea rígido y con una temperatura de fusión alta (Beltrán y Marcilla, 2012).

POLÍMEROS NATURALES

Almidón

El almidón se encuentra en raíces, frutos, tubérculos (como la papa o yuca), semillas e incluso como mecanismo de defensa ante situaciones de estrés presentes en el medio. En la naturaleza el almidón generalmente se encuentra en gránulos, los que estructuralmente consisten de dos polisacáridos: la amilopectina y la amilosa, ambos polímeros de glucosa; cuya proporción es variable dependiendo de la fuente del almidón (Meneses, Corrales, & Valencia, 2007), aunque normalmente la amilosa representa entre el 15% y 30% del contenido de almidón, mientras que la amilopectina entre el 75% y 80% (Tupa, 2019). Los gránulos se encuentran en un sistema semicristalino, con una cristalinidad que oscila entre el 15% y el 45%. Esta característica se atribuye a las cadenas cortas lineales de la amilopectina, las cuales forman dobles hélices organizadas en una estructura cristalina tridimensional (Hernández, Torruco, Chel & Betancur, 2008).

La amilosa (*Figura 4*) es un polímero lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces α (1-4); esta molécula no presenta solubilidad en agua y tiene capacidad de vincularse con moléculas adyacentes mediante puentes de hidrógeno, lo que da lugar a una estructura helicoidal capaz de adquirir un tono azul al formar un complejo con yodo.

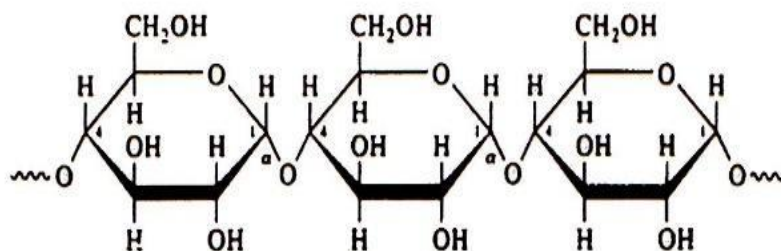


Figura 4. Estructura de la molécula de amilosa.

Nota: Adaptado de Amilosa [Imagen], 2011, TODOESQUIMICA (<https://todoesquimica.blogia.com/2011/103005-amilosa.php>).

La amilopectina (*Figura 5*), por otro lado, constituye un polímero ramificado conformado en un 94-96% por unidades de glucosa unidas mediante enlaces α (1-4), y en un 4-6% por uniones α (1-6). Las ramificaciones presentes en la amilopectina se encuentran ubicadas aproximadamente cada 15-25 unidades de glucosa. En condiciones de agua caliente, la amilopectina exhibe solubilidad parcial y, al reaccionar con yodo, genera un tono rojizo violeta. Los almidones pueden presentar un proceso de “gelatinización” en agua caliente (desorden molecular, perdiendo la estructura cristalina); si el calentamiento persiste, estas moléculas se rompen, dando lugar a una solubilización parcial. (Hernández et al., 2008).

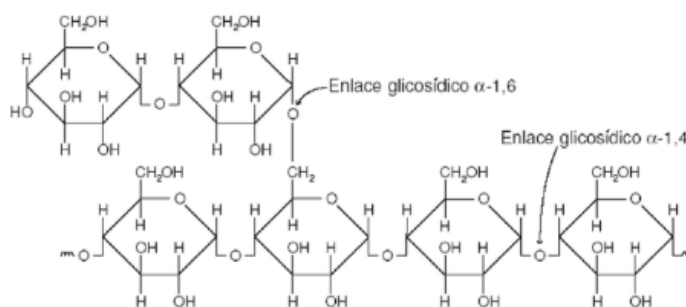


Figura 5. Estructura de la molécula amilopectina.

Tomado de “Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca” (p.60), por M. Valencia, C.M. Corrales & J. Meneses, 2007, *Revista EIA* (https://www.researchgate.net/publication/237024766_SINTESIS_Y_CARACTERIZACION_DE_UN_POLIMERO_BIODEGRADABLE_A_PARTIR_DEL_ALMIDON_DE_YUCA) . Licencia CC BY-NC-ND 4.0

Propiedades fisicoquímicas

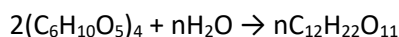
Las propiedades varían dependiendo de la fuente de donde se obtienen. La siguiente descripción de propiedades se derivan de almidón proveniente de almidón de maíz oxidado.

Descripción: Polvo blanco-amarillo claro, inodoro.

- Fórmula molecular: $(C_6H_{10}O_5)_n$
- Peso molecular: 162,1 g/mol
- pH: 5,5 - 7,5 (200 g/l, 25 °C)
- Densidad: 0.5 g/ml a 20°C
- Hidrosolubilidad: ~ 150 g/l a 90 °C

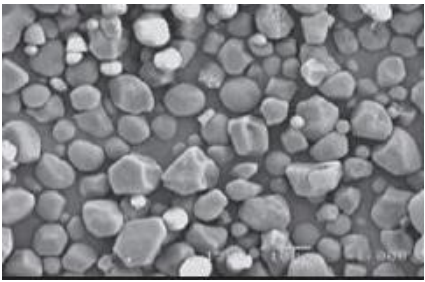
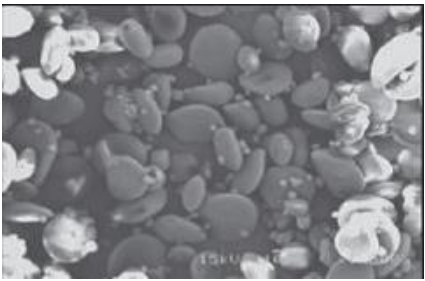
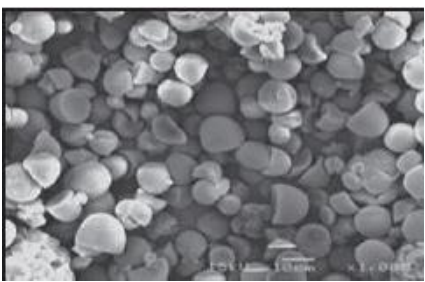
Hidrólisis enzimática

La hidrólisis del almidón genera azúcares (glucosas) que son sustrato de todos los microorganismos; la hidrólisis enzimática se da por acción de las enzimas endoamilasas que atacan (las más comunes son las alfa y beta amilasas), exoamilasas, enzimas desramificadoras y transferasas. Los productos obtenidos dependen de la enzima ocupada y de la estructura granular del almidón, el tamaño y el tipo de cristal, la relación de amilosa/amilopectina y el peso molecular de dicha relación. Además, se consideran cuerpos proteicos, lipídicos y condiciones de especificidad de la enzima (Bustos, Morales, Cuellar & Jaramillo, 2017). En la *Tabla 4* se presentan algunos ejemplos de diferencias estructurales de acuerdo con la fuente de almidón. En el caso de las enzimas endomilasas, los productos finales son oligosacáridos y dextrinas. Para las exoamilasas (glucoamilasas y α -glucosidasa), el producto es glucosa y maltosa, etc. (Bustos, Morales, Cuellar & Jaramillo, 2017; Schlegel, 1997). Reacción de hidrólisis con amilasas



El almidón se transforma en glucosa, maltosa y dextrina; estos productos sirven de sustratos para los microorganismos (Reyna, Robles, Mendoza & Romero, 2004).

Tabla 4. Diferencias estructurales por microscopía electrónica de barrido de gránulos de almidones de diferentes fuentes: maíz, cebada, mango y plátano (Casarrubias, Méndez, Rodríguez, Sánchez & Bello, 2012).

Fuente de almidón	Tamaño	Forma	Morfología
Maíz	Pequeño: 5 μm Grande: 20 μm	Esférica, oval con predominio poligonal	Figura A 
Cebada	Pequeño: 2-5 μm Grande: 15-25 μm	Esféricos Lenticulares	Figura B 
Mango	5 μm a 12 μm	Esférica Domo y punta	Figura C 
Plátano	Longitud: 40 a 45 μm Radio: 10 a 12 μm	_____	Figura D 

Nota: El tamaño y forma de los gránulos depende de la estructura de la amilopectina. Los gránulos alargados tienen amilopectina con pocas ramificaciones, pero largas, y los gránulos pequeños y esféricos con mayor número de ramificaciones y cadenas cortas. Las figuras A, B, C y D son adaptadas de “Diferencias estructurales y reológicas entre almidones de frutas y cereales” (p. 459), por M.G. Casarrubias, G. Méndez, S.L Rodríguez, M.M, Sánchez & L.A. Bello, 2012, *Agrociencia*, 46(5).

Aplicaciones de las enzimas

Las α -amilasas son enzimas capaces de degradar almidón; la eficacia de diferentes α -amilasas depende principalmente de la hidrólisis de la amilopectina que da como resultado la reducción del grado de polimerización y la licuefacción del polímero. Presentan aplicaciones en el lavado de suciedades amiláceas alimentarias (pasta, sopas, chocolates, salsas, papas, etc.), debido a que el almidón en la mayoría de los alimentos presenta un grado de gelatinización que favorece el ataque enzimático; presentan así mismo aplicaciones en detergentes. Estas enzimas suelen ser de origen bacteriano, produciendo fermentaciones a partir de cultivos de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* (Herrera, 2016). Además, se emplean para productos panificadores, permitiendo reducir los tiempos de fermentación, mejorando las propiedades reológicas de la masa, mejora de volumen y modificación de la textura; y para la producción de jugos y clarificación de cerveza (Silva, 2020). En la industria textil, actúan como estabilizadores al modificar el tamaño de la tela mediante la hidrólisis del almidón acumulado en las capas durante el tratamiento térmico en los lavados. En la industria energética, se utilizan para producir bioetanol, facilitando la licuefacción del almidón y su posterior sacarificación (Silva, 2020).

Celulosa

Molécula orgánica abundante en la naturaleza y sintetizada por una gran variedad de organismos, incluyendo plantas, algas, hongos, bacterias y animales. Químicamente, la celulosa se conforma de forma natural por el monómero D-glucosa, el cual se une entre sí mediante enlaces β -1,4, es decir, un enlace β en los átomos de carbono 1 y 4 de sus monómeros (Figura 6), disposición que la hace altamente estable. Además, los enlaces de hidrógeno que unen a sus moléculas le confieren sus propiedades como material estructural de la pared celular. Poseen una estructura semicristalina que varía de acuerdo a la fuente de la cual se obtuvo o fue aislada, así como diferentes morfologías (Gañán, Zuluaga, Castro, Restrepo, Cock, Osorio & Molina, 2017).

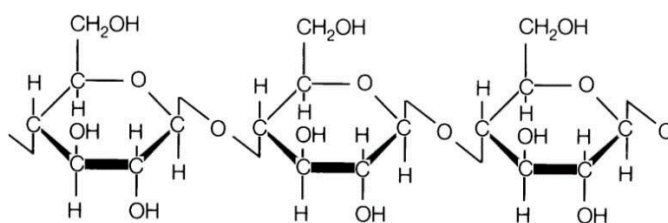


Figura 6. Estructura de la celulosa.

Adaptado de Celulosa [Imagen], por Carlota Benito, 2021, genially
<https://view.genially.com/60741d7fae9a310d13d4591b/interactive-content-celulosa>.

Propiedades fisicoquímicas

Descripción: Polvo blanco

- Fórmula molecular: $(C_6H_{10}O_5)_n$
- Peso molecular: 162.1406 g/mol
- pH: 5 - 7.5 (100 g/l, H_2O , 20 °C)
- Densidad: 1.5 g/ml (20 °C)

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de la celulosa implica la acción secuencial de un conjunto de enzimas denominadas celulasas (Gutiérrez, Moreno & Montoya, 2015) constituido por tres enzimas (Schlegel, 1997):

1. Las endo- β -1,4-glucanasas atacan los enlaces β - 1,4 de la celulosa; a su vez, generan la formación de grandes fragmentos de cadenas con extremos libres.
2. Las exo- β -1,4-glucanasas eliminan los extremos no reductores de la celobiosa.
3. Las β -glucosidasas actúan hidrolizando la celobiosa con formación de glucosa.

De acuerdo con Schlegel (1997) la regulación de la síntesis de la celulasa se ve afectada por la represión por catabolito, es decir, mediante la introducción de una fuente de carbono más favorable; también se ve afectada por la inducción de la celobiosa, así sintetizándose enzimas celulasas. Se indica que las concentraciones que funcionan como inductoras o represoras varían según el organismo. La celulosa influye sobre la síntesis de manera indirecta mediante la liberación de celobiosa.

Aplicaciones

Las enzimas degradadoras de celulosa presentan aplicaciones para la producción de bioetanol a partir de residuos agrícolas con una carga alta de material lignocelulósico. Se han presentado resultados en la fermentación alcohólica de cáscara de maní con *S. cerevisiae* produciendo bioetanol (Monrroy, Zambrano, Latorre & Rosero, 2021). En la industria alimentaria resulta de interés la extracción de aceites. El rendimiento de la extracción de aceites tiene un efecto positivo con preparados celulolíticos, como lo es en la extracción de aceite de aguacate, sometiendo la pulpa del aguacate a un proceso de extracción acuosa enzimática producido por *Aspergillus fumigatus*. La extracción de colorantes por preparados enzimáticos con actividades mixtas, principalmente celulosa, hemicelulasa y pectinasa. Las flores de caléndula con cualquiera de estos preparados enzimáticos permitieron una mayor extracción de la luteína comparado con el testigo, en el cual no se usa enzima (Ovando & Wilszewski, 2005). En la industria textil se busca la aplicación para la sustitución de métodos mecánicos y químicos en la preparación de materiales textiles para eliminación de impurezas, mejora de apariencia y facilidad en el procesamiento de las fibras para teñir, por ejemplo, la enzima “Seycozyme HCE” de la compañía “The Seydel Companies, Inc.” diseñada para la modificación de superficie, suavizado y lavado (Souza, Scito & Ferreira, 2016).

Pectina

La pectina (*Figura 7*) es un polisacárido ácido complejo que naturalmente se encuentra en todos los tejidos vegetales, la cual es extraída con agua caliente, ácido diluido u oxalato de amonio y otros agentes quelantes. Esto ha permitido clasificar las sustancias pécticas en pectina soluble en agua, en agentes quelantes y en protopectina, que se solubiliza por calor en presencia de ácido o álcali (Villalpando et al., 2010). Contiene al menos 65% de unidades de ácido galacturónico ($C_6H_{10}O_7$) con unidades enlazadas por enlaces α 1-4; este tipo de anillos son los que forman parte de su cadena principal. Cada anillo de la cadena posee un grupo carboxilo ($-COOH$) que puede estar esterificado

con metanol, produciendo así ésteres metílicos (-COOCH₃). Por otra parte, el ácido galacturónico viene acompañado de azúcares neutros como la D-galactosa, L-arabinosa y L-ramnosa (Cabarcas, Guerra & Henao, 2012).

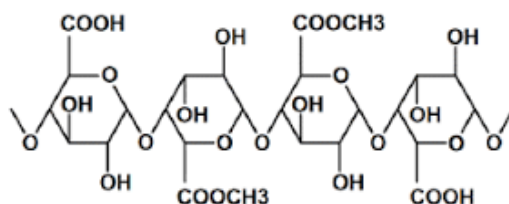


Figura 7. Estructura de la pectina

Adaptado de “Extracción de pectina de residuos de cáscara de naranja por hidrólisis ácida asistida por microondas (HMO)” (p. 66) por Z. Franco & Y. Vanesa, 2015, *Investigación & Desarrollo*, 1(15).

Propiedades fisicoquímicas

La pectina en condiciones controladas de pH, concentración, fuerza iónica y temperatura forma soluciones viscoelásticas y redes estructuradas, ampliamente explotadas en la preparación de alimentos. Propiedades que contribuyen el control de la estabilidad y textura de alimentos en condiciones de pH ácido. Las propiedades son variadas dependiendo de la fuente y el uso que se le otorgue (Lagar, Escalona & Pulgarín, 2014).

Hidrólisis enzimática

Al compuesto hidrolizado por la pectinasa se le denomina sustancia péctica. Las enzimas pectinmetilesterasa o pectinesterasas (rompe el enlace metilestérico) y la poligalacturonasa actúan sobre la pectina. La pectiesterasa ataca los carboxilos esterificados con metanol, liberando los grupos ácidos y el metanol, mientras que la poligalacturonasa rompe las uniones de las unidades de ácido D-galacturónicos residual y libera monómeros de ácido D-galacturónico disminuyendo el peso molecular y cambiando las propiedades del polímero (Cabarcas, Guerra & Henao, 2012).

Aplicaciones

En el procesamiento textil, las pectinasas junto con otras enzimas como amilasas, lipasas, celulasas y hemicelulasas se aplican como agentes de apresto para el algodón, sustituyendo productos químicos agresivos, logrando blancura y absorbencia efectiva del tejido textil. En el tratamiento de extracción de jugo de fruta, son usadas para reducir viscosidad y conseguir claridad; además, contribuyen a reducir el consumo de energía en comparación con los métodos tradicionales. Es utilizada ampliamente en la extracción de aceites como linazas, aceitunas, etc. Las pectinasas se emplean en la fabricación de papel para descomponer los polímeros de ácido galacturónico, disminuyendo la necesidad de cationes en las soluciones de pectina y así evitando el color amarillento y con ello el uso de blanqueadores con cloro presente. Así mismo, reduce los impactos ambientales, debido a que al sustituir sustancias químicas por enzimas se minimiza el riesgo de contaminación, el consumo de energía disminuye y a su vez se logra alterar la unión de propiedades

de tinta y fibra, eliminando la tinta en el lavado, haciéndolo factible para el reciclaje de papel. La industria procesadora de alimentos vegetales libera aguas residuales, las cuales tienen sustancias pécticas; así, la aplicación de un pretratamiento con enzimas pectinolíticas hará adecuado a los subproductos para la descomposición mediante lodos activados (Haile & Ayele, 2022).

Tween-80

Medina, López, Pérez, & Ferlan (2008) definen a los polisorbatos como emulsificantes no iónicos que se obtienen mediante copolimerización del sorbitán anhidro con 20 moles de óxido de etileno. Estos compuestos están esterificados con un ácido graso que se unen a un grupo hidroxilo de la cadena terminal de polioxietileno. La denominación de cada polisorbato varía según el tipo de ácido graso presente su estructura molecular. Si se usa el ácido esteárico, es el tween 60 (*Figura 8*) y con el ácido oleico constituye el tween 80 (*Figura 9*).

Los ácidos grasos presentes en los polisorbatos le confieren propiedades lipofílicas, permitiéndoles

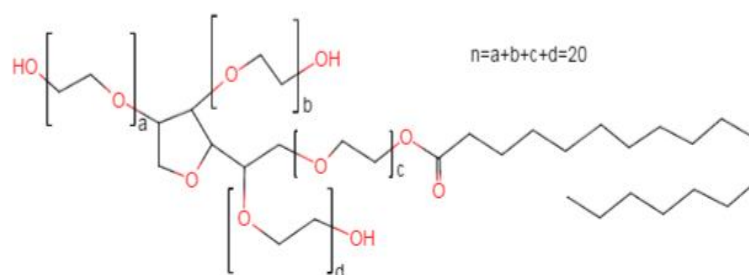


Figura 9. Tween-60 (polisorbato 60)

Adaptado de Polisorbato 60 [Imagen], S.F., HUANA

(https://es.huanachemical.com/uploads/image/20200915/Polysorbate_60.png)

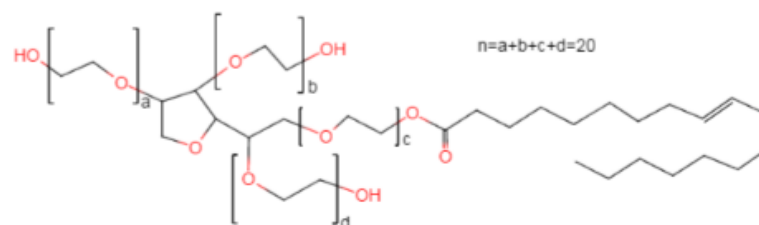


Figura 9. Tween-80 (polisorbato 80)

Adaptado de Polisorbato 80 [Imagen], S.F., HUANA

(https://es.huanachemical.com/uploads/image/20200915/Polysorbate_80.png)

interactuar tanto con componentes lipídicos como con agua, lo que es esencial para su función como emulsionantes en diversas aplicaciones. Así el tween o los polisorbatos nos permiten estudiar la actividad lipolítica.

Propiedades fisicoquímicas

Descripción: Líquido oleoso límpido o ligeramente opalescente, incoloro o amarillo pardusco.

Dispersable en agua, etanol anhidro, acetato de etilo y metanol. Prácticamente insoluble en aceites grasos y en parafina líquida.

- Densidad: 1,06-1,09 g/ml.
- Fórmula molecular: $C_{64}H_{124}O_{26}$
- Peso Molecular: 1309,7 g/mol
- pH: 5-7 (50 g/l, H_2O , 20 °C)

Hidrólisis enzimática en lípidos

Las lipasas (glicerol-éster hidrolasa) son ésteres hidrolasas carboxílicas (enzimas) las cuales rompen los enlaces éster catalizando la hidrólisis de triacilglicéridos presentes en la grasa y aceites. Cuando actúan en un medio acuoso, pueden producir glicerol, ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos. Sin embargo, en ausencia de agua, la reacción es reversible (esterificación, interesterificación y transesterificación), lo que genera glicéridos (Pedroza, Romero & Orduz, 2017).

Aplicaciones

Las aplicaciones industriales principales de la enzima lipasa se encuentran en la fabricación de detergentes, debido a su notable capacidad para eliminar manchas de aceite de los tejidos. Sin embargo, para su uso, la lipasa debe ser estable a altas temperaturas, resistente a los álcalis y capaz de degradar diversas estructuras lipídicas. El uso de enzimas como aditivo en detergentes en lugar de detergentes químicos tradicionales es más efectivo porque permite ahorrar energía al funcionar a temperaturas más bajas, es respetuoso con el medio ambiente, no amenaza la vida acuática y no tiene efectos adversos en el tratamiento de aguas (González., Moreno & del Monte, 2010). *Serratia marcescens* presenta una buena actividad enzimática, abriendo pauta a su uso en aplicaciones biológicas e industriales como biorremediación de aguas contaminadas con grasas o aditivos en detergentes (Pedroza, Romero & Orduz, 2017).

MECANISMOS DE DEGRADACIÓN DE PÓLIMEROS

De acuerdo con Zapata, Pujol & Coda (2012) se aceptan 5 mecanismos de degradación básicos: Fotodegradación, degradación mecánica, degradación térmica, degradación química y degradación mediante microorganismos (bacterias, hongos o algas).

La **fotodegradación** implica alteraciones físicas y químicas en el polímero debido a la exposición a la luz ultravioleta o visible. La creación de polímeros fotodegradables se logra al incorporar grupos funcionales sensibles a la radiación ultravioleta, como los grupos carbonilo, o mediante la adición de aditivos, catalizadores y peroxidantes fotosensibles que aceleran el proceso de degradación.

La **degradación mecánica** resulta de esfuerzos aplicados al material, generalmente acompañados por la ruptura de enlaces en la cadena principal. En cuanto a la **degradación térmica**, esta se refiere a cambios químicos en el polímero a altas temperaturas, sin la intervención de otros factores aparte de la energía térmica.

La **degradación química** se realiza por procesos en los cuales la degradación es provocada por la interacción del polímero con productos químicos reactivos. La degradación hidrolítica es un ejemplo

común, donde el contacto con un medio acuoso provoca hinchamiento, ruptura de puentes de hidrógeno, hidratación y la hidrólisis de enlaces inestables.

La **degradación a través de microorganismos**, como bacterias, hongos o algas, implica la acción de enzimas que reaccionan con polímeros sintéticos y naturales. Este proceso enzimático es inducido por la necesidad de los microorganismos de obtener alimento, ya que la cadena principal de los polímeros sirve como fuente de carbono.

BIODEGRADACIÓN DE POLÍMEROS

“Un polímero biodegradable se define como un polímero en el cual la degradación resulta de procesos naturales propios de los microorganismos presentes en el medio” (Flores, 2009) y tiene como consecuencia una reducción del grado de polimerización, así como la degradación del polímero en fragmentos orgánicos simples (Zapata, Pujol & Coda, 2012). Existen tres clasificaciones de polímeros considerados biodegradables en el mercado: polímeros naturales, polímeros sintéticos y biodegradables naturales que fueron modificados con aditivos y rellenos.

Polímeros naturales: Los polímeros obtenidos de fuentes naturales como celulosa, almidón y proteínas son elementos clave (Zapata, Pujol & Coda, 2012).

Polímeros sintéticos: Existen polímeros sintéticos que son preparados a partir de fuentes naturales renovables, como lo es el poliácido láctico, el cual se obtiene de materias primas agrícolas (Flores, 2009). Polímeros naturales como carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos tienen átomos de oxígeno y nitrógeno en su estructura principal. Cuando estos átomos se incorporan en polímeros sintéticos, el material se vuelve más propenso a la degradación. (Zapata, Pujol & Coda, 2012).

CRITERIOS DE LA BIODEGRADABILIDAD DE POLÍMEROS

De acuerdo con Zapata, Pujol & Coda (2012) el criterio para seleccionar un polímero como material biodegradable considera las propiedades mecánicas requeridas, así como el tiempo de degradación necesario para la aplicación particular.

1. Propiedades mecánicas: La selección de los monómeros y del iniciador de reacción, la presencia de aditivos y las condiciones del procesado son las que influyen en las propiedades mecánicas.
2. Velocidad de degradación
 - a. **Condiciones ambientales o factores físicos y químicos:** temperatura, humedad y pH.
 - b. **Características de los microorganismos o factores biológicos:** variedad, cantidad, fuente y actividad.
 - c. **Características del polímero:** presencia de enlaces químicos susceptibles a hidrólisis, hidrofiliidad, estereoquímica, peso molecular, cristalinidad, superficie específica, temperatura de transición vítrea y de fusión. Se mencionan los más destacados a continuación.

Cristalinidad

La cristalinidad proporciona estabilidad térmica y química a los polímeros. Las zonas cristalinas confieren rigidez y resistencia, mientras que las regiones amorfas aportan flexibilidad y tenacidad (Ccallo, Sacaca, Callata, Vigo, & Calla, 2020).

La flexibilidad de la cadena y las fuerzas intermoleculares

Influyen en la capacidad de cristalización de los polímeros. Polímeros altamente flexibles con fuerzas intermoleculares débiles, como el polisiloxano, no cristalizarán debido a la presencia de átomos de oxígeno en la cadena principal (Ccallo, Sacaca, Callata, Vigo, & Calla, 2020).

La estereorregularidad

La estereorregularidad es crucial, ya que la sustitución de un hidrógeno por otro átomo o grupo de átomos en cada unidad repetitiva del polietileno puede afectar su regularidad, y la disposición relativa de estos grupos en la cadena se denomina tacticidad (Ccallo, Sacaca, Callata, Vigo, & Calla, 2020).

Ramificaciones

Las ramificaciones pueden disminuir la estabilidad térmica, especialmente en polímeros ramificados de mayor longitud, ya que los carbonos terciarios son más susceptibles al ataque químico, lo que facilita la oxidación (Ccallo, Sacaca, Callata, Vigo, & Calla, 2020).

Entrecruzamiento

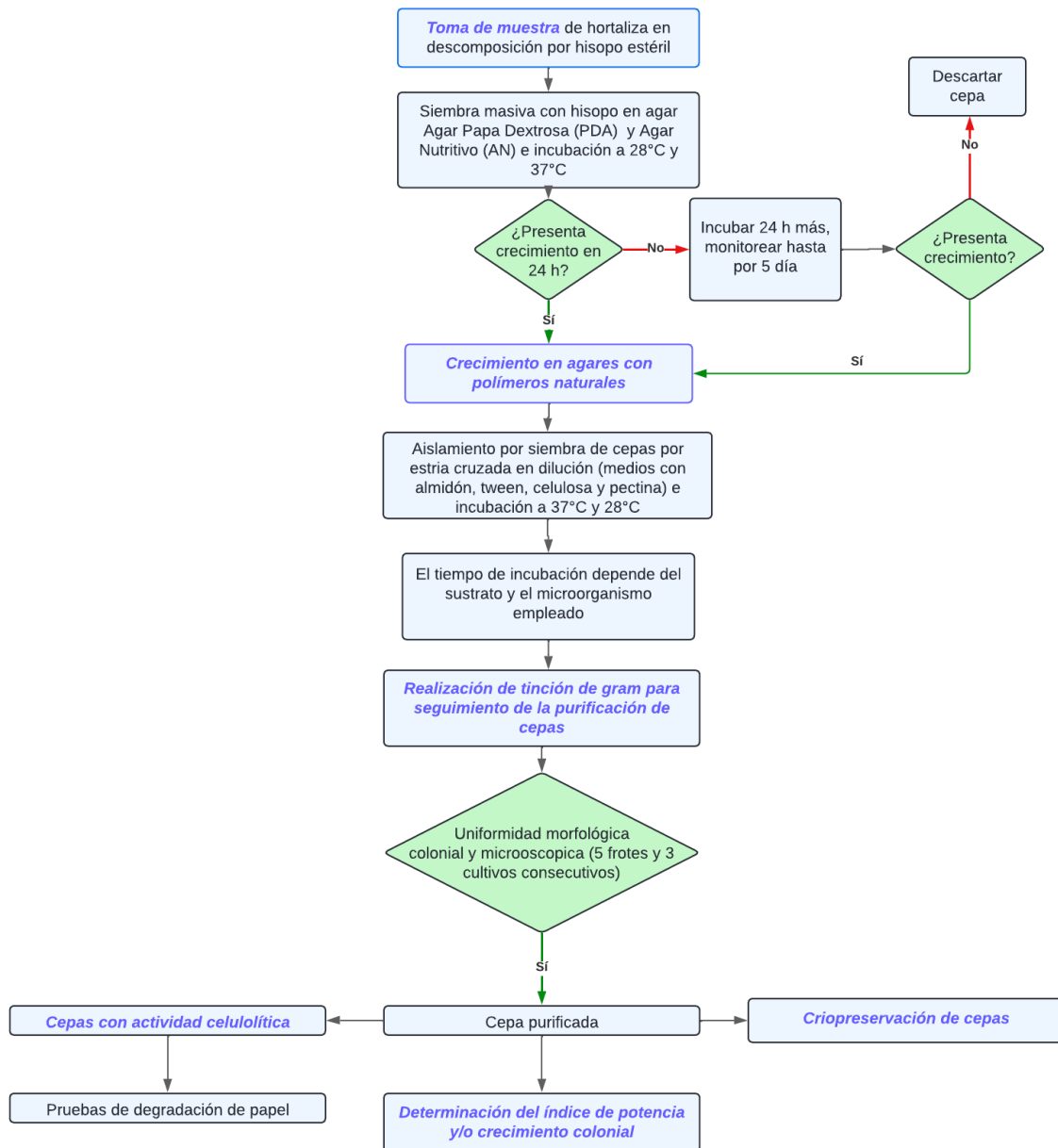
El entrecruzamiento, por otro lado, aumenta la rigidez del polímero, mejorando su estabilidad térmica y química (Ccallo, Sacaca, Callata, Vigo, & Calla, 2020).

VII. METODOLOGÍA

Para alcanzar los objetivos planteados en el presente trabajo de tesis se llevó a cabo la siguiente metodología, la cual, se concibe de las siguientes etapas:

1. Toma de muestra a partir de la descomposición de hortalizas.
2. Crecimiento en los polímeros naturales almidón, celulosa y pectina y en tween-80
3. Aislamiento y purificación de cepas
4. Criopreservación de cepas
5. Evaluación de potencial de degradación en polímeros naturales y de material celulósico (*Figura 10*)

Figura 10. Metodología: Toma de muestra, evaluación de potencial hidrolítico, aislamiento, purificación e identificación de cepas y degradación de material celulósico.



VII.I FUNDAMENTOS DE LA METODOLOGÍA

MEDIOS DE CULTIVO

Como se ha mencionado, los microorganismos necesitan de ciertas condiciones para que se puedan desarrollar y realizar actividades específicas de la mejor manera. Ahí es donde entra la importancia de los medios de cultivo, los cuales brindan las condiciones y nutrientes necesarios para poder hacerlos crecer, multiplicar, activar, aislar, identificar o incluso conservar cepas deseadas, por un largo periodo de tiempo. Estos medios pueden ser sólidos, líquidos o semisólidos y se preparan con una gran diversidad de reactivos en función de las exigencias del microorganismo. Estos reactivos de preparación también brindan las condiciones necesarias para que los microorganismos logren activar eficientemente sus capacidades enzimáticas (Gómez & Batista, 2006).

Para la correcta formulación de los medios de cultivo, se debe asegurar que la elección de nutrientes y su concentración cumplan con los requerimientos de los microorganismos, requerimientos como la fuente de carbono, energía, nitrógeno, fósforo, pH, etc. Tomando en cuenta la gran cantidad de microorganismos y necesidades de los investigadores, se han realizado un gran número de medios de cultivo (Gómez & Batista, 2006).

En base al propósito con el que se desea usar un medio de cultivo, estos se pueden categorizar como:

Medios simples: Aquellos que contienen lo necesario para el crecimiento general de los microorganismos y no tienen algún reactivo con una función en especial, como por ejemplo el Agar Nutritivo.

Medio enriquecido: Son medios que tienen alguna sustancia que satisfaga el crecimiento de microorganismos exigentes en ciertos nutrientes y que no logran crecer en un medio simple, sustancias adicionales como sangre, huevo, vitaminas, etc.

Medio diferencial: Contiene reactivos e indicadores que permiten observar características fisicoquímicas de alguna cepa. Estos cultivos presentan coloraciones o ciertas reacciones con determinados microorganismos.

Medio selectivo: Presenta algún compuesto que inhiba el crecimiento de microorganismos que no son de interés, permitiendo el crecimiento de la cepa deseada (Romero, 2023).

Medio de criopreservación: Son medios utilizados para mantener durante un largo tiempo y a bajas temperaturas a microorganismos que se deseen ocupar en un futuro. Estos medios contienen glicerol, el cual evita la formación de cristales de hielo que puedan dañar a la cepa o generar contaminación cruzada (Ministerio de Agricultura, s.f.).

REACTIVOS PRESENTES EN MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo deben contener lo necesario para brindar las mejores condiciones de desarrollo y trabajo para las bacterias deseadas; a continuación, se describen algunos reactivos y la función que desempeñan.

Agar bacteriológico: Es el medio solidificante que permite la consistencia gelatinosa en los medios de cultivo, lo que permite realizar inoculados y estriados de la muestra. Además, tiene la capacidad de mantenerse en estado sólido hasta los 65°C, soportando perfectamente las temperaturas de incubación. Por otro lado, presenta una gran claridad y solubilidad en agua, lo que ayuda a tener una mejor visibilidad para el estudio de las colonias (MCD LAB, s.f.a).

Almidón: Este polímero se disuelve en la preparación del medio de cultivo como única fuente de carbono, con el objetivo de observar la actividad amilolítica de los microorganismos sembrados en el medio y su producción de enzimas amilasa (Rodríguez, Boucourt, Rodríguez, Albelo, Nuñez & Herrera, 2006).

Peptona de caseína: Es un estimulante para el crecimiento de los microorganismos que les proporciona nutrientes como fuente orgánica de Nitrógeno (Condalow, 2020).

Peptona de caseína I (triptona): Aporta nutrientes, particularmente aminoácidos y péptidos para microorganismos exigentes y no exigentes, además de promover la producción de antibióticos, toxinas y enzimas (Laboratorios MICROKIT, 2020).

Carboximetilcelulosa: Actúa como un espesante, emulsificante y ayuda a evitar la formación de los grumos (Innovative Cooking S.L., 2020). En caso de presentarse como única fuente de carbono, ayudará a comprobar la actividad de degradación de celulosa y realizar pruebas de degradación con la adición de rojo congo (Ortiz & Uribe, 2011).

Pectina: Es el sustrato que se utiliza en el medio de cultivo para inducir a los microorganismos de interés a producir las enzimas pectinasas. Debido a que la pectina se usa como única fuente de carbono, los microorganismos se ven obligados a degradarlos por medio de las pectinasas (Arroyo, 2002).

Extracto de levadura: Se utiliza como fuente de nutrientes como vitaminas y aminoácidos que fomentan el crecimiento de los microorganismos (MCD LAB, s.f.b).

NaCl: Permite que haya un equilibrio en la presión osmótica de las células, evitando que se deshidraten y permitiendo un correcto funcionamiento de sus funciones vitales (Ceiro, Arévalo, Puertas & Hidalgo, 2014). Por otro lado, con altas concentraciones, funciona como un agente diferenciador que permite el crecimiento de microorganismos capaces de desarrollarse en medios salinos (InsumoLab, s.f.).

Tween-80: Los ésteres de ácido grasos de polioxietilen sorbitán (tweens) se utiliza como sustratos para la detección de microorganismos lipolíticos en medio agar (Plou, Ferrer, Nuero, Calvo, Alcalde, Reyes & Ballesteros, 1998).

TÉCNICAS DE CULTIVO DE MICROORGANISMOS

Las técnicas de cultivo sirven para inocular a los microorganismos deseados en el medio de cultivo para desarrollarse. Existen diversas técnicas, las que se adaptarán a las necesidades y propósitos del investigador.

Siembra por estría: La técnica se realiza tomando el inóculo con un asa de anillo para después realizar un primer estriado en forma de zigzag sobre la superficie del medio de cultivo. Una vez terminado el primer estriado, ya no se debe tomar más inóculo y el asa se debe esterilizar, así sucesivamente con los demás estriados. Esterilizar el asa y no tomar más inóculo permite que la concentración del inóculo disminuya y que se logre un aislamiento de colonias.

Siembra masiva: El propósito de esta técnica es tener un crecimiento masivo del inóculo deseado, sin importar el aislamiento de colonias. Esto se realiza principalmente tomando una muestra del inóculo con un hisopo, el cual se pasará por toda la superficie y en todas las direcciones del medio de cultivo (Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, 2020).

Siembra por punción: Se toma el inóculo con un asa en punta y se realiza una punción de forma perpendicular a la superficie del agar, tratando de que sea lo más recto posible, sin tocar las paredes de la placa y asegurándose de que el inóculo se haya adherido al medio. Esta técnica sirve para observar el movimiento o crecimiento de la colonia en un solo punto.

Siembra en medio líquido: Con ayuda del asa en anillo, se toma una muestra de inóculo y se introduce al tubo que tiene el medio de cultivo líquido. Asegurándose de no tocar las paredes del tubo, el asa se introduce al medio y se hacen movimientos rotatorios para que la muestra se suelte y se integre al líquido. La técnica se usa para aumentar el número de microorganismos (Reynoso, Magnoli, Barros & Demo, 2015).

INCUBACIÓN DE MICROORGANISMOS

La temperatura, al ser uno de los factores físicos que influye en el crecimiento de las bacterias, es un elemento que se debe tomar muy en cuenta a la hora de sembrar y trabajar con los microorganismos. La mayoría de las bacterias crecen y logran desarrollarse por encima de los 30°C; sin embargo, hay que tener en cuenta que existen diferentes tipos de microorganismos que crecen a diferentes temperaturas. Están las psicrófilas que se desarrollan entre 15 y 20°C, las mesófilas entre los 30 y 37°C, y finalmente las termófilas que alcanzan un desarrollo óptimo entre los 50 y 60°C (Junco & Rodríguez, 2001). Considerando lo anterior, la incubación de microorganismos promueve el crecimiento de los mismos, ayudando a obtener mejores resultados al contar con condiciones controladas y estandarizadas de temperatura (M&M Instrumentos Técnicos, 2023).

PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN DE GRAM

El principio explicado de la técnica de tinción de Gram fue mencionado en el apartado “DIFERENCIAS ENTRE LAS BACTERIAS Y LEVADURAS” del presente trabajo de tesis, así se explicará el procedimiento de la tinción de Gram de acuerdo a Bado (2022).

- a. Se realizan frotis con los cultivos microbianos, el frotis se cubre con solución de cristal violeta al 0.2% en etanol y/o agua (Laboratorio Britania, 2023), se deja actuar de 30 segundos a 1 minuto, se enjuaga con agua y se escurre el exceso de agua. Se recomienda realizar los lavados con piseta, evitando que caiga directamente con el frotis.
- b. La preparación se cubre con solución lugol o yodo lugol (1% de I_2 y 2% de KI) diluido 1/10 (Laboratorio Britania, 2023), se deja actuar por 30 segundos a 1 minuto, se enjuaga y se escurre el exceso de agua. Se recomienda agitar el portaobjetos para eliminar el exceso de agua, debido a que al agregar el alcohol-cetona con agua puede diluirse.
- c. Al agregarse el alcohol/acetona: 70.5/29.5 (Laboratorio Britania, 2023), se enjuaga con agua y se escurre el exceso. La American Society for Microbiology recomienda ajustar el tiempo de decoloración dependiendo del grosor del frotis, evitando una decoloración insuficiente, ya que, daría como resultado que bacterias Gram positivas se observen como Gram negativas; o en un caso excesivo, hacer pasar una bacteria Gram positiva por Gram negativa o Gram variable. Se recomienda de 5 a 30 segundos, pero en su mayoría se utilizan 15 segundos.
- d. Los frotis se cubren con la solución de safranina al 0.25% en alcohol y/o agua (Laboratorio Britania, 2023), se deja actuar de 30 segundos a 1 minuto, se enjuaga y se escurre el exceso. Se recomienda no exceder más tiempo debido a que puede desplazar el complejo cristal-violeta.

PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN

Se puede decir que la biodegradación es la descomposición de algún material, de una forma más simple o menos tóxica para el ambiente, por parte de los microorganismos. Esta descomposición puede ser parcial o completa si es que se llega a la mineralización, es por ello que, para poder evaluar el nivel de degradación, existen pruebas que permiten cuantificar la cantidad de material degradado o cantidad de material persistente (Vázquez & Beltrán, 2004).

En las pruebas de biodegradación de medios de cultivo, se ocupan ciertos indicadores que son sustancias que al reaccionar con ciertos compuestos adquieren un color determinado. El color que presentan al reaccionar estos compuestos, se ve afectado en caso de que haya una degradación del reactivo involucrado en la coloración, por lo que el color puede cambiar o simplemente desaparecer. Existen ciertos reactivos que se ocupan para determinar la degradación de almidón, celulosa, pectina y tween-80.

Rojo congo: El rojo congo, al tener buena afinidad con los polisacáridos, forma un complejo con la carboximetilcelulosa presente en el agar celulosa. Este complejo genera una intensa coloración roja o anaranjada intensa, la cual perderá su intensidad cuando las enzimas endoglucanasas lleven a cabo la despolimerización de la celulosa. Es decir, mientras haya una mayor degradación de la carboximetilcelulosa, también disminuirá la cantidad de complejos formados con el rojo congo y, por ende, se perderá la coloración inicial (Ortiz & Uribe, 2011).

Lugol: Su presencia es importante en las pruebas de degradación de almidón debido a que este polímero tiene la capacidad de adsorber al lugol dentro de las hélices que se forman a lo largo de su cadena polimérica; es decir, no se trata de una reacción química, simplemente el lugol ocupa un espacio entre las cavidades de la estructura del almidón, lo que genera la coloración. Específicamente, es la unión del lugol con la amilosa lo que genera el color azul oscuro o púrpura, mismo que desaparece cuando hay una despolimerización del almidón y el lugol abandona su posición entre las hélices de la estructura química (Aragón, 2018).

Rojo de metilo: Es un colorante que funciona como indicador para evaluar medios ácidos. Aproximadamente en valores de pH menores a 4.4, el colorante se torna rojo, amarillo para valores mayores a 6.2 y naranja cuando se encuentra en medio de los rangos anteriores (Merck KGaA, s.f.). Por su parte, el Tween-80 presenta un pH de entre 5 y 7 en una solución al 5% (Thermo Fisher Scientific Inc., 2025). Por lo tanto, al haber una biodegradación de los ácidos grasos, productos de la actividad lipolítica en el Tween-80, la acidez en las áreas degradadas cambiará, presentando una variación de color.

VII.II DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA

TOMA DE MUESTRA

La toma de muestra se realizó a partir de la descomposición de hortalizas, en laboratorio por medio de un hisopo estéril, directamente en los puntos de degradación presentes en las hortalizas, bajo condiciones de esterilidad. Obtenido el inóculo, se realizó una siembra masiva por hisopo en Agar papa dextrosa (PDA) y Agar Nutritivo (AN), incubados a 28°C para PDA y 37°C para AN, se monitoreó el crecimiento cada 24 horas hasta por 5 días.

CRECIMIENTO EN POLÍMEROS NATURALES.

Las cepas aisladas del cultivo anterior se sembraron por estría cruzada en dilución en los diferentes medios (agar almidón, agar pectina, agar celulosa y agar tween). La incubación se llevó a 37°C y 28 °C, monitoreando el crecimiento cada 24 h hasta por 5 días. La evaluación del potencial hidrolítico de las cepas obtenidas se realizó mediante la aplicación de diferentes colorantes de acuerdo con el medio usado, para identificar la degradación del sustrato de interés por parte de los microorganismos.

Las actividades hidrolíticas de las cepas se evalúan de la siguiente manera:

Actividad amilolítica.

Se prepararon dos formulaciones diferentes del medio almidón:

- **Medio almidón AAT:** Agar bacteriológico 2%, almidón 0.5%, triptona 0.05%, y carboximetilcelulosa 0.05%, cubrir con lugol al 10%; la aparición de zonas claras es signo de positividad (modificado de Pérez et al., 2020).

- **Medio almidón AA:** Agar bacteriológico 2%, almidón 0.5% y carboximetilcelulosa 0.05%, cubrir con lugol al 10%; la aparición de zonas claras es signo de positividad (modificado de Pérez et al., 2020). El uso de esta formulación se realizó debido a que no todos los medios presentaron halos visibles de degradación, así una formulación más simple en componentes buscó asegurar que los microorganismos ocuparan el almidón como principal sustrato y no la triptona.

Actividad celulolítica.

Se prepararon dos formulaciones diferentes del medio celulosa:

- **Medio celulosa ACT:** Agar bacteriológico 2%, carboximetilcelulosa 1%, triptona 0.05%, teñidas con rojo Congo al 0.1%; la aparición de un halo amarillo indica positividad (modificado de Mazzucotelli et al., 2013).
- **Medio celulosa AC:** Agar bacteriológico 2%, carboximetilcelulosa al 1%, teñidas con rojo Congo al 0.1%; la aparición de un halo amarillo indica positividad (modificado de Mazzucotelli et al., 2013). El uso de esta formulación se realizó debido a que los medios no presentaron halos visibles de degradación, así una formulación más simple en componentes buscó asegurar que los microorganismos ocuparan la carboximetilcelulosa como principal sustrato.

En agar celulosa (agar bacteriológico 2%, carboximetil celulosa 1% y triptona 0.05%) teñidas con rojo Congo al 0.1%; la aparición de un halo amarillo indica positividad (modificado de Mazzucotelli et al., 2013).

Actividad pectinolítica.

Se prepararon dos formulaciones diferentes del medio pectina:

- **Medio pectina APNET:** Agar bacteriológico 15 g/l, pectina 5 g/l, NaCl 5 /l, extracto de levadura 2.5 g/l y triptona 5 g/l, cubrir con lugol al 25%; la aparición de zonas claras es signo de positividad (modificado de Hossain et al., 2020).
- **Medio pectina AP:** Agar bacteriológico 15 g/l y pectina 5 g/l, cubrir con lugol al 25%; la aparición de zonas claras es signo de positividad (modificado de Hossain et al., 2020). El uso de esta formulación se realizó debido a que los medios no presentaron halos visibles de degradación, así una formulación más simple en componentes buscó asegurar que los microorganismos ocuparan la pectina como principal sustrato.

Actividad lipolítica.

- **Medio Tween-80 AT-80:** Agar bacteriológico 20 g/l, Tween-80 15 ml/l, triptona 5 g/l, extracto de levadura 2.5 g/l, NaCl 5 g/l, teñir con solución rojo de metilo 5 ml para 100 ml del medio (0.2 g/L rojo de metilo en etanol al 95%); la aparición de halos claros alrededor de las colonias indica actividad (Hossain et al., 2020).

ASLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS

Las cepas positivas en los diferentes medios se aislaron y purificaron mediante cultivo continuo por estría cruzada en dilución, con seguimiento a través de la tinción de Gram. Se registró la morfología colonial de los microorganismos, así como la morfología microscópica. El número de resiembra dependió del proceso de purificación, hasta verificar la similitud en las morfologías coloniales y microscópicas en tres cultivos consecutivos y cinco frotis homogéneos en cada uno de ellos.

POTENCIAL HIDROLÍTICO

La eficiencia de los aislados para degradación de polímeros naturales o el potencial hidrolítico se evaluó cualitativamente mediante el índice de potencia (IP%), midiendo el diámetro de los halos de degradación entre el diámetro de las colonias (Pérez et al., 2020). Las colonias se sembraron por el método de punción (Sánchez, Heredia, Morales & Medina, 2020) en una caja Petri (con el agar correspondiente) dividida en 6 espacios, 5 serán ocupados y el sexto se establecerá como control.

$$IP (\%) = \frac{z-c}{c} * 100$$

Donde:

Z – Diámetro de halo de hidrólisis

C- Diámetro de la colonia bacteriana

Esta medición se realizará 10 veces para cada microorganismo purificado.

CRIOPRESERVACIÓN DE CEPAS

Se partió de un cultivo fresco crecido en las placas con medio de pectina, almidón, celulosa y tween-80 incubadas a las condiciones idóneas de crecimiento de cada cepa. , a partir de las colonias se tomó suficiente cantidad con un asa redonda, para ser inoculadas en caldo Luria Bertani (LB) para las especies bacterianas y caldo de extracto de levadura, Peptona y Dextrosa (YPD) para las especies de levaduras; en ambos caldos con glicerol al 30 % en crioviales y se almaceno a -18 °C (Pérez et al., 2021).

Caldo Lurina Bertani (LB): Se realizo un medio de cultivo LB estándar, utilizando 10 g de peptona de caseína (10 g/l), 5 g de extracto de levadura (5g/l), 5 g de NaCl (5 g/l) y disueltos en 1 l de solución de 70% agua destilada y 30% glicerol (modificado de Garboza et al., 2011).

Caldo de extracto de levadura, Peptona y Dextrosa (YPED): Se utilizaron 10 g de extracto de levadura (10 g/l), 20 g de peptona (20 g/l) y 20 g de dextrosa (20 g/l), disueltos en 1 l de solución de 70% agua destilada y 30% glicerol (modificado de Castro et al., 2013).

EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE MATERIALES CELULÓSICOS

Se evaluó la degradación de material celulósico cualitativamente, preparando agar sólido a base de servilletas de papel, bajo la siguiente metodología. Las cepas empleadas son las aisladas y purificadas a partir del medio agar celulosa.

Preparación del agar sólido

Se eligió servilletas de papel absorbente como el residuo proveedor del material celulósico. Antes de incorporarlas al medio, se sometió a un proceso que consta de licuarlas en seco para su trituración; posteriormente, se hirvieron para obtener una pasta que se introdujo en un horno de secado a 45°C por 24 horas. Finalmente, se trituraron para obtener la textura más fina posible (Curvelo & Rojas, 2010).

Se preparó tres tipos de agares a base del material celulósico seleccionado (agar 1, agar 2 y agar 3) de la siguiente manera:

- Agar 1 (ARC): Agar bacteriológico (2 %), rojo Congo (3 %) y material celulósico (1.5 %).
- Agar 2 (ATRC): Agar bacteriológico (2 %), triptona (0.5 %), rojo congo (3 %) y material celulósico (1.5 %).
- Agar 3 (ATC): Agar bacteriológico (2 %), triptona (0.5 %) y material celulósico (1.5 %).

1. Se calentó agua destilada y se agregó paulatinamente el material celulósico con agitación lenta y posteriormente se agregó el resto de los ingredientes.

2. Los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 lb de presión durante 15 minutos.

3. Se vertió en zona estéril en placas Petri.

Posteriormente, ya gelificadas, se sembró cada cepa en cada uno de los agares y se incubaron a 28°C durante (tiempo) para observación de crecimiento.

El crecimiento de colonias, la desaparición del color (placas con rojo congo) y la observación de la morfología microscópica mediante observación de la tinción de Gram de cada cultivo son indicativos de degradación y utilización por parte de los microorganismos de la fuente de “C”, es decir, de utilización del residuo celulósico (servilletas de papel absorbente).

VIII. RESULTADOS

VIII. I AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS

Se lograron aislar **22 cepas** a partir de hortalizas en descomposición, de las cuales **5** presentan capacidad celulolítica, **2** con capacidad lipolítica, **8** con capacidad pectinolítica y **7** con capacidad amilolítica.

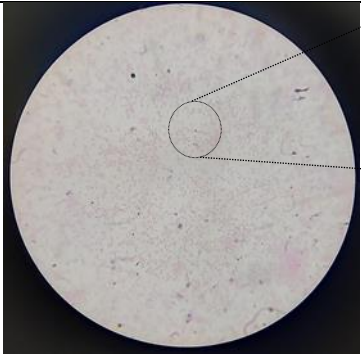
Se describen a continuación las características de las cepas con actividad hidrolítica, así como su índice de potencia o potencial hidrolítico y la comparación de crecimiento o potencial hidrolítico según corresponda entre las diferentes cepas de acuerdo a su capacidad amilolítica, pectinolítica, celulolítica y lipolítica.

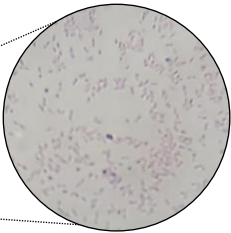
ACTIVIDAD AMILOLÍTICA

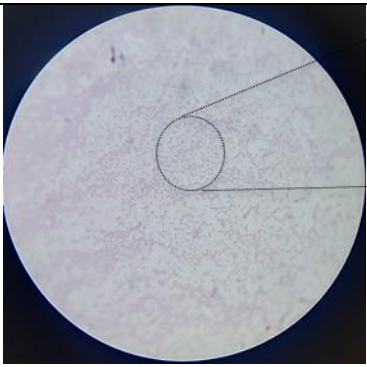
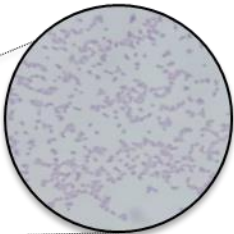
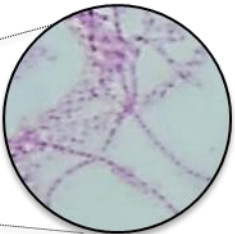
Descripción de la morfología colonial y morfología microscópica

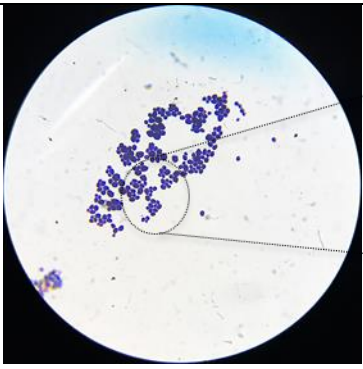
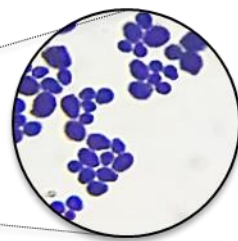
Las condiciones para un crecimiento óptimo se determinaron a una incubación de 28°C para las cepas A2, A3, A4 y A8, a 37°C para las cepas A5, A6 y A7. Durante 24 h de incubación para las cepas A3, A5, A6 y A7; y 48 h de incubación para las cepas A2, A4 y A8. En la *Tabla 5* se muestra la descripción de la morfología colonial y morfología microscópica, así como las imágenes de las cepas al microscopio óptico con un aumento de 100x.

Tabla 5. Descripción de las cepas con actividad amilolítica.

Cepa (Tiempo de incubación)	Morfología colonial.	Morfología microscópica	Foto al microscopio óptico a un aumento de 100x
A2 (48 h)	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Plana Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Traslúcida Color: Blanco-Beige	Bacilos medianos y delgados curvos Gram negativos	
A3 (24 h)	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Plana Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Traslúcida Color: Blanco-Beige	Bacilos gruesos y cortos Gram negativos	



A4 (48 h)	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Plana Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Mate Luz transmitida: Opaca Color: Amarrillo ocre	Bacilos pequeños y gruesos Gram negativos	 
A5 (24 h)	Forma: Circular /irregular Borde: Entero Elevación: Elevada Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Translúcida Color: Blanco – caqui	Bacilos largos (apariencia de actinomiceto) Gram negativos	 
A6 (24 h)	Forma: Irregular Borde: Rizoide Elevación: Plana Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Mate Luz transmitida: Opaca Color: Blanco	Bacilos (apariencia de actinomicetos) Gram negativos	 
A7 (24 h)	Forma: Irregular Borde: Rizado Elevación: Plana Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Translúcida Color: Blanco – caqui	Bacilos anchos y medianos Gram negativos	 

A8 (48 h)	Forma: Irregular Borde: Rizado Elevación: Plana Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Translúcida Color: Blanco – caqui	Levaduras ovaladas y pequeñas Gram positivas		
--------------	---	---	--	---

Potencial hidrolítico

La incubación de los microorganismos se determinó a 28°C para cepas A2, A3, A4 y A8, mientras que las cepas A5, A6 Y A7 se incubaron a 37°C. El experimento se repitió bajo condiciones de refrigeración (5°C) para todas las cepas, esto debido a que se observó que algunas cepas, una vez crecidas y en refrigeración, se hacía visible su halo de degradación con el transcurso de los días, por lo que se complementó con esta refrigeración para observar la degradación a estas temperaturas. Se obtuvieron 2 tipos de resultados para las cepas:

- Evaluación del crecimiento de las colonias a las 48 h de incubación.
- Crecimiento de las colonias y presencia de halos de degradación (halos de hidrólisis) a las 48 h de incubación.

Para las cepas A2, A3 y A8 se reporta la medición de los diámetros de las colonias incubadas a 28°C por 48 h ([Tabla 6](#)) y en refrigeración a 5°C ([Tabla 7](#)). Por otro lado, para las cepas A4 incubada a 28°C, A5, A6 y A7 incubadas a 37°C ([Tabla 8](#)) estas cepas presentaron un halo de degradación visible y en refrigeración a 5°C ([Tabla 9](#)), se reporta los halos de degradación y/o los diámetros de las colonias. Los halos de degradación de las cepas A4, A5, A6 y A7 fueron revelados mediante el uso de lugol al 10%.

CEPAS CON CRECIMIENTO EN AGAR AAT Y AA SIN HALO VISIBLE DE DEGRADACIÓN

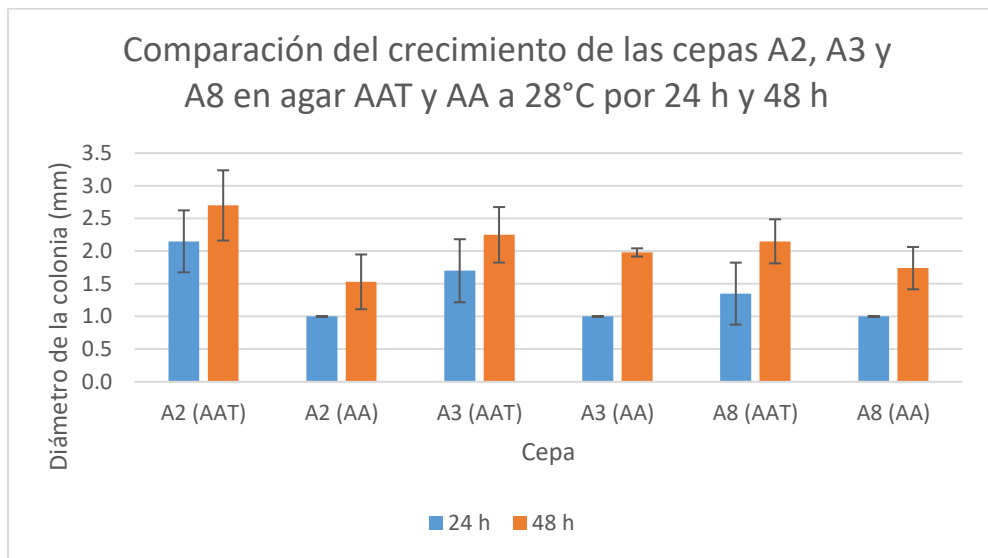
DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS SIN HALO VISIBLE

En la [Tabla 6](#) se muestran las cepas que presentaron crecimiento sin una clara observación del halo de degradación, obteniendo un valor promedio del diámetro (mm) de las colonias sembradas por método de punción en los dos medios de cultivo AAT y AA incubadas a 28°C por 24 h y 48 h, así como la desviación estándar (SDT) de los diámetros medidos de cada colonia.

Tabla 6. Crecimiento de las cepas A2, A3 y A8 en medio AAT y AA incubadas a 28°C.

Cepa	Incubación por 24 h		Incubación por 48 h	
	Diámetro de la colonia (mm) $\pm$ STD en AAT	Diámetro de la colonia (mm) $\pm$ STD en AA	Diámetro de la colonia (mm) $\pm$ STD en AAT	Diámetro de la colonia (mm) $\pm$ STD en AA

A2	2.7 ± 0.54	1.6 ± 0.4	2.7 ± 0.54	1.5 ± 0.4
A3	2.3 ± 0.42	2.0 ± 0.1	2.3 ± 0.42	2.0 ± 0.1
A8	2.2 ± 0.34	1.7 ± 0.3	2.2 ± 0.34	1.7 ± 0.3



Gráfica 1. Comparación del crecimiento de las cepas A2, A3 y A8 en agar AAT y AA a 28°C por 24h y 48h.

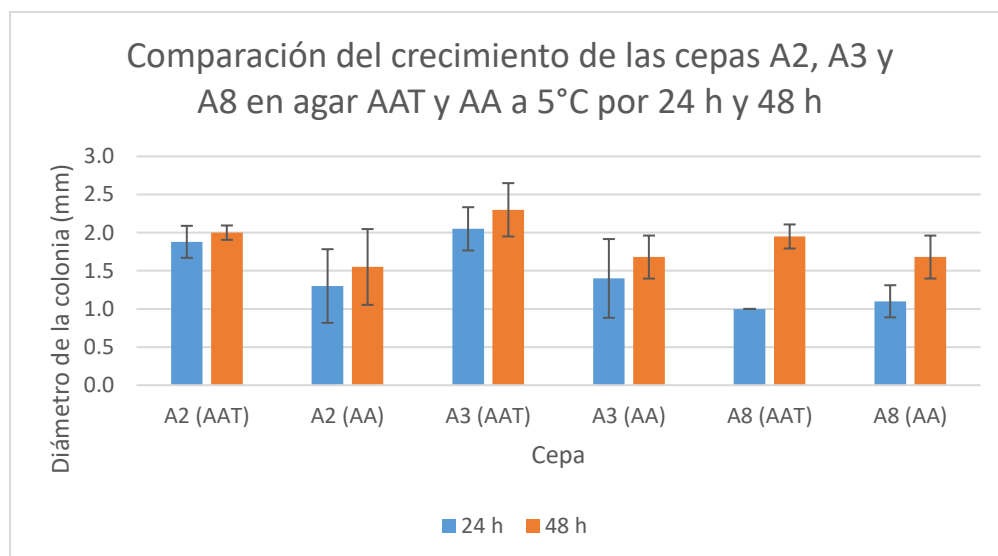
De acuerdo con la *Gráfica 1*, se muestra un mejor crecimiento de las cepas en un medio con presencia del componente triptona, presentando un mejor resultado de crecimiento la cepa A2 (AAT) que la A2, es decir, la cepa 2 en presencia de triptona que en su ausencia; sin embargo, para las cepas A3 y A8 la diferencia de crecimiento es mínima ante la presencia y ausencia de la triptona.

DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS SIN HALO VISIBLE A 5°C

En la *Tabla 7* se muestra el crecimiento de las mismas cepas que la *Tabla 6*, pero a condiciones de temperatura de 5°C, considerando el valor promedio de los diámetros de la colonia (mm) y la desviación estándar (SDT) de los valores de los diámetros de las colonias para 24h y 48h.

Tabla 7. Crecimiento de las cepas A2, A3 y A8 en medio AAT y AA incubadas a 5°C (refrigeración).

Cepa	Incubación por 24 h		Incubación por 48 h	
	Diámetro de la colonia (mm) $\pm$ STD en AAT	Diámetro de la colonia (mm) $\pm$ STD en AA	Diámetro de la colonia (mm) $\pm$ STD en AAT	Diámetro de la colonia (mm) $\pm$ STD en AA
A2	1.9 ± 0.21	1.3 ± 0.48	2.0 ± 0.09	1.6 ± 0.50
A3	2.1 ± 0.3	1.4 ± 0.52	2.3 ± 0.3	1.7 ± 0.28
A8	1.0 ± 0.00	1.1 ± 0.21	2.0 ± 0.16	1.7 ± 0.28



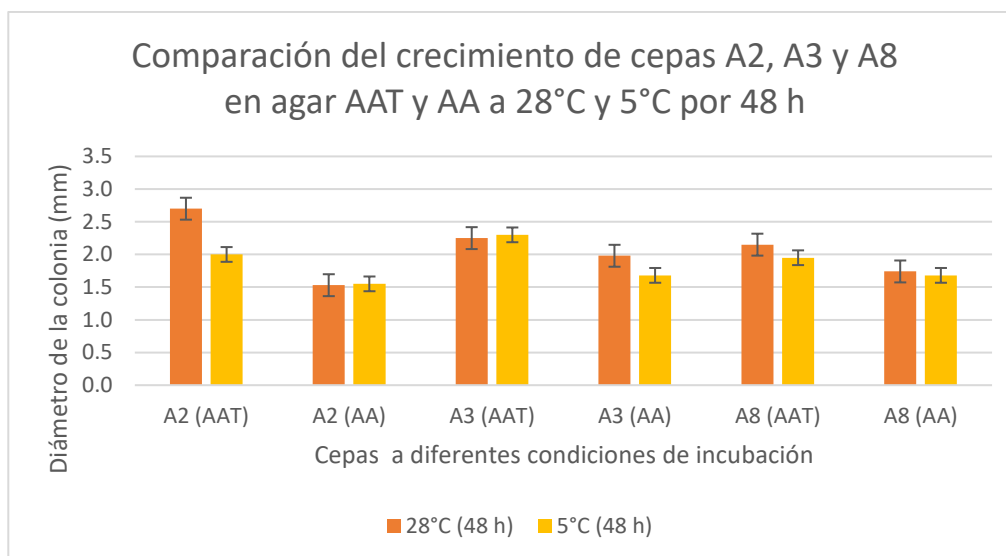
Gráfica 2. Comparación del crecimiento de cepas A2, A3 y A8 en agar AAT y AA a 5°C por 24 h y 48 h.

La *Gráfica 2* indica que a condiciones de incubación de 5°C presenta un mejor crecimiento de la cepa A3 (AAT). Así mismo, se observa que existe un mejor crecimiento de las colonias con la presencia de triptona, aunque el aumento es mínimo (aproximadamente de 1 mm).

COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO A 28°C Y 5°C DE LAS CEPAS SIN HALO VISIBLE

En la *Gráfica 3* se compara el crecimiento de las cepas a temperatura de 28°C y 5°C en 48h con el fin de observar las diferencias de crecimiento a las condiciones de temperatura.

Se muestra que el cambio de temperatura no afectó considerablemente el crecimiento de las cepas en las primeras 48 h; sin embargo, se observa que los componentes con los que cuenta el medio afectan de manera considerable su crecimiento para la cepa A2, pues es notable el crecimiento de la cepa A2 con triptona; sin embargo, cepas A3 y A8 la diferencia es mínima ante la presencia de este componente.



Gráfica 3. Comparación del crecimiento de cepas A2, A3 y A8 en agar AAT y AA a 28°C y 5°C por 48 h.

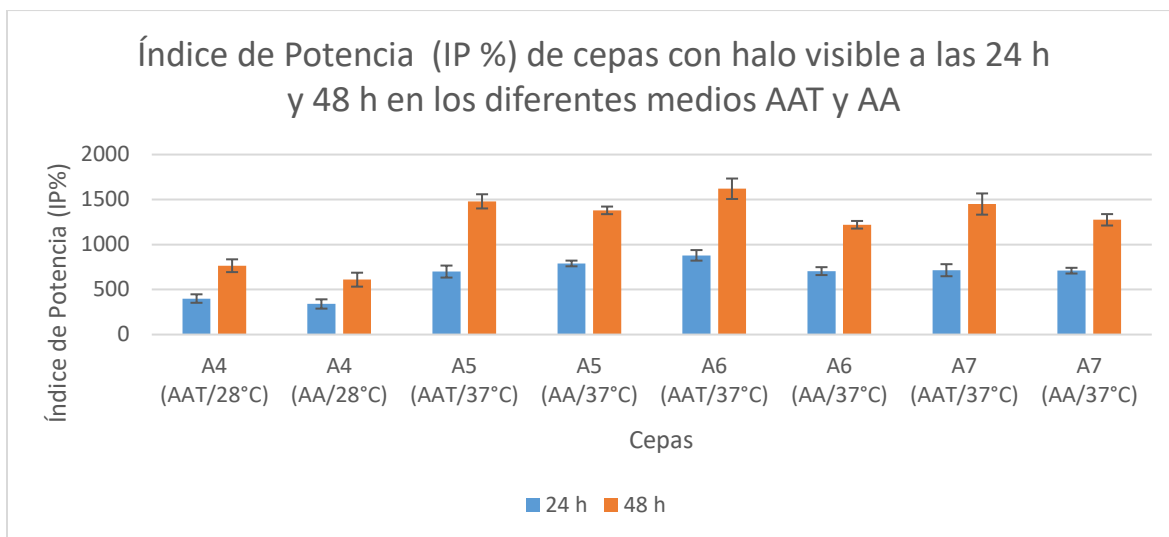
ÍNDICE DE POTENCIA EN MEDIO AAT Y AA A LAS RESPECTIVAS TEMPERATURAS ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO.

El crecimiento de las cepas con presencia de halos de degradación alrededor de la colonia en los medios almidón AA y AAT se muestra en la *Tabla 8*, así como las condiciones de temperatura de cada cepa, el diámetro de las colonias, halo de hidrólisis o de degradación de las colonias, el valor promedio del índice de potencia (IP%) de las colonias, tanto a 24h como a 48h y la desviación estándar del índice de potencia.

Tabla 8. Índice de potencias de las cepas A4, A5, A6 y A7 en medio AAT y AA.

Medio	Cepa	Temperatura de crecimiento	Incubación por 24 h			Incubación por 48 h		
			c	z	Índice de potencia	c	z	Índice de potencia
AAT	A4	28°C	2.0	5.0	400.00 $\pm$ 47.14	2.3	8.7	765.00 $\pm$ 70.91
	A5	37°C	2.2	8.0	700.00 $\pm$ 66.67	3.7	15.8	1480.00 $\pm$ 78.88
	A6	37°C	3.9	9.8	880.00 $\pm$ 58.69	10.8	17.2	1620.00 $\pm$ 113.53
	A7	37°C	1.0	8.2	715.00 $\pm$ 66.87	3.1	15.5	1450.00 $\pm$ 117.85
AA	A4	28°C	1.1	4.4	340.00 $\pm$ 51.64	1.4	7.1	610.00 $\pm$ 77.46
	A5	37°C	1.0	8.9	790.00 $\pm$ 31.62	1.5	14.8	1380.00 $\pm$ 42.16
	A6	37°C	3.2	8.1	705.00 $\pm$ 43.78	8.9	13.2	1220.00 $\pm$ 42.16
	A7	37°C	1.2	8.1	710.00 $\pm$ 31.62	1.8	13.8	1275.00 $\pm$ 63.46

Nota: "c" indica el diámetro de la colonia (mm) y "z" el diámetro del halo de hidrólisis o degradación (mm).



Gráfica 4. Índice de Potencia (IP%) de cepas con halo visible a las 24h y 48 en los diferentes medios AAT y AA.

De acuerdo con la [Gráfica 4](#), se determina que la cepa A6 (AAT) presenta un mejor índice de potencia que las demás cepas, pero únicamente en el medio AAT, es decir, con presencia de peptona; sin embargo, las cepas A5 y A7 con presencia y ausencia de triptona muestran valores muy cercanos a la cepa A6 (AAT) a las 24 y 48 h.

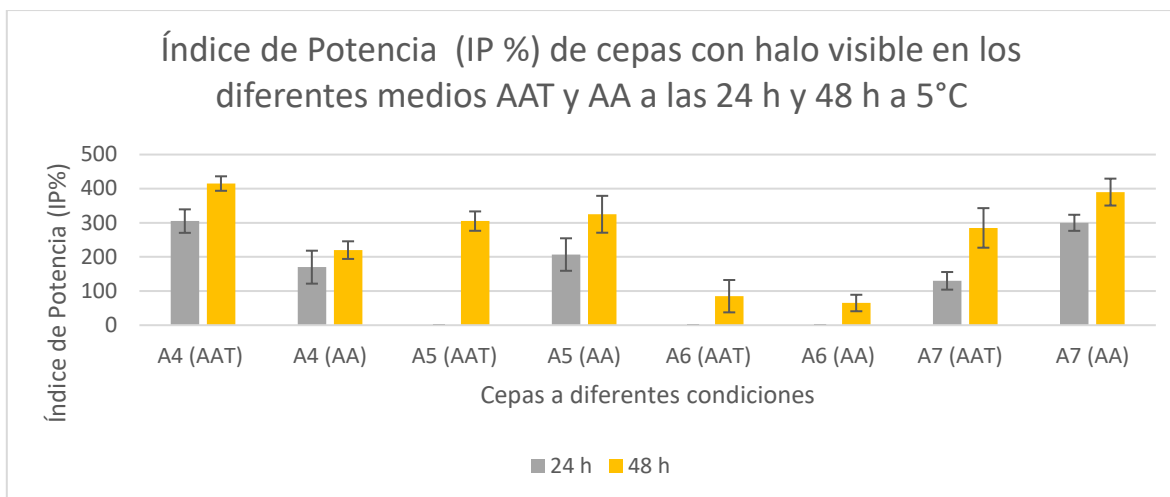
ÍNDICE DE POTENCIA EN MEDIO AAT Y AA A 5°C

La [Tabla 9](#) presenta los resultados de las mismas cepas que en la [Tabla 8](#), pero a condiciones de temperatura de 5°C (refrigeración).

Tabla 9. Índice de potencia de las cepas A4, A5, A6 y A7 en medio AAT y AA incubadas a 5°C (refrigeración).

Medio	Cepa	Incubación por 24 h			Incubación por 48 h		
		c	z	Índice de Potencia (IP %) ± STD (%)	c	z	Índice de Potencia (IP %) ± STD (%)
AAT	A4	2.1	4.1	305.0 ± 34.4	2.6	5.2	415.0 ± 21.2
	A5	1.0	NA	S/H	1.0	4.1	305.0 ± 28.4
	A6	0.7	NA	S/H	0.9	1.9	85.0 ± 47.4
	A7	1.0	2.3	130.0 ± 25.8	1.0	3.9	285.0 ± 58.0
AA	A4	1.1	2.7	170.0 ± 48.30	1.5	3.2	220.0 ± 25.82
	A5	0.9	3.1	207.00 ± 47.62	1.4	4.3	325.00 ± 54.01
	A6	1.0	NA	S/H	1.0	1.7	65.00 ± 24.15
	A7	1.1	4.0	300.00 ± 23.57	1.2	4.9	390.00 ± 39.44

Nota: "c" indica el diámetro de la colonia (mm), "z" el diámetro del halo de hidrólisis o degradación y "S/H" indica que no se observa halo de degradación.

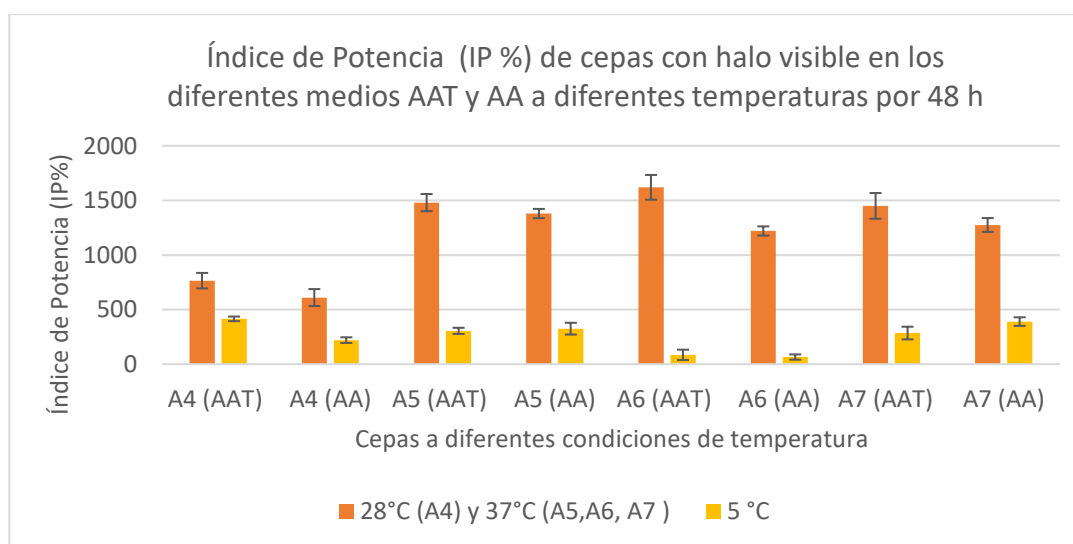


Gráfica 5. Índice de Potencia (IP%) de cepas con halo visible en los diferentes medios AAT y AA a las 24 h y 48 h a 5°C.

La *Gráfica 5* indica que, al variar la temperatura a 5°C, el rendimiento de las cepas cambia considerablemente para las pruebas de A5 (AAT), A6 (AAT) y A6 (AA), pues en las primeras 24h no presentan halos de degradación; sin embargo, si presentan crecimiento en los medios, es hasta las 48 h donde se presenta halo de degradación, por lo cual, hasta las 48 h se puede medir el índice de potencia (IP%). Bajo estas condiciones de temperatura, se considera que presentan una mejor hidrólisis la cepa A4 y la cepa A7, es decir, en medio almidón sin presencia del componente triptona.

COMPARACION DE ÍNDICE DE POTENCIAS DE CEPAS A DIFERENTES TEMPERATURAS

En la *Gráfica 6* compara el índice de potencia a las 24 h y 48 h a diferentes condiciones de incubación de temperatura (28°C y 37 °C) según el crecimiento de la cepa y a condiciones de refrigeración (5°C).



Gráfica 6. Índice de Potencia (IP%) de cepas con halo visible en los diferentes medios AAT y AA a diferentes temperaturas por 48 h.

De acuerdo con la *Gráfica 6* en las cepas A5 (AA), A5 (AAT), A7 (AA) y A7 (AAT) se determina que la presencia o ausencia de la triptona en el medio no presenta una diferencia considerable en el índice de potencia (IP%), es decir, en la degradación de almidón; sin embargo, la temperatura afecta de manera abrupta el rendimiento del índice de potencia (IP%). La cepa A6 (AAT) muestra un mejor rendimiento a 37°C y con presencia de triptona y a condiciones de 5°C; su rendimiento del índice de potencia (IP%) disminuye a casi ser imperceptible. La cepa A4 resulta tener el menor rendimiento a 28°C entre las cepas incubadas a su temperatura óptima; sin embargo, a una temperatura de 5°C, resulta ser la menos afectada.

Se muestran en la *Tabla 10* las cepas con actividad amilolítica de mayor a menor índice de potencia a 48 h.

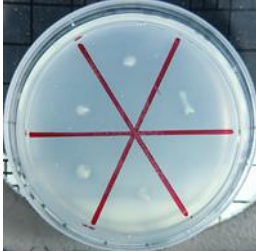
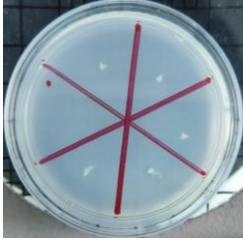
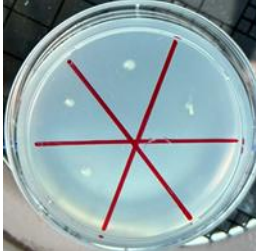
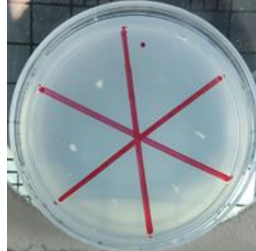
Tabla 10. Índice de potencia (IP%) de las cepas con actividad amilolítica a las 48 h en sus respectivas temperaturas de incubación, ordenados de mayor a menor.

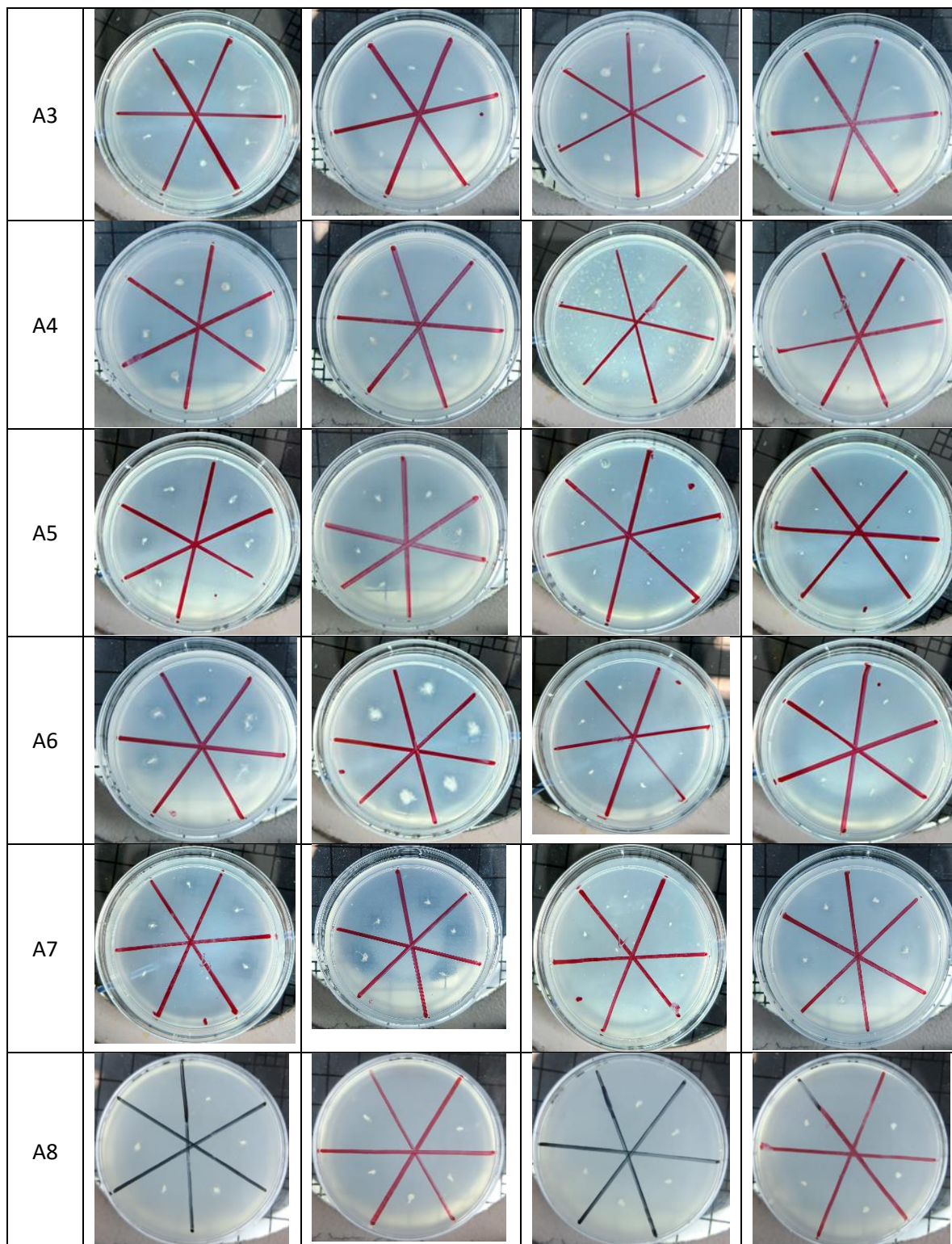
Medio	Cepa (Temperatura)	Incubación por 48 h
		Índice de Potencia (IP %)
AAT	A6 (37°C)	1620.00
AAT	A5 (37°C)	1480.00
AAT	A7 (37°C)	1450.00
AA	A5 (37°C)	1380.00
AA	A7 (37°C)	1275.00
AA	A6 (37°C)	1220.00
AAT	A4 (28°C)	765.00
AA	A4 (28°C)	610.00

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS

En la *Tabla 11* se presenta las imágenes de las pruebas del potencial hidrolítico o índice de potencia de la actividad amilolítica.

Tabla 11. Pruebas de potencial hidrolítico de la actividad amilolítica.

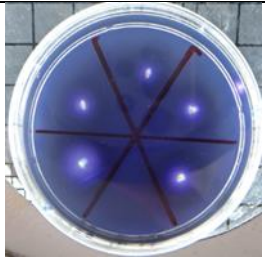
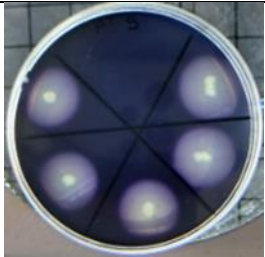
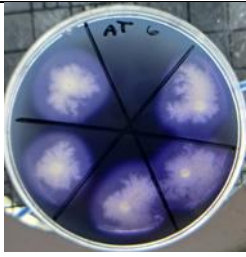
Cepa	Sembrado en medio AAT de 28°C a 37°C por 24 h	Sembrado en medio AA de 28°C a 37°C por 24 h	Sembrado en medio AAT a 5°C por 24 h	Sembrado en medio AA a 5°C por 24 h
A2				



HALO DE DEGRADACIÓN

La *Tabla 12* muestra las pruebas de degradación de las cepas que mostraron halos de degradación, es decir, para las cepas A4, A5, A6 y A7.

Tabla 12. Visualización de la cepa con halos de hidrólisis (A4, A5, A6 y A7) en medio AAT con la aplicación del lugol al 10% durante 15 segundos y retirando el exceso.

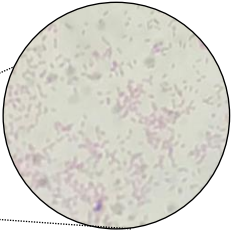
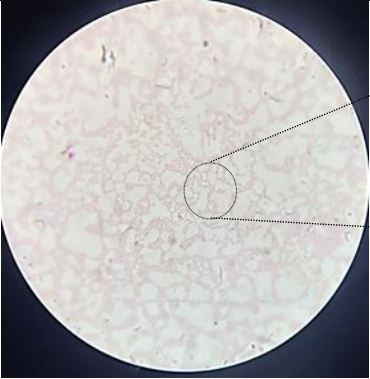
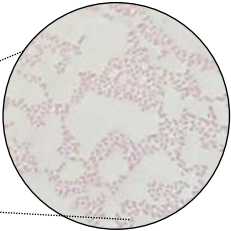
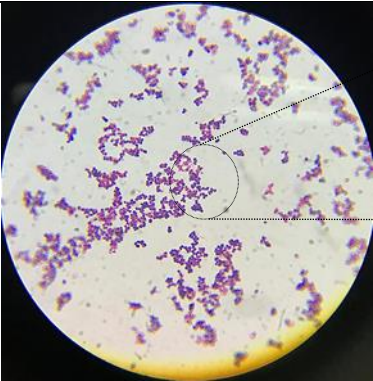
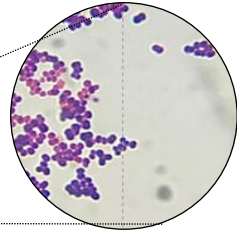
A4 a 28°C por 48 h	A5 a 37°C por 48 h	A6 a 37°C por 48 h	A7 a 37°C por 48 h
			

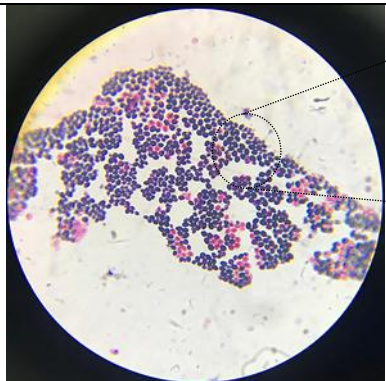
ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

Descripción de la morfología colonial y morfología microscópica

Se aislaron 5 cepas con capacidad celulolítica, las condiciones óptimas de crecimiento se determinaron a una incubación de 28°C de 24 h a 4 días, dependiendo la composición del medio de cultivo sólido celulosa. En la *Tabla 13* se muestra la descripción de la morfología colonial y morfología microscópica; así mismo, las imágenes de la cepa al microscopio óptico con un aumento de 100x.

Tabla 13. Descripción de las cepas con actividad celulolítica, crecidas en medio ACT a 28°C.

Cepa (Tiempo de incubación)	Morfología colonial	Morfología microscópica	Foto al microscopio óptico a un aumento de 100x
C9 (48 h)	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Elevada Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Translúcida Color: Blanco-Beige	Bacilos cortos y curvos, Gram negativos	 
C10 (48 h)	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Elevada Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Translúcida Color: Blanco -Beige	Bacilos cortos Gram negativos	 
C11 (24 h)	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Plana Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Mate Luz transmitida: Opaca Color: Café ocre	Morfología microscópica sugerente de levaduras pequeñas	 

C12 (48 h)	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Plana Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Translúcida Color: Blanco-Crema	Levaduras elipsoidales Gram positivas	
C13 (24 h)	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Mate Luz transmitida: Opaca Color: Amarillo	Cocobacilos ordenados en tétradas y en diplos Gram negativos	

Potencial hidrolítico

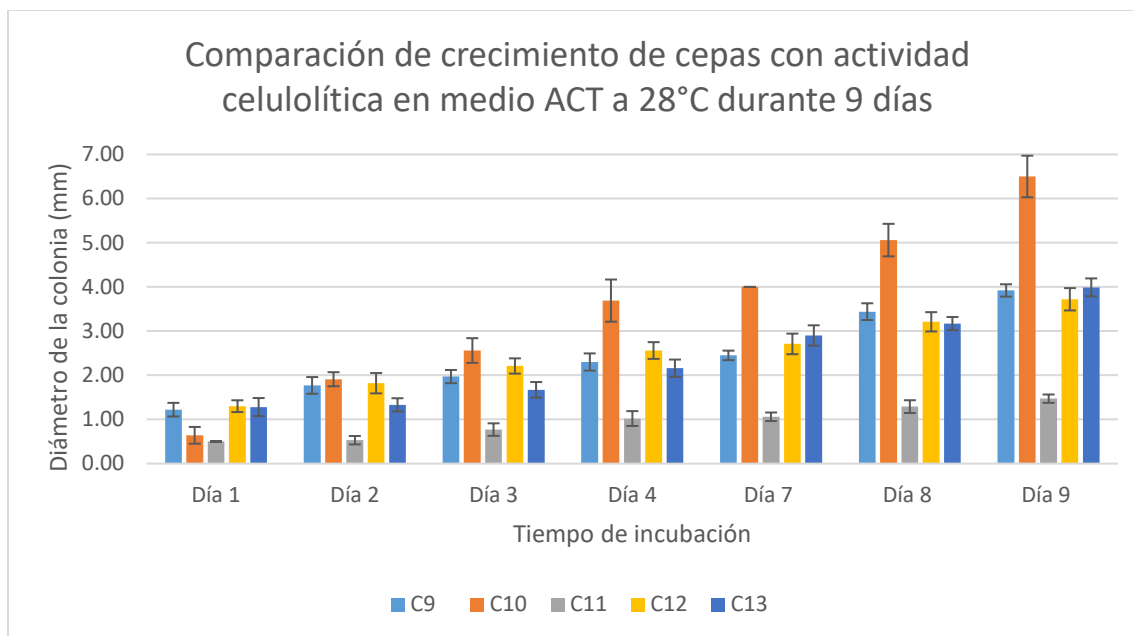
El crecimiento de las cepas en los medios ACT y AC se tomó como evidencia de la utilización de la carboximetilcelulosa como fuente de carbono y se considera que presenta actividad celulolítica, debido a que al agregar la solución de rojo congo al 0.1% no mostró la aparición de halos claros

El diámetro de las colonias crecidas en el medio ACT se presenta en la [Tabla 14](#) y en AC en la [Tabla 15](#), indicando el tiempo de crecimiento, los diámetros promedios de las colonias y la desviación estándar. Además, se realizó la comparación del crecimiento entre las diferentes formulaciones de los medios, se puede observar un mejor crecimiento en el medio ACT (con presencia de triptona). La comparación se realizó para confirmar que el principal sustrato para los microorganismos sea la carboximetilcelulosa. Las cepas muestran crecimiento en menor tiempo (24 h a 48 h) cuando son crecidas en el medio ACT, mientras que crecen en 4 días cuando se siembran en medio AC, razón por la cual se dejó un mayor tiempo en incubación para poder observar y medir las colonias sembradas y hacer la comparación. En la [Tabla 14](#) se muestran las cepas con actividad celulolítica en medio ACT, el diámetro promedio de las colonias y la desviación estándar (SDT) de los diámetros a los 9 días.

Tabla 14. Crecimiento de cepas con actividad celulolítica en el medio ACT con incubación a 28°C.

Cepa en medio ACT	Tiempo de crecimientos (días)	Diámetro de la colonia (mm) $\pm$ SDT
C9	9	3.9 ± 0.1398
C10	9	6.5 ± 0.4714

C11	9	1.4 ± 0.0949
C12	9	3.7 ± 0.2530
C13	9	3.9 ± 0.2025



Gráfica 7. Comparación de crecimiento de cepas con actividad celulolítica en medio ACT a 28°C durante 9 días.

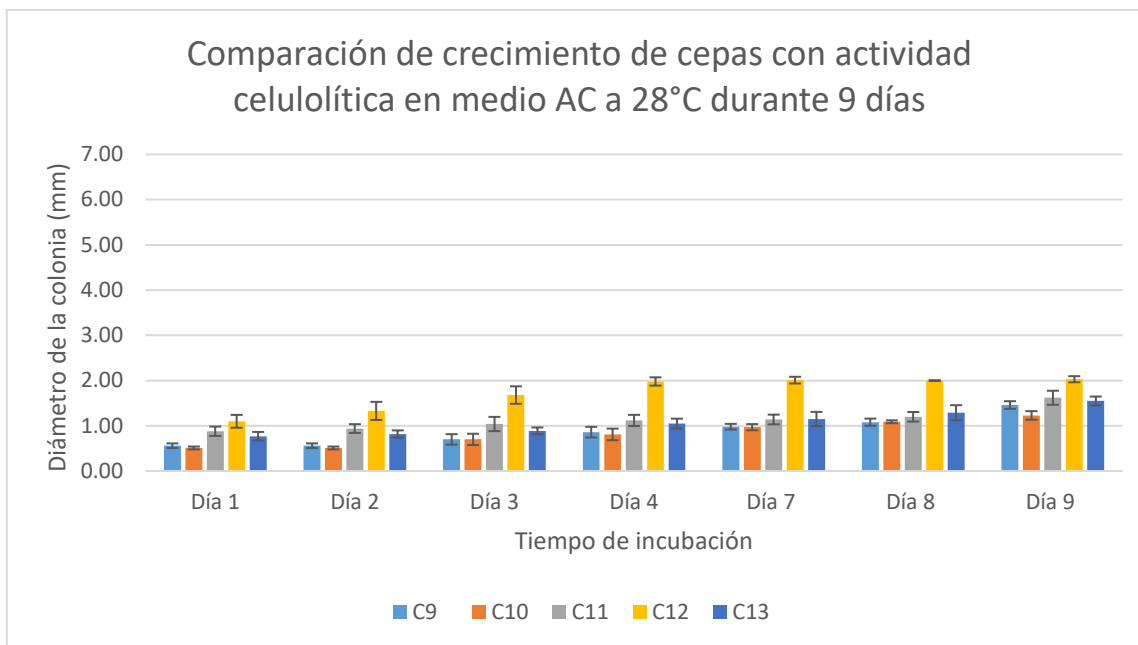
De acuerdo con la [Gráfica 7](#) se determina que ante la presencia triptona la cepa con mejor crecimiento es la cepa C10 (ACT).

En la [Tabla 15](#) se muestran las cepas en medio AC los diámetros promedio de las colonias y la desviación estándar (SDT) de los diámetros al día 9.

Tabla 15. Crecimiento de cepas con actividad celulolítica en el medio AC a 28°C.

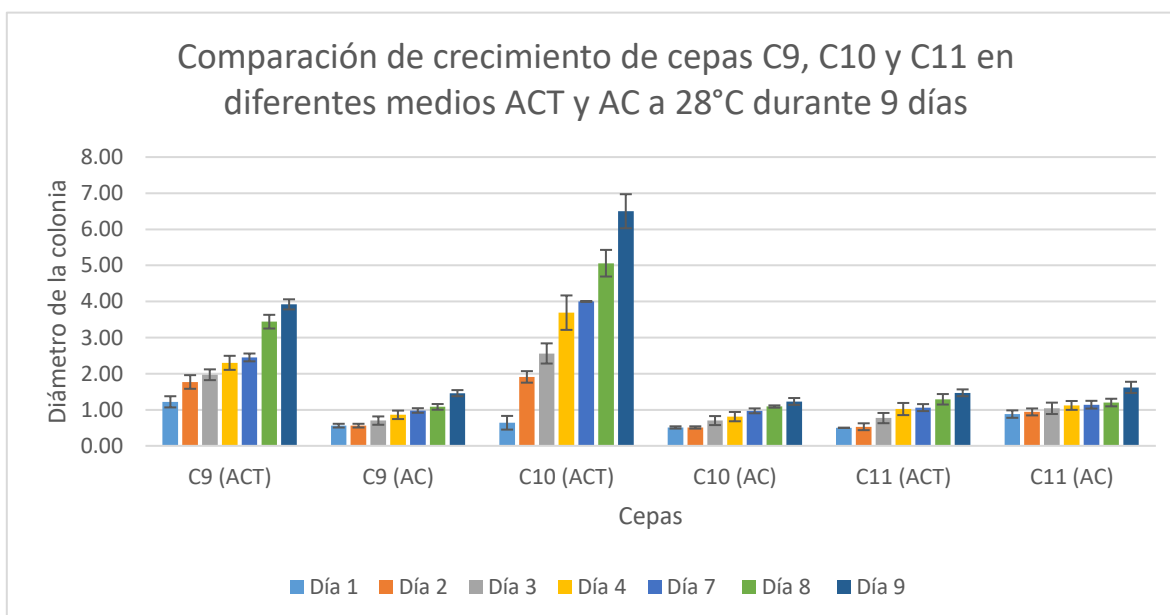
Cepa en medio AC	Tiempo de crecimiento (días)	Diámetro promedio de las colonias (mm) $\pm$ STD
C9	9	1.46 ± 0.0843
C10	9	1.23 ± 0.0949
C11	9	1.62 ± 0.1549
C12	9	2.00 ± 0.0675
C13	9	1.55 ± 0.0972

En la [Gráfica 8](#) se muestra la evolución del crecimiento de las cepas con actividad celulolítica durante 9 días en el medio AC. De acuerdo con la [Gráfica 8](#) la cepa C12 mostró mejores resultados de crecimiento en condiciones de nutrición más estrictas, es decir, triptona (medio ACT). Es importante destacar que las cepas C9, C11 y C13 muestran un mayor crecimiento del día 8 al 9 con respecto a los días anteriores, probablemente debido a su tiempo de adaptación.

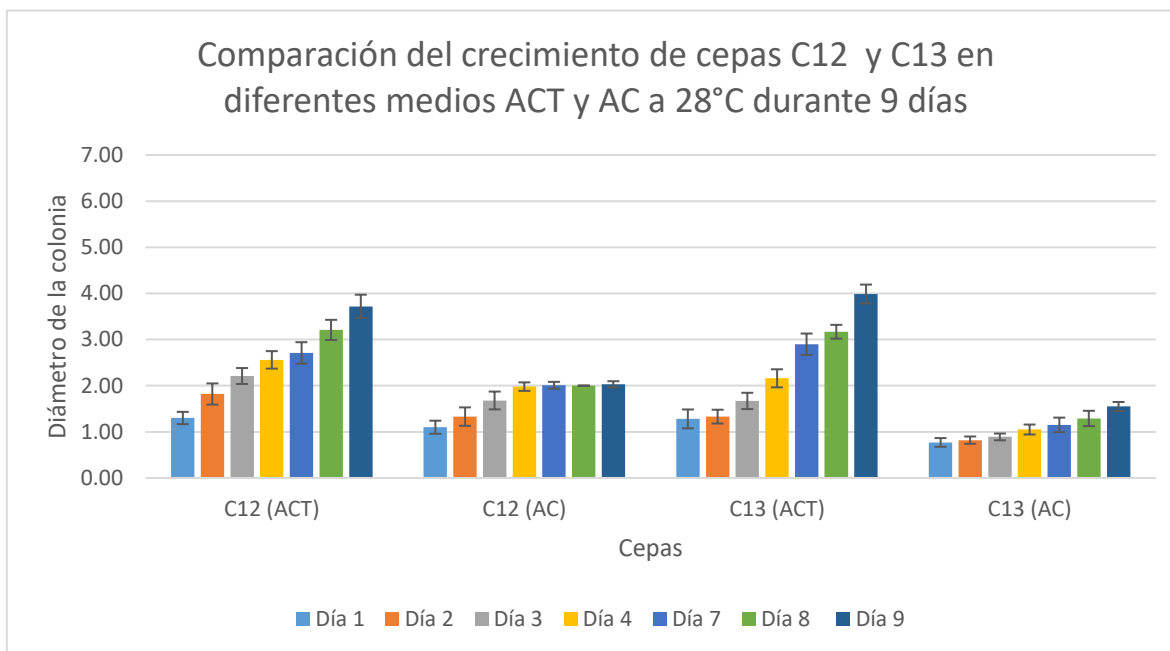


Gráfica 8. Comparación del crecimiento de cepas con actividad celulolítica en medio AC a 28°C durante 9 días.

Se muestra en la [Gráfica 9](#) y [Gráfica 10](#) la comparación de las cepas con actividad celulolítica con presencia y ausencia triptona, es decir, en medio celulosa ACT y ausencia de triptona en medio AC. Se determina que las cepas con presencia triptona muestra un crecimiento más rápido a las mismas condiciones de incubación que las que no presentan triptona.



Gráfica 9. Comparación de crecimiento de cepas C9, C10 y C11 en diferentes medios ACT y AC a 28°C durante 9 días.



Gráfica 10. Comparación de crecimiento de cepas C12 y C13 en diferentes medios ACT y AC a 28°C durante 9 días.

A partir de las gráficas anteriores (*Gráfica 9 y Gráfica 10*) se determina que, para todas las cepas, excepto la C11, ante la presencia de triptona (medio ACT) el crecimiento de las colonias aumenta considerablemente y conforme pasa el tiempo la diferencia se vuelve más grande.

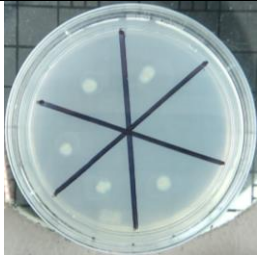
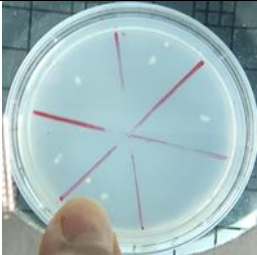
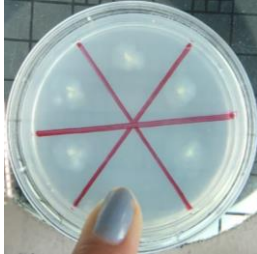
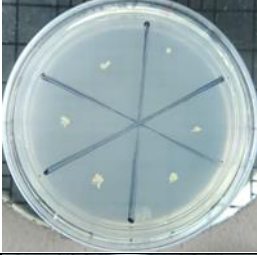
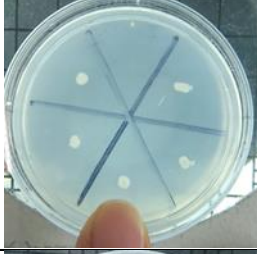
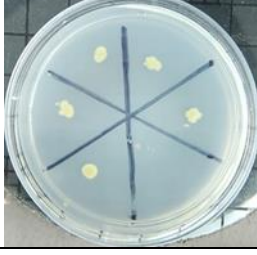
Se presenta la *Tabla 16* donde se muestra el crecimiento de las cepas celulolíticas ordenadas de mayor a menor crecimiento.

Tabla 16. Crecimiento de cepas con actividad celulolítica incubadas a 28°C, ordenadas de mayor a menor.

Medio	Cepa	Tiempo de crecimiento	Diámetro de la colonia
ACT	C10	9 días	6.50
ACT	C13	9 días	3.99
ACT	C9	9 días	3.92
ACT	C12	9 días	3.72
AC	C12	9 días	2.03
AC	C11	9 días	1.62
AC	C13	9 días	1.55
ACT	C11	9 días	1.47
AC	C9	9 días	1.46
AC	C10	9 días	1.23

En la *Tabla 17* se muestran las placas a las cuales se les realizó la medición de los diámetros de las colonias.

Tabla 17. Pruebas de potencial hidrolítico de la actividad celulolítica a 28°C.

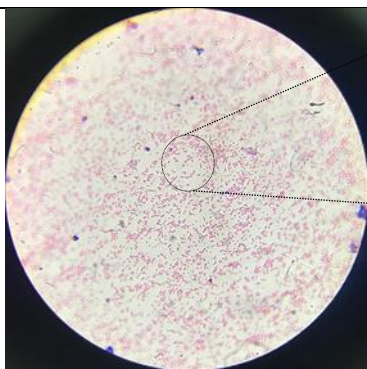
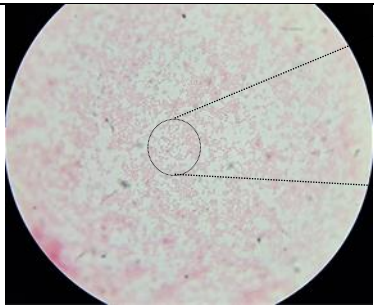
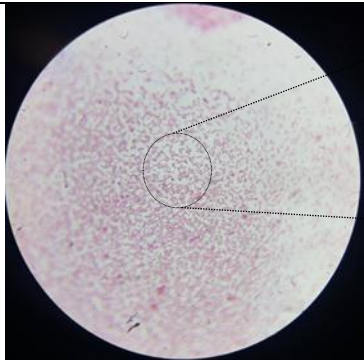
Cepa	Tiempo de crecimiento (días)	Sembrado en medio ACT	Sembrado en medio AC
C9	9		
C10	9		
C11	9		
C12	9		
C13	9		

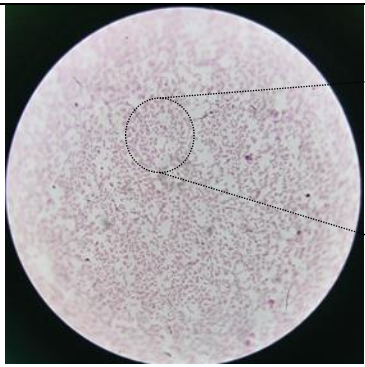
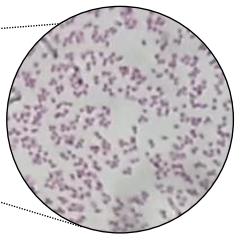
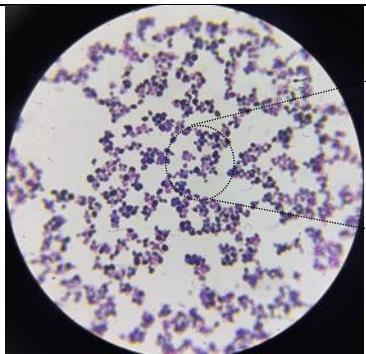
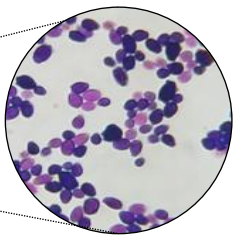
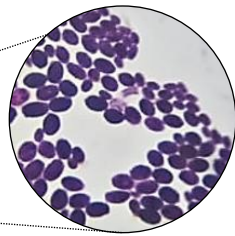
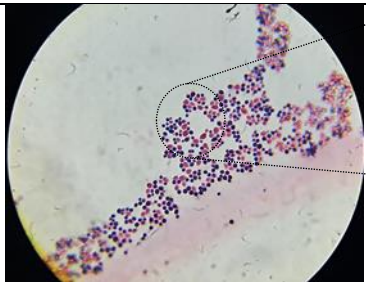
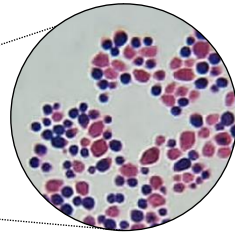
ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA

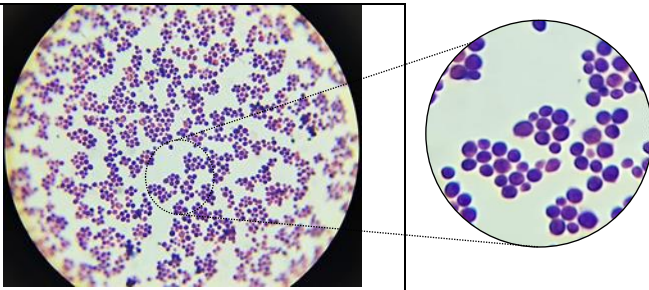
Descripción de la morfología colonial y morfología microscópica

Las condiciones para un crecimiento óptimo se determinaron a una incubación de 28°C durante 24 h para las cepas P14, P15, P16 y P17 y a 48 h para las cepas P19, P22 y P23. En la *Tabla 18* se muestra la descripción de la morfología colonial, morfología microscópica y las imágenes de las cepas al microscopio óptico con un aumento de 100x.

Tabla 14. Descripción de las cepas con actividad pectinolítica, crecidas a 28°C.

Cepa (Tiempo de incubación)	Morfología colonial	Morfología microscópica	Foto al microscopio óptico a un aumento de 100x
P14 (24 h)	Forma: Irregular Borde: Ondulado Elevación: Elevada Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Translúcida Color: Beige-caqui	Bacilos medianos, Gram negativos	
P15 (24 h)	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Elevada Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Translúcida Color: Beige –caqui	Bacilos cortos y gruesos, Gram negativos	
P16 (24 h)	Forma: Irregular Borde: Ondulado Elevación: Elevada Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Translúcida Color: Beige- crema	Bacilos cortos, gruesos y grandes, Gram negativos	

P17 (24 h)	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Plana Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Translúcida Color: Blanco-Crema	Bacilos cortos y gruesos (similares a cocobacilos), Gram negativos	 
P19 (48 h)	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Elevada Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Translúcida Color: Crema – Beige claro	Levaduras elipsoidales, medianas, Gram positivas	 
P22 (48 h)	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Mate Luz transmitida: Translúcida Color: Crema – Beige claro	Levaduras elipsoidales más alargadas, Gram positivas	 
P23 (48 h)	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Elevada Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Translúcida Color: Beige claro	Levaduras elipsoidales apiculadas Gram positivas	 

P24 (24 h)	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Elevada Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Translúcida Color: Beige claro	Levaduras redondeadas Gram positivas	
---------------	---	--	--

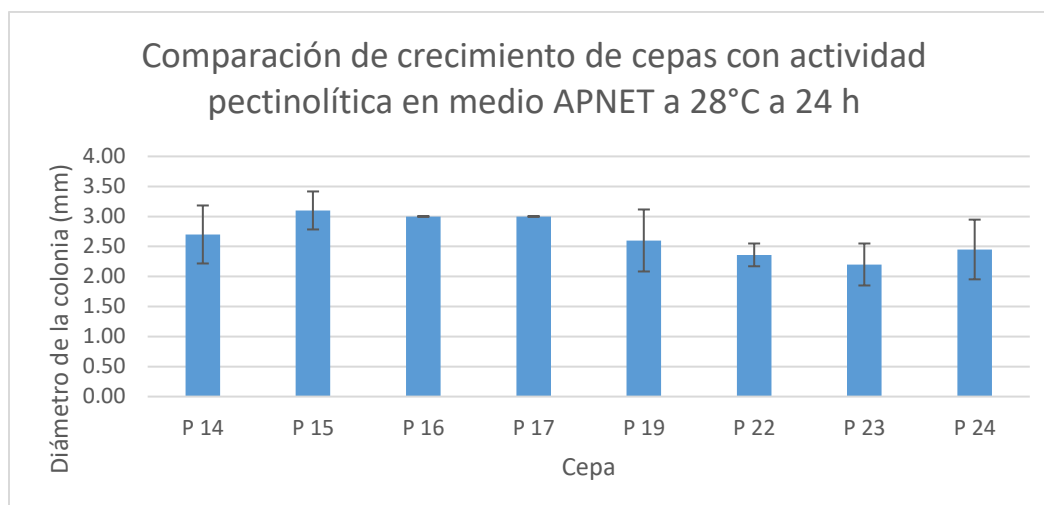
Potencial hidrolítico

El crecimiento de las cepas con capacidad pectinolítica únicamente se diferenció por la formulación de los medios, ya que fueron incubadas a las mismas condiciones (28°C) hasta que presentaron crecimiento. Se planteó inicialmente revelar los halos de degradación con el uso de lugol al 25% sobre la placa; sin embargo, a pesar de lo indicado en la bibliografía, este método no mostró los resultados esperados, siendo necesario demostrar que el sustrato principal para su crecimiento fuera la pectina, restringiendo así el medio original de pectina APNET a solo dos componentes (agar bacteriológico y pectina) obteniendo el medio AP.

En la *Tabla 19* se muestra el crecimiento de las cepas en medio pectina APNET, el valor promedio de los diámetros de las colonias a las 24 h de incubación y la desviación estándar (SDT) de los valores de los diámetros.

Tabla 15. Crecimiento de cepas con actividad pectinolítica en medio de pectina APNET con incubación a 28°C.

Cepa en medio APNET	Tiempo de crecimiento	Diámetro de la colonia (mm) $\pm$ SDT
P 14	24 h	2.70 $\pm$ 0.48
P 15	24 h	3.10 $\pm$ 0.32
P 16	24h	3.00 $\pm$ 0.00
P 17	24h	3.00 $\pm$ 0.00
P 19	24h	2.60 $\pm$ 0.52
P 22	24h	2.36 $\pm$ 0.19
P 23	24 h	2.20 $\pm$ 0.35
P 24	24 h	2.45 $\pm$ 0.50



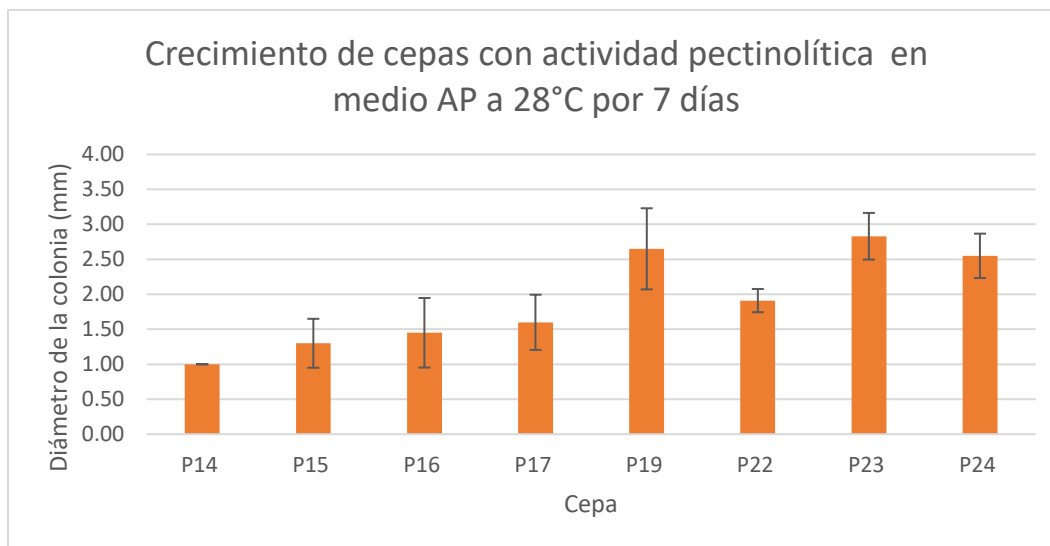
Gráfica 7. Comparación de crecimiento de cepas con actividad pectinolítica en medio pectina APNET a 28°C por 24h.

En el *Gráfico 11* se observa que el crecimiento de cepas con actividad pectinolítica presenta buenos resultados en el medio APNET, destacando las cepas P15, P16 y P17 con un mejor crecimiento, observando que no existe una gran diferencia en el crecimiento del resto de las cepas.

En la siguiente *Tabla 20* se encuentran los resultados del valor promedio de los diámetros de las colonias de las cepas con actividad pectinolítica en medio pectina AP a los 7 días (días en los que se mantuvo en incubación y se presentó un crecimiento apreciable), así como la desviación estándar (SDT).

Tabla 16. Crecimiento de cepas con actividad pectinolítica en medio de pectina AP con incubación a 28°C.

Cepa	Tiempo de crecimiento	Diámetro de la colonia (mm) $\pm$ SDT
P14	7 días	1.00 $\pm$ 0.00
P15	7 días	1.30 $\pm$ 0.35
P16	7 días	1.45 $\pm$ 0.50
P17	7 días	1.60 $\pm$ 0.39
P19	7 días	2.65 $\pm$ 0.58
P22	7 días	1.91 $\pm$ 0.17
P23	7 días	2.83 $\pm$ 0.33
P24	7 días	2.55 $\pm$ 0.32

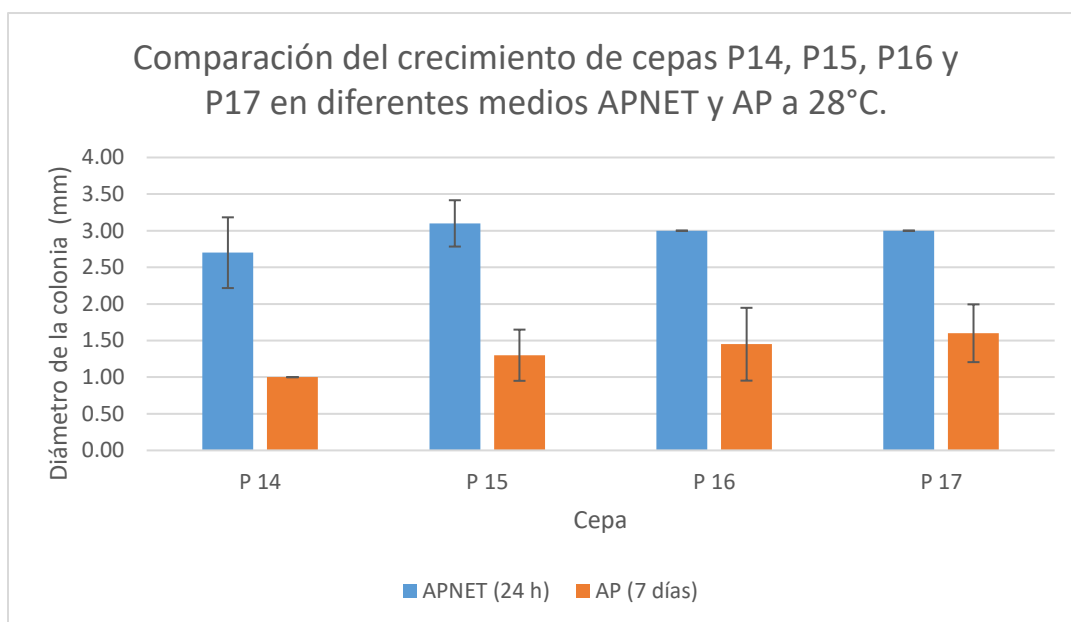


Gráfica 8. Comparación de crecimiento de cepas con actividad pectinolítica en medio AP a 28°C por 7 días.

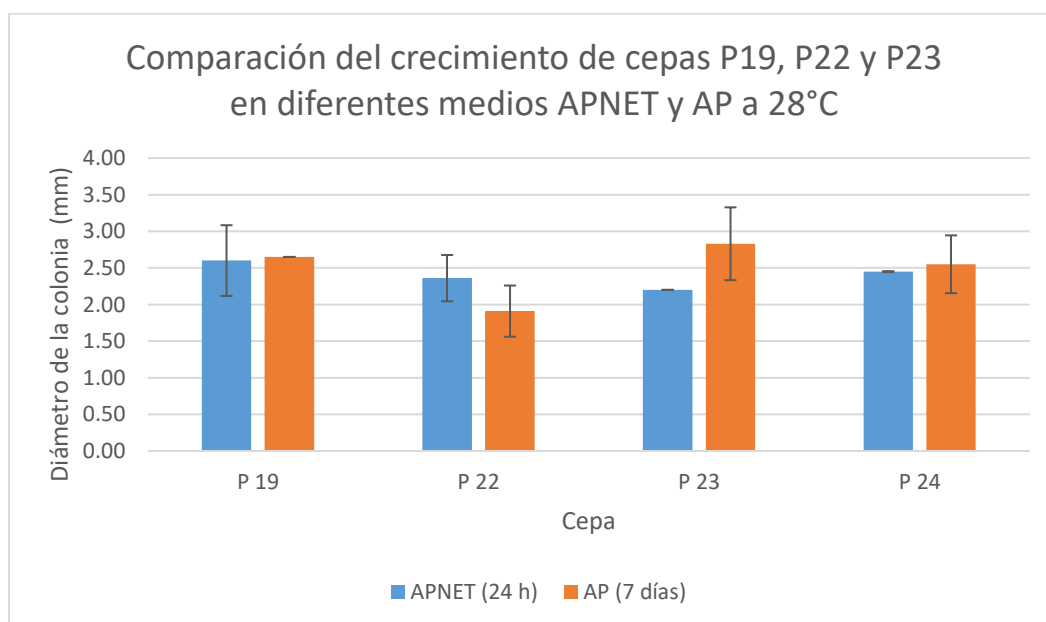
El [Gráfico 12](#) muestra un crecimiento más favorable para las cepas P19, P23 y P24, siendo las únicas cepas que logran pasar los 2 mm de diámetro, acercándose al crecimiento de las mismas cepas, pero en medio APNET.

Con fines comparativos, se presenta en la [Gráfica 13](#) y [Gráfica 14](#) con las dos formulaciones de medio de pectina APNET (barras en color naranja) y AP (barras en color azul). El crecimiento de las cepas en el medio denominado APNET está determinado a 24h, mientras que el crecimiento de las cepas en el medio denominado AP está determinado a los 7 días. Esta comparación se realiza en diferentes tiempos debido a que fue el tiempo en el que se presentó un crecimiento similar para las cepas presentes en medio AP a las presentes en el medio APNET. Considerando que la formulación en el medio APNET cuenta con más constituyentes que el medio AP, se muestra un crecimiento considerablemente mayor en el medio AP en un menor tiempo (24 h). Se destaca que en las cepas P19, P22, P23 el cultivo en presencia de triptona muestra igual crecimiento a las 24h que en las

cepas crecidas sin triptona pero a 7 días, por lo que se recomienda valorar el crecimiento con triptona por 7 días.



Gráfica 9. Comparación de crecimiento de cepas P14, P15, P16 y P17 en diferentes medios APNET y AP a 28°C.



Gráfica 10. Comparación de crecimiento de cepas P19, P22, P23 y P24 en diferentes medios APNET y AP a 28°C.

Se determina a partir de las Gráficas 14 y Gráfica 15 que, a pesar de optar por dejar incubadas 7 días más las cepas en el medio AP a comparación de 24 h en el medio APNET únicamente las cepas

P19, P22, P23 y P24 lograron alcanzar el crecimiento que se logró en las primeras 24 h en el medio APNET mientras que para el resto de las cepas con actividad pectinolítica la diferencia de crecimiento fue considerable.

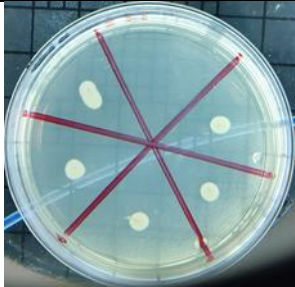
En la siguiente *Tabla 21* se muestran los valores de crecimiento de diámetros de las cepas con actividad pectinolítica ordenados de mayor a menor.

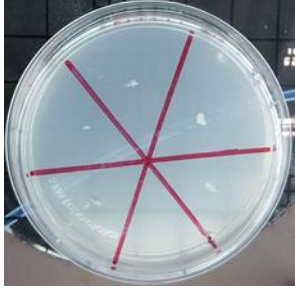
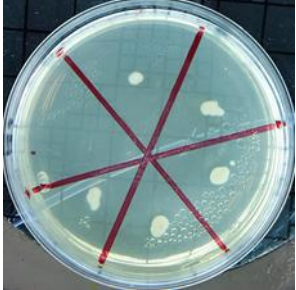
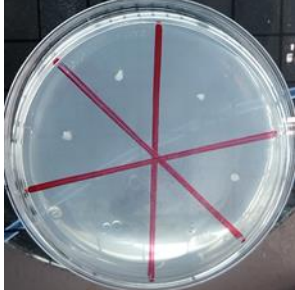
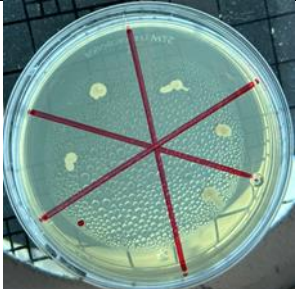
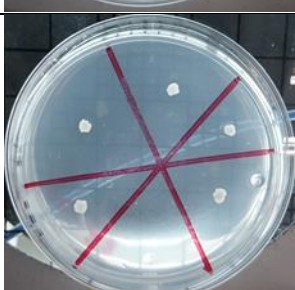
Tabla 17. Crecimiento de cepas con actividad pectinolítica ordenadas de mayor a menor incubadas a 28°C.

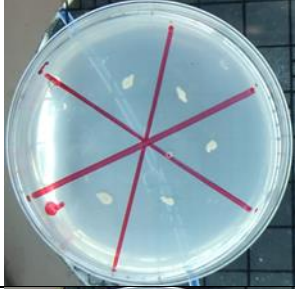
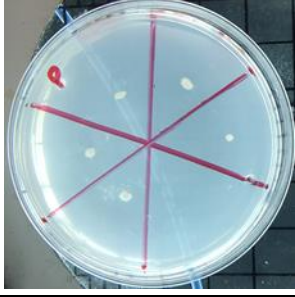
Medio	Cepas	Tiempo de crecimiento	Diámetro de la colonia (mm)
APNET	P 15	24 h	3.10
APNET	P 16	24 h	3.00
APNET	P 17	24 h	3.00
AP	P23	7 días	2.83
APNET	P 14	24 h	2.70
AP	P19	7 días	2.65
APNET	P 19	24 h	2.60
AP	P 24	7 días	2.55
APNET	P 24	24 h	2.45
APNET	P 22	24 h	2.36
APNET	P 23	24 h	2.20
AP	P 22	7 días	1.91
AP	P 17	7 días	1.60
AP	P 16	7 días	1.45
AP	P 15	7 días	1.30
AP	P 14	7 días	1.00

En la *Tabla 22* se muestran las placas a las cuales se les realizó la medición de los diámetros de las colonias.

Tabla 18. Pruebas de potencial hidrolítico de la actividad pectinolítica a 28°C.

Cepa	Crecimiento de cepa en medio APNET		Crecimiento de cepa de medio AP	
	Tiempo de crecimiento (h)	Prueba	Tiempo de crecimiento (días)	Prueba
P14	24		7	

P15	24		7	
P16	24		7	
P17	24		7	
P19	24		7	
P22	24		7	

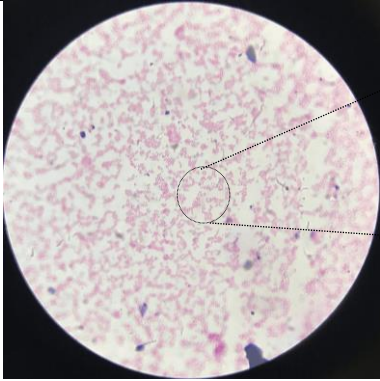
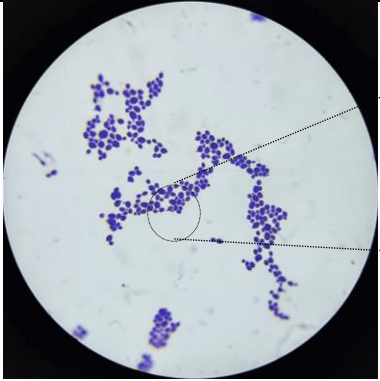
P23	24		7	
P24	24		7	

ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

Descripción macroscópica y microscópica

Se aislaron solo dos cepas con actividad lipolítica, las condiciones óptimas de crecimiento para las cepas fueron a una incubación de 28°C por 24h. En la *Tabla 23* se muestra la descripción de la morfología colonial y morfología microscópica; así como las imágenes de las cepas al microscopio óptico con un aumento de 100x.

Tabla 23. Descripción de las cepas con actividad lipolítica.

Cepa	Descripción macroscópica	Descripción microscópica	Foto al microscopio óptico a un aumento de 100x
T30	Forma: Circular con swarming Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Opaca Color: Blanco-Beige	Cocobacilos Gram negativos	
T31	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: Lisa Consistencia: Suave Brillo: Brillante Luz transmitida: Opaca Color: Blanco-Beige	Levaduras elipsoidales Gram positivas	

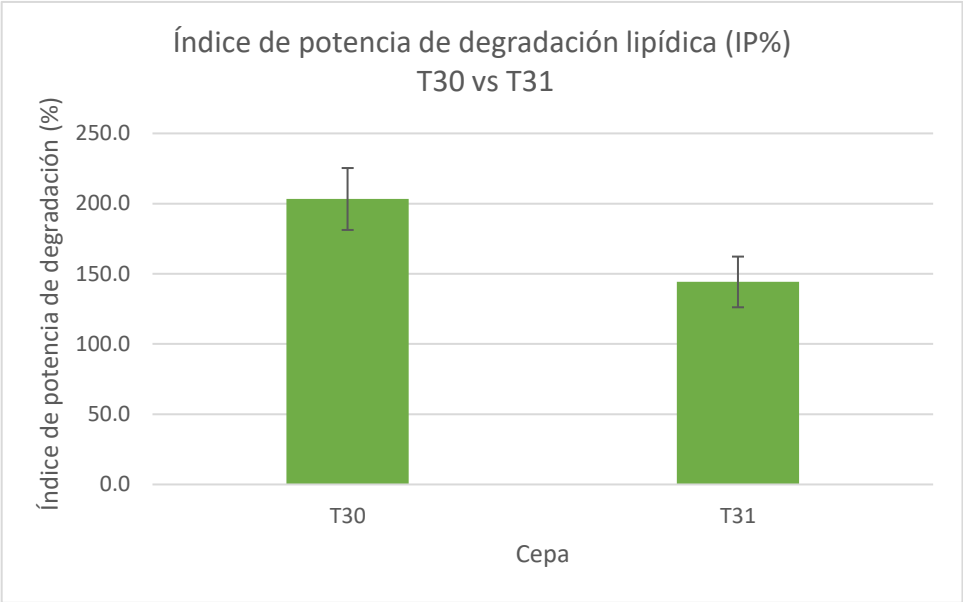
Potencial hidrolítico

Para la obtención de los halos de degradación, se optó por utilizar el colorante rojo de metilo (0.2 g/l en etanol al 96%) directamente en la preparación del medio AT-80.

En la *Tabla 24* se muestra el valor promedio del índice de potencia (IP%) de ambas cepas, así como la desviación estándar (STD) de los índices de potencia individuales de cada colonia.

Tabla 194. Índice de potencia de cepas T31 y T30 incubadas a 28°C.

Cepa	Tiempo de crecimiento (h)	Índice de Potencia (IP %)	STD
T 30	24	203.3	22.04
T 31	24	144.2	18.04



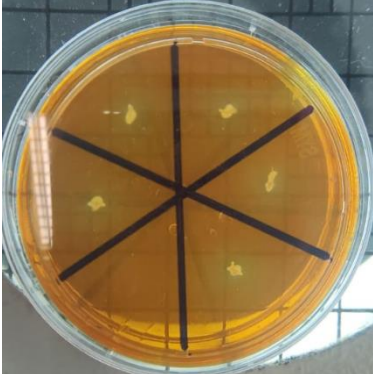
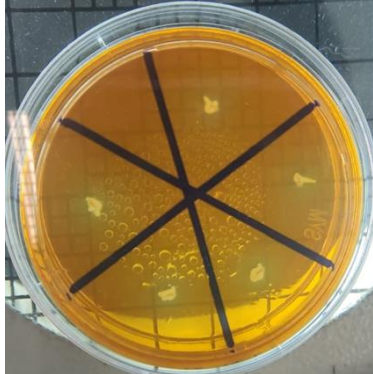
Gráfica 115. Índice de potencia de degradación (IP%) T30 vs T31.

De acuerdo al *Gráfico 15* se observa una mejor degradación lipídica para la cepa T30 en las primeras 24 h.

En la *Tabla 25* se presentan las pruebas de degradación correspondientes a la actividad lipolítica en las 24 h de incubación a 28°C para las cepas T30 y T31

Tabla 25. Pruebas de potencial hidrolítico de la actividad lipolítica.

Cepa	Tiempo de crecimiento (h)	Prueba 1	Prueba 2
T30	24		

T31	24		
-----	----	---	---

VIII. II EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE MATERIALES CELULÓSICOS

La evaluación de la degradación de materiales celulósicos se llevó a cabo en los medios Agar 1 (ARC), Agar 2 (ATRC) y Agar 3 (ATC) con las cepas C9, C10, C11, C12 y C13, las cuales presentaron actividad celulolítica.

Se sembraron los respectivos aislados o cepas (C9, C10, C11, C12 y C13) en cada tipo de agar. Las cepas C9, C10 y C13 presentaron un mejor crecimiento en los agares Agar 2 (ATRC) y Agar 3 (ATC), se incubaron a 28°C. Se muestran en la *Tabla 26* las pruebas con material celulósico para cada cepa.

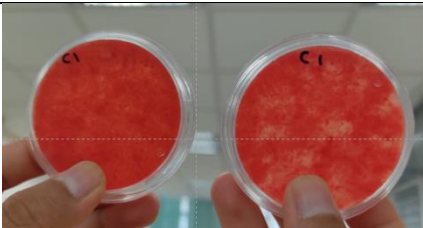
Tabla 26. Pruebas de degradación de material celulósico por las cepas con actividad celulolítica, incubadas a 28°C a las 48 h, en las placas con mayor densidad colonial se puede observar una disminución en la coloración del agar.

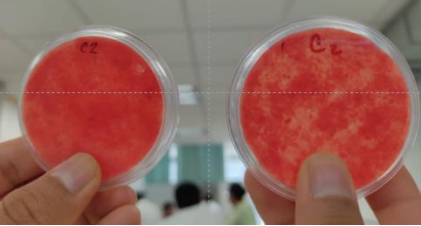
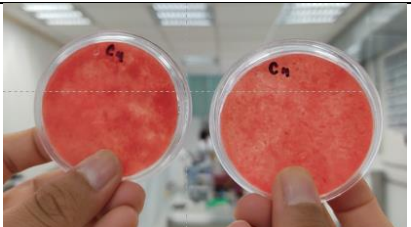
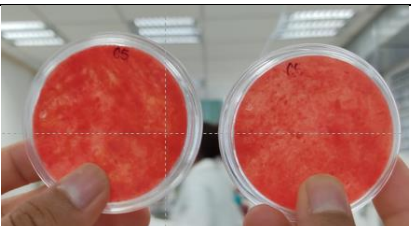
Cepa	Agar 1 (ARC)	Agar 2 (ATRC)	Agar 3 (ATC)
C9			
C10			
C11			

C12			
C13			

El crecimiento ante la presencia de triptona se presentó en un menor tiempo (24h a 48 h) que sin presencia de triptona. Sin embargo, la degradación de material celulósico se observó en mayor proporción en ausencia de triptona, revelado por el rojo congo en la placa, lo cual sugiere que la triptona estaba siendo utilizada como fuente de carbono en un inicio por parte de los microorganismos. Las tinciones de Gram se realizaron a los 18 días de incubación de las placas; así se corroboró el crecimiento y formación de colonias, las cepas C9, C10, C11 y C12 presentaron un crecimiento poco perceptible en el agar sin l triptona, la tinción de Gram confirmó su presencia. En la *Tabla 27* se presentan las evaluaciones del material celulósico a los 18 días, únicamente para el medio Agar 1 (ARC) y Agar 2 (ATRC). La evaluación de la degradación de material celulósico se basó en la aparición de halos claros en los medio Agar 1 (ARC) y Agar 2(ATRC), representando la degradación del material celulósico, el cual forma complejos con el rojo Congo.

Tabla 27. Evaluación cualitativa de cepas con actividad celolítica de material celulósico con rojo congo incubados a 28°C durante 18 días. La placa mostrada a la izquierda presenta Agar 2 (ATRC) y el de la derecha Agar 1 (ARC).

Cepa	Evaluación de material celulósico	
Control		
C9		

C10	
C11	
C12	
C13	

La cepa C13 fue la que presentó un mayor crecimiento a las 24 h en el medio Agar 2 (ATRC) y 72 h (ARC) para el medio Agar 1 (ARC). Por su parte, las cepas C9 y C10 mostraron un buen crecimiento a las 48 h en el Agar 2 (ATRC) mientras que en el Agar 1 (ARC) el crecimiento fue poco perceptible a los 18 días. Las cepas C11 y C12 tardaron 48 h en crecer en medio Agar 2 (ATRC) y en medio Agar 1(ARC) fue poco perceptible el crecimiento a los 18 días.

La evaluación de degradación de material celulósico indica que las cepas C12, C11 y C13 presentaron de manera cualitativa una mayor degradación mediante la presencia de halos claros en ambos medios, se destaca que la cepa C12 fue la que presentó mejores resultados siguiendo con C11 y C13 respectivamente.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

ACTIVIDAD AMILOLÍTICA

Se obtuvieron 7 cepas o aislados, de los cuales cinco (A2, A3, A4, A5 y A7) morfológicamente fueron bacilos Gram negativos; un microorganismo tiene apariencia microscópica de actinomiceto Gram negativo (A6) y una levadura Gram positiva (A8). De los 7 aislados, solo cuatro (A4, A5, A6 y A7) presentaron halos de degradación visibles, de los cuales se puede destacar que en su mayoría se presenta un aumento mínimo de índice de potencia (IP%) ante la presencia de triptona en el medio (AAT), lo sugiere que este componente no tiene un efecto considerable en la actividad enzimática o producción de enzima; sin embargo, el efecto de la temperatura sí afecta directa y considerablemente el índice de potencia, por ejemplo, a una temperatura de 37°C el aislado o cepa A5 a la 48 h presenta un IP(%) con un valor de 1380 %. mientras que a una temperatura de 5°C presento un valor de 325%. Los aislados o cepas que no presentaron halos de degradación y se midió únicamente el diámetro de la colonia, ante la presencia de triptona mostraron un aumento de crecimiento considerable en la cepa A2, está cepa en el medio AAT de 2.7 mm y sin presencia de triptona, la cepa A2 en el medio AA de 1.5 mm incubadas durante 48 h a 28°C, mostrando así un aumento considerable, mientras a 5°C por 48 h para la misma cepa A2 en medio AAT se presentó un valor de 2.0 mm y para A2 en medio AA un valor de 1.6. Así se puede determinar que, para esta cepa, el efecto de la presencia de triptona es más significativo que el efecto de la temperatura. Sin embargo, en las cepas A3 y A8 ambos factores presentan efectos mínimos que no son representativos.

El aislado A6 (AAT) presentó mejor actividad a 37°C, presentando un IP 880 % a las 24 h y 1620 % a las 48 h, sin embargo, las cepas A5 y A7 presentan valores muy cercanos del índice de potencia a la cepa A6. Guzmán, Zambrado, Rivera, Rodón, Silva & Pérez (2015) evaluaron microorganismos aislados de agricultura orgánica y su capacidad amilolítica; el aislado AO-19 presentó características del género *Bacillus ssp.*, el cual fue incubado a 37°C por 72 h, mostrando un halo de hidrólisis de 8.08 mm. Comparando los aislados obtenidos, se determina que presenta una capacidad hidrolítica similar al aislado A4 (incubado a 28°C por 48 h), que presentó un halo de hidrólisis de 8.7 mm en un medio más enriquecido como lo fue el ATT y en condiciones más estrictas de nutrientes como lo es el medio AA, el valor de los halos de hidrólisis es de 7.1 mm. Mientras que los aislados A5, A6 y A7 presentaron halos de hidrólisis similares al registrado por Guzmán et al., 2015, en las primeras 24 h: A5 en AAT (8 mm), A5 en AA (8.9 mm), A6 en AAT (9.8 mm), A6 en AA (8.1 mm), A7 en AAT (8.2 mm) y A7 en AAT (8.1 mm). Aumentando al doble o cercano sus valores de los halos de hidrólisis a las 48 h: A5 en AAT (15.8 mm), A5 en AA (14.8 mm), A6 en AAT (17.2 mm), A6 en AA (13.2 mm), A7 en AAT (15.5 mm) y A7 en AA (13.8 mm). Por otra parte, da Costa, da Rosa, Wastowski, Soriani, Locatelli, da Silva & Bones (2021) reportaron a la bacteria *Bacillus cereus* silvestre incubada a 37°C por 24 h, la cual fue aislada de la planta *Edyechium choronarium*, esta bacteria presentó un Índice de Amilosis (IA) de 3.3; los autores obtienen este índice bajo la relación entre “diámetro del halo de amilosis y diámetro de la colonia”. Además, indican que, si el valor es mayor a 2, denota una excelente capacidad amilolítica. Representando los índices de potencia de los aislados (A4, A5, A6, A7) en términos del índice de amilosis (IA) como lo describen da Costa et al., obtenemos las siguientes equivalencias de la actividad amilolítica en las primeras 24 h en medio AA y AAT: A4 en AAT (4.0), A4 en AA (3.5), A5 en AAT (7.0), A5 en AA (7.9), A6 en AAT (8.8), A6 en AA (7.0), A7 en AAT (7.15) y

A7 en AA (7.1). Comparando los índices, se puede determinar que los aislados A5, A6 y A7 duplican el índice de la degradación de la bacteria *Bacillus cereus* silvestre, mostrando mejor actividad.

Debido a que los aislados A2, A3 y A8 no presentaron halos de degradación en el medio AAT, se preparó un medio, el medio AA, que únicamente presentaba agar bacteriológico al 2 % y almidón al 0.5 % para observar si presentaban crecimiento usando el almidón como sustrato. Sin embargo, este tampoco presentó halo de degradación, pero sí el crecimiento de los microorganismos aislados. Valencia, Quevedo, Franco, Díez, Parra & Rodríguez (2011) sugieren que la falta de visualización de los halos de hidrólisis puede deberse al uso de agentes gelatinizantes como el agar bacteriológico, el cual puede actuar como inhibidor de las enzimas amilolíticas de los aislamientos, dificultando la liberación de glucosa. Además, indican que las fuentes de nitrógeno orgánico favorecen la producción de enzimas como α -amilasas. Al limitar al agar AA de estas fuentes de nitrógeno y con la utilización de un sustrato sólido, puede dar como resultado la falta de expresión enzimática para los aislados A2, A3 y A8.

Valencia et al. (2011) reportaron actividad amilolítica para aislamientos pertenecientes al género *Fusarium*, realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas, en las pruebas cualitativas se realizaron en agar almidón incubado a 30°C y se buscó medir el halo de degradación durante los primeros 2 días y a los 4 días, sin embargo, no se presentó halos de hidrólisis o de degradación, pero al realizar las pruebas cuantitativas realizadas en caldo almidón y condiciones de agitación (mejorando el contacto sustrato- enzima y mejorando la transferencia de oxígeno) se demostró la actividad amilolítica mediante la cuantificación de azúcares reductores liberados como maltosa o glucosa que surgen de la hidrólisis del enlace α -1,4-o-glucosídico causado por las α -amilasas o la acción hidrolítica de las β -amilasas o glucosidasas. Así los aislados A2, A3 y A8 pudieran presentar un mejor rendimiento de la actividad enzimática bajo otras condiciones como uso de caldo, agitación y fuentes de nitrógeno orgánico.

Da Costa et al., 2021, destacan condiciones importantes de la actividad enzimática, como una mayor actividad amilolítica en almidón de papa en comparación con el almidón de maíz y trigo; se observó que en medio YPD ante la presencia de NaCl se inhibió su crecimiento y ante una variación de temperatura la caracterización de las colonias cambió. Los aislados trabajados en este estudio se trabajaron en almidón de maíz, observando que, al cambio de condiciones y nutrientes, existía una variación de color, tamaño e incluso forma.

ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA

Se hallaron 8 aislamientos, de los cuales 4 presentaron características de bacilos Gram negativos (P14, P15, P16 y P17) y 4 levaduras Gram positivas (P19, P22, P23 y P24). A pesar de lo indicado en la literatura, ninguno de los aislados mostró halos visibles de degradación o hidrólisis ante la presencia de lugol al 25%, por lo cual únicamente se reporta el crecimiento de las colonias en dos medios de pectina con diferente composición. El primer medio APNET (descrito anteriormente) con mayores componentes y el medio AP, donde únicamente estaba compuesto por agar bacteriológico y pectina para asegurar el crecimiento del microorganismo usando como único sustrato la pectina, el cual es el polímero de interés.

Ante la presencia de un medio más completo APNET, el cual presenta más componentes, se observa la presencia de colonias a las 24 h a una temperatura de 28°C y no existen diferencias significantes

entre el crecimiento de los diferentes microorganismos; las cepas P15 (3.10 mm), P16(3.00 mm) y P17(3.00 mm) destacan mayor crecimiento ante las cepas P14 (2.70 mm), P19 (2.60 mm), P22 (2.36 mm), P23 (2.20 mm) y P24 (2.45 mm). Para el cultivo en el medio AP se mostró un menor crecimiento. Se realizó la medición de los diámetros de las colonias a los 7 días de incubación a 28°C, ya que fue el tiempo en el que observó un considerable crecimiento; sin embargo, a pesar de que la cantidad de días fue superior a la establecida en el medio AP, solo algunas cepas como la P19 (2.65 mm), P23 (2.83 mm) y P24 (2.55 mm) lograron tener valores similares mientras que las cepas restantes no lograron pasar los 2 mm de diámetro en sus colonias.

Valencia et al. (2011) evaluó las actividades enzimáticas de cepas de *Fusarium spp.*, aisladas de lesiones humanas, animales (canino y bovino) y vegetales (tomate y clavel) incubados durante 4 días a 30°C. Se realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas; ambas presentaron resultados, mostrando halos de degradación y ácido galacturónico como azúcar reductor. Se destaca de este estudio el aislado “313” identificado como *F. oxysporum* (aislado del clavel) que presenta un buen halo de hidrólisis; sin embargo, en las pruebas cuantitativas, presenta bajos rendimientos de ácido galacturónico. En otro caso como el aislado 314 identificado como *F. oxysporum* (aislado del clavel), ocurrió lo contrario, donde el halo de hidrólisis fue mínimo, pero a nivel cuantitativo fue mejor. Otro aspecto importante de mencionar son las fuentes de donde se obtuvieron los aislados. Se presentaron mejores resultados en los de origen animal, ya que todos presentaron actividad hidrolítica, seguido de los de vegetal con un 70% y los de origen humano, que presentan el 60% de los aislados con actividad hidrolítica. Otros autores como Shoily, Fatema, Dina, Biswas, Haque, Rahman & Sajib (2023) reportan actividad en la especie *Burkholderia cepacia* incubada a 37°C por 48 h, mostró capacidad pectinolítica al mostrar zonas claras mediante el ensayo con rojo congo al 0.1%, seguido de la decoloración con la solución de NaCl 1M. Como prueba cuantitativa se evaluó el extracto enzimático; se registraron altos rendimientos a temperaturas entre 30°C y 40°C, con cantidades superiores a 100 mg por litro de azúcar reductor. Destacando así que la falta de expresión de halos de degradación no indica necesariamente la falta de degradación de la pectina, se debe complementar con pruebas de medición de azúcares reductores.

Guzmán et al. (2015) encontraron *Bacillus ssp.* con actividad pectinolítica aislada de la agricultura orgánica, la cual mostró un halo de hidrólisis de 1.7 mm; la cual se incubó a 37°C por 72 horas. Mostrando una actividad hidrolítica cualitativamente mayor a los aislados obtenidos en este trabajo, pero en un mayor tiempo y temperatura. La falta de respuesta de la expresión cualitativa de la actividad pectinolítica de los aislados presentados en este trabajo (P14, P15, P16, P17, P19, P22, P23 y P24) puede deberse a la composición de los medios bajo los cuales fueron cultivados. Así se comparan los medios ocupados en este estudio y en el estudio de Guzmán et al.

1. Valencia et al. (2011), la formulación está dada por los siguientes componentes: 10 g/l de pectina cítrica, sulfato de amonio 0.5 g/l, cloruro de calcio 0.5 g/l, fosfato monobásico de potasio 0.1 g/l, fosfato dibásico de potasio 0.1 g/l y agar 15 g/l.
2. Guzmán et al. (2025), la formulación está dada por los siguientes componentes: agar pectina al 1,0% (p/v), sulfato de amonio 0.05%, cloruro de calcio 0.05%, fosfato monobásico de potasio 0.01%, fosfato dibásico de potasio 0.01% y agar 1.50%.
3. Shoily et al. (2023), la formulación está dada por los siguientes componentes: medio agar mínimo con 0.5% de pectina como única fuente de carbono. Se inoculó *Escherichia coli* no pectinolítica como control. La cepa fue incubada a 37°C durante 48 h y posteriormente se

revelaron los halos de degradación revelados con rojo congo al 0.1% (p/v) en agua, seguido de la decoloración con una solución de NaCl 1M.

4. El presente estudio se realizó bajo la siguiente formulación: 0.5 g/l de pectina, 5 g/L de triptona, 2.5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de agar.

Comparando las diferentes formulaciones entre los agares de pectina establecidos en la bibliografía consultada, se observa que hay presencia de fosfato, el cual puede ser el factor determinante para la expresión enzimática en los aislados de este estudio. Además, no se puede descartar que algunos componentes del medio pueden impedir la visualización del halo.

A nivel industrial, Shoily et al. (2023) menciona que las cepas bacterianas productoras de pectinasas son más convenientes que las pectinasas fúngicas. Las pectinasas fúngicas son ácidas y no adecuadas para su uso industrial, que requieren un pH neutro o alcalino. Además, son más convenientes las pectinasas bacterianas para la industria por la facilidad de ampliación del proceso, la mejora del proceso y la aplicación de otros enfoques modernos para aumentar el rendimiento de la producción, por ejemplo, la industria textil.

ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

Se obtuvieron 2 aislados, cocobacilos Gram negativos (T30) y levaduras elipsoidales Gram positivas (T31). Ambas presentaron actividad lipolítica a las 24 h e incubadas a 28°C. Se observó que tanto a 28°C como a 37°C hubo crecimiento; sin embargo, se decidió incubar a 28°C porque implicaba una temperatura más cercana a la temperatura ambiente y menor gasto de energía. El aislado T30 (cocos Gram negativos) presentó el mayor índice de potencia con 203.3 %, mientras que la cepa T31 (levaduras apiculadas Gram positivas) presentó un valor de 144%.

Otros autores han estudiado la actividad lipolítica, Valencia et al. (2011) realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas para la especie *Fusarium spp.*, usando como sustrato yema de huevo al 2%, en las pruebas cualitativas no se mostró halos de degradación, se adicionaron fuentes de nitrógeno orgánicas como peptona o extracto de levadura a concentraciones de 2,5 g/l con el fin de inducir a la producción de enzima; sin embargo, los resultados fueron bajos. Así dedujeron que el sustrato tal vez contiene lípidos o aminoácidos capaces de inducir la formación de lipasas en la especie *Fusarium spp.*; sin embargo, no desestiman que tanto el sustrato como el solvente empleados en la reacción enzimática pudieron, en cierta forma, inhibir la expresión de las posibles enzimas producidas por los aislamientos de *Fusarium ssp.*, debido a que se ha reportado la producción de una esterasa por *Fusarium oxysporum* y encuentran que cuando se usa como sustrato p-nitrofenil-laurato y p-nitrofenil-palmitato, la actividad de la enzima es nula. Además, señalan que para esta especie de hongo las enzimas necesitan ser inducidas por el uso de sustratos inductores como los aceites. En otro estudio realizado por Baur, Krewinkel, Kranz, von Neubeck, Wenning, Scherer & Fischer (2015), cuantifican la actividad de las esterases y lipasas de 321 aislados de leche cruda incubados a 15°C por 7 días. La actividad se determinó en los sobrenadantes después de la centrifugación; la actividad más alta se presentó por *Acinetobacter guillouiae* con $44,2 \pm 16,9$ RFU (Unidades Relativas de Fluorescencia) $s^{-1} mL^{-1}$. También presentaron actividad *Pseudomonas*, *Candida zeylanoides* y *Lactococcus raffinolactis*. A su vez, Tanasupawat, Phoottosavako & Keeratipibul (2015) reportan bacterias lácticas aisladas de carne fermentada tailandesa como *Lactobacillus pentosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus lolii*, *Leuconostoc fallax*, *Weissella*

thailandensis, *W. cibaria* y *W. paramesenteroides*; la actividad fue evaluada usando como sustrato Tween 20, Tween 40, Tween 60 o Tween 80. Los resultados se cuantificaron mediante el sobrenadante como enzima cruda; se observa que de los sustratos utilizados todos presentaron buenos resultados, pero variaban entre los aislados. *Pediococcus lolii* mostró la mayor actividad en Tween 80 ($1,090 \pm 0,033$ U/ml).

La presencia de levaduras lipolíticas se presenta con menor frecuencia que las bacterias, se realiza una comparación morfológica entre las levaduras lipolíticas obtenidas en T31 presentando una morfología de levaduras elipsoidales Gram positivas con otras levaduras registradas, para descartar o sugerir encontrar una levadura ya conocida o registrada. Dentro de las levaduras conocidas que tienen actividad lipolítica, está la *Candida Albicans*, que es considerada como un patógeno fúngico humano que genera enzimas lipolíticas extracelulares (Park, Do, & Jung, 2013). Su morfología se distingue por tener un aspecto celular redondo u ovoide, y forman pequeños grupos entre las células (INSST, 2023). De esta forma, la levadura de T31 no presentan la formación de grupos entre sus células y tienen una forma elipsoidal, a diferencia de *Candida Albicans* que sí forman grupos celulares y tienen una forma más redonda.

Otro ejemplo de levadura con actividad lipolítica importante es la *Yarrowia lipolytica*, la cual produce 8 tipos diferentes de lipasa y una de ellas (Lp) en grandes cantidades (Sandoval, Rivera, Barrera, Casas y Olguín, 2009). Una de las características de este microorganismo es su dimorfismo, presentando forma de levadura e hifas septadas (Barth & Gaillardin, 1997). Es precisamente la característica anterior lo que descarta a la *Yarrowia Lipolytica* de una similitud morfológica con las levaduras T31, ya que ésta última solo presenta forma de levadura y no hifas septadas.

Por su parte, *Candida Antarctica* es una levadura que produce dos tipos de lipasas, denominadas CALA y CALB (Martínez, Cortés, Madrigal y Gonzáles, 2019). Sus células presentan una forma de levaduras elipsoidales, con conidiogénesis polar y proliferación simpodial (Sánchez, 2007). En este caso, las levaduras de T31 coinciden con la forma elipsoidal, pero no presentan la conidiogénesis polar ni proliferación simpodial, por lo tanto, tampoco coinciden morfológicamente.

De las diferentes fuentes consultadas, no se habían registrado de manera cualitativa halos notables de degradación de microorganismos aislados de muestras vegetales; en su mayoría, se registraron de productos cárnicos y de lácteos. A su vez, se determina que el sustrato es un factor determinante para la expresión de la actividad enzimática. Cualitativamente, los aislados T30 y T31 presentaron buenos resultados, por lo cual se podrían realizar pruebas cuantitativas sobre la actividad lipasa mediante ensayo espectrofotométrico y tener una mejor comparación con otros microorganismos presentes en los diferentes estudios.

ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

Se obtuvieron 5 aislados con actividad celulolítica, de los cuales 2 presentaron características de bacilos Gram negativos (C9 y C10), 1 de levadura Gram positivo (C12), 1 cocobacilo Gram negativo (C13) y 1 cocobacilo Gram variable (C11). Todos los aislados presentaron crecimiento en medio celulosa AC y ACT; sin embargo, no presentaron halos visibles de degradación bajo la metodología empleada. Hubo un crecimiento más rápido y mayor de los microorganismos en el medio ACT, en especial para el aislado C10; para el aislado C11, la diferencia de crecimiento entre los medios no presentó diferencias notables. Valencia et, al. (2011) registraron *Fusarium spp* de origen humano,

animal (canino y bovino) y vegetal (tomate y clavel) con actividad celulolítica, la cual, se reveló de manera cualitativa mediante la formación de halos ante la presencia de rojo congo y de manera cuantitativa mediante la cuantificación de azúcares reductores; el tiempo de incubación fue de 4 días a 30°C. Se reportó que *F. oxysporum* obtenido de muestra vegetal (tomate) presentó un mayor halo de hidrólisis de 1.3 cm al segundo día, sin embargo, el aislado que obtuvo mejores resultados en Rendimiento Neto de Glucosa (RNG) lo presentó *F. verticillioides*, el valor fue medido al cuarto día, la muestra fue obtenida de la lesión de un canino. Sin embargo, los resultados en las pruebas no difieren considerablemente del origen de donde se obtuvo al aislado. Otro estudio realizado por Guzmán et al. (2015) aislaron 93 microorganismos de zonas de agricultura orgánica (AO), agricultura convencional (AQ), bosque artificial (BM), área cañera (RC) y pilas de compost (AC); 70 de estos microorganismos se reportaron como bacterias con características similares a *Bacillus spp.*, los cuales presentaron actividad hidrolítica. Se presentaron halos de degradación revelados con rojo congo; el halo de hidrólisis mayor mostrado fue de 12.33 mm incubados a una temperatura de 37°C por 72 h y condiciones de pH 7. Artha et al. (2019) reportó 20 aislados bacterianos de sedimentos de estanques de acuicultura con capacidad de producir enzimas extracelulares y bacterias proteolíticas, amilolíticas y celulolíticas, de las cuales 4 especies se destacaron por su alta capacidad de hidrólisis. Se muestran a continuación los halos de degradación de celulosa:

1. *Bacillus thuringiensis*: halo de hidrólisis para celulosa de 41 mm.
2. *Bacillus lentus*: halo de hidrólisis para celulosa de 31 mm.
3. *Corynebacterium pilosum*: halo de hidrólisis para celulosa de 44 mm.
4. *Bacillus sphaericus*: halo de hidrólisis para celulosa de 28 mm.

Comparando los medios usados en los estudios encontrados, se puede observar que existe una mayor aportación de nutrientes a los microorganismos, lo que puede sugerir un mejor crecimiento y expresión de enzimas, dando como resultado una mejor visualización de halos de degradación.

- Valencia et al. (2011) realizaron el medio bajo la siguiente formulación: 10 g/l de carboximetilcelulosa, sulfato de amonio 0,5 g/l, cloruro de calcio 0,5 g/l, fosfato monobásico de potasio 0,1 g/l, fosfato dibásico de potasio 0,1 g/l y agar 15 g/l.
- Guzmán et al. (2015): carboximetilcelulosa 1,0 %, extracto de levadura 0,25 %, peptona 0,25 %, sulfato de amonio 0,05 %, cloruro de calcio 0,05 %, fosfato monobásico de potasio 0,01 %, fosfato dibásico de potasio 0,01 % y agar 1,5 %
- Artha et al. (2019): Carboxilmetilcelulosa 1,0 %, 15 gramos de agar Bacto, 5 gramos de peptona Bacto, 1 gramo de extracto de levadura y agua de mar estéril para alcanzar un volumen de 1 l.
- En el presente estudio, la formulación más completa para el medio ACT está constituida por carboximetilcelulosa 1%, agar bacteriológico 2% y triptona 0.05% mientras que el medio AC únicamente cuenta con carboximetilcelulosa al 1% y agar bacteriológico.

Se puede determinar de esta manera que el medio empleado en este estudio presenta una mayor restricción de componentes y nutrientes, lo cual representa dificultades para el crecimiento y expresión enzimática de los aislados. Sin embargo, los microorganismos aislados, aun encontrándose en esta restricción, lograron usar como fuente de carbono la celulosa, probando de esta manera su capacidad celulolítica. A su vez, estos aislados fueron probados en otro tipo de material celulósico, mediante un medio creado a través de servilletas de papel como principal

sustrato o fuente de carbono, donde la expresión de halos de degradación fue notable y corroborando su actividad celulolítica.

Ramírez & Cocha (2003) trabajaron con cepas de actinomicetos a las cuáles se les comprobó su actividad celulolítica mediante el su crecimiento en dos medios mínimos líquidos en los que su única fuente de carbono fueron tiras de papel filtro. Las cepas se incubaron a 45°C (*Streptomyces*) y 50°C (*Thermomonospora*) durante 5 días en los medios Crawford y McCoy, y en el medio Skinner.

Tras la incubación, se determinó que, de las 158 cepas identificadas, 12 mostraron cualitativamente una **"buena actividad celulolítica"** en el medio Crawford y McCoy, mientras que 4 cepas fueron clasificadas con esta misma actividad en el medio Skinner. Las cepas obtenidas en este trabajo presentaron un buen crecimiento a partir de las 48 h, con una temperatura de incubación de solo 28°C, lo que representa condiciones más fáciles de proporcionar para su desarrollo y actividad celulolítica

La actividad celulolítica de estos microorganismos puede aprovecharse biotecnológicamente para desarrollar métodos sostenibles que mejoren la producción de nuevos bioprocesos y productos. Sutaoney, Nand Rai, Sinha, Choudhary, Gupta, Kumar Singh & Banerjee (2024) indican que los géneros más investigados para la producción de enzimas son *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* y *Aspergillus*. Los microorganismos degradadores de celulosa tienen aplicaciones biotecnológicas en:

1. La industria alimentaria para la mejora de extracción, clarificación y estabilización de zumos; mejorar la calidad y eficiencia de la producción de cerveza y del vino. Además, señalan aplicaciones en la industria agrícola para promover el desarrollo de cultivos, *Trichoderma* sp., *Chaetomium* sp., y *Geocladium* sp., promueven la mejora de la germinación de semillas, el rápido crecimiento de las plantas y los mayores rendimientos agrícolas.
2. Industria agrícola se han aplicado celulasas para mejorar la calidad del suelo. La integración de la paja se ha visto durante mucho tiempo como una táctica crucial para mejorar la calidad del suelo y reducir la dependencia de [los fertilizantes inorgánicos](#), así el uso de bacterias para la degradación de paja presenta una alternativa viable.
3. Entre otras aplicaciones de las enzimas celulasas se encuentran en la industria de la pulpa y papel durante el proceso del refinamiento en la producción papel presentando ahorro de energía y mejorando las cualidades de las hojas de papel.
4. Producción de bioetanol presentan aplicaciones, debido a que toma varios pasos el transformar los recursos lignocelulósicos en productos útiles y valiosos. Así el [pretratamiento](#) de la biomasa mediante la hidrólisis de los [azúcares simples](#) por celulasas y xilanasas son aplicados para producir biocombustible.
5. La aplicación en la industria textil se usa para dar acabado a los textiles presentando una mayor eficiencia. Además, estas enzimas celulasas son aplicadas actualmente en detergentes, debido a que son más amigables con el medio ambiente en comparación con los detergentes químicos, aunado a esto los detergentes enzimáticos actúan eficientemente sin requerir temperaturas elevadas como requieren los detergentes químicos, dando como resultado una reducción en el consumo de energía, entre otras ventajas que presentan.

Sutaoney et al. 2024, señalan que existe una necesidad de explorar más microorganismos productores de celulasas que puedan sobrevivir en condiciones duras, ya que pueden ser más económicos, ambientalmente benignos y sostenibles que los convencionales.

X. CONCLUSIONES

6. Actividad amilolítica. Conforme a los resultados obtenidos en el presente estudio, se determinaron un total de 22 cepas o aislados obtenidos de una muestra de hortaliza en descomposición (zanahoria); 7 de los aislados presentaron actividad amilolítica (A2, A3, A4, A5, A6, A7 y A8), pero únicamente 4 presentaron halos de degradación visible a 48 h (A4 - 765%; A5 - 1480%; A6 - 1620% y A7 - 1450%). Para los otros tres aislados, que presentaron únicamente crecimiento de colonia a 48 h (A2 - 2.7 mm; A3 - 2.3 mm y A8 - 2.2 mm) se podría requerir un cambio de condiciones como lo es el uso de caldos de cultivos en lugar de medios sólidos o incluso agitación para una mayor interacción sustrato enzima y mejor transferencia de oxígeno.
7. Actividad lipolítica. Se obtuvieron 2 aislados (T30 y T31) con actividad lipolítica empleando Tween-80 como sustrato, presentando valores de IP (%) de 203.3 % para T30 y 144.2% en T31 a 24 h. Comparados con otros sustratos, como Tween-20 o Tween-60, la principal diferencia es el tipo de ácido del cual se constituyen, Tween-20 presenta un ácido láurico, Tween-60 un ácido esteárico y Tween-80 un ácido oleico.
8. Actividad pectinolítica. Determinada mediante el crecimiento de los microorganismos aislados; se obtuvieron 8 cepas (P14, P15, P16, P17, P19, P22, P23 y P24) capaces de crecer usando como sustrato la pectina. Aunque no se pudo visualizar el halo de degradación, el crecimiento en el medio implica que puede degradar este sustrato, siendo los que presentaron mejor crecimiento P15 (APNET) - 3.10 mm, P16 (APNET) - 3.00 mm, P17 (APNTE) - 3.00 mm, debido a que es la única fuente de carbono. Se sugiere la realización de pruebas cuantitativas, como la medición de azúcares reductores. Los aislados encontrados presentan características morfológicas propias de bacterias y levaduras.
9. Actividad celulolítica. Se obtuvieron 5 aislados (C9, C10, C11, C12 y C13) que mostraron crecimiento (3.92 mm, 6.50 mm, 1.62 mm, 3.72mm y 3.99 mm respectivamente) en el medio con carboximetilcelulosa como única fuente de carbono, aunque no hubo halos de degradación visibles. De la misma manera, con una fuente de carbono diferente como lo fue la celulosa presente en el papel comercial de servilletas, el resultado a las pruebas de degradación fue favorable, presentando visibilidad de dichos halos de degradación.

Se destaca que en los aislados en los que no fueron visibles los halos de degradación, un cambio de los componentes en los medios o un cambio de medio sólido de cultivo a caldo de cultivo, podría favorecer la actividad enzimática.

XI. REFERENCIAS

Planteamiento del problema

1. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y Asociación Internacional de Residuos Sólidos (2024). *Perspectivas mundiales de gestión de residuos 2024: más allá de una era de residuos: convertir la basura en un recurso*. <https://wedocs.unep.org/20.500.11822/44939>
2. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2023). *5 informe de labores*. <https://www.gob.mx/sedatu/documentos/quinto-informe-de-labores-2022-2023-343849?state=published#:~:text=En%20este%20Quinto%20Informe%20de,en%20el%20olvido%20por%20d%C3%A9cadas>.
3. Consejo de Ciencia y Tecnología (2020). *Diálogos del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado del Tabasco*. Recuperado de: <https://ciateq.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1020/402/1/Residuos%20agroindustriales.pdf>
4. Fernández, A. (2005). LA GESTION INTEGRAL DE LOS RESIDUOS SÓLIDOS URBANOS EN EL DESARROLLO SOSTENIBLE LOCAL. *Revista Cubana de Química*, XVII (3), 35-39. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543687013.pdf>
5. Cámara Nacional de la Industria Editorial Mexicana. (2022). *Consumo aparente de la industria en México*. México. <http://caniem.mx/boletines/files/documents/Boletin1004.pdf>
6. Prada, R. (2012, junio). Alternativa de aprovechamiento eficiente de residuos biodegradables: el caso del almidón residual derivado de la industrialización de la papa Bogotá. *Revista EAN*. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-81602012000100012
7. Ceballos, M. (2021). ¿Qué hacer con el aceite vegetal usado? Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Recuperado de: <https://www.ciad.mx/que-hacer-con-el-aceite-vegetal-usado/>
8. Moya M & Moya J. (2018). *BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE ACEITE USADO DE COCINA POR HONGOS LIPOLÍTICOS: UN ESTUDIO IN VITRO*. Universidad Privada Norbert Wiener. Lima, Perú. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v36n2/0188-4999-rica-36-02-351.pdf>
9. Ccallo-Arela, M., Sacaca Masco, F., Callata Churac, R.A., Vigo Rivera, J.E. & Calla Calla, J. (2020). Biodegradación de polímeros de plástico por *Pseudomonas*. *Ciencia, Tecnología y Desarrollo* 6 (2): 46-59. https://revistas.upeu.edu.pe/index.php/ri_ctd/article/view/1457
10. Alania-Vilcachagua, Y. M., & Pérez-Romero, S. G. (2017). *Efecto de la temperatura en el crecimiento de dos cepas ATCC de Pseudomonas sp. expuestas a polipropileno*. Universidad Peruana Cayetano Heredia. <https://docplayer.es/94219006-Tesis-para-optar-por-eltitulo-profesional-de-licenciado-en-tecnologia-medica-especialidad-laboratorio-clinico.html>
11. PLASTICS EUROPE. Enabling a sustainable future. (2022). *Plásticos-Situación en 2022*. <https://plasticseurope.org/es/knowledge-hub/plasticos-situacion-en-2022/#:~:text=El%20informe%20C2%ABPI%3%A1sticos%20E2%80%9393%20Situaci%C3%B3n%20en,industria%20europea%20de%20los%20pl%C3%A1sticos>.
12. Ortega, M. (2022). Industria del plástico en México cierra 2022 con números positivos. *Plastics Technology México*. Recuperado de: <https://www.pt->

mexico.com/noticias/post/industria-del-plastico-en-mexico-cierra-2022-con-numeros-positivos

Justificación

13. Butron-Pinazo, S. B. (2020). CAPACIDAD DE BIODegradación DE *Pseudomonas aeruginosa* FRENTE AL POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD. *Revista De Investigaciones*, 9(3), 134 - 147. <https://doi.org/10.26788/riepg.v9i3.2027>
14. Garzón, J. M., Rodríguez-Miranda, J. P., & Hernández-Gómez, C. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Universidad y salud*, 19(2), 309-318.
15. De Lera, A. (2011). Aplicaciones enzimáticas en procesos de conservación y restauración de obras de arte. Consolidación de celulosa (Tesis doctoral). Universidad del País Vasco, España. Recuperado de: <https://addi.ehu.es/handle/10810/14292>
16. García L., Sánchez, L., Padilla, L., & Giraldo, G. (2012). DEGRADACIÓN DE CELULOSA EN DESECHOS ORGÁNICOS DOMÉSTICOS EN LOS ESTRATOS SOCIALES 1 Y 2 UTILIZANDO *ASPERGILLUS NIGER*. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente*, (11), 27-32. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231125817003>
17. González, D. (2022). ESTUDIO DE BIODegradación AERÓBICA EN MEDIO MARINO DE MEZCLAS BASADAS EN ALMIDÓN TERMOPLÁSTICO DE MAÍZ. (Proyecto de grado). Universidad de los Andes. Recuperado de: <https://repositorio.uniandes.edu.co/server/api/core/bitstreams/99504284-7635-4821-a164-0c6381da4ee4/content>

Marco Teórico

18. Joklik, D., Willett, PH., Amos, M.D. & Wilfert, M.D. (1998). *Microbiología*. (20ª ed., Vol.). Editorial Médica Panamericana.
19. SCHLEGEL, H. (1997). *Microbiología general*. Ediciones Omega.
20. Liébana, J. (2002) *MICROBIOLOGÍA ORAL* (2da ed.) McGraw Hill Interamericana.
21. Stuart, W. (2003). *Microbiología*. McGraw-Hill Interamericana
22. Gonn. (2013). *Curva de crecimiento bacteriano* [Imagen]. Wikipedia. [Consultado el: 03 de febrero de 2025]. Recuperado de: https://es.m.wikipedia.org/wiki/Archivo:Curva_de_crecimiento_svg.svg
23. Mendoza, M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 15-23. Recuperado en 02 de febrero de 2025, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000100004&lng=es&tlng=es.
24. Curia, M. V., D'alessandro, O., & Briand, L. E. (2010). La Enseñanza de Conceptos en Biotecnología a través de un Experimento Sencillo y Económico. *Formación universitaria*, 3(1), 27-30. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/formuniv/v3n1/art05.pdf>
25. Luna-Guevara, M.L. (30 de noviembre de 2016). Microbiología general. Práctica 3. Observación de microorganismos del ambiente. Manual de laboratorio de microbiología general. Facultad de Ingeniería Química. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
26. Bado, M. J. C. (2022). La importancia de realizar una correcta tinción de Gram en la identificación bacteriana. *Revista Colegio de Microbiología Química Clínica de Costa Rica*.

27. Tortura, G.J., Funke, R.B & Case C.L. (2007) *Introducción a la microbiología* (9ª ed.) Editorial Médica Panamericana.
28. Ramírez, J. & Ayala, M. (2014, 1 de diciembre). ENZIMAS: ¿QUÉ SON Y CÓMO FUNCIONAN? Revista Digital Universitaria UNAM. Recuperado de: <https://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/art91.pdf>
29. Alcántara, A. Sánchez, J. (2010, 14 de diciembre). *Utilización de hidrolasas en la preparación de fármacos e intermedios homóquiales*. ANALES. Recuperado de: https://analesranf.com/wp-content/uploads/2010/76_02/7602_02.pdf
30. Caffini, N.(2009). *Enzimas proteolíticas de vegetales superiores, Aplicaciones industriales*. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Martha-De-La-Caridad-Hernandez/publication/282290286_Enzimas_proteoliticas_de_vegetales_superiores_Aplicaciones_industriales/links/5ecad4c4299bf1c09adcd673/Enzimas-proteoliticas-de-vegetales-superiores-Aplicaciones-industriales.pdf
31. Shukla, E., Dipak, A. & Gaikwad, S. (2022). *Hydrolases: The Most Diverse Class of Enzymes*. IntechOpen. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.102350>
32. Ramos, S. (2016). *Identificación y caracterización de una esterasa proveniente del acuífero de Yucatán (tesis de maestría)*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Yucatán, México.
33. Alquicira, L. (2003). *DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE PROTEASAS FÚNGICAS EN LA HIDRÓLISIS DE PROTEINA* (Tesis de especialidad). Universidad Autónoma Metropolitana, CDMX, México.
34. Barrios, Y. (2011). Biorremediación: una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo. *Biotechnología Aplicada*, 28(2), 60-68. Recuperado de <https://elfoscientia.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Ap/2011/28/2/BA002802RV060-068.pdf>
35. Fiaco García, J. F. (2014). Evaluación de modelos de degradación de polímeros basados en la lignina. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/37111/Tesis.pdf.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
36. Flores Valdez, D.S. (2009). " *ELABORACIÓN DE MATERIALES BIODEGRADABLES BASE SACAROSA* (CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA). <https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/370/1/Daniela%20Sarahi%20Flores%20Valdez.pdf>
37. Iturbide R. (2010). ¿Qué es la biorremediación? CDMX, México: Dirección General de Divulgación de la Ciencia, UNAM. Recuperado de: https://www.dgdc.unam.mx/assets/cienciaboletto/cb_11.pdf
38. Brown, LeMay, Bursten & Murphy (2009)
39. Billmeyer, F. (2020). *CIENCIA DE LOS POLÍMEROS*. (2ª ed.).[E-book], Barcelona, España: REVERTÉ. <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=Fe0FEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=polimeros+articulos+%C2%B4pdf&ots=e3A5tVfgll&sig=P4TgTWW4CvR6E9xpcA-KKLw6Yw8#v=onepage&q&f=true>
40. Coreño-Alonso, & Méndez-Bautista, M.T. (2010). Relación estructura-propiedades de poliméricos. *Educ. quím.*, 21(4), 291-299. <https://www.scielo.org.mx/pdf/eq/v21n4/v21n4a6.pdf>

41. Meira, G. & Gugliotta, L. (2019). POLÍMEROS. INTRODUCCION A SU CARACTERIZACIÓN A LA INGENIERIA DE LA POLIMERIZACIÓN. (1ª ed.). Santa Fe, Argentina. edicionesUNL:3-
https://www.fiq.unl.edu.ar/institucional/wp-content/uploads/sites/3/2021/08/Meira-y-Gugliotta_Digital-solo-cap.-1.pdf
42. Meneses, J., Corrales, C. M., & Valencia, M. (2007). SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN POLÍMERO BIODEGRADABLE A PARTIR DEL ALMIDÓN DE YUCA. *Revista EIA*, (8),57-67. ISSN: 1794-1237. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/1492/149216950005.pdf>
43. Tupa, M. Modificación organocatalítica de almidón para la obtención sostenible de derivados de alto valor agregado. [Tesis doctoral]. Buenos Aires: Instituto de Tecnología en Polímeros y Nanotecnología, Universidad de Buenos Aires. 2019. Recuperado de: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/81107/CONICET_Digital_Nro.c9f6a8d7-e72b-43a7-8fe9-aa27a87b20c7_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
44. Hernández-Medina, M., Torruco-Uco, J. G., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Food Science and Technology*, 28, 718-726.
<https://www.scielo.br/j/cta/a/BFmq3pZQMP33pwHsyNjK9Yf/?format=pdf&lang=es>
45. TODOESQUÍMICA. (2011). Amilosa [Imagen]. [Consultado el: 03 de febrero de 2025]. Recuperado de: <https://todoesquimica.blogia.com/2011/103005-amilosa.php>
46. Valencia, M., Corrales, A.M & Meneses, J. (2007). Síntesis y características de un polímero biodegradable a partir del almidón yuca. *Revista EIA* (p.60).
https://www.researchgate.net/publication/237024766_SINTESIS_Y_CARACTERIZACION_D_E_UN_POLIMERO_BIODEGRADABLE_A_PARTIR_DEL_ALMIDON_DE_YUCA
47. Bustos, C. R. B., Morales, D., Cuellar, L., & Jaramillo, S. (2017). Hidrólisis enzimática de almidón. *Revista de Investigación*, 10(1), 129-140.
<https://revistas.uamerica.edu.co/index.php/rinv/article/view/70/65>
48. Reyna, L., Robles, R., Reyes, M., Mendoza, Y., & Romero, J. (2004). Hidrólisis enzimática del almidón. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 7(1), 40-44.
49. Casarrubias-Castillo, M. G., Méndez-Montevalvo, G., Rodríguez-Ambriz, S. L., Sánchez-Rivera, M. M., & Bello-Pérez, L. A. (2012). Diferencias estructurales y reológicas entre almidones de frutas y cereales. *Agrociencia*, 46(5), 455-466.
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952012000500003
50. Herrera Márquez, O. (2016). Estudio de formulaciones detergentes y métodos para la limpieza del almidón en la industria alimentaria utilizando micro/nanopartículas, enzimas y tensioactivos.
51. Silva Salinas, A. M. (2020). Estudio e inmovilización de las α -amilasas producidas por *Bacillus licheniformis* Ib04 (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
52. Gañán, P., Zuluaga, R., Castro, C., Restrepo-Osorio, A., Cock, J. V., Osorio, M., ... & Molina, C. (2017). Celulosa: un polímero de siempre con mucho futuro. *Revista Colombiana de Materiales*, (11), 1-4. ISSN 2256-1013
53. Benito, C. (2021). Celulosa [Imagen]. Ganially. [Consultado el: 03 de febrero de 2025]. Recuperado de: <https://view.genially.com/60741d7fae9a310d13d4591b/interactive-content-celulosa>

54. Monrroy, I.L., Zambrado, A.M. & Latorre, C.G., Rosero, D.E. (2021). Producción de etanol a partir de la conversión de residuos agrícolas. *Revista Científica "INGENIERÍA": Ingeniería, Tecnología e Investigación*. 8(4). 128-143.
55. Ovando-Chacón, S.L. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia* 21(42).113-122 Universidad Juárez Autónoma de Tabasco Villahermosa, México.
56. Souza Moreira, LR, Sciuto, DL y Ferreira Filho, EX (2016). An Overview of Cellulose-Degrading Enzymes and Their Applications in Textile Industry.. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 165-175.
57. Villalpando, J., Jaubert S., Cordova J., Ibarra, D., Amaya, L., Díaz, D., Rodriguez, J & Herrera, E. (2010). Producción de pectinasas por fermentación en estado sólido utilizando residuos agroindustriales.
58. Cabarcas, E., Guerra, A., & Henao, C. (2012). Extracción y caracterización de pectina a partir de cáscaras de plátano para desarrollar un diseño general del proceso de producción.
59. Lagar Barbosa, M. P., Escalona Fernández, M. I., & Pulgarín Guerrero, A. (2014). Análisis de la interdisciplinariedad en la ingeniería química universitaria española. <https://redc.revistas.csic.es/index.php/redc/article/view/832/1059>
60. Haile, S. y Ayele, A. (2022). Pectinasa de microorganismos y sus aplicaciones industriales. *La revista Scientific World*, 2022(1). <https://doi.org/10.1155/2022/1881305>
61. Medina R., E., López M., CA, Pérez R., NO, & Ferlan, I. (2008). Determinación de Tween-20 en AgsHB mediante un método espectrofotométrico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39 (2),11-15 *Revista de Ciencias Sociales y Humanidades* (1970). <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57939203>
62. Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1-12. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1130140614000138>
63. Zegada Franco, V. Y. (2015). Extracción de pectina de residuos de cáscara de naranja por hidrólisis ácida asistida por microondas (HMO). http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2518-44312015000100007
64. HUANA. S.F. Polisorbato 60 [Imagen]. [Consultado el: 03 de febrero de 2025]. Recuperado de: <https://es.huanachemical.com/products/polysorbate-60/>
65. HUANA. S.F. Polisorbato 80 [Imagen]. [Consultado el: 03 de febrero de 2025]. Recuperado de: <https://es.huanachemical.com/products/polysorbate-80/>
66. González-Bacerio, J., Moreno-Medina, V. R., & del Monte Martínez, A. (2010). Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 113-140.
67. Pedroza-Padilla, C.J., Romero-Tabarez.M. R & Orduz, S. (2017). Actividad lipolítica de microorganismos aislados de aguas residuales contaminadas con grasas. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(1), 36-44.
68. Zapata, D., Pujol, R., & Coda, F. (2012). Polímeros biodegradables: una alternativa de futuro a la sostenibilidad de medio ambiente. *Técnica industrial*, 297(1), 76-80. <https://www.tecnicaindustrial.es/wp-content/uploads/Numeros/82/889/a889.pdf>

69. Gómez, G., & Batista, C. (2006). OPTIMIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS PARA MICROORGANISMOS, UNA VALIOSA ESTRATEGIA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOPREPARADOS DE INTERÉS AGRÍCOLA. *Cultivos Tropicales*, 27(3), 17-24. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193215825002.pdf>
70. Romero, G. (2023). GUÍA GENERAL DE MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México. Recuperado de: <https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000840223/3/0840223.pdf>
71. Ministerio de Agricultura. (s.f.). Preservación de microorganismos por congelación (428). Recuperado de: <https://biblioteca.inia.cl/server/api/core/bitstreams/c2c15231-bc2a-40ad-b943-64bcd372e2b0/content>
72. MCD LAB. (s.f.a). Ficha Técnica, Agar Bacteriológico. Recuperado de: https://mcd.com.mx/index.php?controller=attachment&id_attachment=22759
73. Rodríguez, Z., Boucourt, R., Rodríguez, J., Albelo, N., Nuñez, O., & Herrera, F. R. (2006). Aislamiento y selección de microorganismos con capacidad de degradar el almidón. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 40(3), 349-354. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193017723014.pdf>
74. Condalow. (2020). Peptonas para bioprocesos. Recuperado de: <https://www.condalab.com/img/catalogos/Folleto Condalow APP Notes ESP.pdf>
75. Laboratorios MICROKIT. (2020). PEPTONA PANCREATICA DE CASEINA (TRIPTONA). Recuperado de: <https://www.microkit.es/fichas/PEPTONA-PANCREATICA-DE-CASEINA-TRIPTONA.pdf>
76. Innovative Cooking S.L. (2020). (CMC) CARBOXIMETIL CELULOSA Recuperado de: https://www.cocinista.es/download/bancorecursos/documentos/fichas/laguilhoat/CMC%20Carboximetil%20celulosa%20Ed3.pdf?srsId=AfmBOop8WPr3yiW_uIU5BiDaJdeMEbN0Hev84ZacheJKLnzoK0ej6Wjy
77. Ortiz, M. & Uribe, D. (2011). Nuevo método para la cuantificación de la actividad endoglucanasa basado en el complejo celulosa-rojo congo. *Orinoquia*, 15(1), 7-15. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/896/89621344002.pdf>
78. Arroyo, A. (2002). Producción de enzimas pectinasas por actinomicetos en cultivo sumergido utilizando pectina y cáscara de naranja (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Recuperado de: https://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/tesis/salud/arroyo_o_a/Arroyo_O_A.htm
79. MCD LAB. (s.f.b). Ficha Técnica, Extracto de levadura. Recuperado de: https://mcd.com.mx/index.php?controller=attachment&id_attachment=22761
80. Ceiro, W., Arévalo, J., Puertas, A., & Hidalgo, L. (2014). Efecto de concentraciones de NaCl sobre el crecimiento micelial y la esporulación de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams en medio PDA y suelo. *Revista de Protección Vegetal*, 29(2), 122-127. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522014000200007&lng=es&tlng=es
81. InsumoLab. (s.f.). Agar 6.5% de Na. Recuperado de: https://www.insumolab.cl/descargas/area_clinica/tubos/12x100/ficha_tecnica/15.pdf
82. Plou, F., Ferrer, M., Nuero, O., Calvo, M., Alcalde, M., Reyes, F & Ballesteros, A. (1998). Analysis of Tween 80 as an esterase/ lipase substrate for lipolytic activity assay.

- Biotechnology Technique 12(3), 183-186. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/226276395_Analysis_of_Tween_80_as_an_esterase_lipase_substrate_for_lipolytic_activity_assay
83. LABORATORIO BRITANIA S.A. (2023). B1446082, B1446562, B1445862, B1446281, B1446321, B1445221, B1446421, B1446362, B1445262. Recuperado de: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_64429d1270800.pdf
 84. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. (2020). CULTIVO DE BACTERIAS MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL, Río Gallegos, Argentina. Recuperado de: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/microambiental/wp-content/uploads/2020/03/TP-5-Cultivo-de-Bacterias.pdf>
 85. Reynoso, M., Magnoli, C., Barros, G. & Demo, M. (2015). Manual de Microbiología General. Recuperado de: <https://www.unirioeditora.com.ar/wp-content/uploads/2018/10/978-987-688-124-1.pdf>
 86. Junco, R. & Rodríguez, C. (Ed.). (2001). Microbiología y Parasitología Médicas. La Habana, Cuba: Editorial de Ciencias Médicas. Recuperado de: <https://cbtis54.edu.mx/wp-content/uploads/2024/04/Microbiologia-y-Parasitologia-Medicas-Llop-Valdes-Dapena-Zuazo.pdf>
 87. M&M Instrumentos Técnicos. (2023). Incubación de cultivos microbianos. Recuperado de: <https://myminstrumentostecnicos.com/incubacion-de-cultivos-microbianos/#:~:text=Los%20cultivos%20microbianos%20se%20incuban,de%20investigaci%C3%B3n%20diagn%C3%B3stico%20y%20producci%C3%B3n.>
 88. Vázquez, G. & Beltrán, R. (2004). Pruebas normalizadas para la evaluación de la biodegradabilidad de sustancias químicas. Una revisión. *Interciencia*, 29(10), 568-573. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/339/33909705.pdf>
 89. Aragón, L. (2018). PRÁCTICAS DE LABORATORIO. Universidad de Cádiz. Recuperado de: <https://rodin.uca.es/bitstream/handle/10498/20933/PR%C3%81CTICAS%20DE%20LABORATORIO.pdf>
 90. Merck KGaA. (s.f). Tween® 80. Recuperado de: [https://www.merckmillipore.com/MX/es/product/Tween-80,MDA_CHEM-822187#:~:text=Tween%C2%AE%2080%20for%20synthesis,H%E2%82%82O%2C%2020%20%C2%BOC\).](https://www.merckmillipore.com/MX/es/product/Tween-80,MDA_CHEM-822187#:~:text=Tween%C2%AE%2080%20for%20synthesis,H%E2%82%82O%2C%2020%20%C2%BOC).)
 91. Thermo Fisher Scientific Inc. (2025). Thermo Scientific Chemicals SAL de sodio rojo de metilo. Recuperado de: <https://www.fishersci.es/shop/products/methyl-red-sodium-salt-22/11438047#:~:text=El%20rojo%20de%20metilo%20es,y%20naranja%20entre%20esos%20valores.>
 92. Curvelo Gutiérrez, L., & Rojas Barreto, J. A. (2010). *Revisión preliminar de medios de cultivo empleados en estudios de microorganismos de los phylums ascomycetes, deuteromycetes y oomycetes como agentes causantes de enfermedades en plantas*. Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana
 93. Pérez Y., Díaz M., Rondón A., Fuentes L., González L., Guzmán A., (2020) Aislamiento de cepas de *Bacillus* spp. A partir del bioproducto IHPLUS con potencialidades para el desarrollo agropecuario e industrial., Pastos y forrajes, vol. 42 no 1 Cuba.
 94. Mazzucotelli, C. A., Ponce, A. G., Kotlar, C. E., & Moreira, M. D. R. (2013). Isolation and characterization of bacterial strains with a hydrolytic profile with potential use in

- bioconversion of agroindustrial by-products and waste. *Food Science and Technology*, 33, 295-303.
95. Hossain, T. J., Chowdhury, S. I., Mozumder, H. A., Chowdhury, M. N., Ali, F., Rahman, N., & Dey, S. (2020). Hydrolytic exoenzymes produced by bacteria isolated and identified from the gastrointestinal tract of Bombay duck. *Frontiers in microbiology*, 11, 2097.
 96. Sánchez Castelbianco, E. M., Heredia Martín, J. P., Buitrago Morales, S. M., & Medina Rodríguez, J. P. (2020). Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), 36-44.
 97. Pérez-Rodríguez, M., Díaz-Pérez, Y., Oliva-Llanes, N., Díaz-García, D., Gómez-Santesteban, E., San Juan-Rodríguez, A. N., León-Fernández, V., & Dopico-Ramírez, D. (2021). Evaluación de la efectividad de diferentes métodos de conservación para las cepas de *Rhizobium* sp 3 y *Lactobacillus rhamnosus* LB/103-1-5. *Icidca sobre los derivados de la caña de azúcar*, 55(1), 70-79. <https://www.revista.icidca.azcuba.cu/wp-content/uploads/2021/06/articulo-10.pdf>
 98. Garboza, F., Frontado, R., Noguera, N., Ávila, H., Ojeda, L., Ramírez, N., ... & Triana, F. (2011). Uso de medios alternativos a base de hidrolizado de caseína y extracto de *Aspergillus niger* y su efecto sobre la expresión genética de una cepa de *Escherichia coli*. *Revista de la sociedad Venezolana de microbiología*, 31(2), 138-143.
 99. Castro-Pérez, S. M., González-Marín, R., Castaño-Zapata, J., & Sanjuán, T. (2013). Evaluación de medios de cultivo para inducir esporulación de *Isaria tenuipes* Peck. *Rev Agronomía*, 21, 19-25. [http://vip.ucaldas.edu.co/agronomia/downloads/Agronomia21\(1\)_3.pdf](http://vip.ucaldas.edu.co/agronomia/downloads/Agronomia21(1)_3.pdf)

Análisis de resultado

100. Valencia-Guerrero, M. F., Quevedo-Hidalgo, B., Franco-Correa, M., Díez-Ortega, H., Parra-Giraldo, C. M., & Rodríguez-Bocanegra, M. X. (2011). Evaluación de actividades enzimáticas de *Fusarium* spp., aislados de lesiones en humanos, animales y plantas. *Universitas Scientiarum*, 16(2), 147-159.
101. Guzmán Cedeño, Á. M., Zambrano Pazmiño, D. E., Rivera Fernández, R. D., Rondón, A. J., Silva, M. L., & Pérez Quintana, M. (2015). Aislamiento y selección de bacterias autóctonas de Manabí-Ecuador con actividad celulolítica. *Cultivos Tropicales*, 36(1), 7-16.
102. Shoily, SS, Fatema, K., Dina, RB, Biswas, A., Haque, P., Rahman, MM, ... y Sajib, AA (2023). Actividad pectinolítica de *Burkholderia cepacia* y su aplicación en el biodescudado de tejidos de punto de algodón. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21 (1), 136.
103. Baur, C., Krewinkel, M., Kranz, B., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., ... & Fischer, L. (2015). Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 49, 23-29. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694615000928?casa_token=Yk6g1uruhhMAAAAA:wVYvO5rUd0x7uvXYyg-ZX_C72fGAyBZpFg0nKpnPhf4w-SwmLeTinwNJv7KUlGxb0A1ITQKfr3y
104. Tanasupawat, S., Phoottosavako, M., & Keeratipibul, S. (2015). Characterization and lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(3), 006-012.

105. Park, M., Do, E. y Jung, WH (2013). Enzimas lipolíticas implicadas en la virulencia de hongos patógenos humanos. *Mycobiology*. doi: 10.5941/MYCO.2013.41.2.67
106. Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST). (2023). Candida albicans. Gobierno de España. Recuperado de: [https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/candida-albicans#:~:text=En%20forma%20de%20levadura%20presenta,\(4\)%20\(12\).](https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/candida-albicans#:~:text=En%20forma%20de%20levadura%20presenta,(4)%20(12).)
107. Sandoval, G., Rivera, I., Barrera, K., Casas, L. y Olguín, S. (2009). XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México. Recuperado de: https://smbb.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_I/OI-09.pdf
108. Barth, G. & Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19(4), 219-237. Recuperado de: <https://academic.oup.com/femsre/article/19/4/219/476967>
109. Martínez, R., Cortés, C., Madrigal, L. y Gonzáles, J. (2019). HONGOS Y LEVADURAS: FÁBRICAS DE LIPASAS. *Interciencia*, 44(7), 378-385. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/journal/339/33960285002/html/>
110. Sánchez, S. (2007). PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS LIPASAS DE *Candida* Antártica. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. CDMX, México. Recuperado de: <https://ru.dgb.unam.mx/jspui/bitstream/20.500.14330/TES01000620653/3/0620653.pdf>
111. da Costa Júnior, J. A., da Rosa, G. M., Wastowski, A. D., Soriani, H. H., Locatelli, A. P. C., da Silva, D. W., ... & Bones, U. A. (2021). Biotechnology: identification and evaluation of the *Bacillus cereus* amylolytic activity. *Research, Society and Development*, 10(13), e437101321301-e437101321301. <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/21301/19086>
112. Kwon, YM, Choi, HS, Lim, JY, Jang, HS y Chung, D. (2020). Caracterización de la actividad amilolítica por una levadura de origen marino, *Sporidiobolus pararoseus* PH-Gra1. *Mycobiology*, 48 (3), 195–203. <https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1763100>
113. Artha, O. A., Pramono, H., & Sari, L. A. (2019). Identification of extracellular enzyme-producing bacteria (proteolytic, cellulolytic, and amylolytic) in the sediment of extensive ponds in Tanggulrejo, Gresik. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 236, No. 1, p. 012003). IOP Publishing.
114. Ramírez, P. & Cocha, J. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología*. Recuperado de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v10n1/v10n1a08.pdf>
115. Sutaoney, P., Rai, S. N., Sinha, S., Choudhary, R., Gupta, A. K., Singh, S. K., & Banerjee, P. (2024). Current perspective in research and industrial applications of microbial cellulases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 264(Part 1), 130639. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813024014429#s0055>